

단백질 가수분해 효소를 이용한 탁주박의 가수분해 및 그 분해물의 특성

김창원 · 최혁준¹ · 한복경¹ · 유승석² · 김창남³ · 김병용 · 백무열*
경희대학교 생명자원과학연구원 생명과학대학 식품공학과, ¹(주)비케이바이오 연구소
²세종대학교 호텔관광대학 외식경영학과, ³해전대학교 호텔제과제빵과

Derivatization of Rice Wine Meal Using Commercial Proteases and Characterization of Its Hydrolysates

Chang-Won Kim, Hyuk-Joon Choi¹, Bok-Kyung Han¹, Seung-Seok Yoo², Chang-Nam Kim³,
Byung-Yong Kim, and Moo-Yeol Baik*

Department of Food Science and Biotechnology, Institute of Life Science Resources, Kyung Hee University

¹Research & Development Department, BKbio

²Department of Culinary and Foodservice Management, Sejong University

³Department of Hotel Baking Technology, Hyejeon University

Abstract With the goal of transforming rice protein from an insoluble to a soluble form to increase the industrial utilization of rice wine meal (RWM), RWM was derivatized using commercial proteases and the RWM hydrolysates were characterized. Eight commercial proteases were used individually or in combination for hydrolysis of RWM. The degree of hydrolysis was assessed by determining the soluble protein in supernatant using the Lowry assay, protein in precipitates using a semimicro Kjeldahl procedure, and gravimetrically by the weight difference before and after hydrolysis. Protamex, Alcalase and Protease N proteases were most effective for hydrolysis of RWM. Although these assessment methodologies displayed some variation, they generally showed a similar pattern. When the aforementioned three proteases were simultaneously used to treat RWM, no significant difference was observed between the three assays ($p < 0.05$) indicating an absence of enzymatic synergy.

Keywords: rice wine meal, rice protein, protease, enzymatic hydrolysis

서 론

쌀 단백질은 현재 식물성 단백질의 급원으로써 가장 많이 사용되고 있는 soy protein isolates(SPI)나 whey protein과 달리 오랫동안 아시아에서 주식으로 사용된 쌀로부터 유래된 단백질로써 알레르기 작용이 거의 없고 아미노산이 풍부한 것으로 알려져 있다. 쌀의 생산량은 매년 증가하는 추세지만 서구화된 식습관에 의해 밀의 소비량이 증가하는 반면 상대적으로 쌀의 소비량이 낮아지고 이로 인해 잉여의 쌀로 쌀 가공식품을 개발하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한 가공식품의 완성 후 생성되는 쌀 부산물의 양도 쌀 가공식품의 증가와 함께 늘어나고 있다. Cho 등(1)은 쌀 부산물을 이용하여 가식성 필름을 제조하였고 Gnanasambandam 등(2)은 쌀 도정 중 부산물로 생성되는 미강으로부터 가식성 필름을 제조하였으며 Cho 등은 도정 부산물로부터 색소를 분리하거나(3) 떡 고물 및 소를 제작하였다(4). 과거에는 쌀

단백질을 미강으로부터 알칼리 추출하여 등전점 침지법으로 제조하거나(5) 쌀을 분쇄하여 효소를 사용한 다음 전분질을 제거하는(6) 것이 주요 방법이었으나 기능성과 비용적인 문제가 있어서 다른 단백질들에 비해 식품산업에 널리 이용되지 못하고 있다. 쌀 단백질의 새로운 활용방법으로서 Shih(7)는 쌀가루를 효소처리하여 전분을 제거함으로써 쌀단백질 농축물을 제조하여 pullulan과의 혼합 가식성 필름을 제조하였다.

쌀 가공산업의 부산물로 생성되는 저가의 쌀 단백질 원료로는 막걸리 제조 시 생성되는 부산물으로써 원료 쌀의 약 20%에 달하는 탁주박을 들 수 있다. 탁주박은 당, 알코올 및 효모 등을 함유하고 있지만 전분과 단백질이 주성분을 이루고 있으며 단백질의 함량은 쌀이나 밀, 보리보다 높다. 현재 탁주박의 이용분야는 탁주박의 특유한 향을 이용하여 절임 음식에 이용되기도 하지만 대부분 동물 사료로 이용되거나 폐기 처리되고 있는 실정이다. 따라서 주박의 식품소재로서의 이용을 위해 Lee와 Kim(8)은 청주박의 전분질을 이용하여 저지방 고추장을 양조하였고, Lim(9) 등은 주박으로부터 효모포자를 생산하여 효모를 재활용 하였다. 그러나 주박의 건물기준 30% 이상인 단백질 성분의 식품첨가물로서 이용에 대한 연구는 이루어지지 않는 실정이고 또한 protease의 혼합을 하여 단백질을 가수분해한 연구는 식육에 대해서만 이루어진 실정이다(10). 따라서 본 연구에서는 상업적으로 쓰이는 효소들을 단일 혹은 혼합으로 탁주박을 처리하여 불용성 쌀 단백질을 수용성 단백질로 분리하고 이렇게 얻어진 가수분해물의

