

탄수화물공학 기법을 이용한
고부가가치 쌀전분 식품소재의 개발
(Development of value-added food materials from rice
starch by carbohydrate engineering)

맞춤형 쌀전분 식품소재의 제조 및 이를 이용한 식품의 개발
(Production and application of rice starch-based functional food
materials)

맞춤형 쌀전분 제조 효소의 개발 및 특성
(Preparation and characterization of carbohydrate-active enzymes
for development of tailor made rice starch)

난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 및 응용
(Development of resistant and slowly digestible starches and their
application)

서울대학교 산학협력단

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “탄수화물공학 기법을 이용한 고부가가치 쌀전분 식품소재의 개발” 과제(세부과제 “맞춤형 쌀전분 식품소재의 제조 및 이를 이용한 식품의 개발”, “맞춤형 쌀전분 제조 효소의 개발 및 특성”, “난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 및 응용” 에 관한 연구)의 보고서로 제출합니다.

2009년 4월 24일

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 김 용 노

세부연구책임자 : 박 관 화

세부연구책임자 : 문 태 화

보고서 요약서

과 제 명	(국문) 탄수화물공학 기법을 이용한 고부가가치 쌀전분 식품소재의 개발 (영문) Development of value-added food materials from rice starch by carbohydrate engineering				
주관연구기관	서울대학교 산학협력단	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 서울대학교 바이오시스템·소재학부		
참 여 기 업	(주) 삼립식품		(성명) 김 용 노		
총연구개발비	계	720,000 천원	총 연 구 기 간	2006. 04. 25 ~ 2009. 04. 24 (3년)	
(720,000 천원)	정부출연 연구개발비	360,000 천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	38
	기업부담금	360,000 천원		내부인원	13
	연구기관부담금			외부인원	25
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>1. 맞춤형 쌀전분 식품소재의 제조 및 이를 이용한 식품의 개발 ① 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 제조 및 특성 규명 ② 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 이용 가공제품의 품질 평가법 정립 ③ 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 이용 떡 제품의 가공적성, 특성 및 저장 중 품질평가 ④ 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 이용 면제품의 가공적성 및 제품 특성</p> <p>2. 맞춤형 쌀전분 제조 효소의 개발 및 특성 ① 전분효소의 생산 ② 전분효소의 작용 메카니즘 ③ 맞춤형 전분효소의 작용 개선 및 효소의 산업적 대량 생산</p> <p>3. 난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 및 응용 ① 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 제조 및 특성 ② 난소화성 및 지소화성 쌀전분의 구조 및 물성분석 ③ 맞춤형 쌀떡의 가공 적성 연구 및 개발</p> <p>○ 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4-α-glucanotransferase를 이용하여 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 소재의 제조방법을 탐색, 최적화 하고, 그 구조 및 물성을 조사하였다. 또한 제조한 다양한 소재를 떡과 면 제조에 첨가하여, 저장중 품질과 조직감이 향상된 떡과, 냉해동 과정 후에도 조직감과 품질이 유지되는 면을 제조하여, 본 연구에서 제조된 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 소재의 응용 가능성을 확인하였다. • 기계적인 텍스처 측정 방법과 관능검사를 이용하여, 유통기한내 조직감 향상 및 냉동안정성이 향상된 제품의 제조조건을 확인하였다. • 미생물로부터 다양한 탄수화물 효소를 클로닝하고 이의 특성을 밝혀 쌀전분 등 전분의 구조변형에 이용 하였다. 효소 수식 전분의 평균분자량 변화, 가지결합분포 변화 등 구조적 특징을 정밀하고 분석하고 그와 연관된 물성학적 특징을 밝혔다. • Amylosucrase를 이용한 효소적 방법 및 citric acid를 이용한 화학적 방법을 통하여 난소화성 및 지소화성 전분의 제조 방법을 탐색 및 최적화하고, 그 구조 및 물성을 조사하였다. 또한, 이를 떡에 적용하여 가공적성을 조사하고 난소화성분이 가공 이후에도 존재함을 확인하여, 본 연구에서 개발된 맞춤형 전분의 응용가능성을 확립하였다. <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> • 효소를 이용한 기능성 소재를 제조하고 특성을 연구한 결과, 식품의 보습제 또는 냉동방지제로의 사용 가능성이 확인되어, 식품의 냉동변성방지제와 관련한 특허를 출원하였고, 산업화 방법을 모색중임. • 냉해동 과정 후에도 조직감과 품질이 유지되는 냉동면 제조는 상품화 가능성이 높으며 기술이전 가능성을 협의중임. • 쌀전분 등으로부터 다양한 특성의 전분 소재를 생산하기 위한 탄수화물 효소를 확보하고 그 특성에 맞게 이용하고자 하며, 효소 수식 전분의 구조적 변화를 이해하여, 탄수화물 효소를 활용하여 쌀전분 등 으로부터 식품산업에서 요구되는 물성학적 및 생리학적 특성을 지닌 다양한 종류의 변형 전분을 생산하고자 함. • 생물공학기법을 이용한 지소화성, 난소화성 쌀전분 제조기술의 특허 출원으로 국제적 기술 선점 • 가열에 안정한 난소화성 쌀전분 제조기술은 산업화 가능 • 생리기능적 맞춤형 떡 제조기술은 현장보급이 가능하여 상품화 가능 					

요 약 문

I. 제 목

탄수화물공학 기법을 이용한 고부가가치 쌀전분 식품 소재의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 감자, 옥수수, 쌀, 밀 등에 풍부히 들어있는 전분은 특히 한국인에게 가장 중요한 식량 자원이며, 자원의 풍부함과 그 물리적 특성으로 인해 식품, 제약, 제지, 화공 등 다양한 산업분야에서 증점제, 젤화제, 안정제, 흡습제 등으로 널리 사용되고 있다. 그러나 천연 전분의 물리화학적 특성은 다양한 산업적 요구에 비해 제한적이기 때문에, 이를 극복하기 위하여 산업체에서는 주로 물리적, 화학적인 방법으로 전분의 구조를 변형하여 이용하고 있다.

○ 물리적, 화학적으로 전분의 구조를 수식하는 방법은 식품용으로 이용하기에는 많은 제한점들이 있어 일부만이 이용되고 있는 실정이며, 화학적 수식은 전분의 구조를 근본적으로 바꿀 수 없기 때문에 맞춤형 전분을 제조하기에는 부적합하다.

○ 최근 들어 효소를 이용하여 전분을 수식하는 연구가 진행되고 있으나, 희박한 전분 용액을 제조하여 조사한 것으로, 식품에 응용하여 실용화 하기에는 아직 이른 단계이다.

○ 식이섬유로 분류되는 난소화성 전분은 장내 미생물의 활성화, 부티르산 등 단쇄 지방산 생성으로 대장 pH의 저하, 면역 기능 강화, 대장암 예방, 분변량의 증대, 혈당 증가의 억제 등과 같은 생체 조절 기능을 수행하는 것을 알려져 있다.

○ 지소화성 전분은 천천히 포도당을 방출하므로 식사 후 급속한 혈당 상승의 방지가 요구되는 당뇨병자식 및 오랫동안 에너지를 필요로 하는 운동 선수식 등 맞춤형 기능식에 활용될 수 있는 고부가가치 신소재로, 이에 관한 연구는 시작 단계이다.

○ 가장 일반적인 화학적 방법으로 제조한 변형 전분은 우수한 소재 특성으로 말미암아 사용량이 증가하고 있는 추세이나, 상당 부분을 수입에 의존하고 있다. 화학적 변형은 다양한 변수로 인해 반응 조절이 어려울 뿐만 아니라, 이때 생성되는 유기 화합물 잔류, 폐기물 재처리 등도 환경적인 문제점으로 제기되고 있다.

○ 그러므로 본 연구과제의 목적은 탄수화물 효소로 쌀 전분의 구조를 수식하여 맞춤형 쌀 전분 및 기능성 식품 소재를 제조하고 이를 이용하여 제품을 개발하는 것을 최종 목적으로 하며, 구체적으로 1) 탄수화물 효소를 이용한 맞춤형 쌀 전분 및 기능성 식품 소재의 제조 및 특성 규명, 2) 맞춤형 쌀 전분 및 기능성 식품 소재 제조용 효소의 개발, 3) 탄수화물 효소를 이

용한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 개발 및 특성 분석, 4) 맞춤형 전분 기법을 이용한 쌀 가공 제품의 개발을 세부 목적으로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

○ 제 1세부과제는 맞춤형 쌀전분 식품 소재의 제조 및 이를 이용한 식품 개발의 목표를 달성하기 위하여, 1차년도에는 맞춤형 쌀가루, 쌀전분, 쌀 분지 아밀로펙틴 클러스터의 제조 조건을 확립하고 특성을 규명하였으며, 맞춤형 식품소재 이용 가공 제품의 품질 평가법을 정립하였다. 2차년도에는 제조한 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 소재를 이용하여 백설기, 증편, 가래떡의 최적 제조조건을 연구하였으며, 이들의 물리화학적 특성을 규명하였다. 3차년도에는 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 소재를 이용한 냉동면의 최적 제조 조건을 조사하였으며 이들 물리화학적 특성을 규명하였다.

○ 제 2세부과제는 맞춤형 쌀전분 제조 효소의 개발 및 특성 조사의 목표를 달성하기 위하여, 1차년도에는 신규 α -GTase의 생산 및 맞춤형 쌀전분 제조 특성에 관한 연구와 CDase의 생산 및 쌀분지 올리고당 제조 특성에 관하여 연구하였다. 2차년도에는 전분 효소의 action pattern을 규명하였으며 이에 따른 맞춤형 전분 구조를 규명하고 이용하고자 하였다. 3차년도에는 쌀 전분 분지 올리고당을 제조하고 맞춤형 전분을 위한 효소 작용 메커니즘을 확립하였다.

○ 제 3세부과제는 탄수화물 효소를 이용하여 난소화성/지소화성 쌀전분을 제조하고 이를 응용할 수 있게 하기 위하여 1차년도에는 효소적, 화학적 방법에 의한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분 제조의 최적 조건을 확립하였고, 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 특성을 비교 분석하였다. 2차년도에는 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 물리화학적, 구조적 및 물성적 특성 분석을 통한 기능성 식품소재로서의 활용성을 평가하였고, 3차년도에는 이들 소재를 첨가한 맞춤형 떡을 제조하고 특성을 조사하여 기존의 쌀떡과 특성을 비교 평가하였다.

IV. 연구개발결과

○ 4- α -glucanotransferase를 이용하여 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 소재의 제조방법을 탐색, 최적화 하고, 그 구조 및 물성을 조사하였다. 또한 제조한 다양한 소재를 떡과 면 제조에 첨가하여, 저장중 품질과 조직감이 향상된 떡과, 냉해동 과정 후에도 조직감과 품질이 유지되는 면을 제조하여, 본 연구에서 제조된 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 소재의 응용가능성을 확인하였다.

○ 기계적인 텍스처 측정 방법과 관능검사를 이용하여, 유통기한내 조직감 향상 및 냉동안정성이 향상된 제품의 제조조건을 확인하였다.

○ 쌀전분 수식에 이용할 수 있는 여러 종류의 탄수화물 효소를 확보하고 쌀전분 등 전분에 대한 효소 특성을 밝혔다. α GTase, branching enzyme 및 BSMA 등을 이용하여 전분에 대한 반응 특성을 규명하고 수식된 전분의 구조적 변화를 연구하여, 변형 전분의 평균분자량 및 가지결합분포의 변화를 밝혔다. 전분 수식 효소 대량 생산 및 산업화를 위한 발현시스템 개발에 일부 성공하였으며 현재 보완연구를 진행 중이다.

○ Amylosucrase를 이용한 효소적 방법 및 citric acid를 이용한 화학적 방법을 통하여 난소화성 및 지소화성 전분의 제조 방법을 탐색 및 최적화하고, 그 구조 및 물성을 조사하였다. 또한, 이를 떡에 적용하여 가공적성을 조사하고 난소화성분이 가공 이후에도 존재함을 확인하여, 본 연구에서 개발된 맞춤형 전분의 응용가능성을 확립하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 효소를 이용하여 맞춤형 쌀전분과 쌀가루 소재를 제조하고, 이들의 특성을 조사한 결과, 식품의 보습제 또는 냉동방지제로 사용가능이 확인되어, 식품의 냉동변성방지제와 관련한 특허를 출원하였고, 산업화 방법을 모색중이다.

○ 효소를 이용하여 제조한 쌀전분과 쌀가루 소재를 첨가하여, 조직감 향상 및 냉동안정성이 향상된 제품을 제조하였으므로, 이를 상업화 할 수 있는 방법을 모색해보고자 한다.

○ 쌀전분 등으로부터 다양한 특성의 전분 소재를 생산하기 위한 탄수화물 효소를 확보하고 그 특성에 맞게 이용 가능할 것으로 사료 된다. 또한 효소적으로 변형된 전분의 구조적 특성을 정확하게 분석함으로써 물리화학적 특성과의 연관성을 이해하고 효소수식을 통하여 전분으로부터 원하는 특성을 이끌어 낼 수 있을 것으로 기대한다.

○ 생물공학기법을 이용한 지소화성, 난소화성 쌀전분 제조기술의 특허 출원으로 국제적 기술을 선점하였다. 가열에 안정한 난소화성 쌀전분 제조기술은 산업화가 가능하리라 생각되며, 생리기능적 맞춤형 떡 제조기술은 현장보급이 가능하여 이 또한 상품화가 가능하리라 생각된다.

SUMMARY

(영문요약문)

In this study, to develop value-added food materials from rice starch and flour by carbohydrate engineering, first, enzymatically-modified starch and flour depending on treatment conditions (substrate concentrations, enzyme concentrations, treatment time) were prepared. A thermostable 4- α -glucanotransferase (4 α GTase) was used to modify the physical and structural properties of starch. The physicochemical properties of the modified rice starch and flour were investigated. As enzyme treatment time increased, the weight average molecular weight of rice starch and flour decreased to around 2.28×10^4 and the obtained moisture sorption isotherm revealed that the equilibrium moisture contents of 4 α GTase-treated rice starches and flours were higher than that of control especially at higher water activity values ($A_w > 0.8$). The amount of unfrozen water in rice starch and flour measured using differential scanning calorimetry increased when starch and flour were modified with 4 α GTase. This result indicated that the 4 α GTase-treated starches and flours can be used in the food industry as cryoprotectants. In an attempt to produce high-quality rice cake with prolonged shelf life, rice cake was prepared by two different methods. The first method was to mix enzymes with other ingredients when rice cakes were produced. The second method was to substitute rice flour with the enzymatically-modified rice flours. From this study, results demonstrated that the treatment of rice starch and flour with amylolytic enzymes like TA α GTase, TS α GTase, and BSMA could be successfully applied to the production of Korean traditional rice cakes, Packsulki and Jeungpyun. Treatment of those enzymes resulted in the considerable retardation of starch retrogradation, maintaining desirable textural characteristics of rice cakes. Noodle was also prepared with 5% and 10% addition of enzymatically-modified rice flour, and an increase of the noodle weight gain after cooking resulted. During freeze-thaw cycles, the noodle containing modified rice flour exhibited higher values of hardness, cohesiveness, and chewiness than those of control. The result of this study implied that the modified rice flour could be an effective substituent for improving quality of starchy foods after repeated freeze-thaw cycling. The results of this research could contribute to food industry in several aspects including an increase in diversity of enzyme selection for food production, a unique modification of food texture somewhat specific to enzyme selected, and an expansion of enzyme application to other starchy food production.

Various kinds of carbohydrate-active enzymes from microorganisms were cloned, expressed, and purified. Properties of carbohydrate enzymes were analyzed for the purpose of starch modification. Structure of enzymatically modified starch was analyzed for understanding mechanism of the carbohydrate enzymes. The enzymes modified the structure of rice starch such as average molecular mass and side chain distribution. Relationship between structure and physicochemical properties of rice starch was investigated and could be applied for producing modified starch with desired properties using carbohydrate enzymes.

Starch can be classified into three major fractions, resistant starch (RS), slowly digestible starch (SDS) and rapidly digestible starch (RDS), in nutritional aspects. In this study, enzymatic and chemical means were employed to increase the RS and SDS fractions of rice starch. Amylosucrase (AS; E.C.2.4.1.4) from *Neisseria polysaccharea* was applied to waxy and normal rice starches. The AS-treated waxy rice starch showed increased SDS fraction (~25%) compared to control. The molecular weights of starches increased and the proportion of long side chains (>DP 20) also increased. The AS-treated starches demonstrated a B-type X-ray diffractogram and showed higher relative crystallinities than those of non-treated starches. The moduli for the gel of AS-treated starches were much larger than those of raw starches indicating increased gel strengths of AS-treated starches. The AS treatment conditions were optimized using response surface methodology. The optimum conditions established, which had the highest SDS and RS fractions, were the treatment with 18700 units of AS per 0.45 gram starch for 13 hours 40 minutes. The AS-treated starch produced under optimum conditions was applied to a rice cake (*Baeksulki*). Rice flour was partially substituted with AS-treated rice starches at levels of 20, 30 and 40% to prepare rice cakes. The enthalpy values of endothermic peaks of AS-treated rice cakes were lower than that of rice cake without AS-treated starch implying the delays in retrogradation. Citric acid was used to produce resistant starch. The optimum condition established for resistant citrate starch was the treatment with 0.4 g citric acid per gram starch for 6 hours at 150°C. FT-IR spectra showed C=O bending stretching of citrate starches, indicating the formation of cross-linking by esterification. Morphological characteristics depicted the destruction of granule structure in citrate starches, and loss of birefringence. The resistant citrate starch showed a loss of crystallinity, shortening in side chains, and a decrease in molecular weight. The citrate starch produced under optimum conditions was applied to a rice cake (*Baeksulki*). Rice flour was partially substituted by citrate waxy rice starch at levels of 10, 20, 30, and 40% to prepare rice cakes. The RS of rice cakes was kept relatively

stable during cooking. The textural properties of rice cakes changed with storage time. The hardness and chewiness showed steep decreases with the increase in CS content. The degree of starch retrogradation determined by DSC suggested that the *Baeksulki* substituted with CS had a significantly lower retrogradation rate than the *Baeksulki* without CS ($p < 0.05$). The result suggested that the use of CS could effectively inhibit the retrogradation of starch in rice cakes.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1 Outline of Research Development	21
Section 1 Necessity of Research Development	21
1. Technical Aspects	21
2. Economical and Industrial Importance	22
Section 2 Purpose and Scope of Research	22
1. Purpose of Research	22
2. Propose and Scope of Yearly Research Development	22
Chapter 2 Current Status of Technical Development	26
Chapter 3 Contents and Results of Research Development	28
Section 1 Research Contents	28
Section 2 Research Results of Detailed Projects	29
1. The First Project	29
A. Introduction	29
B. Methods and Results of Yearly Research	29
(1) The First Year	29
(A) Materials and Methods	29
① Preparation of modified starch gels using TA α GTase	29
② Structure analysis of 4 α GTase-treated starch gels by HPLC	29
③ Texture analysis of 4 α GTase-treated starches	30
④ Measurement of moisture sorption isotherm	30
⑤ Establishment of quality evaluation method for rice cakes	30
(B) Research Results	30
① Texture properties of 4 α GTase-treated starch gels by TPA	30
② Molecular weight distribution of 4 α GTase-treated starch gels	33
③ Optimization of production of modified rice starches	33
④ Moisture sorption properties of modified rice starches	37
⑤ Solubility properties of 4 α GTase-treated starches	38
⑥ Establishment of quality evaluation method for rice cakes	38
(C) Discussion and Conclusion of Research Performance	40

