

반응표면분석법을 이용한 쌀귀리 단백질의 알칼리 추출 공정 최적화

- 연구노트 -

정용선 · 김정원 · 이의석 · 길나영 · 김산성 · 홍순택

충남대학교 식품공학과

Optimization of Alkali Extraction for Preparing Oat Protein Concentrates from Oat Groat by Response Surface Methodology

Yong-Seon Jeong, Jeong-Won Kim, Eui-Seok Lee, Na-Young Gil,
San-Seong Kim, and Soon-Taek Hong

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University

ABSTRACT In this study, an attempt was made to produce oat protein concentrates from defatted oat groat by alkali extraction. Independent variables formulated by D-optimal design were NaOH concentration (X1, 0.005~0.06 N) for extraction and precipitation pH (X2, pH 4.0~6.0), and the dependent variable was extraction yield (Y1, %). Experimental results were analyzed by response surface methodology to determine optimized extraction conditions. Extraction yield increased both with an increase in NaOH concentration of the extraction solution and when approaching a precipitation pH of 4.9, and NaOH concentrations were a major influencing parameter. Solubility of oat protein concentrates showed a minimum value (i.e., 0.1%) at pH 5 and increased substantially at pH values in the range of \leq pH 3 or \geq pH 7, reaching a maximum value at pH 11 (i.e., 76%). Regression equation coincided well with the results of the experiment. Optimized extraction conditions to maximize extraction yield were 0.06 N NaOH (X1) for extraction and pH 4.7 (X2) for precipitation.

Key words: oat protein concentrates, alkali extraction, optimization, nitrogen solubility index

서 론

귀리(*Avena sativa* L.)는 벼과(*Gramineae*)에 속하며 일반적으로 냉습한 지역에서 생산되는 대표적인 곡류로서(1), 주로 러시아와 미국에서 생산되고 있다. 귀리의 소비 현황을 보면 생산된 귀리의 대부분인 약 75%가 가축의 사료로 소비되고 있으며 식용 및 증자용으로는 약 22%만이 이용되고 있지만(2), 근래에는 귀리에 함유되어 있는 β -glucan의 혈중 콜레스테롤 강하, 당뇨병 예방, 변비 치료 등의 다양한 생리활성 기능이 알려지면서 건강식, 균형식으로 가치가 재인식되고 있는 작물이다(3).

귀리는 다른 곡류보다 많은 양의 단백질(13~20%)을 함유하고 있으며, 다른 곡류에서는 단백질 함량이 높으면 lysine 함량은 떨어지는 경향을 보이는 반면 귀리의 경우는 lysine 함량이 총 단백질 함량에 관계없이 일정하다. 이처럼 귀리 단백질의 아미노산 조성은 lysine 등 18개로 구성되어 필수아미노산이 균형 있게 포함되어 있기 때문에 채식을 위

주로 하는 사람들을 위한 단백질 공급원으로써 그 가치가 높다. 또한 귀리 단백질의 유화 기능성은 밀 글루텐, 대두 단백질 등과 비슷한 수준으로 우수한 것으로 알려져 있어(4) 천연 유화 소재로 이용될 여지가 충분하다. 뿐만 아니라 귀리 단백질에는 감칠맛을 발현하는 것으로 알려진 glutamic acid의 함량이 약 23%로 다른 곡류에 비해 많이 함유되어 있으며(5,6), 타 천연조미료의 원료인 버섯류, 어류 등에 비해 상대적으로 값이 저렴하기 때문에 향후 천연조미료 관련 산업의 소재로 응용될 가능성이 높다.