*Corresponding author: Moo-Yeol Baik, Department of Food Science and Biotechnology, Institute of Life Science and Resources, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea
Tel: 82-31-201-2625
Fax: 82-31-204-8116
E-mail: mooyeol@khu.ac.kr
Received October 18, 2010; revised September 15, 2011;
accepted September 23, 2011

특성과 효소의 혼합에 의한 시너지효과를 연구하였다.

재료 및 방법

탁주박

본 실험에 사용된 탁주박은 인천탁주제조협회에서 탁주 제조 후 생성된 부산물을 수거하여 -19°C 에서 냉동 보관하면서 해동하여 사용하였다.

효소

이 실험에 사용된 효소들은 상업적으로 널리 사용되는 Protamex (Novozyme, Bagvaerd, Denmark), Neutrase(Novozyme), Flavourzyme (Novozyme), Alcalase(Novozyme), Protease M(Amano, Nagoya, Japan), Protease N(Amano), Protease A(Amano) 그리고 Protease F(Kikkoman, Chiba, Japan)와 같이 총 8가지의 효소를 구입하여 사용하였다.

시료의 수용성 성분 제거

탁주박에 존재하는 수용성 단백질을 제거하기 위해 탁주박 100 g에 증류수 400 mL를 가하여 5분간 교반을 한 뒤 이를 20분간 원심분리(3000×g)를 하여 얻어진 침전물을 dry oven에서 24시간 동안 건조하여 무게를 측정하였다. 증류수를 가하여 수세하는 횟수에 따라 각각 무게를 측정한 후 그 무게의 변화가 없을 때의 시료를 수용성 성분이 완전히 제거된 시료로 결정하여 마쇄 한 후 40 mesh의 표준체를 통과시켜 이후 실험의 시료로 사용하였다.

단일효소 처리

수용성 성분이 완전히 제거된 탁주박 5 g에 증류수(28.3 mL)를 첨가하여 15% 현탁액 형태로 제조하고, 1 N HCl 혹은 1 N NaOH 를 사용하여 기준에 알려진 효소들의 최적 pH로 조절하고, 최적 온도에서 시료의 고형분 대비 0.1%의 효소를 첨가한 후 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 현탁액을 20분간 원심분리(3000×g)를 하고 이때 얻어진 상등액과 침전물, 그리고 침전물의 건조 후 무게변화를 통하여 생성된 단백질의 양을 비교하였다(Fig. 1).

혼합효소 처리

단일효소 처리로 얻어진 결과를 토대로 가장 효과가 좋은 효소인 Protamex(Pro), Alcalase(Al) 그리고 Protease N(N)을 각각 다음과 같이 2개 또는 3개의 효소를(Pro+Al, Pro+N, Al+N, Pro+Al+N) 4가지의 방법으로 혼합하여 단일처리와 같은 방법으로 최적 pH와 최적 온도에서 4시간 동안 반응한 후 20분 동안 원심분리(3000×g)하여 상등액과 침전물을 분리, 분석하였다(Fig. 1).

단백질 분석

단백질분석은 총 3가지의 방법으로 분석되었다. 원심분리를 하여 얻어진 상등액 중의 수용성 단백질은 TP0300-1KT Kit(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 Lowry protein assay(11)를 통하여 측정하였다. 또한 침전물은 digester(MBCM12, Raypa, Spain), distiller (DNP1500, Raypa, Spain)와 titrater(Akku-drive, Hirschmann Laborgerate, Germany)를 사용하여 Semimicro-Kjeldahl (12)법으로 측정하였으며, 무게변화를 통한 불용성 단백질의 변화량을 알아보기 위해 원심분리를 하여 얻어진 침전물을 105°C 의 dry oven에서 24시간 건조한 후 처음 시료의 무게와 건조된 침전물의 무게 차이를 이용하여 단백질 변화량을 계산하고 3가지 방법의 값을 비교, 분석 하였다. 이때 각각의 분석방법에 대한 계산식은 다음과 같다.