(2) The Second Year	40
(A) Materials and Methods	40
① Preparation of Packsulki	40
② Preparation of Jeungpyun	40
③ Isolation of rice flour from rice cakes	40
④ Preparation of 4 α GTase-treated rice flour	43
⑤ Structure analysis of 4 α GTase-treated rice flour by HPLC	43
⑥ Preparation of rice cakes using 4 α GTase-treated rice flour	43
⑦ Measurement of moisture sorption isotherm	44
⑧ Pasting properties of rice flour by RVA (Rapid Visco-Analyzer)	44
⑨ Crystalline analysis of rice cakes by X-ray diffraction	44
⑩ Measurement of amylose content	44
⑪ Structure analysis of separated starch from rice cakes by HPAEC	44
⑫ Molecular weight distribution analysis by SEC-MALLS-RI	45
⑬ Retrogradation analysis by DSC (differential scanning calorimetry)	45
⑭ Texture analysis of rice cakes	45
(B) Research Results	45
① Properties of rice cakes preparing 4 α GTase-treated rice flour	45
② Properties of BSMA-treated rice cakes	53
③ Preparation of isomaltooligosaccharides (IMO)-added rice cakes	55
④ Preparation of rice cakes using 4 α GTase-treated rice flour	59
(C) Discussion and Conclusion of Research Performance	66
(D) Sensory analysis of rice cakes adding 4 α GTase-treated rice flour	67
① Materials and Methods	67
② Research Results	70
③ Summery and Conclusion	73
(3) The Third Year	74
(A) Materials and Methods	74
① Preparation of 4 α GTase-treated rice flour	74
② Molecular weight distribution analysis of 4 α GTase-treated rice flour by HPLC	74
③ Ice crystal of melting enthalpy	74

④ Preparation of noodle adding 4 α GTase-treated rice flour	74
⑤ Cooking characteristics of noodle adding 4 α GTase-treated rice flour	75
⑥ Texture properties of noodle adding 4 α GTase-treated rice flour after freeze-thawing cycle	75
(B) Research Results	76
① Molecular weight distribution analysis	76
② Ice crystal of melting enthalpy	76
③ Cooking characteristics of noodle	78
④ Freeze-thaw properties of noodle	78
2. The Second Project	81
A. Methods and Results of Yearly Research	81
(1) The First Year	81
① Cloning and expression of new α -GTase	81
② Purification of new α -GTase	82
③ Characterization of new α -GTase	82
㉞ Temperature profile	82
㉟ Substrate specificity of PfaGT	83
㊱ Enzymatic properties of new α -GTase regarding starch modification	83
㊲ Expression and purification of MAase	85
㊳ Production of branched oligosaccharides from rice starch	85
㊴ Yeast display of CGTase mutant	85
(2) The Second Year	88
① Application of PfaGT for tailor made starch preparation	88
㉞ Expression and purification of enzyme	88
㉟ Characteristics of PfaGT on the starch modification	90
② Cloning and characterization of branching enzyme	93
㉞ Cloning of BE (GlgB)	93
㉟ Expression and purification of BE	93
㊱ Modification of amylose by BE treatment	95
㊲ Application of BE on tapioca starch modification	97
③ Application of BSMA for producing tailor made starch	98
(3) The Third Year	100

① Cloning and characterization of hyperthermophilic maltogenic amylase	100
㉞ Cloning of SMMA	100
㉟ Expression and purification of SMMA	100
㊱ Characterization of SMMA : pH, temp. profile, action pattern	103
㊲ Characterization of SMMA : DSC analysis of thermostability	104
㊳ Characterization of SMMA : substrate specificity	105
② Mass production of enzymes for industrial application	110
㉞ BSMA and TSaGT	110
㉟ PfaGT and GlgB	110
3. The Third Project	111
A. Introduction	111
B. Methods and Results of Yearly Research	112
(1) The First Year	112
(A) Materials and Methods	112
① Preparation of slowly digestible and resistant rice starch using the enzymatic method	112
② Preparation of resistant rice starch using the chemical method	112
(B) Research Results	113
① Preparation of slowly digestible and resistant rice starch using the enzymatic method	113
② Preparation of resistant rice starch using the chemical method	115
(2) The Second Year	118
(㉞) Materials and Methods	118
① Structural and rheological properties of slowly digestible and resistant rice starch using the enzymatic method	118
㉞ Preparation of amylosucrase-treated rice starches	118
㉟ Measurement of <i>In vitro</i> digestibilities	118
㊱ Analysis of side chain distributions of amylopectins by HPAEC-PAD	118
㊲ Analysis of molecular weight distributions determined by HPSEC -MALLS-RI system	118
㊳ Analysis of X-ray diffraction patterns and relative crystallinities	119
㊴ Analysis of thermal properties determined by DSC	119

㉔	Analysis of rheological properties of starch gels	119
②	Structural and rheological analysis of resistant rice starch using the chemical method	119
㉕	Optimizing conditions for citrate starch production	119
㉖	Morphological observation of starch granules	120
㉗	Verification of cross-links induced by citrate treatment by FT-IR	120
㉘	Analysis of side chain distributions of amylopectins	120
㉙	Analysis of X-ray diffraction pattern and relative crystallinity & Thermal properties of citrate starches determined by DSC	120
(ㄴ)	Research Results	121
①	Structural and rheological properties of slowly digestible and resistant rice starch using the enzymatic method	121
㉕	<i>In vitro</i> digestibility of amylosucrase-treated starches	121
㉖	Side chain distributions of Amylosucrase-treated starch	121
㉗	Molecular weight distributions of amylosucrase-treated starches	122
㉘	X-ray diffraction patterns and relative crystallinities of amylosucrase- treated starches	123
㉙	Thermal properties of amylosucrase-treated starches	124
㉚	Rheological properties of amylosucrase-treated starch	125
②	Structural and rheological analysis of resistant rice starch using the chemical method	126
㉕	Establishment of optimum conditions for preparing citrate starch	126
㉖	Morphological changes of starch granules	128
㉗	Observation of cross-linking determined by FT-IR	129
㉘	Side chain distributions of citrate starches	130
㉙	Change of X-ray diffraction pattern and relative crystallinity	131
㉚	Change of thermal properties	131
(3)	The Third Year	132
1)	Optimizing preparation conditions of slowly digestible and resistant starch using the enzymatic method, and characteristics of <i>Baeksulki</i>	132
(A)	Materials and Methods	132
㉕	Optimization of conditions for amylosucrase treatment using response	

surface methodology	132
Ⓞ Properties of <i>Baeksulki</i> substituted with Amylosucrase-treated starch	133
(B) Research Results	135
Ⓢ Optimization of amylosucrase treating condition	135
Ⓞ Properties of <i>Baeksulki</i> substituted with amylosucrase-treated starch	137
2) Preparation of <i>Baeksulki</i> substituted with resistant rice starch made by chemical method and examination of the properties	140
(A) Materials and Methods	140
Ⓢ Preparation and properties of citrate starch	140
Ⓞ Preparation and properties of <i>Baeksulki</i> substituted with citrate starch	141
(B) Research Results	143
Ⓢ Properties of citrate starch	143
Ⓞ Properties of <i>Baeksulki</i> substituted with citrate starch	145
Chapter 4 Objective achievement Scale and Contribution Scale on Related Field	152
1. The Point of Research Objectives and Valuation	152
2. The Achievement Scale of Research Objectives and Contribution on Related Field for Technique Development	153
Chapter 5 Research Performance and Utilization Plan	157
Chapter 6 International Scientific and Technical Information collected in the process of Research Development	158
Chapter 7 Reference	160

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요	21
제 1 절 연구개발의 필요성	21
1. 기술적 측면	21
2. 경제적, 산업적 중요성	22
제 2 절 연구의 목적 및 범위	22
1. 연구의 목적	22
2. 연차별 연구개발의 목표 및 범위	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
제 1절 연구내용	28
제 2절 세부과제별 연구수행 결과	29
1. 제 1 세부과제	29
가. 서론	29
나. 연차별 연구방법 및 결과	29
(1) 1차년도	29
(가) 재료 및 방법	29
① 효소 반응시간에 따른 전분 겔 형성	29
② HPLC를 이용한 효소처리에 따른 전분 겔의 구조 변화 측정	29
③ TAcGTase 처리한 전분의 조직감 측정	30
④ TAcGTase 처리한 전분의 등온흡습곡선	30
⑤ 떡류 (백설기, 증편, 가래떡)의 품질 평가법 정립	30
(나) 연구결과	30
① TAcGTase 처리한 전분겔의 TPA	30
② TAcGTase 처리 한 전분의 분자량 분포 특성	33
③ 맞춤형 쌀전분 소재 제조의 최적화	33
④ 맞춤형 쌀전분의 등온흡습특성	37
⑤ 효소처리에 따른 전분의 용해도 측정	38
⑥ 떡류 (백설기, 증편, 가래떡)의 품질 평가법 정립	38

(다) 1차년도 연구성과 고찰 및 결론	40
(2) 2차년도	40
(가) 재료 및 방법	40
① 백설기의 제조	40
② 증편의 제조	40
③ 떡으로부터 쌀전분의 분리	40
④ 4aGTase 처리 쌀가루의 제조	43
⑤ HPLC를 이용한 효소처리 시간에 따른 쌀가루의 구조 변화 측정	43
⑥ 4aGTase 처리 쌀가루를 이용한 떡의 제조	43
⑦ 등온흡습 특성 측정	44
⑧ RVA를 이용한 쌀가루의 호화특성.	44
⑨ X선 회절도에 의한 특성	44
⑩ 아밀로오스 함량의 결정	44
⑪ HPAEC를 이용하여 효소에 의해 변성된 전분 구조 변화 측정	44
⑫ SEC-MALLS-RI analysis에 의한 특성	45
⑬ DSC에 의한 떡 노화도의 결정	45
⑭ 떡의 조직감 측정	45
(나) 연구결과	45
① TSaGTase 처리한 쌀가루로 제조한 떡의 특성	45
② BSMA- 처리한 떡의 특성	53
③ IMO를 첨가한 떡의 제조	55
④ 효소 처리한 쌀가루 (기능성 소재)를 이용한 떡의 제조	59
(다) 2차년도 연구성과 고찰 및 결론	66
(라) 4aGTase 처리 쌀가루를 첨가한 떡의 관능적 특성 조사	67
① 재료 및 방법	67
② 연구결과	70
③ 요약 및 결론	73
(3) 3차년도	74
(가) 재료 및 방법	74
① 4aGTase 처리한 쌀가루의 제조방법	74

② HPLC를 이용한 4aGTase 처리 쌀가루의 분자량 분포도	74
③ 얼음결정의 용융 엔탈피	74
④ 4aGTase 처리 쌀가루를 첨가한 국수의 제조 특성	74
⑤ 4aGTase 처리 쌀가루를 첨가한 국수의 조리 특성	75
⑥ 4aGTase 처리 쌀가루를 포함하는 국수의 냉해동 특성	75
(나) 연구결과	76
① 분자량 분포도	76
② 얼음결정의 용융 엔탈피	76
③ 국수의 조리 특성	78
④ 국수의 냉해동 특성	78
2. 제 2 세부과제	81
가. 연차별 연구방법 및 결과	81
(1) 1차년도	81
① 신규 α -GTase의 클로닝 및 발현	81
② 신규 α -GTase의 생산	82
③ 신규 α -GTase의 특성	82
㉠ 온도의 효과	82
㉡ PfaGT의 기질 특이성	83
㉢ PfaGT의 맞춤형 전분 제조이용 특성	83
㉣ MAase의 생산	85
㉤ MAase의 쌀 분지올리고당 제조 특성	85
㉥ Yeast display of CGTase mutant	85
(2) 2차년도	88
① PfaGT를 이용한 맞춤형 전분의 생산	88
㉠ PfaGT의 발현 및 정제	88
㉡ PfaGT의 전분에 대한 효소작용 메커니즘	90
② BE의 클로닝 및 전분에 대한 효소 특성 연구	93
㉠ BE(GlgB)의 cloning	93
㉡ BE의 발현 및 정제	93
㉢ BE를 이용한 amylose의 변형	95

㉔ BE를 이용한 tapioca starch의 수식	97
③ BSMA 처리를 통한 찹쌀전분으로부터 맞춤형 전분의 생산	98
(3) 3차년도	100
① 초내열성 말토제닉 아밀레이즈의 클로닝 및 특성 규명	100
㉔ SMMA의 클로닝	100
㉕ SMMA의 발현 및 정제	100
㉖ SMMA의 효소역가 측정 및 최적 반응 조건 탐색	103
㉗ DSC를 이용한 SMMA의 열안정성 분석	104
㉘ SMMA의 기질특이성 분석	105
② 효소의 산업적 이용을 위한 대량생산 체제 구축	110
㉔ BSMA 및 TSaGT의 대량생산 시스템 구축	110
㉕ PfaGT 및 GlgB의 대량생산 시스템 구축	110
3. 제 3 세부과제	111
가. 서 론	111
나. 연차별 연구방법 및 결과	112
(1) 1차년도	112
(가) 재료 및 방법	112
① 효소적 방법을 사용한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 제조	112
② 화학적 방법에 의한 난소화성 쌀 전분 제조	112
(나) 결과	113
① 효소적 방법을 사용한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 제조	113
② 화학적 방법에 의한 난소화성 쌀 전분 제조	115
(2) 2차년도	118
(가) 재료 및 방법	118
① 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석	118
㉔ Amylosucrase 처리 쌀 전분의 제조	118
㉕ 소화율 측정	118
㉖ 아밀로펙틴 사슬 분포	118
㉗ 분자량 측정	118
㉘ X선 회절도 및 상대적 결정화도	119

㉞ DSC를 이용한 열적 특성 조사	119
㉟ 전분 겔의 유변학적 특성	119
㊱ 화학적 방법으로 제조한 난소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석	119
㊲ 시트르산 전분 제조의 최적 조건 확립	119
㊳ 전분 입자의 형태 조사	120
㊴ FT-IR 측정	120
㊵ 아밀로펙틴의 사슬 분포	120
㊶ X선 회절도 및 상대적 결정화도, DSC를 이용한 열적 특성	120
(나) 결 과	121
㉶ 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석	121
㉷ Amylosucrase 처리에 의한 소화율의 변화	121
㉸ Amylosucrase 처리에 의한 전분 사슬 분포의 변화	121
㉹ Amylosucrase 처리에 의한 분자량의 변화	122
㊰ Amylosucrase 처리에 의한 X선 회절도 및 상대적 결정화도 변화	123
㊱ Amylosucrase 처리에 의한 열적 특성의 변화	124
㊲ Amylosucrase 처리 후 전분의 유변학적 특성의 변화	125
㊳ 화학적 방법으로 제조한 난소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석	126
㊴ 시트르산 전분 제조의 최적 조건 확립	126
㊵ 전분 입자의 형태 변화	128
㊶ FT-IR 분석을 통한 가교결합 확인	129
㊷ 시트르산 전분의 사슬 분포의 변화	130
㊸ X-ray 회절 분석과 전분 결정화도의 변화	131
㊹ 시트르산 처리에 의한 전분의 열적 특성 변화	131
(3) 3차년도	132
1) 효소적 방법을 이용한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분	
제조 조건의 최적화 및 백설기의 품질 특성	132
(가) 재료 및 방법	132
㉶ 반응표면분석을 이용한 amylosucrase 처리 조건의 최적화	132
㉷ Amylosucrase 처리 전분으로 대체한 백설기의 특성	133
(나) 결 과	135

㉔ Amylosucrase 반응 조건의 최적화	135
㉕ Amylosucrase 처리 전분으로 대체한 백설기의 특성	137
2) 화학적 방법으로 제조한 난소화성 쌀 전분 대체 백설기의 제조 및 특성 규명	140
(가) 재료 및 방법	140
㉔ 시트르산 전분의 제조 및 특성	140
㉕ 시트르산 전분으로 대체한 백설기의 제조 및 특성	141
(나) 결 과	143
㉔ 시트르산 전분의 특성	143
㉕ 시트르산 처리 전분 대체 백설기의 특성 변화	145
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	152
1. 연구별 연구목표 및 평가착안점	152
2. 당초 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도	153
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	157
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	158
제 7 장 참고문헌	160

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

전분은 쌀, 밀, 감자, 옥수수 등에 풍부히 들어있으며 특히 한국인에게 가장 중요한 식량 자원으로 거대분자인 아밀로오스 (amylose)와 아밀로펙틴 (amylopectin)으로 구성되어 있으며 글루코오스 단위가 α -1,4 및 α -1,6 결합으로 이루어져 있다. 그러나 쌀 전분은 구성성분은 단순하나 결합방식이 다양하여 화학적 구조분석이 용이하지 않고, 비수용성이어서 구조 해석이 난해하여, 전분의 구조를 규명하는데 많은 시간이 소비되고 타 화합물에 비해 연구 개발이 지연되었다. 그러나 최근에는 전분의 구조 분석 기술이 발전되고 전분 분해 및 합성효소 연구가 활발해지면서 쌀전분 분야의 학문적 발전이 가속화되고 있다.

화학적으로 전분의 구조를 수식하는 연구는 오랫동안 산업적으로 수행되어 왔으나 (1-6), 식품용으로 이용하기에는 부적합하여 일부만이 이용되고 있고, 화학적인 수식은 전분의 구조를 근본적으로 바꿀 수 없어 맞춤형 전분의 제조에는 부적합하다. 최근 들어 효소를 이용한 전분의 수식 연구가 진행되고 있으며, 특히 α -glucanotransferase를 이용하여 제조한 전분 용액의 냉·해동 안정성이 우수하다고 보고된 바 있다 (7). 그러나 이 보고는 5-10%의 전분 용액의 겔 특성을 측정된 것으로 전분 입자를 수식하여 식품에 이용한 예는 아직 보고된 바 없다.

유전자 조작을 통해 감자로부터 전분합성효소를 제거한 형질전환 감자를 이용하여 생산한 맞춤형 전분 용액이 냉·해동 안정성을 갖는다는 연구가 발표된 바 있고 (8-9), 이와 같이 제조된 전분은 아밀로펙틴의 측쇄 길이가 재배열 되었음이 밝혀졌으나. 이 결과 또한 희박한 전분 용액을 제조하여 특성을 조사한 것으로서 세계적으로 아직 개발 초기단계이며 실용화되기에는 많은 연구와 시일이 요구된다. 더구나 쌀 전분에 응용한 예는 아직 보고된 바 없어, 효소를 이용한 쌀 전분 식품소재의 개발은 꼭 필요하리라 생각된다.

쌀에 관하여는 벼 재배 시에 육종이나 유전자 재조합을 이용하여 전분의 아밀로오스 함량, 구조, 성질 등을 변화시켜 쌀의 수확량을 증가시키고 품질을 개선하려는 연구들이 주로 이루어지고 있고, 그 중 쌀 전분에 대해서는 전분의 아밀로오스 함량을 조절하거나, 물리화학적 방법으로 처리하여 다양한 성질의 전분을 제조하는 연구들이 진행되고 있다. 그러나 쌀 전분에 효소를 직접 반응시켜 새로운 성질을 갖는 맞춤형 전분을 제조하려는 시도는 국내외에서 처음으로 우리 연구진에 의해 시도되고 있다.