이처럼 귀리 단백질이 곡류 단백질 공급원 혹은 산업용 식품 소재로써 높은 가치를 지니고 있음에도 불구하고 산업적으로 귀리 단백질의 추출 기술은 아직 부족한 실정이다. 알칼리 추출법은 귀리 단백질을 추출하기 위해 사용되는 방법 중 하나로 알칼리 조건에서 단백질을 용출시킨 후 용출된 단백질을 산성 조건의 pH에서 침전시켜 분획·획득하는 방법을 말한다(7-9). 알칼리 추출법은 효소를 이용하여 세포벽에 존재하는 다당류를 분해하여 추출하는 효소처리법(10-12) 또는 다른 물리적, 화학적 방법에 비하여 추출수율이 낮지만(13) 방법이 간단하고 추출비용이 저렴하기 때문에 시간적, 비용적인 면에서 경제적인 장점을 가지고 있어 알칼리 추출법은 귀리에서 단백질을 추출하기 위한 주된 방법으로 이용되어 왔다. 그러나 추출수율 및 이의 개선에 대

Received 29 April 2014; Accepted 17 June 2014

Corresponding author: Soon-Taek Hong, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
E-mail: hongst@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6727

한 연구는 매우 제한적으로 수행된 것으로 조사되었는데, 특히 단백질 추출수율에 직접적인 영향을 미치는 추출 용액의 알칼리 농도와 침전 pH 조건은 연구자에 따라 다르게 보고되어(4,7-9,14), 이의 최적화는 귀리 단백질 이용의 극대화 측면에서 매우 중요한 문제이다.

실험계획법 중 하나인 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)은 두 개 이상이 되는 독립변수(X_1, X_2, \dots, X_n)들이 종속변수(Y_1, Y_2, \dots, Y_n)에 복합적인 작용을 하여 영향을 미치고 있을 때 종속변수(반응변수)가 이루는 반응표면에 대한 통계적인 분석법을 뜻한다(15). 이러한 반응표면분석법은 독립변수와 종속변수 간의 함수관계를 실험값으로부터 추정하여 독립변수의 변화에 따른 반응량(반응변수의 값)을 예측함과 동시에 반응량이 최소 또는 최대가 되는 최적값을 예측할 수 있는 장점이 있기 때문에 최소한의 비용과 시간으로 적합한 실험계획법을 찾기 위한 방법으로 널리 이용되어 왔다(16,17).

이에 본 연구는 귀리 단백질의 알칼리 추출 공정 시 추출에 큰 영향을 미칠 것으로 예상되는 알칼리 농도, 침전 pH를 독립변수로 설정하여 통계적 실험방법 중 하나인 반응표면 분석법을 이용해 최적 조건을 규명하고자 하였으며, 최종적으로 식품 산업에서 알칼리 추출법의 적용 여부를 평가하기 위한 기초 자료를 확보하는 데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 귀리는 쌀귀리(*Avena nuda* L.)로 품종은 '조양귀리'이며, 정읍영농귀리법인에서 2010년에 생산된 것으로 도정된 귀리를 ball mixer로 분쇄한 다음 표준체(32 mesh)를 통과시킨 후 -70°C 의 deep freezer(DF8514, Ilshin, Daejeon, Korea)에 보관하면서 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 일급 이상의 등급을 사용하였다.

단백질 추출을 위한 탈지귀리 제조

분말귀리 시료와 *n*-hexane을 1:5(w/w) 비율로 혼합한 뒤 균질기(Omni mixer macro homogenizer, Omni International, Kennesaw, GA, USA)를 이용해 setting 값 2.7에서 한 시간 동안 교반한 후 감압 여과 과정을 통해 핵산 층을 제거하였다. 핵산 층이 제거된 분말귀리와 *n*-hexane을 1:4(w/w) 비율로 재혼합한 다음 위와 같은 조건에서 교반한 후 다시 감압 여과 과정을 통해 핵산 층을 제거하고 이 과정을 총 3회 반복하였다. 탈지 과정을 진행한 분말귀리 시료는 상온에서 48시간 동안 방치하여 탈지귀리에 잔존하는 핵산을 제거하였다.