-Lowry protein assay (mg/g)

$$\frac{P \times (28.3 + E + C)}{S}$$

P=protein contents (mg/mL)

E=amounts of enzyme (mL)

C=amounts of 1 N NaOH or HCl (mL)

S=sample weight (g)

-Semimicro-Kjeldahl (mg/g)

$$\frac{1.4 \times T}{S} \times 5.95$$

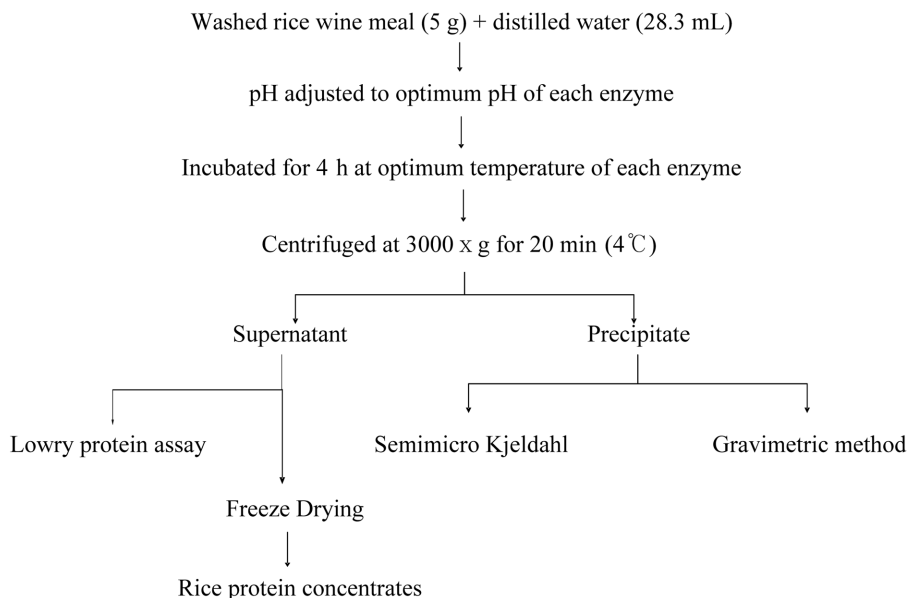


Fig. 1. Flow chart for the preparation of rice protein concentrates from rice wine meal.

S=sample weight (g)
T=amounts of spending of 0.1 N HCl (mL)

-Gravimetric method (mg/g)

$$\frac{(S \times 1000 / W)}{S}$$

S=sample weight (g)
W=weight of sample after drying (mg)

수분함량

A.O.A.C. 방법에 따라 시료 2g을 forced convection dry oven (HB-502M, Hanbaek scientific Co., Korea)을 이용하여 105°C에서 overnight한 후 무게를 측정하여 수분함량을 계산하였다.

조회분 함량

A.O.A.C. 방법에 따라 시료 1g을 electric muffle furnace(LMF 1200, Carbolite/Sheffield, England)를 사용하여 550°C에서 overnight한 후 무게를 측정하여 조회분 함량을 계산하였다.

조지방 함량

A.O.A.C. 방법에 따라 refrigerated circulator(Isotemp 1006p, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 ether 추출을 하는 Soxhelt extraction 방법으로 조지방 함량을 계산하였다.

SDS PAGE

효소처리 후의 시료는 SDS(Sodium dodesyl sulfate)를 포함하는 polyacrylamide gel을 이용한 Laemmli(1970)의 방법에 따라서 전기영동을 하였다. Separating gel은 10% acrylamide gel을 사용하였고, running gel은 H₂O 1.9 mL, 30% acrylamidemix 1.7 mL, 1.5 M Tris(pH 8.8) 1.3 mL, 10% SDS 0.05 mL, 10% ammonium persulfate 0.05 mL, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) 0.002 mL의 조성으로 제조하였으며, stacking gel은 H₂O 0.68 mL, 30% acrylamidemix 0.17 mL, 1.0 M Tris(pH 6.8) 0.13 mL, 10% SDS 0.01 mL, 10% ammonium persulfate 0.01 mL, TEMED 0.001 mL의 조성으로 제조하였다. Sample은 sample buffer[60 mM Tris-HCl buffer(pH 6.8), 14.4 mM β-mercaptoethanol, 2%(W/V) SDS, 25%(V/V) glycerol, 0.1%(w/v) bromophenol blue]와 섞어서 10분간 끓인 다음 침전물은 12,000 rpm으로 1분간 원심분리 시킨 후 gel에 loading하였다. 전기영동은 150 mA로 분리했으며, staining buffer(coomassie blue R-250 1.0 g, methanol 450 mL, H₂O 450 mL, glacial acetic acid 100 mL)와 destaining buffer(methyl alcohol 100 mL, acetic acid 100 mL, H₂O 800 mL)를 사용해서 염색과 탈색을 하였다.