식이섬유로 분류되는 난소화성 전분이 장내 미생물의 활성화, 부티르산 등 단쇄 지방산의 생성, 대장 pH의 저하, 면역기능 강화, 대장암 예방, 분변량의 증대와 같은 생체 조절 기능을

수행한다고 보고됨에 따라(10-15), 특히 조리 및 냉각에 의한 노화를 이용한 RS3와 화학적 수식 또는 가열처리에 의해 변형된 구조를 지닌 RS4에 대한 관심이 증가하고 있다. 현재까지 반복적 가압, 가열, 냉각의 물리적 처리, 지질의 제거에 의한 아밀로오스간의 결합력 향상, 산 처리에 의한 분지점 제거, 가교 결합에 의한 효소저항성 획득 증가 등이 난소화성 전분의 제조 방법으로 보고된 바 있다. 그러나 효소에 의해 구조가 변형된 전분을 이용한 연구에 관한 보고는 거의 없으며, 우리 연구진에 의해 시도되고 있다.

2. 경제적, 산업적 중요성

○ 쌀 전분은 새로운 생물자원 : 쌀 전분으로부터 새로운 쌀 전분 식품소재 및 맞춤형 쌀 전분을 개발함으로써 쌀 전분을 식품 및 바이오산업의 원료로 공급할 수 있다.

○ 쌀소비 확대 : 최근 국제적으로 WTO 협상에 따른 쌀 생산 농가의 문제점이 대두되고, 국내적으로는 쌀 생산량이 증대하고 쌀 소비가 감소되면서 상대적으로 쌀이 과잉 생산되는 등 생산과 소비의 불균형이 초래되었다. 그러나 본 연구를 통해 쌀 가공제품의 품질개선, 신소재 및 맞춤형 쌀가루 개발, 품질이 개선된 제품 등 다양화가 가능하게 된다면 쌀 소비가 크게 촉진될 것으로 기대된다.

○ 안전성이 높은 쌀 가공 즉석식품과 냉동식품의 제조 : 맞춤형 쌀 전분은 인체에 안전하므로 화학적 변성 전분과 달리 그 활용도를 확대할 수 있으며, 특히 즉석식품과 냉동식품의 냉동·해동 안정성이 높은 제품을 생산할 수 있다.

○ 새로운 쌀 전분 소재 및 맞춤형 전분의 산업 전략화 : 우리 연구팀이 이미 확보한 효소는 쌀 분지올리고당 및 맞춤형 전분을 제조할 수 있는 가능성을 최초로 제시하였으며 기술적으로 세계 우위에 있으며 따라서 이를 이용하여 제조한 새로운 타입의 전분은 국내 농산물의 부가가치를 제공하고 수출 전략품으로 개발될 것이다.

제 2 절 연구의 목적 및 범위

1. 연구의 목적

탄수화물 효소로 쌀 전분의 구조를 수식하여 맞춤형 쌀 전분 및 기능성 식품 소재를 제조하고 이를 이용한 제품 개발을 목적으로 한다.

- 맞춤형 쌀 전분 및 기능성 식품 소재의 제조 및 특성 규명
- 맞춤형 쌀 전분 및 기능성 식품 소재 제조용 효소의 개발
- 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 개발 및 특성 분석
- 맞춤형 전분 기법을 이용한 쌀 가공 제품의 개발

2. 연차별 연구개발의 목표 및 범위

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	2006	<ul style="list-style-type: none"> ○맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 제조 및 특성 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ·생산을 위한 효소처리 조건의 최적화 - 효소 종류, 농도, 반응 시간별 분자구조 및 수율 분석 ·맞춤형 쌀가루, 쌀전분, 쌀 분지올리고당, 쌀 분지아밀로펙틴 cluster(정제 또는 효소반응물)의 특성 분석 - 유변학적 특성 - 등온흡습특성 -비결정 수분함량 및 냉동 특성 	<ul style="list-style-type: none"> ·맞춤형 쌀가루, 쌀전분, 쌀 분지올리고당, 쌀 분지아밀로펙틴 cluster의 제조 조건 확립 및 물리화학적 특성 규명
		<ul style="list-style-type: none"> ○맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 이용 가공제품의 품질 평가법 정립 	<ul style="list-style-type: none"> ·떡류 (백설기, 증편, 가래떡), 면류, 빵류의 품질 평가법 정립 -물성평가(TPA), 노화도(DSC, 효소법)측정, 관능 검사법(묘사분석 및 소비자호도검사), 	<ul style="list-style-type: none"> ·물성 및 노화도 검사법 확립 ·훈련된 패널 확보, 소비자 기호도 검사법 확립,
	2006	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전분효소의 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ·신규 α-GTase의 클로닝 및 발현 ·신규 α-GTase의 정제 ·신규 α-GTase의 맞춤형 전분 제조 이용 특성 ·MAase의 생산 및 정제 ·MAase의 쌀 분지올리고당 제조 특성 	<ul style="list-style-type: none"> ·신규 α-GTase의 생산 및 맞춤형 쌀전분 제조 특성 ·CDase의 생산 및 쌀분지올리고당 제조 특성
	2006	<ul style="list-style-type: none"> ○난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 제조 및 특성 	<ul style="list-style-type: none"> ·효소 반응에 의한 구조 변형 전분 생산 - 최적 효소 첨가량 탐색 ·화학적 변형 방법을 통한 제조 - 가교 형성 및 치환제 최적 반응조건 확립 ·제조된 쌀 전분의 특성 분석 - Iodine 결합력 평가 - 아밀로펙틴 사슬 길이 분석 - 노화 정도 분석 ·소화율 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ·효소적, 화학적 방법에 의한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분 제조의 최적 조건 확립 ·난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 특성 비교 분석

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차년도	2007	<ul style="list-style-type: none"> ○ 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 이용 떡제품의 가공적성 및 제품특성 	<ul style="list-style-type: none"> ·맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 소재를 이용한 백설기, 증편, 가래떡 제조 - 조직감, 노화도, 수분결합특성 분석 ·떡제품의 냉동안정특성 - 저장중 수분흡습특성, 기계적 물성의 변화 - 냉해동 안정성 	<ul style="list-style-type: none"> ·맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 소재를 이용한 백설기, 증편, 가래떡의 최적 제조조건 확립 및 물리화학적 특성 규명
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 맞춤형 쌀전분 및 기능성 식품소재를 이용한 가공조건 최적화 및 가공제품의 저장중 품질평가 	<ul style="list-style-type: none"> ·효소별, 사용함량별 떡, 면, 빵제품에 효과탐색 -품질평가: 관능검사법(묘사 분석 및 소비자기호도 검사), 물성평가, 노화도측정법. -보존기간별 품질평가(보존온도 보존기간등) 	<ul style="list-style-type: none"> ·현장조건에 맞는 효소공정 및 소재이용 공정조건 최적화 ·유통기한내 노화억제, 조직감향상 및 냉동안정성이 향상된 제품 제조공정 선정
	2007	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전분효소의 작용 메카니즘 	<ul style="list-style-type: none"> ·α-GTase 처리 맞춤형 전분의 분석 - amylopectin - amylose - side chain length ·MAase 처리 맞춤형 전분의 분석 - amylopectin / amylose - side chain length 	<ul style="list-style-type: none"> ·전분효소의 action pattern 규명 ·맞춤형 전분구조의 규명 및 이용
	2007	<ul style="list-style-type: none"> ○ 난소화성 및 지소화성 쌀전분의 구조 및 물성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ·제조된 전분의 구조 분석 - DSC - HPAEC - X-ray 결정 분석 ·제조된 쌀 전분의 물성 분석 - 젤 형성능력 평가 - 유변학적 성질 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ·난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 물리화학적, 구조적 및 물성적 특성 분석을 통한 기능성 식품소재로서의 활용성 평가

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차년도	2008	<ul style="list-style-type: none"> ○ 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 이용 ○ 면제품의 가공적성 및 제품특성 	<ul style="list-style-type: none"> · 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 소재를 이용한 냉동면의 제조 - 제면특성, 조직감, 노화도, 수분결합특성 분석 · 냉동면의 냉동안정특성 - 저장중 수분흡습특성, 기계적 물성의 변화 - 냉해동 안정성 	<ul style="list-style-type: none"> · 맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 소재를 이용한 냉동면의 최적 제조조건 확립 및 물리화학적 특성 규명
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 맞춤형 쌀전분 소재를 이용한 신제품개발 	<ul style="list-style-type: none"> · 제품의 대량생산 공정 개발 및 공정조건 최적화(Pilot & Plant Scale) 	<ul style="list-style-type: none"> · 생물공정에 의해 설계된 기능성 떡, 면, 빵제품의 개발
	2008	<ul style="list-style-type: none"> ○ 맞춤형 전분효소의 작용의 개선 및 효소의 산업적 대량 생산 	<ul style="list-style-type: none"> · α-GTase, MAase 동시처리 - 맞춤형 전분의 제조, 분석 - 작용 메카니즘 · α-GTase의 <i>Bacillus</i> 발현생산 · 효소생산을 위한 발효조건, 정제조건 (Column, Ultra filtration) 및 분말화 방법 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> · 쌀전분 분지올리고당 제조 · 맞춤형 전분을 위한 효소작용 메카니즘 확립 · 효소의 대량 생산
	2008	<ul style="list-style-type: none"> ○ 맞춤형 쌀떡의 가공적성 연구 및 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · 맞춤형 쌀떡의 제조 조건 연구 - 난소화성 및 지소화성 전분을 첨가한 떡 제조 조건 최적화 · 난소화성 및 지소화성 전분 첨가에 따른 맞춤형 쌀떡의 가공적성 연구 - 텍스처 특성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> · 맞춤형 떡 제조 및 특성 규명 - 기존의 쌀떡과 특성 비교 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

○ 감자, 옥수수, 쌀, 밀, 카사바 등에 풍부히 들어있는 전분은 특히 한국인에게는 가장 중요한 식량 자원이며, 자원의 풍부함과 그 물리적 특성으로 인해 식품, 제약, 제지, 화공 등 다양한 산업분야에서 증점제, 젤화제, 안정제, 흡습제 등으로 널리 사용되고 있다.

○ 그러나 천연 전분의 물리화학적 특성은 다양한 산업적 요구에 비해 제한적이기 때문에, 이를 극복하기 위하여 물리적, 화학적, 생물공학적, 효소적인 전분 변형에 대한 연구가 진행되어 왔다.

○ 물리적, 화학적으로 전분의 구조를 수식하는 연구는 오랫동안 산업적으로 수행되어 왔으나 식품용으로 이용하기에는 많은 제한점들이 있어 일부만이 이용되고 있는 실정이며, 화학적 수식은 전분의 구조를 근본적으로 바꿀 수 없기 때문에 맞춤형 전분을 제조하기에는 부적합하다 (1-6).

○ 최근 들어 전분의 구조분석 기술이 발전되고 전분 분해 및 합성효소 연구가 활발해지면서 인체에 위해한 화학적 첨가제의 사용 없이 전분 자체의 구조를 효소를 이용하여 특이적으로 수식하는 연구가 진행되고 있으며 이 분야의 학문적 발전이 가속화 되고 있다(16-22).

○ 유전자 조작을 통해 감자로부터 전분합성효소를 제거한 형질전환 감자로부터 생산한 맞춤형 전분 용액은 냉·해동에 안정한 것이 보고되었고, 이와 같이 제조된 전분은 아밀로펙틴의 측쇄길이가 재배열 된 것으로 밝혀졌다 (8-9). 그러나 이 결과는 희박한 전분 용액을 제조하여 특성을 조사한 것으로서 직접 식품으로 이용할 수는 없다. 또한 이와 같은 연구는 실험실에서만 이루어진 것으로 세계적으로 아직 개발 초기 단계이며 실용화되기에는 많은 연구와 시일이 요구된다. 더구나 쌀 전분에 응용한 예는 아직 보고된 바 없고 우리 연구진에 의해 처음 시도 되는 것이다.

○ 지금까지 쌀에 관하여는 벼 재배 시에 육종이나 유전자 재조합을 이용하여 전분의 아밀로오스 함량, 구조, 성질 등을 변화시켜 쌀의 수확량을 증가시키고 품질을 개선하려는 연구들이 주로 이루어 졌고, 그중 쌀 전분에 대해서는 전분의 아밀로오스 함량을 조절하거나, 물리화학적 방법으로 처리하여 다양한 성질의 전분을 제조하거나 쌀가루의 입도나 체분방법에 따른 성질과 가공적성을 개선하기 위한 연구들이 진행되었다. 쌀전분을 식품산업에 이용하고자 쌀전분을 전분 신소재로 이용하려는 시도들이 진행되어 왔으나 쌀전분에 효소를 직접 반응시켜 새로운 성질을 갖는 맞춤형 전분을 제조하려는 시도는 국내외에서 처음으로 우리 연구진에 의하여 진행되었다.

○ 국내에서 효소 (dextranase)를 이용하여 전분의 구조를 변형하는 연구가 시도되었으

나 이는 전분의 부분적 수식이었다.

○ 우리 연구진은 자체 개발한 효소 (α -glucanotransferase 및 cyclomaltodextrinase)를 이용하여 쌀 및 감자 전분으로부터 맞춤형 전분 제조에 성공하고 이의 특성을 연구하였다. 따라서 우리 연구진은 효소에 의한 맞춤형 연구 분야에서 세계적 수준에 이르고 있다고 생각된다. 또한 우리 연구진에서는 고정화 효소 반응을 이용하여 효율적인 분지 올리고당 제조법을 개발하였으며, 다양한 물리화학적 특성을 규명하고, 이를 바탕으로 전분질 식품의 저장성 증진 효과 및 냉동변성방지제로의 가능성을 확인하였다.

○ 소화기관 내에서 전분의 아밀로오스/아밀로펙틴의 가치를 서서히 분해하여 혈당의 급속한 상승을 방지하여 다양한 생리기능성을 나타내는 지소화성 전분에 대한 국내외 연구는 초기 단계에 있다.

○ 일본에서는 효소를 이용하여 전분으로부터 고분자 환형 텍스트린을 제조하고 낮은 혈당 지수와 인슐린 반응의 이점을 활용하여 스포츠 음료에 적용하였다.

○ 천천히 소화되는 당알코올 제품인 Isomalt가 출시되었으나, 천천히 당을 방출한다고 주장하는 이 제품은 생리 기능적 측면에서는 지소화성 전분과는 매우 상이하다 (10).

○ 현재 산업적으로 생산되는 지소화성 전분은 전무한 상태이며, 지소화성 전분을 제품에 적용한 사례는 국내외를 막론하고 전무하다.

○ 난소화성 전분은 국내외에서 식품소재로 판매되고 있으나 제품화는 많이 진행되지 않은 추세이다. 호주에서는 옥수수의 종자개량을 통해 개발된 Hi-maize®라는 난소화성 전분을 생산하여 판매하고 있는데, 최근에는 난소화성 전분 함유 식빵이 출하되어 20주 만에 흰빵 시장의 12%를 장악했으며, 흰빵 시장의 규모를 8% 정도 증가시킨 것으로 보고되고 있다(11).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구내용

탄수화물 효소인 maltogenic amylase, 4- α -glucanotransferase 등을 이용하여 1) 쌀 전분으로부터 분지올리고당, 2) 분지 아밀로펙틴 cluster, 3) 맞춤형 쌀전분, 4) 지소화성/난소화성 쌀전분을 제조하고 5) 제조된 신규 제품의 물리화학적 특성을 연구하며, 이를 6) 떡,면,빵제품 생산에 이용함

- 맞춤형 쌀전분 식품 소재의 제조 및 특성
 - 맞춤형 쌀전분 및 기능성 식품소재 제조 및 특성 규명, 맞춤형 쌀전분 및 기능성 식품소재 이용 떡제품의 가공적성 및 제품특성, 맞춤형 쌀전분 및 기능성 식품소재 이용 면제품의 가공적성 및 제품특성
- 맞춤형 쌀전분 제조 효소의 개발 및 특성
 - 전분효소의 생산, 전분효소의 작용메카니즘, 맞춤형 전분효소의 작용의 개선 및 효소의 산업적 대량 생산
- 난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 및 응용
 - 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 제조 및 특성, 난소화성 및 지소화성 쌀전분의 구조 및 물성 분석, 맞춤형 쌀떡의 가공 적성 연구 및 개발
- 맞춤형 쌀전분 소재 이용 식품의 개발
 - 맞춤형 쌀전분 및 기능성 식품소재 이용 가공제품의 품질 평가법 정립, 맞춤형 쌀전분 및 기능성 식품소재를 이용한 가공조건 최적화 및 가공제품의 저장중 품질평가, 맞춤형 쌀전분 소재를 이용한 신제품개발

제 2절 세부과제별 연구수행 결과

1. 제 1 세부과제

가. 서론

제 1 세부과제의 연구목표는 맞춤형 쌀전분 식품 소재를 제조하고, 이를 이용하여 식품을 개발하는 것으로서, 1차년도에서는 맞춤형 쌀전분 및 기능성 식품 소재를 제조하기 위하여, 효소 처리에 의한 전분 구조 변형을 실시하였고, 변형된 전분의 유변학적 성질 등 물리 화학적 특성을 조사하였다. 전분의 효소적 처리에 의한 구조 변화는 전분의 점도 특성, 수분과의 결합력 등에 있어서 변화를 가져오게 되며 이로 인하여 식품에 첨가했을 때 식품의 특성에도 영향을 미칠 것으로 판단되므로 효소에 의해 구조가 변형된 전분의 물리 화학적 특성을 파악하는 것은 맞춤형 전분 제조에 필수적인 부분이라 할 수 있다.

2차, 3차년도에서는 1차년도의 결과들을 바탕으로 *Thermus aquaticus*로부터 분리한 4- α -glucanotransferase (TAaGTase)로 구조를 변형시킨 쌀가루를 만들어 떡과 면을 제조하고, 떡과 면의 물리 화학적 특성의 변화를 규명하였고, *Thermus scotoductus*로부터 분리된 thermostable 4- α -glucanotransferase (TSaGTase) 와 *Bacillus stearothermophilus*로부터 분리한 maltogenic amylase (BSMA)를 첨가하여 백설기와 증편을 제조하고, 특성을 조사하여 맞춤형 식품 소재의 응용 가능성을 조사하였다.

나. 연차별 연구방법 및 결과

(1) 1차년도

(가) 재료 및 방법

① 효소 반응시간에 따른 전분 겔 형성

전분으로는 쌀전분과 찹쌀전분을 이용하였으며, 효소로는 TAaGTase를 사용하였다. 각 전분은 건조 중량으로 5% 전분 분산액을 100°C 수욕조에서 30분 동안 교반 가열하여 전분 겔을 제조하였다. 제조된 전분 용액에 농도별(1, 3, 6 U/g) TAaGTase를 첨가하여 2시간 동안 반응을 시켰다. 효소의 활성을 막기 위해 100°C에서 30분간 가열하여 효소를 불활성화하여 효소 처리된 전분 겔을 제조하였다.

② HPLC를 이용한 효소처리에 따른 전분 겔의 구조 변화 측정

전분 0.5% 농도로 1N NaOH를 이용하여 전분을 분산 시킨 다음 1N HCl을 이용 중화한 후, 100°C에서 1시간동안 stirring 하면서 전분을 완전히 분산시켰다. 분산된 시료는 pore size 4

μm 필터를 이용하여 필터한 후, 50mM NaNO_3 이동상을 이용하여 분당 0.4ml의 속도로 흘러 분리한 후, RI detector를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 Tosoh 사 제품 G5000와 G3000을 시리얼로 연결하여 사용하였다.

③ TAcGTase 처리한 전분의 조직감 측정

효소 처리된 전분 겔은 페트리 디쉬에 담아 4°C 에서 0,1,3,5,7일간 저장하며 조직감을 측정하였다. 측정 방법은 Texture analyzer를 이용하여 50mm 원형 probe를 이용하여 compression test로 90%의 변형을 주어 겔의 조직감을 측정하였으며 측정 속도는 1mm/sec로 측정하였다.