귀리 단백질 농축물 제조 공정

귀리 단백질 농축물 제조 공정은 Cluskey 등(7)의 방법을 변형하여 이용하였고, 이를 Fig. 1에 나타내었다. 즉 탈지귀

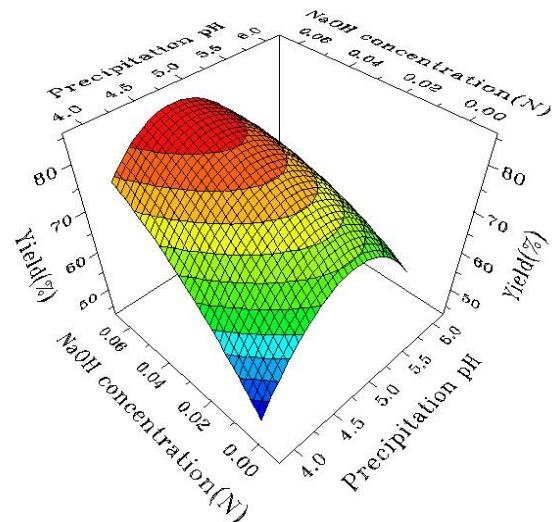


Fig. 1. Contour plot for the extraction yield of oat protein with respect to the extraction condition.

리 50 g을 Table 1의 NaOH 노르말(N) 농도를 독립변수(X_1)로 하여 1:50(w/w) 비율로 혼합한 후 균질기(Omni mixer macro homogenizer, Omni International)를 이용해 setting 값 2.7에서 1시간 동안 교반하여 단백질을 용출시켰다. 이후 혼합물을 $4,000 \times g$, 4°C 의 조건에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 수집하고 450 mesh의 표준체를 통과시키는 과정을 2회 반복하여 침전물을 완전히 제거하였다. 그리고 Table 1의 침전 pH를 독립변수(X_2)로 하여 상등액의 pH를 조절하여 단백질을 침전시킨 후 $10,000 \times g$, 4°C 의 조건에서 30분간 원심분리 하여 침전된 단백질을 회수하였다. 회수한 단백질은 5배(w/w)의 1차 증류수를 가하고 pH 7로 조절하여 -70°C 의 deep freezer(DF8514, Ilshin)에서 24시간 동안 급속 동결시키고, 동결건조기(Clean vac 8B, Biotron, Bucheon, Korea)를 이용해서 건조시켜 최종적으로

Table 1. Experimental combinations according to codes of experimental design at various extraction conditions of NaOH concentration for extraction and precipitation pH

Treatment	S (N)		Actual parameters	
	X_1	X_2	NaOH concentration (N)	Precipitation pH
1	-1	-1	0.005	4.0
2	-0.455	-1	0.02	4.0
3	0.273	-1	0.04	4.0
4	1	-1	0.06	4.0
5	-1	-0.5	0.005	4.5
6	1	-0.5	0.06	4.5
7	0.273	0	0.04	5.0
8	-1	0.5	0.005	5.5
9	1	0.5	0.06	5.5
10	-1	1	0.005	6.0
11	-0.455	1	0.02	6.0
12	0.273	1	0.04	6.0
13	1	1	0.06	6.0
14	1	1	0.06	6.0

Table 2. Proximate composition of full fat oat and defatted oat

Sample	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Crude ash (%)	Carbohydrate (%)
Full fat oat	11.55±0.37 ^a	11.25±0.03 ^b	9.66±0.06 ^a	1.39±0.04 ^b	66.14±0.48 ^b
Defatted oat	11.77±0.22 ^a	13.40±0.10 ^a	0.89±0.06 ^b	1.81±0.04 ^a	74.46±0.36 ^a

Values are mean±SD (n=3).

^{a,b}Means followed by the same letters in a column are not significantly different ($P<0.05$).

로 귀리 단백질 농축물을 획득하였다.