아미노산 분석

시료 30 mg를 300 mL의 이차증류수에 녹인 후 10% TCA 용액을 1:1의 비율로 첨가하고 10분간 원심분리(12000×g)하여 단백질을 침전 시켰다. 지방을 제거하기 위해 hexane을 1:1의 비율로 첨가하여 지방을 녹인 후 5분간 원심분리(12000×g)를 하고 침전된 침전물을 시료로 사용하였다. 시료는 0.4 mm의 filter로 여과한 후 amino acid analyzer(Hitachi L-8900, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

통계처리

SAS V8.02(Statistical Analysis System)을 사용하여 분산 분석 및 Duncan 다범위 검증(Duncan's multiple range test)을 실시하였다(13).

결과 및 고찰

수세 횟수에 따른 무게 변화

시료의 수용성 분획을 제거하기 위해 증류수로 수세를 하였고 수용성분획의 제거는 수세 횟수에 따른 무게변화를 통해 알 수 있었다. 수세 횟수에 따른 무게 변화는 Fig. 2에 나타내었는데, 탁주박을 3회 이상을 수세하였을 때 그 무게 변화가 없는 것을 알 수 있었으며 이때의 횟수만큼 수세한 쌀 부산물을 취합하여 건조한 후 이후 실험의 시료로 사용하였다.

일반성분 분석 및 특징 평가

탁주박의 일반성분을 Table 1에 나타내었다. 탁주박은 쌀에 비해 상대적으로 높은 조단백질 함량을 나타내었는데 이는 탁주를 제조하는 과정에서 알코올 발효에 의해 쌀전분과 같은 탄수화물은 줄어드는 반면 단백질은 상대적으로 변화가 없어 결과적으로 쌀에 비해 높은 단백질 함량을 나타낸 것으로 판단된다.

단일효소 처리

Fig. 3에서 볼 수 있듯이 전체적인 패턴이 비슷한 형태를 나타내어 수용성 단백질 생성량을 비교 분석함에 있어서 Lowry protein assay, Kjeldahl protein assay 및 건조방법 등 3가지 방법 모두 수용성 단백질의 생성량을 측정하는데 적절함을 알 수 있었다. 특히 Lowry protein assay와 Kjeldahl protein assay의 값의 경우 Protamex를 처리한 시료는 88.44, 90.70 mg/g값을 나타내었고

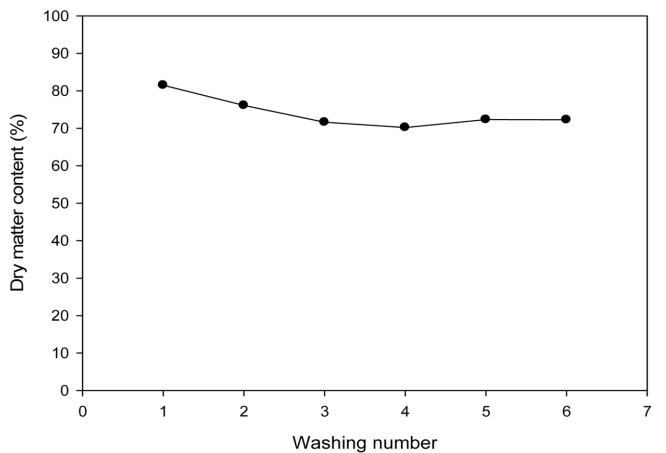


Fig. 2. Weight change of rice wine meal during washing.

Table 1. Proximity composition of rice and rice wine meal

	Rice	Rice wine meal
Crude Protein (%)	6.12-8.67	32.48
Crude Lipid (%)	0.35-0.45	4.32
Crude Ash (%)	0.59-0.63	0.39
Moisture content (%)	13.22-14.23	1.36
Carbohydrates (%)	76.6-79.12	61.45

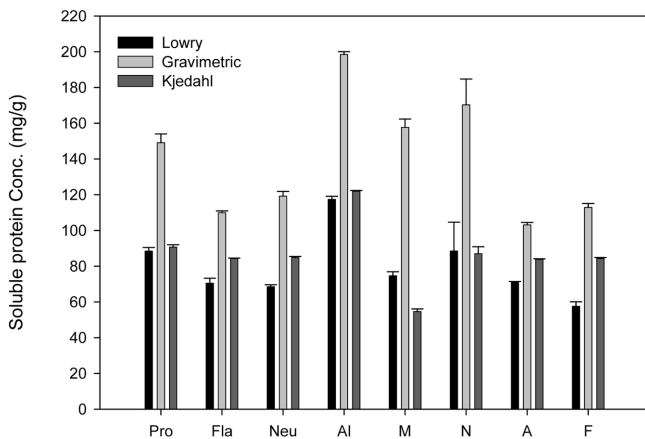


Fig. 3. Soluble protein contents of rice wine meal after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases. Pro, Protamex; Fla, Flavourzyme; Neu, Neutralse; Al, Alcalase; M, Protease M; N, Protease N; A, Protease A; F, Protease F