④ TAcGTase 처리한 전분의 등온흡습곡선

효소 처리한 전분의 수분활성도에 따른 흡습성질을 알아보기 위해 포화염 용액으로 평형 상대습도가 각각 11%~96%의 범위로 고정된 항온항습조에 시료 $0.5\pm 0.001\text{g}$ 을 넣어 시료의 수증기압이 주위의 수증기압과 평형이 되도록 약 2주간 저장하면서 무게변화를 측정하여, 더 이상 시료의 중량이 변하지 않는 상태를 평형상태로 하였으며, 그 때의 수분함량과 상대습도를 각각 평형수분함량과 평형상대습도로 하여 이들의 관계를 등온흡습곡선(sorption isotherm)으로 나타내었다.

⑤ 떡류 (백설기, 증편, 가래떡)의 품질 평가법 정립

Texture analyzer를 이용하여 저장 기간별 떡류의 조직감을 측정하였다. 시료는 $2\text{cm}\times 2\text{cm}\times 1\text{cm}$ 로 잘라 사용했으며, resilience test와 TPA test를 하였다. TPA test는 원형 probe를 이용하였으며 측정 속도는 1mm/sec로 80% 변형도에서 측정하였다.

(나) 연구결과

① TAcGTase 처리한 전분겔의 TPA

TAcGTase 처리 농도와 저장 기간에 따른 쌀과 옥수수 전분의 텍스처 특성들 (fracturability, fracture strain, hardness, adhesiveness, cohesiveness, gumminess, and resilience)은 각각 그림 1과 2에 나타내었다.

옥수수 전분과 쌀 전분, 또 효소를 처리한 것과 처리하지 않은 샘플 사이에는 뚜렷한 차이가 있었다. 쌀 전분 겔의 변형(strain)은 옥수수 전분 겔보다 높았으나, 파쇄성(fracturability)은 낮았다. 이것은 쌀 전분 겔이 옥수수 전분 겔보다 깨지기는 쉬우나 변형에 견디는 힘은 더 강한 것으로 해석된다. 경도의 경우 쌀 전분 겔이 옥수수 전분 겔 보다 낮은 반면에 부착성과 응집성은 쌀 전분 겔이 옥수수 전분 겔보다 두 배 정도 높았다. 원래의 쌀 전분 겔은 일주일동안 저장되면서 strain, 부착성, 응집성, 검성의 면에서 극적으로 감소된 현상을 나타내었다.

변형(Strain)에 있어서는 효소처리 하지 않은 겔과 효소 처리한 전분 겔(1U/g) 사이에는 큰

차이(감소)가 있었지만 효소의 농도가 증가함에 따른 변형에서는 완만히 감소하는 경향을 나타내었다. 효소 처리한 전분 겔과 처리하지 않은 전분 겔 사이에서의 경도는 효소 처리한 겔이 더 높게 나타났으므로 더 깨지기 쉽고, 단단하다는 결과가 나왔다. 또한 효소 처리한 겔이 처리하지 않은 것보다 검성, 복원성(resilience)이 높게 나타났다. 효소를 처리한 효과의 가장 흥미로운 결과는 쌀과 옥수수 전분 겔의 과쇄성에서 나타났다. 다양한 농도 (1, 3, 6 U/g)로 효소 처리를 한 결과 효소의 농도가 커질수록 옥수수 전분 겔은 완만히 감소하는 경향을 나타내었으나, 쌀 전분 겔은 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. 부작성의 경우 효소의 농도가 커질수록 증가하였다. 경도, 응집성, 검성, 복원력에서는 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다.

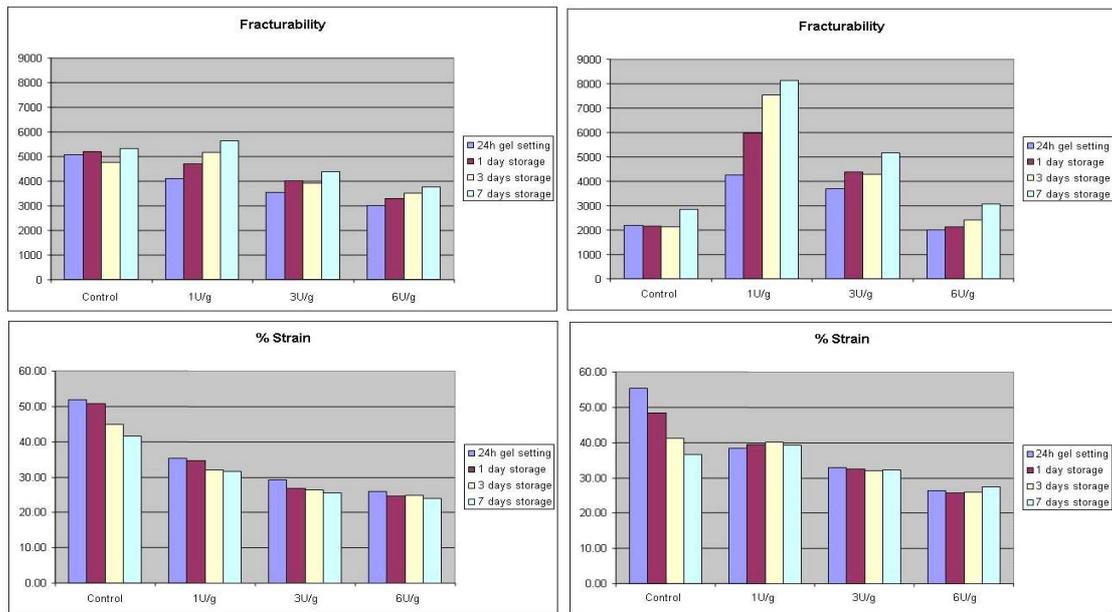


그림 1. 저장 중 TAcGTase 처리한 옥수수 (왼쪽)와 쌀 (오른쪽) 전분 겔의 과쇄성과 변형에서의 변화

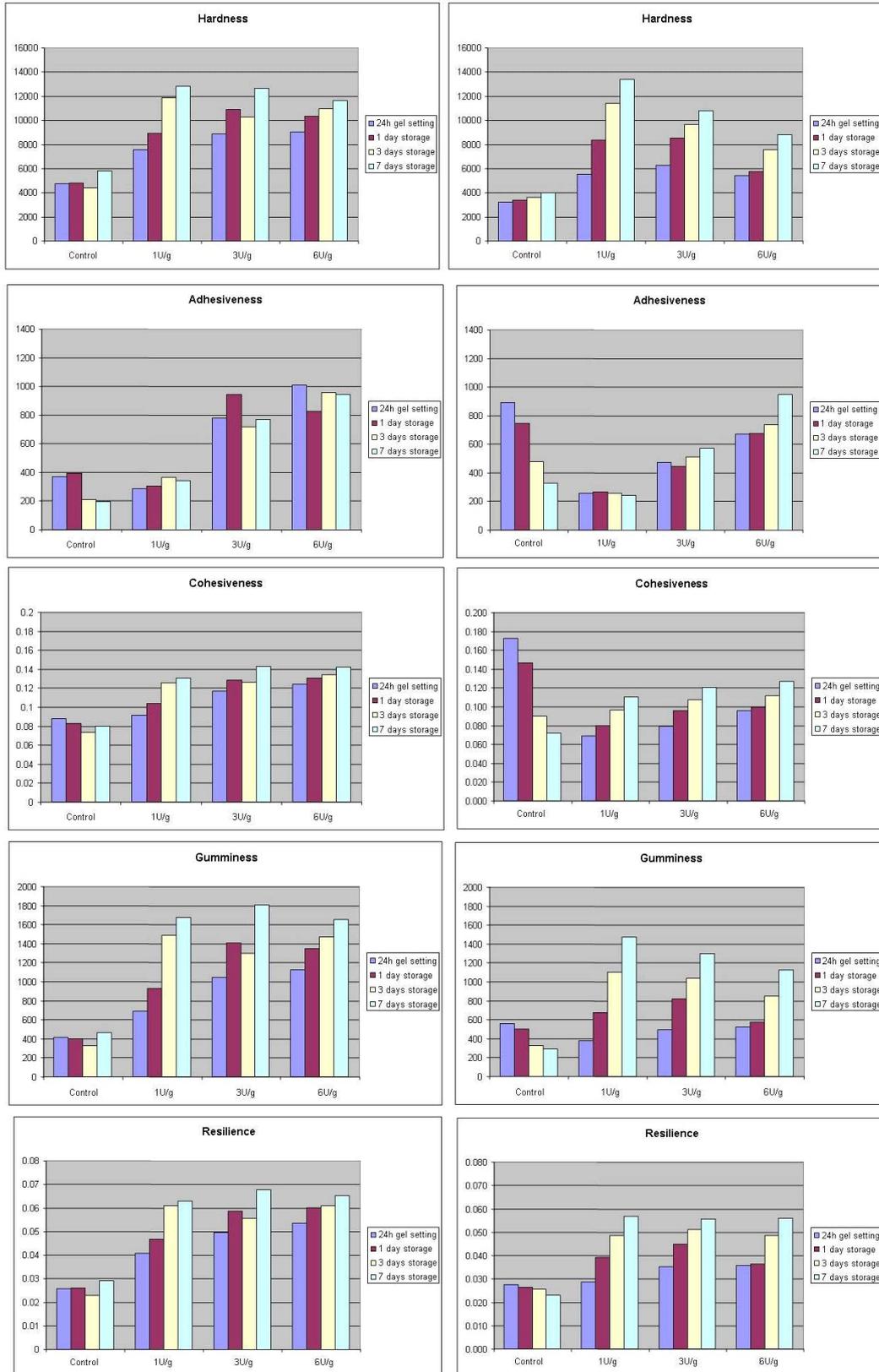


그림 2. 저장 중 TAαGTase 처리한 옥수수 (왼쪽)와 쌀 (오른쪽) 전분 겔의 텍스처 특성

② TAcGTase 처리 한 전분의 분자량 분포 특성

원래의 전분과 효소 처리를 한 전분의 분자량 분포 특성 (molecular distribution)은 그림 3 과 4에 나타내었다. 전분에 처리한 4αGTase의 농도가 커질수록 아밀로오스와 아밀로펙틴의 intermediate and low-Mw fractions 의 함량이 증가했다. 쌀 전분이 옥수수 전분보다 효소 반응이 더 잘 일어남을 알 수 있었고, 효소 처리의 양이 같을 때 쌀 전분이 아밀로오스의 중간 분자량이 감소했을 뿐 아니라 intermediate-Mw AP fraction도 증가하였다. 아밀로오스 함량의 감소와 체인 길이의 감소가 4αGTase를 처리한 쌀 전분 겔에서 겔의 힘(경도)을 감소시키는 결과를 나타냈다고 보여진다 (그림 3, 4).

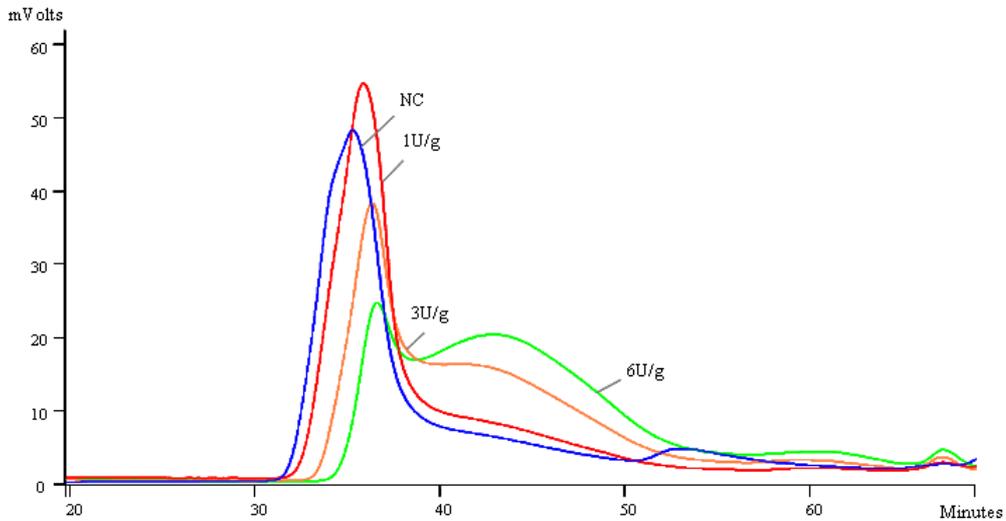


그림 3. 4αGTase 처리한 옥수수 전분 겔의 분자량 분포도

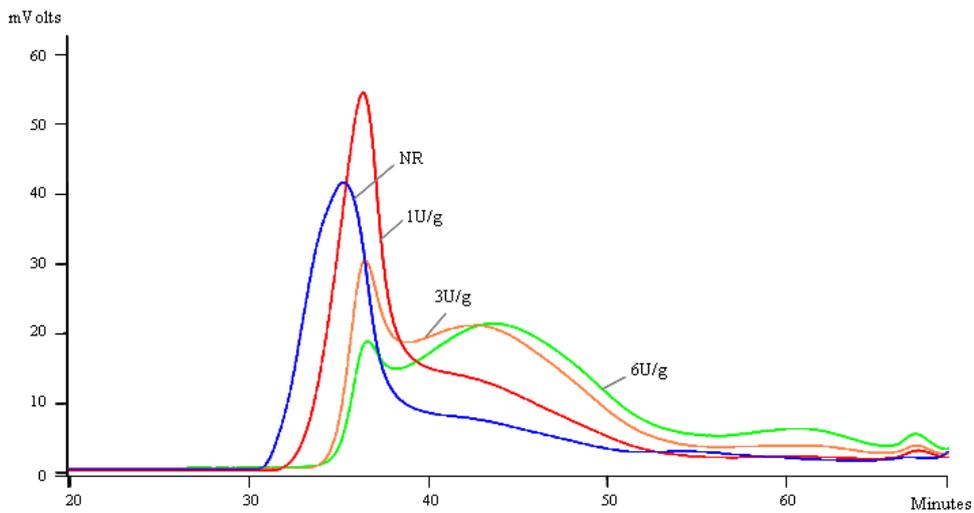


그림 4. 4αGTase 처리한 쌀 전분 겔의 분자량 분포도

③ 맞춤형 쌀전분 소재 제조의 최적화

맞춤형 쌀전분 및 쌀 분지 아밀로펙틴 클러스터는 쌀전분에 내열성 효소인 4αGTase를 처리하여 제조하였다. HPLC를 이용하여 효소 처리한 전분 구조의 변화를 측정된 결과이다. 효소를 처리하지 않은 쌀전분의 경우에는 아밀로펙틴과 아밀로오스의 부분이 분리되어 나타났으나, 효소 처리한 쌀전분의 경우에는 효소에 의해 쌀전분의 구조가 변화됨을 나타내고 있다. 이들 소재의 제조를 최적화하기 위해서 기질 농도별, 효소농도별, 반응 시간별 반응 정도를 HPSEC를 이용하여 측정하였다. 그림 5와 6에서 보는 것과 같이 찹쌀전분의 경우는 효소 농도 3U/g으로 90시간 이내에 기질 전량을 전환시킬 수 있었고 (그림 5), 멍쌀전분의 경우는 기질 전량을 전환하기 위해서 90시간 이상의 시간이 필요한 것으로 나타났다 (그림 6). 기질 농도를 달리하여 조사하였을 때, 30%까지 기질 농도를 높이는 경우, 효소 농도 25 U/g로 48시간 이내에 기질 전량을 전환시킬 수 있는 것으로 조사되었다 (그림 7, 8).