알칼리 추출 공정의 최적화

탈지귀리로부터 알칼리를 이용한 단백질 추출의 최적 조건을 도출하기 위하여 반응표면분석에 적합한 D-optimal design에 따라 실험을 설계하였다(Table 1). 독립변수(X_n)로는 추출 공정에 영향을 미칠 것으로 예상되는 NaOH의 노르말(N) 농도(X_1)와 침전 pH(X_2)를 설정했으며, 반응변수(Y_n)는 추출수율(Y_1)로 하였다. 추출수율은 다음 공식을 이용하여 계산하였으며 모든 실험값들은 MODDE version 5.0 software(Umetrics, Umea, Sweden)를 사용하여 분석하였다.

$$\text{추출수율(\%)} = \left[\frac{\text{추출된 단백질의 건물량(g)} \times \text{추출된 단백질의 함량}}{\text{탈지귀리의 건물량(g)} \times \text{탈지귀리의 단백질 함량}} \right] \times 100$$

질소용해지수 측정

귀리 단백질의 질소용해지수(nitrogen solubility index)는 Bera와 Mukherjee(18)의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저 알칼리 추출법으로 얻은 귀리 단백질 2.5 g을 100 g의 증류수에 용해시킨 후 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 이용하여 각각을 pH 3, 5, 7, 9, 11로 조절하였다. 이를 30°C의 shaking water bath(HB-205SW, Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 120 rpm으로 1시간 동안 교반하여 용해시킨 후 4,000×g, 4°C의 조건에서 20분간 원심분리 하여 상등액 중의 단백질 함량을 Lowry 등(19)의 방법으로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 BSA(bovine serum albumin) 시약을 0~100 µg/mL까지 희석하여 표준곡선을 작성하고, 다음 공식을 이용하여 질소용해지수를 구하였다.

$$\text{질소용해지수(\%)} = \frac{\text{흡광도(ppm)} \times \text{희석배수}}{\text{시료의 농도(ppm)} \times \text{단백질 함량}} \times 100$$

일반성분 분석

일반성분으로 수분, 조회분, 조지방 그리고 조단백질을 AOAC(20) 방법에 따라 분석하였다. 시료에 대한 수분함량은 105°C 상압 가열 건조법에 의해 분석하였으며, 조회분은 550°C에서 직접 회화법으로, 조지방은 Soxhlet 방법으로 측정하였고, 조단백질 함량은 Micro-Kjeldahl법을 이용하여 측정하였다. 탄수화물은 전체에서 수분, 조회분, 조단백질, 조지방을 뺀 값으로 나타내었다.

통계처리

모든 실험 결과들은 3회 이상 반복 측정하여 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 처리별 평균치 간의 유의성 검정은 SAS(Statistical Analysis System, version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA 분석 후 $P<0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성 검증을 하였다.

결과 및 고찰

일반성분 분석

탈지하지 않은 귀리와 탈지귀리의 일반성분을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 탈지하지 않은 귀리는 수분함량 11.55%, 조단백질 11.25%, 조지방 9.66%, 조회분 1.39%, 탄수화물 66.13%를 함유하였으며, 탈지귀리는 수분함량 11.77%, 조단백질 13.40%, 조지방 0.89%, 조회분 1.81%, 탄수화물 74.46%로 측정되었다. 따라서 탈지 공정을 통해 귀리에 함유되어 있던 조단백질의 함량은 증가하였으며 조지방은 거의 제거된 것을 확인할 수 있었다.

추출 조건에 따른 수율의 변화

각 추출 조건에 따른 추출수율을 Table 3에 나타내었다. 추출수율의 경우 알칼리 농도 0.04 N, 침전 pH 5 조건(No.