Alcalase의 경우는 117.41, 122.01 mg/g으로 대부분 유사한 값을 나타낸 반면 건조방법의 경우 비슷한 경향을 나타내었지만, 그 양은 다른 두 가지 방법에 비하여 훨씬 크게 나타났다. Lowry 방법의 경우 Alcalase가 가장 큰 분해 정도를 나타내었고 Protease N과 Protamex의 순으로 분해 정도가 큰 것으로 나타났다. 건조 방법의 경우 Alcalase가 가장 큰 분해 정도를 나타내었고, 그 다음 Protease N, Protease M, Protamex의 순으로 분해 정도가 나타났으며, 이 중 Protease M과 Protamex의 경우 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. Kjeldahl의 경우 Alcalase가 가장 큰 분해 정도를 나타내었고, Protamex가 두 번째로 큰 분해 정도를 나타내었으며, 나머지 다섯 개의 효소의 경우 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 세가지 방법 모두에서 유의적으로 분해 정도의 차이가 큰 Protamex, Alcalase, Protease N 등 3가지 단백질 분해 효소가 가장 효과가 좋음을 알 수 있었다. 또한 단백질 분해율을 알아보기 위해 실제 침전물을 비교해서 전체 양과의 차이를 계산한 Kjeldahl의 경우 Alcalase가 전체 단백질의 37.56%의 분해율을 나타내었다. 탁주박과 유사한 보리부산물인 맥주박을 protease처리를 한 Faulds 등(14)의 연구에서는 Alcalase를 사용했을 경우 맥주박 단백질의 26%만이 분해가 되어 식품에 상업적으로 쓰이는 Alcalase가 곡물에 있어서는 높은 분해율을 나타내지 못하는 것을 보여주었는데, 이는 곡물에 존재하는 다량의 섬유질 중 일부분이 단백질과 complex를 형성하여 효소를 사용하여 단백질을 가수분해할 경우 섬유질의 방해로 인해 가수분해가 어려운 것으로 보고되었다(15). Faulds 등(14)은 이런 단점을 보완하기 위해 맥주박에 carbohydrase와 protease를 혼합하여 처리하였지만 곡물의 경우 lignin이 효소에 의해 분해가 잘 되지 않고 잔존하는 lignin이 다당류와 세포벽에 결합되어 있는 단백질과 지속적으로 결합하여 단백질의 가수분해가 잘 되지 않는 것을 확인하였다.

혼합효소 처리

단일 효소처리를 하여 가장 높은 분해율을 나타낸 Protamex, Alcalase, Protease N 세가지 효소를 두 개씩 또는 세가지 모두를 혼합하여 탁주박의 단백질을 분해한 결과 Lowry protein assay의 경우 Alcalase와 3가지 효소를 모두 혼합한 것을 비교하였을 때 단일처리 한 것은 117.41 mg/g, 혼합의 경우 131.72 mg/g으로 나타났다. 건조방법의 경우 단일처리 198.50 mg/g, 혼합처리

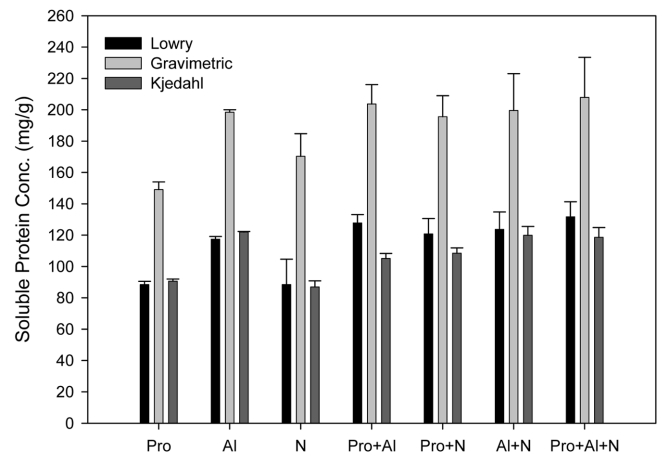


Fig. 4. Soluble protein contents of rice wine meal after enzymatic hydrolysis with mixed proteases. Pro, Protamex; Al, Alcalase; N, Protease N