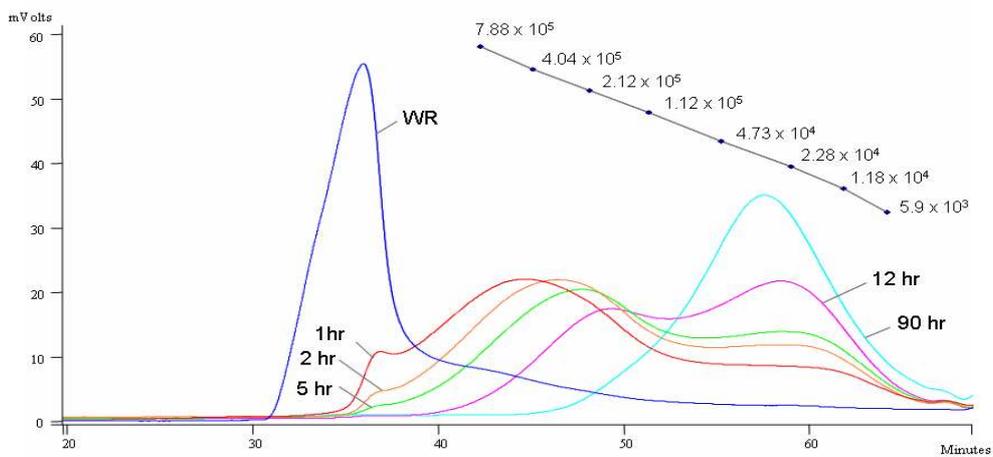


그림 5. 효소 농도 3 U/g으로 4αGTase 처리한 찹쌀전분의 분자량 분포도

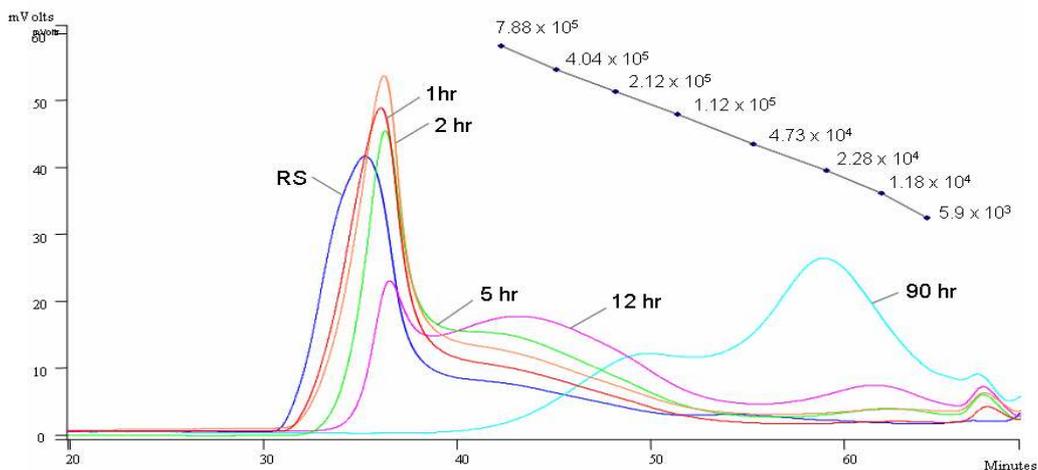


그림 6. 효소 농도 3 U/g으로 4αGTase 처리한 멍쌀전분의 분자량 분포도

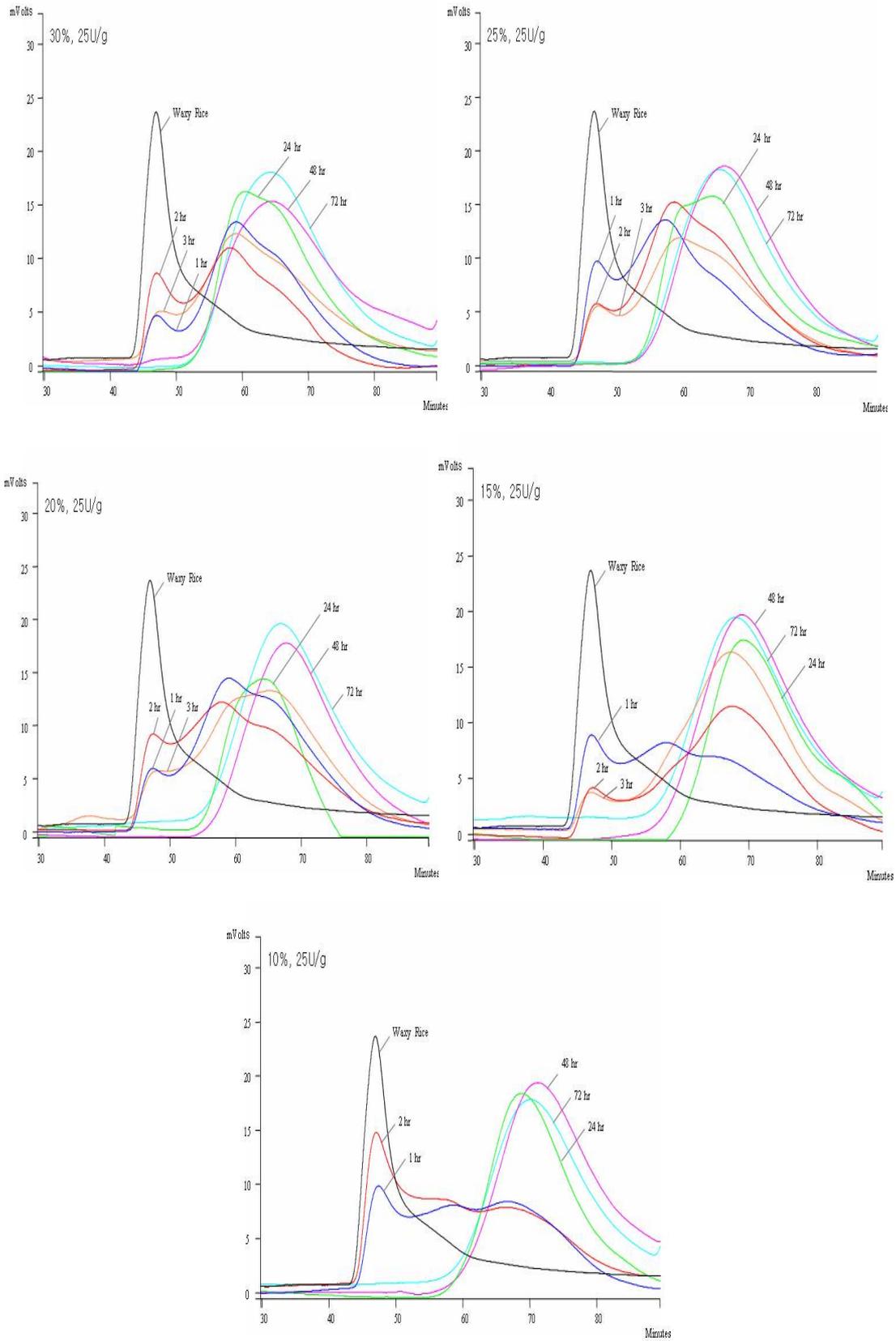


그림 7. 기질 농도를 달리하여 측정된 4aGTase 처리 찹쌀전분의 분자량 분포도 (10, 15, 20, 25 and 30% 기질농도(w/w), 25U/g)

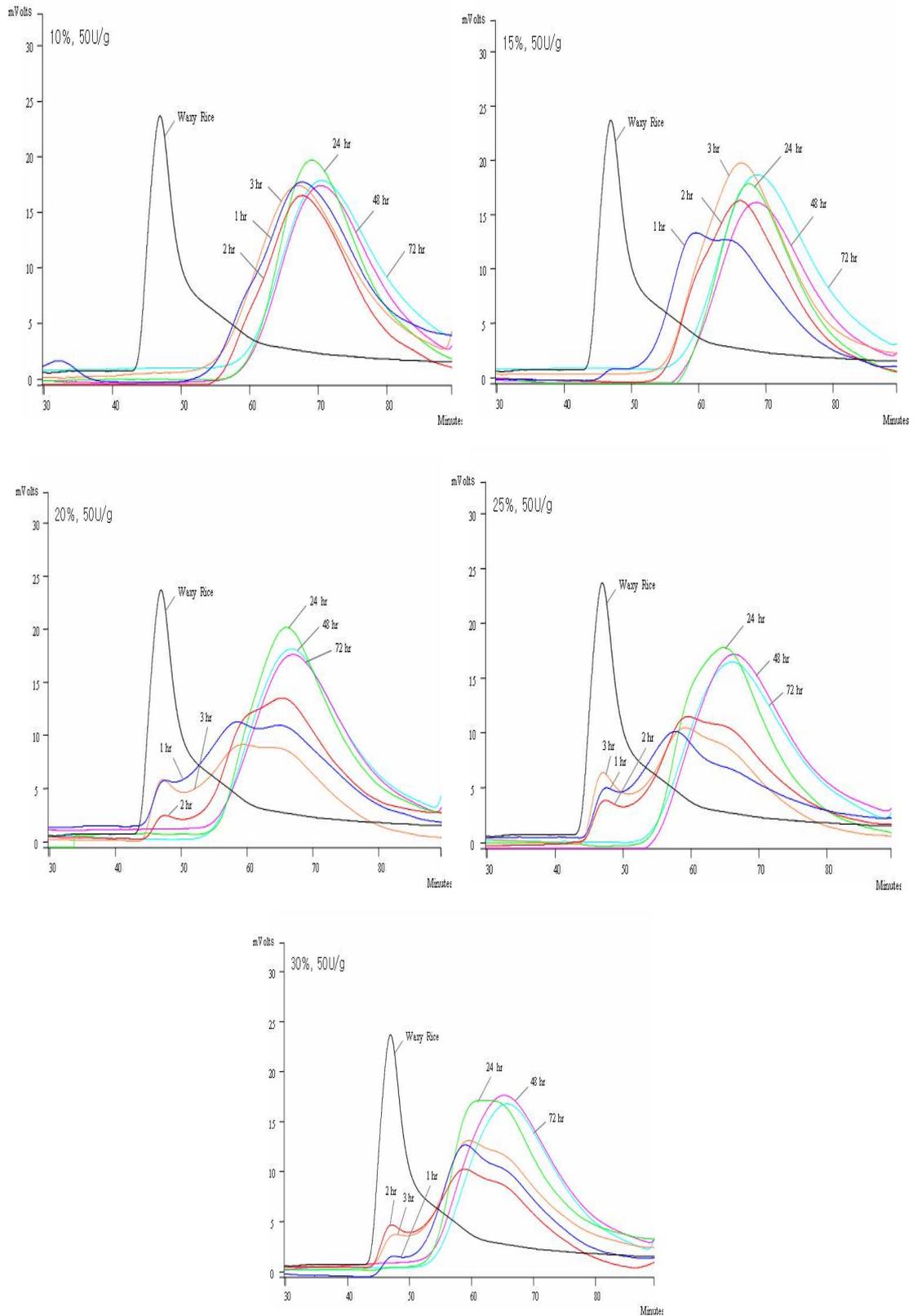


그림 8. 기질 농도를 달리하여 측정 한 4αGTase 처리 찹쌀전분의 분자량 분포도 (10, 15, 20, 25 and 30% 기질농도(w/w), 50U/g)

④ 맞춤형 쌀전분의 등온흡습특성

등온흡습특성을 측정한 결과 높은 수분활성도 영역에서 (>약 0.8) 동일 수분함량일 때 맞춤형 쌀전분 소재의 수분활성도가 대조구보다 유의적으로 낮아짐을 알 수 있었다. 이는 4- α GTase 처리 맞춤형 쌀전분 소재가 보습제 또는 냉동 안정제 등의 기능성 소재로 사용될 수 있는 가능성을 보여준다 (그림 9, 10) (23).

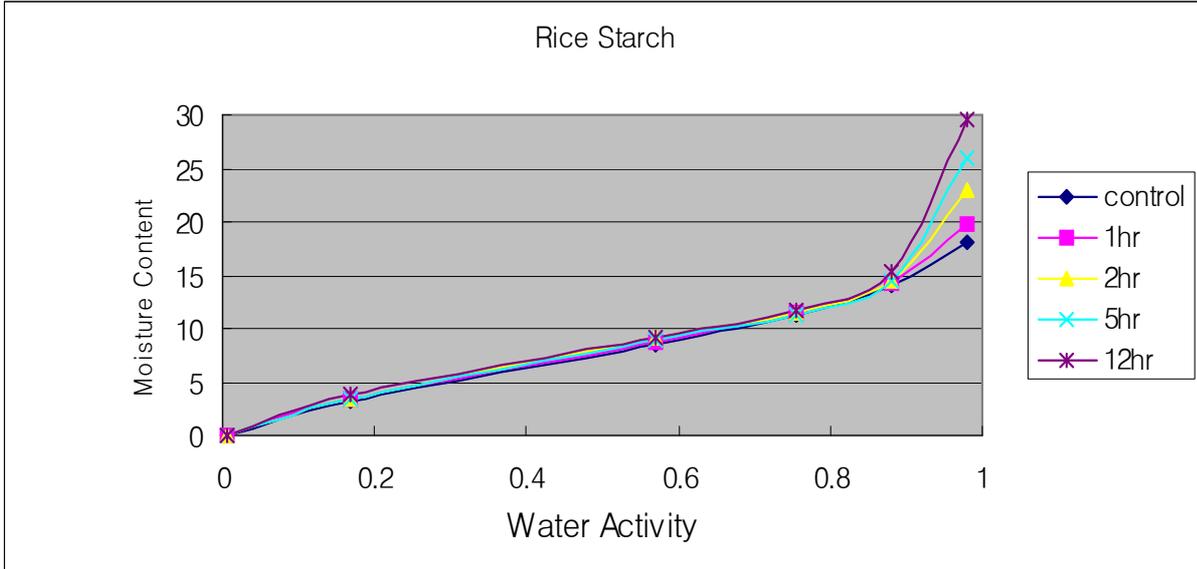


그림 9. 25°C에서 측정한 멍쌀전분의 등온흡습곡선

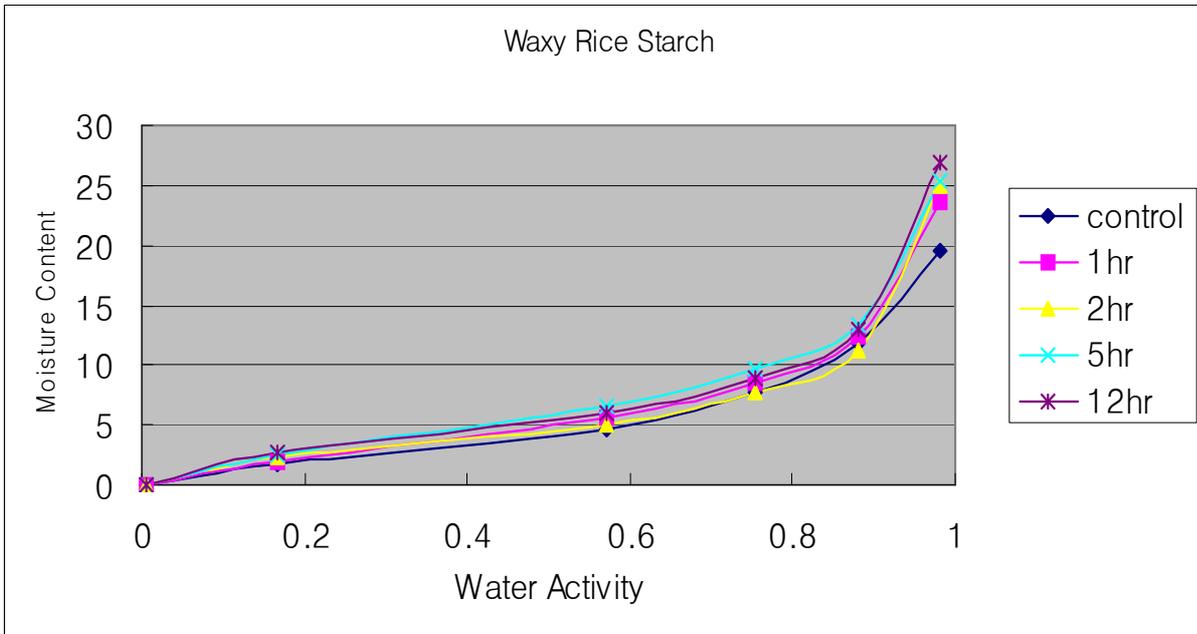


그림 10. 25°C에서 측정한 찹쌀전분의 등온흡습곡선

⑤ 효소처리에 따른 전분의 용해도 측정

맞춤형 쌀전분(3U/g)의 용해도 측정을 위해 황산페놀방법을 이용하여, 실내 온도(25)에서 1시간동안 녹인 결과이다(표 1). 쌀전분 보다 찹쌀전분이 높은 용해도를 보였으며, 대조군과의 비교에서는 효소처리군의 용해도가 높음을 알 수 있었다.

표 1. 4αGTase 처리한 멥쌀과 찹쌀전분의 용해도 (mg sugar/mg starch)

Sample	Control	4αGTase-treated time			
		1hr	2hr	5hr	12hr
Rice Starch	0.08	0.18	0.16	0.35	0.47
Waxy Rice Starch	0.42	0.88	0.86	0.92	0.93

⑥ 떡류 (백설기, 증편, 가래떡)의 품질 평가법 정립

가래떡, 백설기, 증편의 저장기간에 따른 물성 특성을 two bite compression test에 의해 얻어진 7개 항목의 TPA 특성치로 표 2에 나타내었다. 떡의 복원성을 나타내는 resilience의 경우 백설기, 증편 모두 저장기간에 따라 감소하였고, 떡의 견고성을 나타내는 hardness의 경우 백설기, 증편 모두 시간이 지날수록 증가하는 것으로 나타나 저장 7일까지도 계속 노화가 진행되고 있음을 알 수 있었다.

떡의 내부적인 결합력 및 응집성을 나타내는 cohesiveness의 경우, 백설기와 증편 모두 시간이 지날수록 감소하였다. 특히 백설기의 경우는 저장 1일째 큰 폭으로 감소하였다가 그 이후로는 거의 차이를 나타내지 않았다. 떡의 탄력성을 나타내는 springiness의 경우 백설기는 저장 1일째까지는 거의 차이가 없었으나 3일째에 급격히 증가하였고 그 이후는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 반면에 증편은 저장 3일째까지는 소폭 감소하다가 저장 7일째에 소폭 증가하였다. Gumminess 및 chewiness는 두 시료 모두 비슷한 경향을 보였다. 백설기의 경우는 저장기간이 1일째가 되었을 때 그 값이 큰 폭으로 감소하였고, 증편은 3일째에 감소하였다가 그 이후로는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 또한 부착성을 나타내는 adhesiveness는 백설기, 증편 모두 저장기간이 지날수록 큰 폭으로 감소하여 백설기는 1일째부터, 증편은 3일째부터 그 값이 나타나지 않았다 (표 2).

표 2. 가래떡, 백설기, 증편의 저장중 텍스처 변화 (0, 1, 3, 7일 저장, 4℃)

Texture Parameter	sample	Storage period(days)			
		0	1	3	7
Resilience	karedduk	0.56	0.67	—	—
	backsulgi	0.52	0.52	0.49	0.47
	jeungpyun	0.64	0.64	0.57	0.49
Hardness	karedduk	28298.96	—	—	—
	backsulgi	18469.68	20898.47	27337.65	27751.20
	jeungpyun	8862.50	13257.44	14673.09	27751.20
Adhesiveness	karedduk	-5232.07	—	—	—
	backsulgi	-782.78	—	—	—
	jeungpyun	-638.43	-190.87	—	—
Cohesiveness	karedduk	0.72	—	—	—
	backsulgi	0.51	0.25	0.25	0.23
	jeungpyun	0.54	0.39	0.29	0.27
Springiness	karedduk	0.79	—	—	—
	backsulgi	0.50	0.49	0.63	0.66
	jeungpyun	0.46	0.43	0.41	0.54
Gumminess	karedduk	20281.06	—	—	—
	backsulgi	9479.31	5195.02	6811.91	6420.26
	jeungpyun	4751.67	5213.71	3911.36	3872.87
Chewiness	karedduk	16153.62	—	—	—
	backsulgi	4771.50	2559.65	4319.69	4233.20
	jeungpyun	2239.12	2227.75	1732.22	2117.91

(다) 1차년도 연구성과 고찰 및 결론

맞춤형 쌀전분 및 쌀 분지 아밀로펙틴 클러스터는 쌀전분에 내열성 효소인 4 α GTase를 처리하여 제조하였다. 이들 소재의 제조를 최적화 하기 위해서 기질 농도별, 효소농도별, 반응 시간별 반응 정도를 HPSEC를 이용하여 측정한 결과 기질 농도를 30%까지 높였을 때 효소 농도 25U/g으로 48시간 이내에 기질 전량을 소재로 전환시킬 수 있었다. 최종 효소 산물은 분자량이 약 십만에 이르는 측쇄길이의 재배열이 일어난 아밀로펙틴 클러스터임이 확인되었다(18). 효소적으로 제조한 전분 겔은 특이하게 열가소성이 있었으며 효소를 처리하지 않은 일반 전분 겔에 비해 과쇄성과 경도가 큰 반면 낮은 변형 값을 나타내, 단단하고 깨지기 쉬운 겔을 형성함을 밝혔다. 등온흡습특성을 측정한 결과 높은 수분활성도 영역에서 (>약 0.8) 동일 수분함량일 때 맞춤형 쌀전분 소재의 수분활성도가 대조구보다 유의적으로 낮아짐을 알 수 있었다. 이상의 사실로 맞춤형 쌀전분 소재가 보습제 또는 냉동방지제로서 이용될 수 있는 가능성을 확인하였으며, 우수한 특성을 가지는 새로운 식품첨가제로 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

(2) 2차년도

(가) 재료 및 방법

① 백설기의 제조

삼립식품에서 제공한 쌀가루를 이용하여 표 3과 4에 나타낸 비율로 재료들을 혼합하고, TS α GTase (50units/g rice flour)와 75°C에서 3시간 반응시켰다. 반응시킨 쌀가루 6g를 plastic cup (25 mm diameter and 30 mm deep)에 넣어 30분간 증자하고 10분간 뜸들인 후 실험에 사용하였다.

② 증편의 제조

쌀가루와 재료, 효모를 표 5와 6에 표시한 비율대로 섞은 다음 TS α GTase (20units / g rice flour)와 75°C에서 3시간 반응시킨 후 향온기를 이용하여 35°C에서 4시간을 발효시켰다. 발효를 끝낸 시료는 plastic cup (25 mm diameter and 30 mm deep)에 15g 씩 넣고 30분간 증자한 다음 30분간 뜸을 들여 실험에 사용하였다.

③ 떡으로부터 쌀전분의 분리

떡 1g을 1% (w/v) 농도가 되게 90% dimethyl sulfoxide에 분산시킨 다음 1시간동안 가열하였다. 가열한 시료를 overnight하여 교반한 후, 에탄올을 6배 붓고, 원심분리 하였다. 원심분리후 침전물을 50°C에서 건조하였다.