Table 3. Extraction yield in the oat protein concentrates with alkali extraction method according to the D-optimal design

No.	Extraction conditions		Variables
	NaOH concentration (N)	Precipitation pH	Yield (%)
1	0.005	4.0	46.01±0.05 ¹⁾
2	0.020	4.0	48.73±0.01 ^{k2)}
3	0.040	4.0	76.80±0.14 ^d
4	0.060	4.0	76.33±0.38 ^d
5	0.005	4.5	55.18±1.16 ^h
6	0.060	4.5	77.60±0.04 ^e
7	0.040	5.0	86.60±0.58 ^a
8	0.005	5.5	62.94±0.14 ^e
9	0.060	5.5	78.78±0.05 ^b
10	0.005	6.0	53.81±0.05 ⁱ
11	0.020	6.0	56.11±0.03 ^g
12	0.040	6.0	50.25±0.02 ^j
13	0.060	6.0	55.20±0.44 ^h
14	0.060	6.0	58.12±0.05 ^f

¹⁾Values are mean±SD (n=3).

²⁾Means followed by the same letters in a column are not significantly different ($P<0.05$).

7 실험구)에서 86.60%로 가장 높았으며, 알칼리 농도 0.005 N, 침전 pH 4 조건(No. 1 실험구)에서 46.01%로 가장 낮아 최고 수율보다 약 40.6% 수율 차이를 보였다.

각 독립변수 값의 변화에 따른 반응변수 값을 등고선 분석을 통해 Fig. 1에 나타내었다. 눈에 띄는 변화로는 전반적으로 독립변수인 알칼리 농도가 증가할수록 그리고 침전 pH 5 부근에서 수율은 증가하는 경향을 나타내었다.

가장 높은 수율을 유도한 조건(No. 7 실험구)을 기준으로 각 독립변수 값의 변화에 따른 수율의 변화를 분석한 결과, 알칼리 농도 0.005 N에서 최저 수율 65.00%, 0.06 N에서 최대 수율 84.20%로 알칼리 농도가 증가할수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 고농도의 알칼리 조건에서 단백질 수소결합의 붕괴로 인한 수소원자의 해리가 증가하게 되고 이로 인해 단백질의 표면전하량이 증가하여 용해도가 증가하였기 때문인 것으로 사료된다(21). 침전 pH에 따른 추출수율의 변화는 침전 pH 4.9에서 최대 수율 81.80%로 관찰되었으며, 이를 기준으로 하여 침전 pH 4에서 추출 수율 68.70%, 침전 pH 6에서 58.00%로 좌우로 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 귀리 단백질의 주요 구성 단백질인 globulin(38%), prolamin(14%), glutelin(14%), albumin(12%)의 등전점이 albumin을 제외하고 pH 4~6의 범위이므로(4) 용출된 단백질이 pH 4.9 부근에서 등전점 침전에 의해 높은 추출수율을 나타낸 것으로 사료되며, 이는 5°C 이하에서 pH 4.6으로 알칼리 추출물을 처리하였을 때 귀리 단백질의 최대 수율을 얻을 수 있다는 Hohner와 Hyldon(8)의 연구 결과와 유사하다. 따라서 귀리 단백질의 추출 공정 중 독립변수인 알칼리 농도와 침전 pH는 추출수율에 모두 영향을 미치는 것으로 확인되었으며, 알칼리 농도가 침전 pH에 비하여 추출수율에 보다 큰 영향을 미치는 인자로 판단되었다.

질소용해지수

알칼리 추출 공정으로 얻어진 귀리 단백질 농축물의 질소 용해지수를 pH 3~11의 범위에서 측정하였다. 일반적으로 수용액 상에서 단백질의 용해도는 단백질 분자 간의 정전기적 반발력과 소수성 결합력에 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 정전기적 반발력이 소수성 결합력보다 더 커질 때 용해도는 증가하게 되고, 단백질의 net charge가 '0'인 등전점(isoelectric point)에서 용해도는 최소값을 나타낸다(22). 귀리 단백질의 질소용해지수는 pH 3 이상에서부터 급격히 감소하기 시작하여 pH 5 부근에서 최소값을 나타내었고, pH 7 이상에서 다시 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 Ma(9)의 연구 결과와 정성적으로 일치하고 있으며 이들은 알칼리 추출법을 이용해 얻은 귀리 단백질의 등전점은 pH 5 부근이라 하였다. 따라서 본 실험의 알칼리 추출 공정 시 침전 pH 4.9 부근에서 최대 수율을 나타내는 것은 귀리 단백질의 등전점에 근접하여 용해도가 최소값을 나타내기 때문인 것으로 판단하였다. 한편 pH 7에