207.85 mg/g으로, Kjeldahl의 경우 단일처리 122.01 mg/g, 혼합처리 118.65 mg/g으로 모든 방법에서 단일처리에 비해 유의적인 상승 효과는 없는 것으로 나타났다(Fig. 4). 가장 분해능력이 큰 Alcalase 단독으로 처리한 것에 비하여 Alcalase와 다른 두 가지 효소들을 각각 하나씩 또는 두 개 모두를 혼합하여 단백질을 분해하여도 이들간의 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 탁주박의 불용성 단백질 중 분해가 가능한 부분이 Alcalase에 의해 완전히 분해가 되어 더 이상 다른 효소들에 의해 분해가 일어나지 않는 것이기 때문으로 생각된다. 한편 Treimo 등(16)의 실험에서는 탁주박과 유사한 부산물인 맥주박에 carbohydrase를 혼합하여 처리하였는데 protease와는 다르게 단일 처리하였을 때 보다 상승효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 곡물의 탄수화물의 경우 당뿐만 아니라 cellulose, hemicellulose, lignin등이 존재하여 carbohydrase가 혼합이 될수록 각각의 부분을 분해할 수 있는 확률이 높아져서 이런 상승효과를 나타낼 수 있는 반면 protease의 경우 상업적으로 사용되는 protease 중 많은 수가 endo type의 형태이며 Alcalase와 Protamex 또한 endo type의 효소로서 lignin 등과 복합체를 형성한 단백질의 양이 많은 곡물 등에 protease를 혼합하여 처리하여도 가수분해 할 수 있는 능력이 낮아지므로 상승효과를 크게 기대 할 수 없는 것으로 생각된다. 또한 protease는 각각 가수분해 할 수 있는 고유의 특정 아미노산이 있는데 이런 아미노산이 곡물에 부족하거나 결핍되게 되면 protease의 가수분해 효과가 없는 것으로 알려져 있으며 protease의 경우 다른 효소들과는 다르게 효소자체 혹은 효소끼리의 상호작용에 의해 분해되기도 해서 상승효과가 없었던 것으로 판단 된다(17).

효소에 의해 분해된 단백질의 특성

효소를 이용하여 분리한 단백질의 특성을 확인하기 위하여 단일효소를 사용한 경우 수용성 단백질을 가장 많이 생성한 Protamex, Alcalase, Protease N과 혼합효소에서 가장 효과가 좋았던 Protamex+Alcalase+Protease N을 선택하여 SDS-PAGE를 하였다(Fig. 5). 효소처리를 한 샘플에는 어떠한 밴드도 형성이 되지 않는 것을 볼 수 있었는데 이것은 탁주박에 존재하는 단백질이 15 kDa 미만의 작은 크기의 polypeptide 혹은 amino acid의 형태로 분해가 된 것을 의미한다. Treimo 등(18)은 맥주 가공 후 생성되는 부산물인 맥주박의 경우 Alcalase와 같은 protease를 맥주박에 처리 하였을 때 분자량 10 kDa 미만의 물질들이 분리되었고, 대

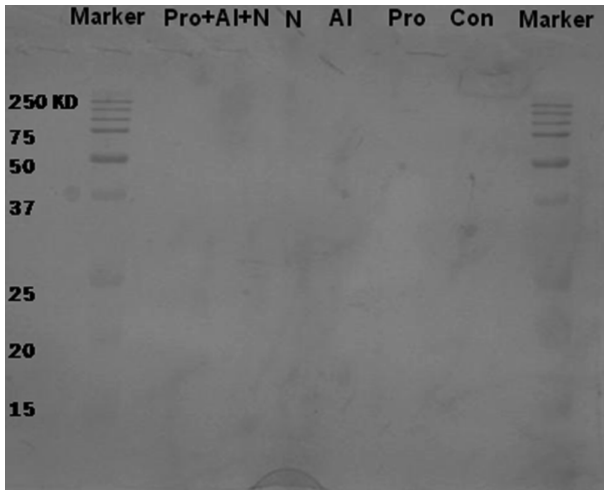


Fig. 5. SDS PAGE of protein concentrates of rice wine meal. Pro, Protamex; Al, Alcalase; N, Protease N

부분의 단백질은 1 kDa 미만의 작은 polypeptide나 amino acid의 형태로 분해가 된다고 보고하였다.