표 3. TSαGTase를 처리한 백설기를 제조하기 위한 성분표

Unit : g

Ingredients	Control	TSαGTase-treated
Rice Flour	100	100
Salt	1	1
Sugar	15	15
Water	20	20
TSαGTase	0	5000 U / g rice flour

표 4. IMO가 첨가된 백설기를 제조하기 위한 성분표

Unit : g

Ingredients	Control	IMO
Rice Flour	100	100
Salt	1	1
Sugar	15	0
IMO	0	15
Water	20	20

표 5. TSaGTase 처리한 증편을 제조하기 위한 성분표

표 6 IMO가 첨가된 증편을 제조하기 위한 성분표

④ 4αGTase 처리 쌀가루의 제조

쌀가루는 삼립식품에서 제공받은 습식쌀가루(수분함량 35%)를 이용하였으며, 효소는 4αGTase를 사용하였다. 쌀가루 30g(dry basis)을 1L 멸균병에 담아 증류수를 사용하여 5%(w/v) 쌀가루 분산액으로 만들어서 95℃ 수욕조에서 30분 동안 교반 가열하여 호화시켰다. 호화된 쌀가루 용액에 5 U/g 4αGTase를 첨가하여 반응시켰으며, 반응 후에는 효소의 활성을 막기 위해 100℃에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화하였다. 그 용액을 5배 분량의 95%에탄올을 이용하여 침전시켰고 6,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상온에서 건조시킨 후 믹서로 갈아 45mesh에 내린 쌀가루를 사용하였다.

⑤ HPLC를 이용한 효소처리 시간에 따른 쌀가루의 구조 변화 측정

효소 처리한 쌀가루를 1% 농도가 되도록 90%DMSO를 가하여 분산시킨 다음 1시간동안 교반하면서 가열하였다. 그 용액을 24시간동안 상온에서 교반한 후, 5배 분량의 에탄올을 가하여 침전시켰다. 그 침전액을 12,000rpm에서 15분 동안 원심분리하였고, 그 이후 바로 3배 분량의 아세톤을 가해 다시 12,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 탈수시켰다. 그 가루를 가열된 증류수로 농도 0.5%가 되게 eppen tube에 분산시키고, 30분 동안 끓는 물에 교반하면서 분산시켰다. 그것을 5.0 μm membrane filter를 이용하여 필터한 후, 50 mM NaNO₃를 이동상을 이용하여 분당 0.4ml의 속도로 흘려 분리한 후, RI detector를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 Tosoh 사 제품 G5000와 G3000을 시리얼로 연결하여 사용하였다.

⑥ 4αGTase 처리 쌀가루를 이용한 떡의 제조

떡은 아래와 같은 배합비로 재료들을 혼합하여 30분 증자하고, 10분 동안 뜸을 들인 후, 상온에서 tempering하여 사용하였다. 쌀가루 소재가 첨가된 떡의 경우는 4αGTase와 1, 3, 48시간 동안 반응시켜 제조한 쌀가루 소재를 10%와 20%(dry basis) 첨가하여 제조하였다. 떡의 최종 수분함량은 38%로 맞추었고, 만들어진 떡은 크기 2×2×1cm로 잘라 사용하였으며 상온에 2일 동안 저장하였다.

Ingredients	Control ^a	A ^b	B ^c
Rice flour(g)	100	93	87
Constituent(g)	0	7	13
Sugar(g)	15	15	15
Salt(g)	1	1	1
Water(g)	18	21	24

^aControl : 4αGTase 처리하지 않은 쌀가루로 제조한 떡, ^bA : 4αGTase 처리 쌀가루를 10% 첨가하여 제조한 떡, ^cB : 4αGTase 처리 쌀가루를 20% 첨가하여 제조한 떡

⑦ 등온흡습 특성 측정

효소 처리한 전분의 수분활성도에 따른 흡습성질을 알아보기 위해 포화염 용액으로 평형 상대습도가 각각 11%~96%의 범위로 고정된 항온항습조에 시료 0.5±0.001g을 넣어 시료의 수증기압이 주위의 수증기압과 평형이 되도록 약 2주간 저장하면서 무게변화를 측정하여, 더 이상 시료의 중량이 변하지 않는 상태를 평형상태로 하였으며, 그 때의 수분함량과 상대습도를 각각 평형수분함량과 평형상대습도로 하여 이들의 관계를 등온흡습곡선(sorption isotherm)으로 나타내었다.

⑧ RVA를 이용한 쌀가루의 호화특성.

4αGTase 처리된 쌀가루 소재가 첨가되지 않은 쌀가루와 쌀가루 소재 10%, 20% 와 혼합한 쌀가루의 호화특성을 Rapid Visco-Analyzer (RVA) (RVA-4, Newport Scientific Pvt. Ltd., Warriewood, Australia)를 이용하여 측정하였다. 파우더 3g(수분함량 14%)을 RVA 시료통에 넣고 증류수를 25g 넣은 다음 0~2분은 50°C, 2~10분은 95°C까지 상승, 10~12분은 95°C에서 유지, 12~20분은 50°C까지 냉각, 20~22분은 50°C를 유지하면서 점도를 측정하였다.

⑨ X선 회절도에 의한 특성

X-ray diffractometer (D5005, Rietveld Software, Bruker Co., Germany)로 분석하였고, reflection mode는 40kV와 40mA, 샘플은 aluminium tray(sample layer, 15×20×1.5mm)에 담아서 diffraction angles 2θ에서 $\lambda = 1.5406$ nm로 10°에서 30°까지 step size 0.02°, time per step 2.5sec의 속도로 촬영하였다.

⑩ 아밀로오스 함량의 결정

떡의 전분내 아밀로오스 함량은 iodine method를 이용하여 측정하였다.

⑪ High Performance anion exchange chromatography (HPAEC)를 이용하여 효소에 의해 변성된 전분 구조 변화 측정

떡 중에 포함되어 있는 효소 처리된 전분의 branched chain length distribution을 결정하기 위하여 떡으로부터 분리한 전분을 isoamylase (Hayashibara biochemical Laboratories, Okayama, Japan)와 25 mM NaOAc buffer (pH4.3), 60°C에서 60분간 반응시켜 debranching 시켰다. 5분간 가열하는 것에 의해 반응을 종결시켰고, branched chain length distribution이 HPAEC system (Dionex-300, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) 에 의해 결정되었다.

⑫ Size exclusion chromatography (SEC)-multi angle laser-light scattering (MALLS)-refractive index (RI) analysis에 의한 특성

떡 중에 포함되어 있는 전분의 molecular weight distribution이 multi-angle laser light scattering (SEC-MALLS-RI system Dawn DSP, Wyatt Technology, St. Barbara, CA, USA)에 의해 측정되었다.

⑬ Differential scanning calorimetry (DSC)에 의한 떡 노화도의 결정

떡의 노화도는 떡을 4°C에서 24시간 저장한 후 DSC(Seiko, Okuma, Japan)에 의해 측정되는 흡열피크의 엔탈피를 구하는 것에 의해 결정되었다. 떡가루와 물의 비율을 1:1로 하여 총 10 mg을 알루미늄 팬에 밀봉하고 20°C에서 120°C까지 분당 5°C (5°C/min) 비율로 증가시키면서 실험하였다.

⑭ 떡의 조직감 측정

Texture analyzer를 이용하여 효소처리된 떡의 조직감을 측정하였다. 시료는 2cm×2cm×1cm로 잘라 사용했으며, resilience test와 TPA test를 하였다. TPA test는 compression test로 원형 probe를 이용하였으며 측정 속도는 1mm/sec로 80% 변형도에서 측정하였다.

(나) 연구결과

① TSaGTase 처리한 쌀가루로 제조한 떡의 특성

㉠ 백설기의 아밀로오스 함량

표 7에 나타낸 것과 같이 TSaGTase 처리한 쌀가루의 아밀로오스 함량이 12.7%로 처리하지 않은 쌀가루의 16.6%보다 낮게 나타났다. 다른 연구들의 보고에 의하면 전분의 노화는 부분적으로 아밀로오스 분자들의 재결합에 의해 초래될 수 있으며, 아밀로오스 함량을 감소시켰을 때 저장중 전분의 노화가 지연될 수 있다고 하였는데(24), 이러한 TSaGTase 처리한 쌀가루의 아밀로오스 함량 감소에 관한 결과는 TSaGTase 처리한 쌀가루로 제조한 떡의 노화가 지연될 수 있는 가능성을 시사해주었다.

표 7. TSaGTase 처리한 백설기의 아밀로오스 함량

	Amylose Contents* (%)	Relative Amylose Contents (%)
Control	16.6±0.44	100
TSaGTase-treated	12.7±0.07	76.5

$$* \text{ Amylose Contents (\%)} = \frac{\text{amylose content in the sample (mg/ml)}}{\text{total starch content in the sample (mg/ml)}} \times 100$$

㉔ 백설기의 구조 분석

TSaGTase 처리한 쌀가루로 제조한 백설기의 maltooligosaccharide의 양을 측정된 결과는 표 8과 그림 11에 나타내었다. 포도당 2-6개 (G2-G6)를 갖는 maltooligosaccharide가 TSaGTase 처리한 백설기의 경우 처리하지 않은 백설기와 비교하여 더 많이 포함되어 있음을 알 수 있었다(18). TSaGTase 처리한 쌀가루에서 G2-G6의 양이 증가한 것은 TSaGTase의 disproportionation reaction 때문인 것으로 생각되며, 이러한 저분자 물질들이 떡의 노화에 영향을 줄 것으로 생각되었다.

TSaGTase 처리한 백설기내 전분의 분자량 분포도는 HPLC로 측정하였으며, 평균 분자량 (Average molecular weight, Mw)이 SEC-MALLS-RI system에 의해 측정되었다 (그림12, 표 9). HPLC에 의해 측정된 TSaGTase 처리한 백설기의 elution profile은 3개의 fraction을 갖는 것으로 나타났으며, 첫 번째 fraction은 아밀로펙틴에 의해 나타나는 것으로 TSaGTase 처리하지 않은 백설기의 elution time과 같은 위치에서 나타났으나, 피크는 감소함을 알 수 있었다. 반면 세 번째 fraction은 효소처리 후 크게 증가하였고, 평균 분자량은 10^5 g/mol로 측정되었다. 세 번째 fraction은 효소의 hydrolysis와 disproportionation에 의해 재배열된 modified amylopectin과 작은 크기의 amylopectin cluster들에 의한 것으로 생각되며 이러한 전분 구조의 변화가 TSaGTase 처리한 백설기의 노화와 조직감에 영향을 줄 것으로 생각되었다(17-18, 25).

아밀로펙틴의 side chain-length distribution은 HPAEC에 의해 조사되었으며 결과는 그림 13과 14 나타내었다. TSaGTase 처리한 백설기의 경우는 짧은 side chain (DP 1-9)이 증가한데 반해, 긴 side chain (above DP 10)은 크게 감소함을 알 수 있었다. TSaGTase는 disproportionation process를 촉매하기 때문에, 반응 중 amylose가 amylopectin의 side chain으로 옮겨질 수 있으며, 그 결과 amylose 함량이 감소하고 더 넓은 chain length distribution을 나타내는 amylopectin을 형성하는 것으로 알려져 있다. DP 14-24를 갖는 chain이 증가할수록 전분의 노

화가 촉진되며, DP 6-9를 갖는 짧은 chain이 증가할수록 전분의 노화가 저하된다는 보고들을 고려한다면, TS α GTase에 의해 변형된 side chain profile을 나타내는 TS α GTase 처리한 백설기의 노화가 TS α GTase 처리하지 않은 백설기와 비교하여 저하될 것으로 생각된다 (26).

표 8. TS α GTase 처리한 백설기에서의 maltooligosaccharide의 조성

	Malto-oligosaccharide (mg/g rice cake)						
	G2	IG2	G3	Pan	G4	G5	G6
Control	12.00 \pm 0.72	0.46 \pm 0.02	2.09 \pm 0.11	1.51 \pm 0.01	0.61 \pm 0.02	0.47 \pm 0.04	0.30 \pm 0.00
TS α GTase-treated	28.93 \pm 1.03	0.90 \pm 0.12	11.93 \pm 0.46	3.71 \pm 0.04	4.22 \pm 0.10	3.91 \pm 0.07	2.66 \pm 0.07

G2, maltose; IG2, isomaltose; G3, maltotriose; Pan, panose; G4, maltotetraose; G5, maltopentaose; G6, maltohexaose

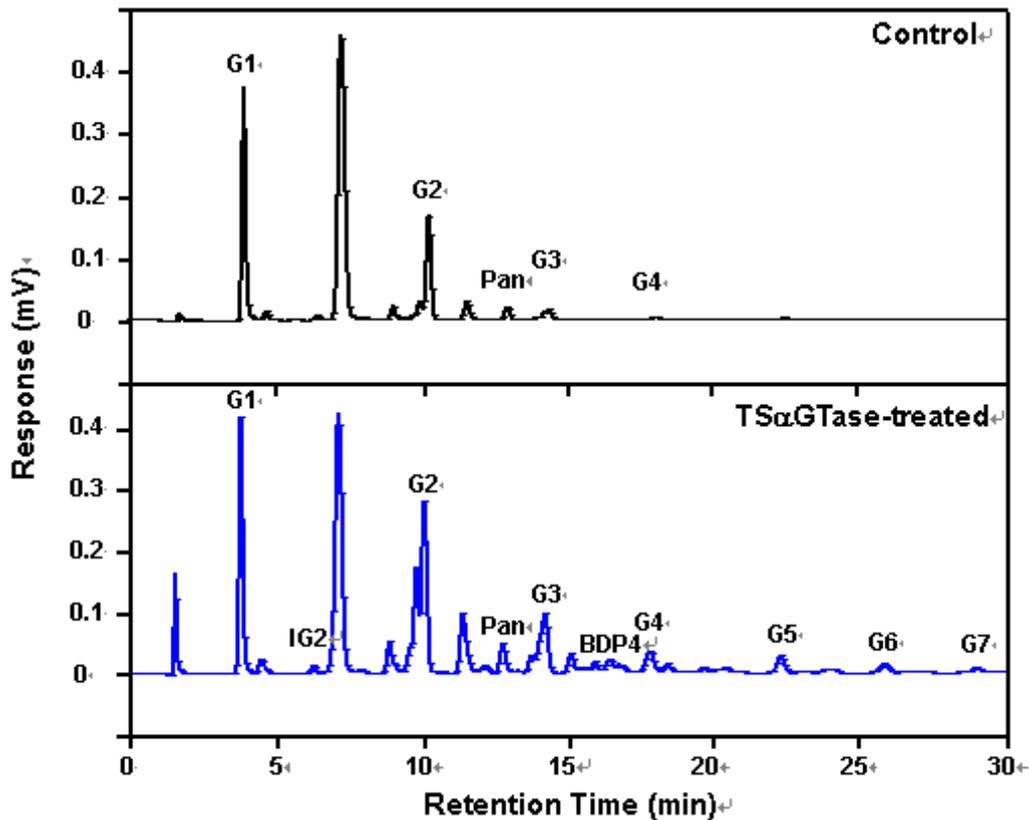


그림 11. TS α GTase 처리한 백설기에서의 maltooligosaccharide의 조성

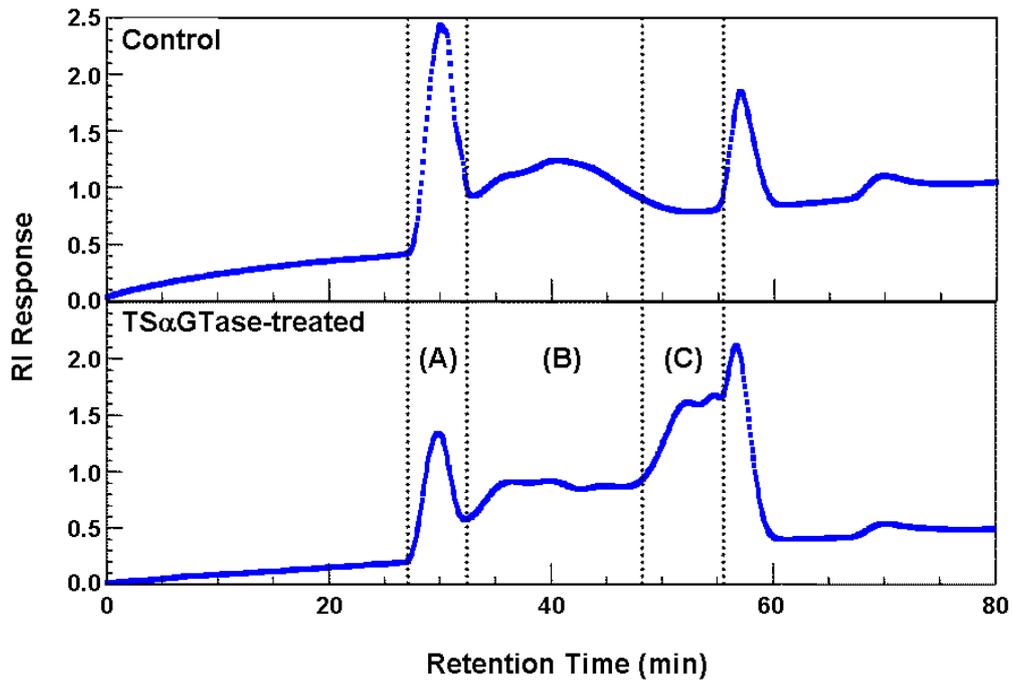


그림 12. TSαGTase 처리한 백설기내 전분의 SEC-MALLS-RI chromatogram (TSGTase와 75C에서 3시간 반응)

표 9. TSαGTase 처리한 백설기내 전분의 분자량 분포도

	^a The amount of starch (mg)		
	^b Fraction		
	(A)	(B)	(C)
Control	0.36	0.47	0.05
TSαGTase-treated	0.21	0.55	0.47

^aThe amount of starch is the recovered mass in each fraction from the injected mass of 2 mg.

^bA, B, and C are fractions obtained at different retention times in the MALLS-analysis.

The corresponding M_w of each fraction is as follows; (A) 4.7×10^7 , (B) 2.8×10^6 , (C) 1.3×10^5 g/mol.