서 귀리 단백질 농축물의 질소용해지수는 약 12%로 측정되어 미강 단백질 농축물과 비교하였을 때 다소 낮았지만(23) 이는 Ma(9)의 연구 결과와 유사하였다.

알칼리 추출 공정의 최적화

탈지귀리로부터 귀리 단백질의 알칼리 추출 최적 조건을 도출하기 위하여 추출용매의 NaOH 농도(X_1), 침전 pH(X_2)를 독립변수(X_n)로 설정한 후 D-optimal design에 의한 반응표면분석을 실시하여 최적화된 조건을 살펴보았다. 즉 각 독립변수에 따른 반응변수(Y_n)인 추출수율(Y_1)의 변화를 회귀분석 하여 반응표면 회귀식과 유의성을 검토하였다. ANOVA 분석에서 모형의 적합도 검정을 위한 lack of fit의 P -value는 0.05 이상이어야만 모형이 적합한 것으로 판단하며, R^2 (coefficient of determination)은 1에 가까운 수치일수록 실험모델식이 실제 실험값과 가깝게 일치하는 좋은 모형임을 나타낸다(24). 추출수율에 대한 lack of fit의 P -value는 0.235로 본 실험의 수행을 위하여 가정된 모델(Table 1)은 적합한 것으로 판단되었고, 추출수율에 대한 R^2 값은 0.865로 나타났다. 회귀분석 결과, 알칼리 추출 공정 모델식의 최대 추출수율을 나타내는 최적 조건은 알칼리 농도 0.06 N, 침전 pH 4.7일 때 추출수율이 85.89%로 예측되었다. 알칼리 추출법을 이용하여 귀리 단백질을 추출한 기존의 연구들에 의하면(4,7-9,14) 알칼리 농도 0.005~0.05 N, 침전 pH 4.5~6.0의 범위로 기존의 연구마다 체감기 차이를 보였지만, 본 연구의 알칼리 추출 공정 최적화 결과 귀리 단백질 농축물 제조를 위한 최적 조건은 알칼리 농도 0.06 N, 침전 pH 4.7인 것으로 확인하였다.

요 약

알칼리 추출법을 이용하여 쌀귀리로부터 단백질을 추출하고 추출수율을 최적화하기 위한 알칼리 농도 조건 및 침전 pH 조건을 반응표면분석을 통해 검토하였다. 추출수율은 추출용매인 알칼리 농도가 증가할수록 그리고 침전 pH 4.9 부근에서 높은 경향을 보였으며, 알칼리 농도가 침전 pH에 비하여 보다 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 알칼리 추출 공정으로 얻어진 귀리 단백질 농축물의 질소용해지수는 등전점 부근인 pH 5에서 최소값을 나타내었고, pH 3 이하, pH 7 이상에서는 급격히 증가하였다. 알칼리 추출 공정의 최적화를 위한 회귀분석 결과, 알칼리 농도 0.06 N, 침전 pH 4.7에서 최대 수율 85.89%로 예측되었으며 예측모델식과 실제 측정값을 비교하였을 때 유의적인 차이가 크게 나타나지 않아 설계된 실험모델식은 적합한 것으로 나타났다. 따라서 기존의 연구들은 알칼리 추출법을 이용한 귀리 단백질 추출 시 알칼리 농도와 침전 pH가 각기 다를 수 있었지만, 본 연구를 통하여 귀리 단백질 농축물 제조를 위한 알칼리 추출 공정의 최적 조건은 알칼리 농도 0.06 N, 침전 pH 4.7인 것으로 확인되었다.