아미노산 분석

Table 2는 효소처리한 탁주박의 수용성성분에 존재하는 아미노산의 조성을 분석한 결과이다. 일반 쌀의 경우 20개의 아미노산이 모두 함유되어 있지만 아미노산 중 tryptophan과 lysine 등이 제한아미노산으로 알려져 있다. 특히 제1제한 아미노산으로 알려진 lysine의 경우 필수아미노산으로써 일반 쌀의 약 0.25%를 차지한다. 하지만 이번 시료의 경우 lysine이 약 0.08-0.11%로써 일반 쌀보다 함량이 낮은 것을 알 수 있었다(19). 일반적으로 탁주박에는 lysine이 풍부한 효모가 다량 존재하지만 이번 시료의 경우 lysine의 함량이 적은 것으로 보아 탁주박으로 부터 분리한 단백질은 대부분 쌀로부터 유래하였다고 판단된다. 또한 필수아미노산의 경우 isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine의 함량이 일반 쌀에 비해 높았으며 총 아미노산의 경우 Protamex+Alcalase, Protamex+Protease N, Alcalase+Protease N, Protamex

Table 2. Amino acids distribution of rice wine meal concentrates

(mg/L)

	Pro*+Al*	Pro*+N*	Al*+N*	Pro*+Al*+N*
Phosphoserine	1781.3	2439.0	2885.4	1891.5
Taurine	840.0	63.7	88.2	894.3
Phospho ethanol amine	820.2	0.0	833.2	797.0
Aspartic acid	1927.0	1712.7	2009.6	1826.8
Threonine	443.5	356.7	379.0	514.6
Serine	624.7	647.2	535.5	858.6
Glutamic acid	637.4	594.3	588.2	729.7
Sarcosine	1772.8	2318.6	1966.2	2758.7
Glycine	374.8	442.9	360.5	568.4
Alanine	1191.9	1131.1	871.8	1466.3
Citulline	327.7	450.1	307.3	485.0
α-Amino-n-butyric acid	769.7	645.0	739.6	896.2
Valine	539.9	308.0	435.3	361.3
Cystine	112.1	329.1	918.4	313.4
Methionine	31.7	31.5	39.4	507.5
Cystathionine	0.0	27.0	15.1	1034.0
Isoleucine	943.0	1107.7	954.9	1287.4
Leucine	1281.6	566.5	760.1	1679.7
Tyrocine	1826.2	750.9	1699.4	2487.4
Phenylalanine	2653.9	630.6	791.1	3501.7
β-Alanine	1574.8	2202.0	1446.2	292.0
β-Amino isobutyric acid	2206.6	3859.7	2501.0	4347.2
β-Amino-n-butyric acid	951.4	1368.8	1044.8	1760.7
Ethanol amine	593.8	636.0	694.9	741.2
Ammonia	268.3	383.5	344.9	313.1
Hydroxylysine	181.5	144.5	26.0	285.4
Ornithine	387.0	524.1	445.9	658.5
Lysine	338.3	273.6	364.0	280.8
1-Methylhistidine	0.0	32.5	0.0	46.0
Histidine	150.7	114.8	136.6	218.0
3-Methylhistidine	114.1	158.2	117.9	182.9
Anserine	393.4	866.8	489.6	1003.6
Carnosine	350.1	489.5	397.8	572.1
Arginine	1320.8	978.4	1262.2	1391.7
Proline	78.2	35.4	80.7	46.7

*Pro, Protamex; Al, Alcalase; N, Protease N



Fig. 6. Freeze-dried protease hydrolysates of rice wine meal. Pro+Al+N, Protamex+Alcalase+Protease N

+Alcalase+Protease N의 값이 각각 0.0278, 0.0266, 0.0265, 0.0370 g/g으로써 모든 효소를 혼합하였을 때 총 아미노산의 함량이 가장 높은 것을 알 수 있었고 두 개만을 혼합하였을 때는 거의 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

동결건조처리한 시료의 비교

Fig. 6은 탁주박을 효소처리 후 동결건조하여 상업적으로 사용할 수 있는 형태의 분말형태로 제작한 결과이다. SDS PAGE와 마찬가지로 단일과 혼합에서 수용성단백질 생성량이 많았던 Protease, Alcalase, Protease N, Protamex+Alcalase+Protease N을 처리한 시료의 상등액을 동결건조 하여 사진촬영을 하였다. 탁주박의 경우 효소처리 전 시료의 색과 비슷하게 진한 갈색의 형태로써 효소의 종류와는 관계없이 모두 시료 본래의 고유한 색을 나타내었다. 동결건조 후 시료에는 탁주박 특유의 막걸리 향은 더 이상 존재하지 않았으며, 식품에 protease를 처리하였을 때 가장 큰 문제점인 쓴맛은 미미하게 남아 있었다.