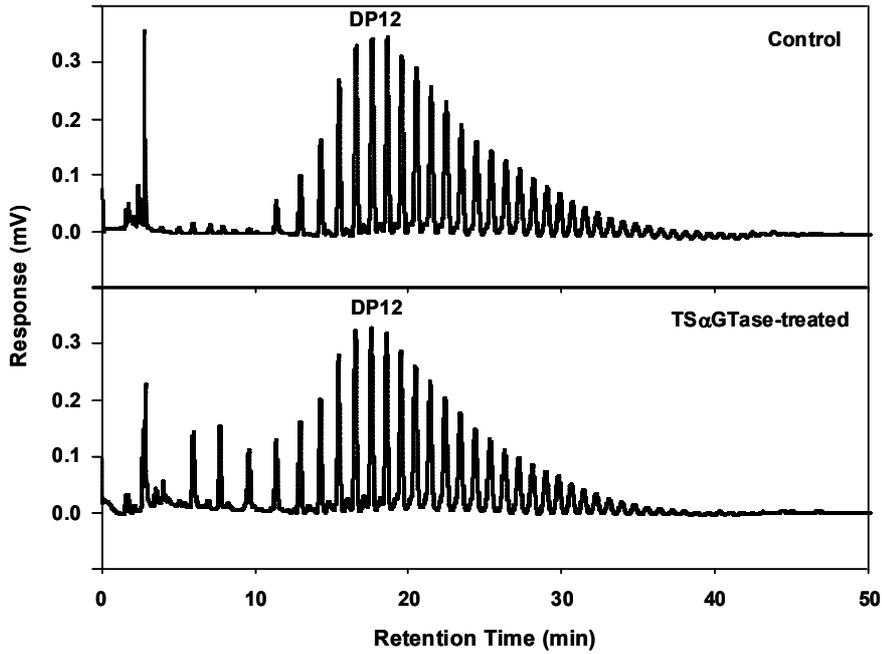


그림 13. TSαGTase 처리한 백설기내 전분 아밀로펙틴의 측쇄사슬 길이 분포도

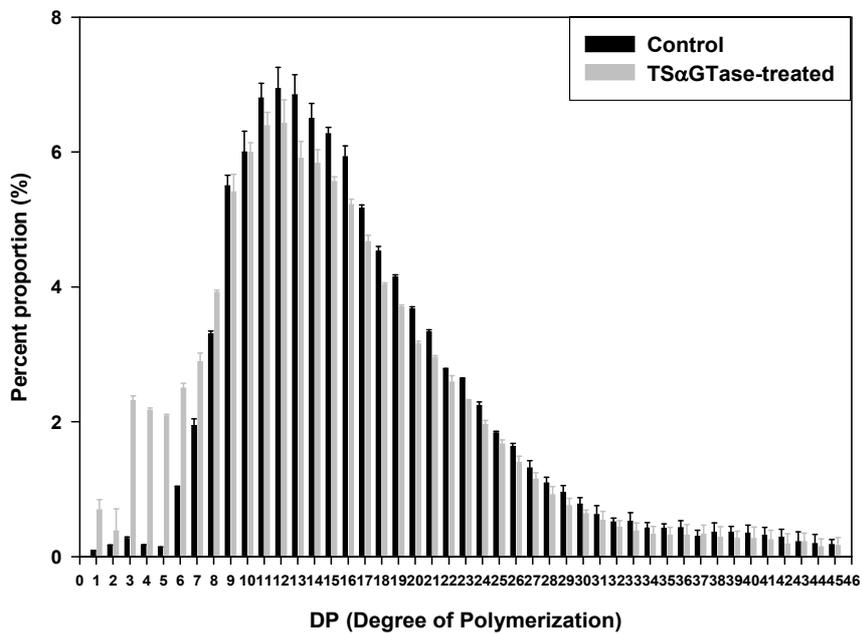


그림 14. 아밀로펙틴 측쇄 사슬 길이 각각의 면적 %

㊤ 저장 중 TSαGTase 처리한 백설기의 안정성

DSC thermogram의 40-60°C 정도에서 나타나는 흡열피크의 엔탈피 (ΔH)를 측정하여 전분 노화정도를 비교하였다 (그림15. 16). 백설기를 저장하면서 측정한 엔탈피 값은 TSαGTase 처리한 백설기의 경우 처리하지 않은 백설기에 비해 낮게 나타났으며, 4°C에서 24시간 저장한 후

에도, TSaGTase 처리한 백설기의 경우는 상당히 낮은 수준 (0.4 mJ/mg)의 엔탈피 값을 나타내었다. 이러한 결과는 TSaGTase 처리가 백설기의 노화를 저하시킬 수 있음을 시사해주었는데, 효소처리가 노화를 저하시킬 수 있는 기작에 대해서는 확실히 밝혀져 있지는 않지만, 두가지 기작이 가능하리라 생각된다. 한 가지는 TSaGTase 처리에 의해 변형된 amylopectin이 전분분자의 association에 의한 matrix가 형성되는데 있어 효과적이지 않는 구조를 갖을 수 있다는 것과, 또 한가지는 효소 반응중 생성되는 oligosaccharide가 전분의 노화를 지연시키는데 효과가 있을 것이라는 것이다 (27). 결국 TSaGTase 처리에 의한 amylose 함량의 감소와 amylopectin rearrangement, malto-oligosaccharides의 형성과 같은 기작들이 TSaGTase 처리된 백설기의 노화를 감소시키는 결과를 초래한 것으로 사료된다.

TSaGTase 처리한 백설기의 조직감이 TPA analysis를 이용하여 조사되었다. TSaGTase 처리한 백설기의 경도(hardness)가 4°C에서 24시간 저장했을 때, 처리하지 않은 백설기보다 낮은 값을 나타냈으며, 응집성(cohesiveness)은 유사한 값을 나타내었다 (표 10).

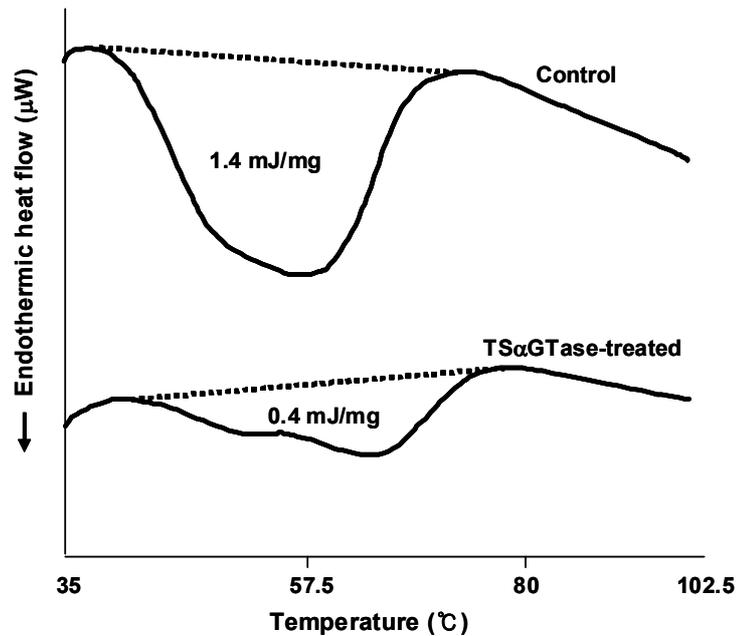


그림15. 4°C에서 24시간 저장한 백설기의 DSC thermograms

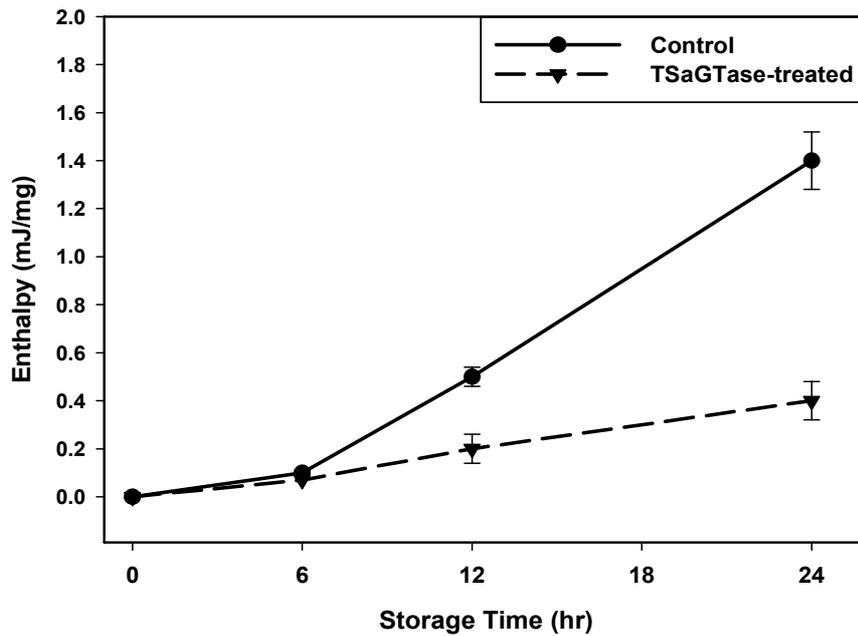


그림 16. 4°C에서 24시간동안 저장하는 동안 측정된 TSaGTase 처리 백설기의 노화율

표 10. 4°C에서 24시간 저장한 TSaGTase 처리 백설기의 텍스처 특성

Properties	Control	TSaGTase-treated
hardness	11280.0	5241.12
cohesiveness	0.408 (±0.01)	0.422 (±0.02)
springiness	0.899 (±0.001)	0.609 (±0.01)
chewiness	4138.42	1373.32

㉠ 저장 중 TSaGTase 처리한 증편의 안정성

TSaGTase 처리한 증편을 4°C에서 24시간 저장한 후, 측정된 노화도와 조직감은 그림 17, 18과 표 11에 나타내었다. 백설기의 결과와 마찬가지로 TSaGTase 처리한 증편의 저장 후 엔탈피가 처리하지 않은 증편보다 낮은 값을 나타내었고, 증편이 저장됨에 따라 원래의 조직감이

소실되었으나, 소실되는 정도가 TSαGTase 처리한 증편의 경우 처리하지 않은 증편에 비해 감소하였음을 알 수 있었다.

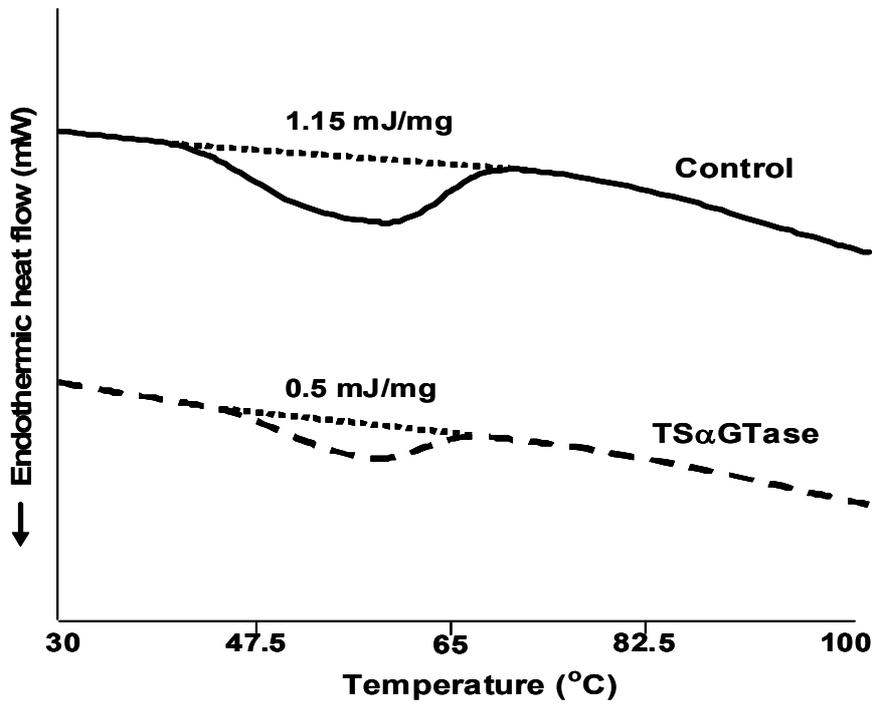


그림 17. 4°C에서 24시간 저장한 증편의 DSC thermograms

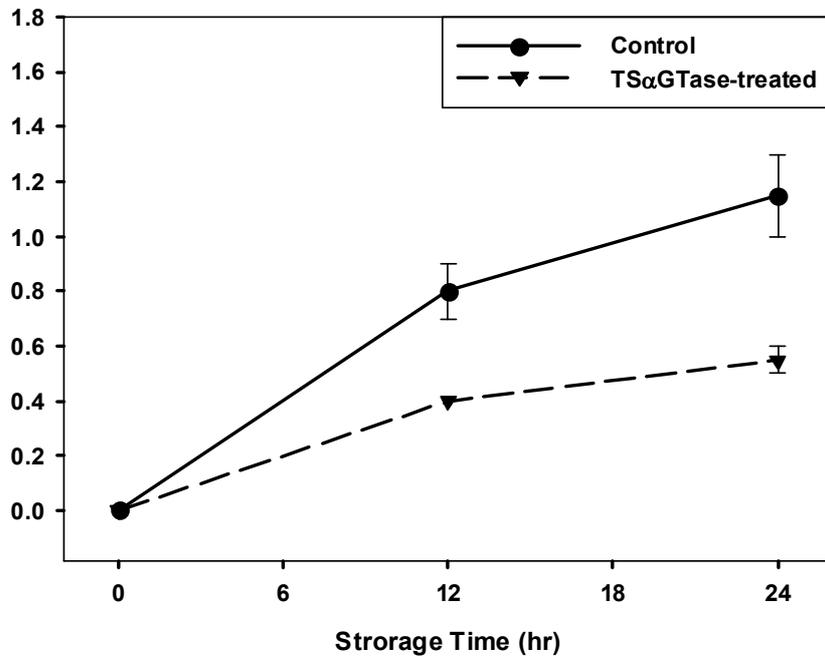


그림 18. 4°C에서 24시간동안 저장하는 동안 측정된 TSαGTase 처리한 증편의 노화율

표 11. 4°C에서 24시간 저장한 TSaGTase 처리 증편의 텍스처 특성

② BSMA- 처리한 떡의 특성

㉠ BSMA 처리한 증편에 포함된 전분의 side chain distribution

BSMA 처리한 증편에 포함된 전분의 짧은 side chain (DP 1-19)은 BSMA 처리하지 않은 경우에 비해 증가한 반면 긴 chain (above DP 20)은 감소하였다(그림 19). 그러나 이러한 변화는 TSaGTase의 처리와 비교했을 때는 적은 것이었다. *Thermus maltogenic amylase*의 기질 특이성과 구조를 연구한 보고에 의하면, 효소의 dimeric form은 효소의 active site를 좁게 하며 이로 인하여 bulky한 전분 분자들에 대한 효소의 활성도가 제한된다고 보고 하였다

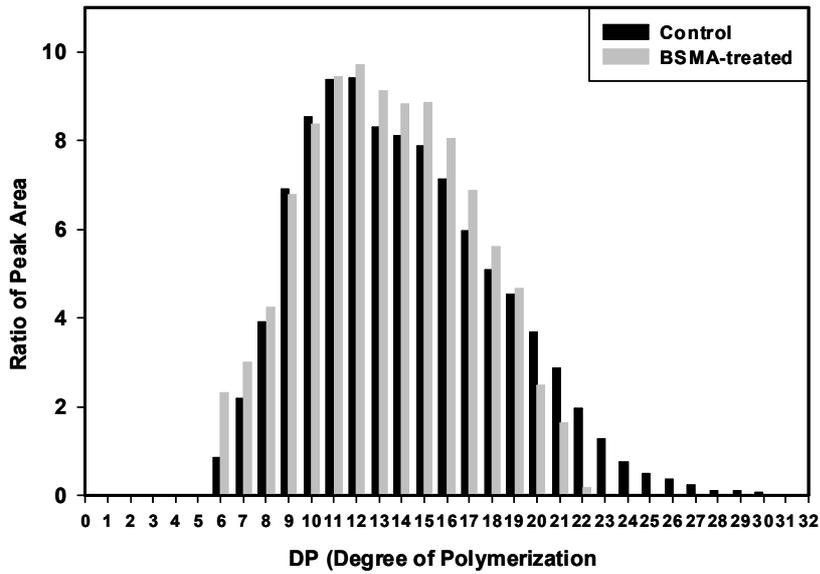


그림 19. 아밀로펙틴 측쇄 사슬 길이 각각의 면적 %

㉞ BSMA 처리한 증편의 저장 중 안정성

BSMA 처리한 증편의 저장 중 노화도와 조직감이 DSC와 텍스처 측정기에 의해 측정되었다. BSMA 처리한 증편의 경우는 TSaGTase 처리한 떡에서의 노화감소를 만큼 노화를 저하시키지는 못하였으나, 효소처리하지 않은 증편에 비해 노화도가 감소함을 확인할 수 있었다. 4°C에서 24시간 저장한 후의 경도 역시 BSMA 처리한 증편이 처리하지 않은 증편에 비해 낮은 값을 나타냈으나, TSaGTase 처리한 떡과 비교했을 때 감소폭이 적었다. 이러한 결과들을 통해 TSaGTase 처리가 BSMA 처리에 비해, 떡의 노화를 저하시키고, 조직감을 향상시키는데 있어 더 효과적임을 확인할 수 있었다.

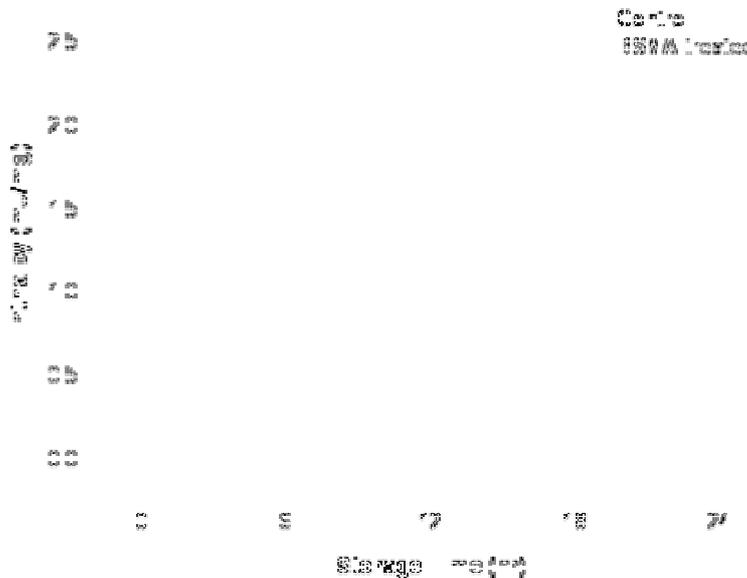


그림 20. 4°C에서 24시간 저장한 BSMA 처리 증편의 노화율

표 12. 4°C에서 24시간 저장한 BSMA 처리 증편의 텍스처 특성

③ 효소반응에 의해 생성된 isomaltooligosaccharides (IMO)를 첨가한 떡의 제조

㉞ IMO의 조성

BSMA에 의해 생성된 IMO의 조성이 HPAEC에 의해 측정되었고, 그 결과는 표 13에 나타내었다. 생성된 IMO는 주로 isomaltose, panose, isopanose, branched pentose였으며, 적은 양의 glucose, maltose가 포함되어 있었다. 그러므로 sucrose나 oligosaccharide와는 다르게, IMO는 강한 단맛을 피해야 하는 식품에 첨가제로써 사용하기에 적합할 것으로 기대되었으며 (28), 백설기와 증편을 제조할 때, IMO를 첨가하고 떡의 특성에 대한 IMO의 효과를 조사하였다.