REFERENCES

1. Macrae R, Robinson R, Sadler MJ. 1993. *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. Academic Press, San Diego, CA, USA. p 3319-3322.
2. Forsberg RA, Reeves DL. 1992. Breeding oat cultivars for improved grain quality. In *Oat Science and Technology, Agronomy Monograph 33*. Marshall HG, Sorrells ME, eds. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA. p 751-775.
3. Burnette D, Lenz M, Sisson PF, Sutherland S, Weaver SH. 1992. Marketing, processing and uses of oat for food. In *Oat Science and Technology, Agronomy Monograph 33*. Marshall HG, Sorrells ME, eds. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA. p 247-263.
4. Ma CY. 1983. Chemical characterization and functionality assessment of protein concentrates from oats. *Cereal Chem* 60: 36-42.
5. Hirschke Jr HH, Potter GC, Graham Jr WR. 1968. Nutritive value of oat protein. I. Varietal differences as measured by amino acid analysis and rat growth responses. *Cereal Chem* 45: 374-378.
6. McMullen MS. 1991. Oats. In *Handbook of Cereal Science and Technology*. Marcel Dekker, New York, NY, USA. p 199-263.
7. Cluskey JE, Wu YV, Wall JS, Inglett GE. 1973. Oat protein concentrates from a wet-milling process: preparation. *Cereal Chem* 50: 475-481.
8. Hohner GA, Hyldon RG. 1977. Oat groat fractionation process. *US Patent* 4,028,468.
9. Ma CY. 1983. Preparation, composition and functional properties of oat protein isolate. *Can Inst Food Sci Technol J* 15: 201-205.
10. Guan X, Yao H. 2008. Optimization of L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chem* 106: 345-351.
11. Liu J, Guan X, Zhu D, Sun J. 2008. Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling. *LWT-Food Sci Technol* 41: 1913-1917.
12. Jodayree SC, Smith J, Tsopmo A. 2012. Use of carbohydrase to enhance protein extraction efficiency and antioxidative properties of oat bran protein hydrolysates. *Food Res Int* 46: 69-75.
13. Tang S, Hettiarachchy NS, Shellhammer TH. 2002. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: 1. Physical processing and enzyme treatment. *J Agric Food Chem* 50: 7444-7448.
14. Ma CY, Haewalkar VR, Paquet A. 1990. Physicochemical properties of alkali-treated oat globulin. *J Agric Food Chem* 38: 1707-1711.
15. Xu X, Skands ARH, Adler-Nissen J, Hoy CE. 1998. Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification: optimization of the reaction by response surface design. *Lipid/Fett* 100: 463-471.
16. Lee YS, Ha JK, Lee ES. 2008. Optimization of peel adhesion of acrylic pressure sensitive adhesive using design of experiments. *Journal of Adhesion and Interface* 9: 22-27.
17. Lee GD, Lee JE, Kwon JH. 2000. Application of response surface methodology in food industry. *Food Science and Industry* 33: 33-45.
18. Bera MB, Mukherjee RK. 1789. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J Food Sci* 54: 142-145.
19. Lowry OH, Nida J, Rosebrough A, Lewisfarr R, Ranoall J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
20. AOAC. 1990. *Official method of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 292.
21. Shen L, Wang X, Wang Z, Wu Y, Chen J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chem* 107: 929-938.
22. Kinsella JE. 1976. Functional properties of proteins in food: a survey. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 7: 219-280.
23. Lee ES, Kim KJ, Kim JH, Hong ST. 2010. A study on the development of high functional food protein ingredient from rice bran. *CNU Journal of Agricultural Science* 37: 61-68.
24. Lee MJ, Lee JH. 2007. Analysis of processing conditions on *Maesil Kochujang* production using response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 629-635.