요 약

쌀부산물인 탁주박을 상업적으로 사용되는 8가지 protease를 최적화된 조건에서 단일 혹은 혼합 처리하여 수용성 단백질을 분리하였다. 이렇게 분리된 단백질을 Lowry, Kjeldahl 그리고 건조 방법 등 총 3가지 방법으로 분석을 한 결과 Protamex, Alcalase, Protease N이 가장 높은 분해율을 나타냈으며 이것을 이용하여 3가지 protease를 혼합하여 처리하였을 때 단일처리와 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 효소처리를 하여 얻어진 단백질의 사이즈를 알아보기 위해 SDS PAGE를 한 결과 어떠한 밴드도 형성이 되지 않았고 이는 단백질이 마커의 최소사이즈 15 kDa보다 작은 것을 의미한다. 즉 일단 단백질보다 사이즈가 작은 polypeptide나 amino acid로써 분해된 것을 뜻하고 실제로 섭취하였을 때는 trypsin이나 chymotrypsin의 효소적인 분해 없이도 흡수할 수 있는 식품첨가물로써 활용도가 높은 단백질로 분해 되었음을 알 수 있었다. 또한 아미노산의 경우 lysine의 함량이 적기 때문에 단백질의 유래가 탁주박에 존재하는 효소가 아닌 쌀이라는 것을 알 수 있었으며 총 아미노산의 함량은 효소 3개를 모두 혼합하였을 때 가장 높은 것을 알 수 있었다. 전체적으로 필수아미노산 8가지 중 4가지의 함량이 일반 쌀보다 높은 것을 알 수 있었는데 이것은 각 효소마다 작용하는 기질이 정해져 있고 효소의 개수가 많을수록 아미노산의 생성확률이 높아져서 총 아미노산의 함량이 효소를 모두 혼합하였을 때 가장 높아진 것으로 생각된다. 상대적으로 효소를 두 개 혹은 세 개로 혼합하였을 때 생성된 총 단백질 함량은 비슷하였지만 총 아미노산의 함량은 적었

기 때문에 두 개의 효소를 혼합한 샘플들은 효소에 의해 아미노산으로 분해되지 못한 polypeptide가 모든 효소를 혼합한 샘플에 비해 더 많이 존재 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부(농림, 식품, 수산)기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Cho SY, Park JW, Rhee C. Edible films from protein concentrates of rice wine meal. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 1097-1106 (1998)
2. Gnanasambandam R, Hettiarachchy NS, Coleman M. Mechanical and barrier properties of rice bran films. J. Food Sci. 62: 395-398 (1997)
3. Cho MK, Kim SH, Kang MY. Application of rice polishing by-products to processed rice food (I). J. East Asian Soc. Dietary Life 18: 361-367 (2008)
4. Cho MK, Kim MH, Kang MY. Application of rice polishing by-products to processed rice food (II). J. East Asian Soc. Dietary Life 18: 331-336 (2008)
5. Gnanasambandam R, Hettiarachchy NS. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: Preparation and properties. J. Food Sci. 60: 1066-1069 (1995)
6. Morita T, Kiriya S. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. J. Food Sci. 58: 1393-1396 (1993)
7. Shih FF. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. Cereal Chem. 73: 406-409 (1996)
8. Lee KS, Kim DH. Effect of sake cake on the quality of low salted gochujang. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 109-115 (1991)
9. Lim YS, Bae SM, Kim K. Production of yeast spores from rice wine cake. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 32: 184-189 (2004)
10. Kim EM, Choe IS, Hwang SG. Effects of singular manner or mixed type treatment of proteases isolated from pear, pineapple, and kiwifruit on actomyosin degradation. Korean J. Food Sci. An. 23: 193-199 (2003)
11. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
12. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 16th ed. Method 991.43. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (1995)
13. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1990)
14. Faulds CB, Robertson JA, Waldron KW. Effect of pH in the solubilization of brewer's spent grain by microbial carbohydrases and proteases. J. Agr. Food Chem. 56: 7038-7043 (2008)
15. Iiyama K, Lam TBT, Stone BA. Covalent cross-links in the cell wall. Plant Physiol. 104: 315-320 (1994)
16. Treimo J, Westereng B, Horn SJ, Forssell P, Robertson JA, Faulds CB, Waldron KW, Buchert J, Eijssink GH. Enzymatic solubilization of brewer's spent grain by combined action of carbohydrases and peptidases. J. Agr. Food Chem. 57: 3316-3324 (2009)
17. Lee GS. Enzymology. Daihak Publishing Company, Seoul, Korea. pp. 15-20 (2007)
18. Treimo J, Aspino SI, Eijssink VGH, Horn SJ. Enzymatic solubilization of proteins in brewer's spent grain. J. Agr. Food Chem. 56: 5359-5365 (2008)
19. Kim SK, Kim IW, Han YI, Park HH, Lee KH, Kim ES, Cho MH. Calorie, mineral content, and amino acid composition of Korean rice. J. Korean Soc. Food Nutr. 13: 372-376 (1984)