㉟ IMO가 첨가된 백설기의 저장 중 안정성

IMO가 첨가된 백설기의 노화도를 DSC에 의해 측정되는 엔탈피 값을 결정하는 것에 의해 조사하였다 (그림 21-23). 4°C에서 24시간 저장한 후 측정된 엔탈피는 IMO가 첨가된 백설기와 첨가하지 않은 백설기가 각각 1.2 mJ/mg, 2.4 mJ/mg로 IMO가 첨가된 백설기가 더 낮았다. 증편 역시 IMO를 첨가했을 때, 노화 엔탈피가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. TPA 결과는 표 14에 나타내었다. 시료간에 응집성 (cohesiveness), 탄성 (springiness)의 차이는 보이지 않았으나, 4°C에서 24시간 저장 후, IMO를 첨가하지 않은 증편의 경도 (hardness)와 씹힘성 (chewiness)는 증가하였다. 이러한 결과들은 IMO 첨가가 떡의 노화를 저하시키고, 조직감을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

표 13. IMO의 조성

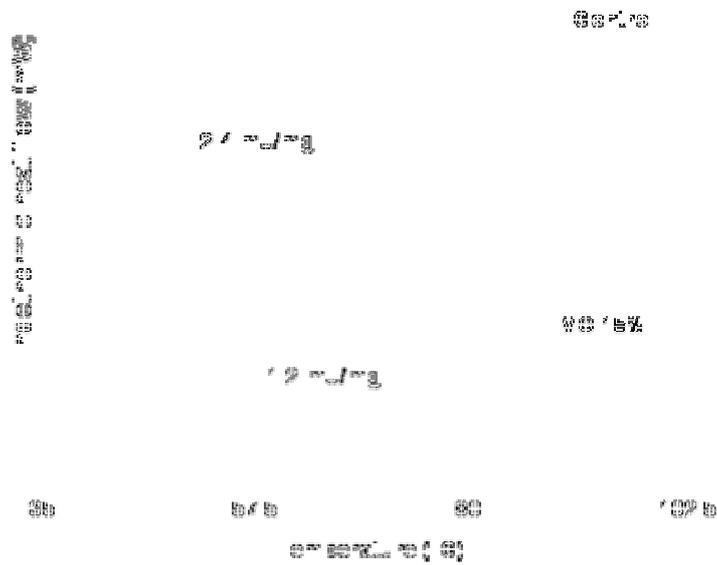


그림 21. 4°C에서 24시간 저장한 IMO 첨가 백설기의 DSC thermogram

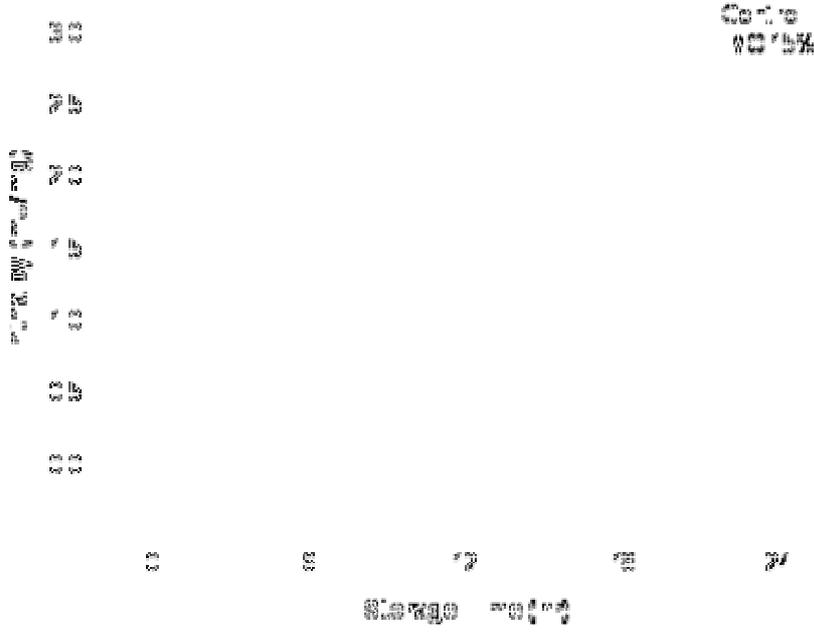


그림 22. IMO가 첨가된 백설기의 노화율

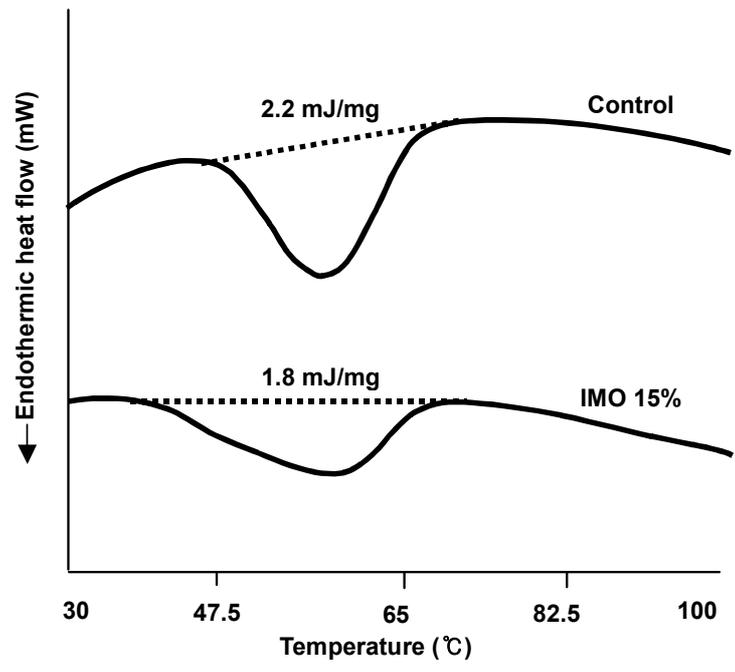


그림 23. IMO가 첨가된 증편의 DSC thermogram
(4°C에서 24시간 저장)

표 14. IMO가 첨가된 증편의 텍스처 특성 (4°C에서 24시간 저장)

Properties	Control	IMO
hardness	21059.19	12914.40
cohesiveness	0.53	0.50
springiness	0.71	0.70
chewiness	10909.43	7299.11

㉔ IMO가 첨가된 백설기의 냉·해동 안정성

IMO가 첨가된 백설기의 냉·해동 안정성에 관한 결과는 그림 24에 나타내었다. 냉동과 해동을 3회 반복하는 과정 중, 엔탈피는 IMO를 첨가하지 않은 백설기가 1.2 mJ/mg이고, 15% IMO를 첨가한 백설기가 0.8 mJ/mg으로 IMO를 첨가한 백설기의 냉·해동 과정 중 나타내는 엔탈피가 더 낮은 것을 확인할 수 있었다. 증편의 경우도 백설기의 결과와 같았다 (그림 25).

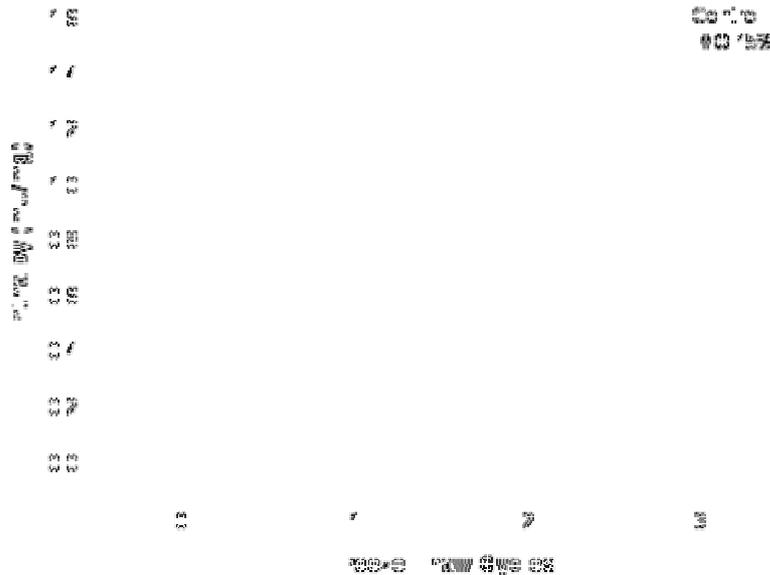


그림 24. 냉해동 과정에서 IMO가 첨가된 백설기의 노화율

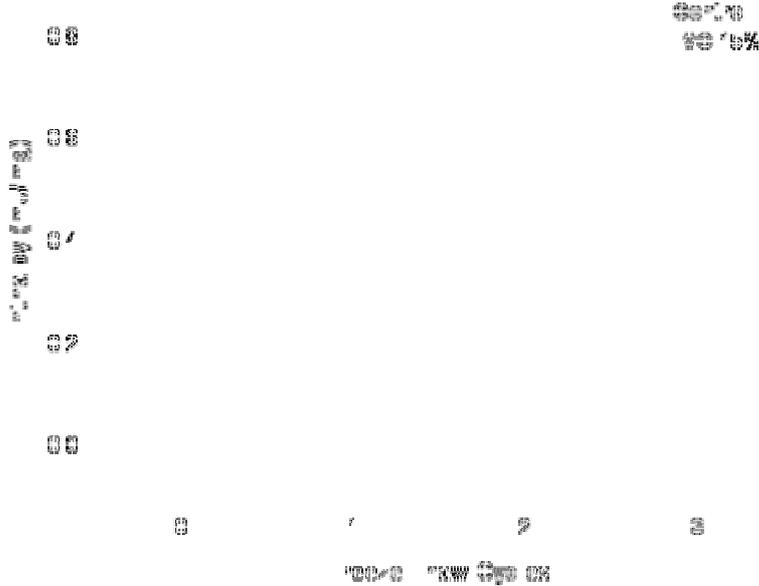


그림 25. 냉해동 과정중 IMO가 첨가된 증편의 노화율

④ 효소 처리한 쌀가루 (기능성 소재)를 이용한 떡의 제조

㉞ 효소 처리 한 쌀가루(소재)의 분자량 분포

효소 처리를 한 쌀가루의 분자량 배열 특성(the molecular weight distribution)은 그림 26에 나타내었다. 쌀가루에 4αGTase를 처리하는 시간이 커질수록 아밀로오스와 아밀로펙틴의 중간 분자량과 작은 분자량의 분획들이 증가함을 알 수 있었다.

아밀로오스 함량의 감소와 체인 길이의 감소가 4αGTase를 처리한 쌀가루에서 분자량을 감소시키는 결과를 나타냈다고 볼 수 있다. 분자량의 분포에 따라 1시간, 3시간, 48시간 효소 처리한 소재를 선택하여 떡에 첨가하였고, 제조된 떡의 특성에 미치는 영향을 조사하였다.

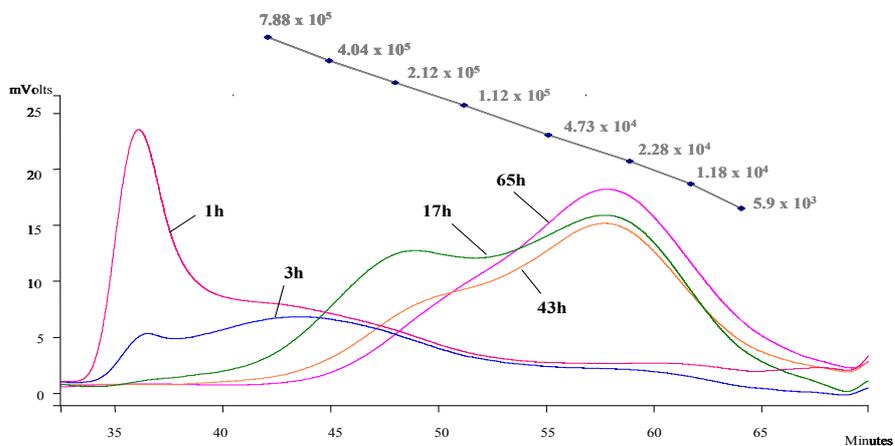


그림 26. 4αGTase 처리한 쌀가루의 분자량 분포도

㉔ 소재를 첨가한 백설기 떡의 저장 중 텍스처의 변화

4αGTase를 각각 1, 3, 48시간 동안 처리하여 제조한 쌀가루 소재를 백설기 떡에 첨가하고, 저장기간에 따른 물성 특성을 two bite compression test에 의해 얻어진 7개 항목의 TPA 특성치로 나타내었다 (표 15). 떡의 견고성을 나타내는 hardness의 경우 4αGTase를 1시간 처리한 소재를 10%, 20% 첨가한 경우만 첨가하지 않은 떡보다 낮은 값을 보였고, 다른 첨가군들은 첨가하지 않은 떡에 비해 높은 hardness 값을 나타내었다. 저장 2일째에는 4αGTase를 3시간 처리한 소재를 20% 첨가한 떡의 경우도 소재를 첨가하지 않은 떡보다 낮은 값을 보였으나, 전체적인 경향은 효소처리를 한 시간이 증가할수록 hardness는 증가하는 경향을 나타내었다. 떡의 내부적인 결합력 및 응집성을 나타내는 cohesiveness의 경우, 4αGTase 3시간, 48시간 처리한 소재를 10%, 20% 첨가한 떡이 소재를 첨가하지 않은 떡보다 다소 높은 값을 나타냈다. 그러나 저장 2일 후에는 4αGTase를 48시간 처리한 소재를 10% 첨가한 떡의 경우만 소재를 첨가하지 않은 떡과 비슷한 값을 나타내었고, 나머지 시료들은 모두 소재를 첨가하지 않은 떡보다 낮은 값을 보였다.

떡의 탄력성을 나타내는 springiness의 경우도 소재를 첨가한 떡이 첨가하지 않은 떡에 비해 모두 낮은 값을 보였고, 특히 4αGTase를 1시간 처리한 소재를 20% 첨가하여 제조한 떡이 가장 낮은 값을 보였다. 저장 2일 후에도 그 경향은 같아서 1시간 처리한 샘플이 가장 낮은 값을 보였다. 또한 부착성을 나타내는 adhesiveness는 저장 0일에는 20% 첨가군들이 소재를 첨가하지 않은 떡이나 10%첨가군에 비해 월등히 높은 값을 보였지만 저장 2일 후에는 첨가하지 않은 떡, 10%, 20% 첨가 순으로 높은 값을 보였고, 소재별로는 3시간, 1시간 처리군이 비슷하고 48시간 처리군은 낮은 값을 보였다. 씹힘성을 나타내는 gumminess 및 chewiness는 4αGTase를 48시간 처리한 소재를 10% 첨가한 떡이 저장 0, 2일 모두 가장 높은 값을 나타내었으며 1시간 처리군은 저장 전 후 모두 첨가하지 않은 떡보다 낮은 값을 보였다. 떡의 복원성을 나타내는 resilience의 경우 4αGTase를 48시간 처리한 소재를 10% 첨가한 떡이 가장 높은 값을 나타냈고, 1시간 처리군을 20% 첨가한 떡이 가장 낮은 값을 나타내었다. 이와 같은 결과들로 비추어 봤을 때 소재를 첨가한 떡은 효소처리시간이 증가할수록 견고해지는 경향이었으나, 소재를 첨가하지 않은 떡에 비해서 씹힘성이 좋고 복원성이 다소 높은 특성을 가짐을 알 수 있었다.

표 15-1. 4αGTase 처리 쌀가루를 첨가하여 제조한 백설기의 텍스처 특성

(실온에서 2일간 저장, 10% 첨가)

Texture Parameter	samples	Storage period(day)	
		0	2
Resilience	control	0.49	0.56
	1hr	0.47	0.49
	3hr	0.48	0.56
	48hr	0.52	0.60
Hardness	control	2738	5265
	1hr	2647	4403
	3hr	4298	6015
	48hr	4770	5898
Adhesiveness	control	-41	-69
	1hr	-34	-29
	3hr	-51	-34
	48hr	-40	-14
Cohesiveness	control	0.46	0.30
	1hr	0.42	0.27
	3hr	0.49	0.26
	48hr	0.49	0.30
Springiness	control	0.44	0.69
	1hr	0.35	0.48
	3hr	0.38	0.65
	48hr	0.44	0.59
Gumminess	control	1262	1585
	1hr	1124	1177
	3hr	2109	1546
	48hr	2354	2264
Chewiness	control	557	1095
	1hr	398	550
	3hr	812	1038
	48hr	1040	1351

표 15-2. 4αGTase 처리 쌀가루를 첨가하여 제조한 백설기의 텍스처 특성

(실온에서 2일간 저장, 20% 첨가)

Texture Parameter	samples	Storage period(day)	
		0	2
Resilience	control	0.49	0.56
	1hr	0.44	0.36
	3hr	0.46	0.62
	48hr	0.53	0.63
Hardness	control	2738	5262
	1hr	2011	4265
	3hr	3508	4787
	48hr	4488	5898
Adhesiveness	control	-41	-69
	1hr	-77	-7
	3hr	-252	-3
	48hr	-212	-4
Cohesiveness	control	0.46	0.30
	1hr	0.43	0.28
	3hr	0.52	0.26
	48hr	0.48	0.27
Springiness	control	0.44	0.69
	1hr	0.30	0.44
	3hr	0.39	0.67
	48hr	0.44	0.63
Gumminess	control	1262	1585
	1hr	871	1184
	3hr	1829	1227
	48hr	2146	1628
Chewiness	control	557	1095
	1hr	265	518
	3hr	709	820
	48hr	933	1011

㉔ 효소처리한 쌀가루의 등온흡습특성

수분활성도가 0.8 이하수준에서는 효소처리를 한 쌀가루의 등온흡습 특성이 효소처리를 하지 않은 쌀가루에 비해서 대체적으로 낮은 편이었지만 0.8 이상 수준에서는 효소처리를 하지 않은 쌀가루에 비해서 월등히 높은 값을 보였고, 효소처리 시간이 증가할수록 높은 경향을 나타내었다. 이것은 분자 구조적으로 보았을 때 효소처리를 한 쌀가루가 낮은 분자량을 가지게 되어 훨씬 더 수분과 결합할 수 있는 능력이 커진 결과라고 말할 수 있다.

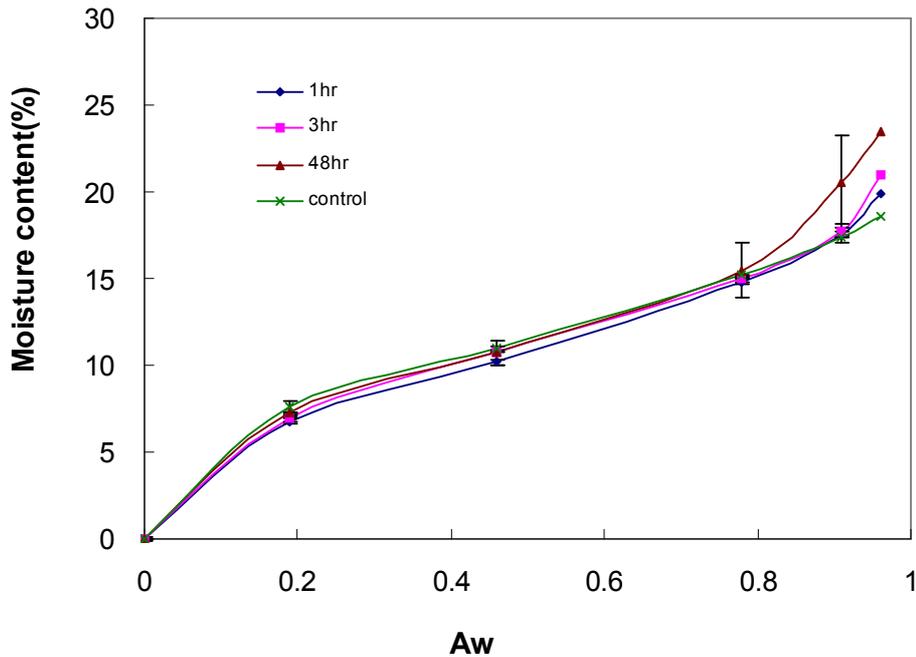


그림 27. 4αGTase 처리한 쌀가루의 등온흡습곡선

㉔ 소재를 첨가한 백설기 떡의 등온흡습특성

소재를 첨가한 백설기의 등온흡습 특성은 쌀가루 소재를 10% 첨가하였을 때와 20% 첨가하였을 때가 다른 양상을 보였다. 먼저 10%를 첨가했을 때는 수분활성도가 0.7이상이 될 때부터 48시간 효소 처리한 소재가 첨가된 떡이 가장 높은 수분함량을 나타내었고, 20%를 첨가했을 때는 수분활성도가 0.6이상이 될 때부터 3시간 효소 처리한 소재가 첨가된 떡이 가장 높은 수분함량 값을 보임으로써 소재와는 다른 등온흡습특성을 나타냈다. 그러나 소재를 첨가한 백설기가 첨가하지 않은 백설기에 비해서는 항상 높은 수분함량을 가져 보수력의 면에서 첨가하지 않은 백설기보다 항상 높은 특성을 가짐을 알 수 있었다.

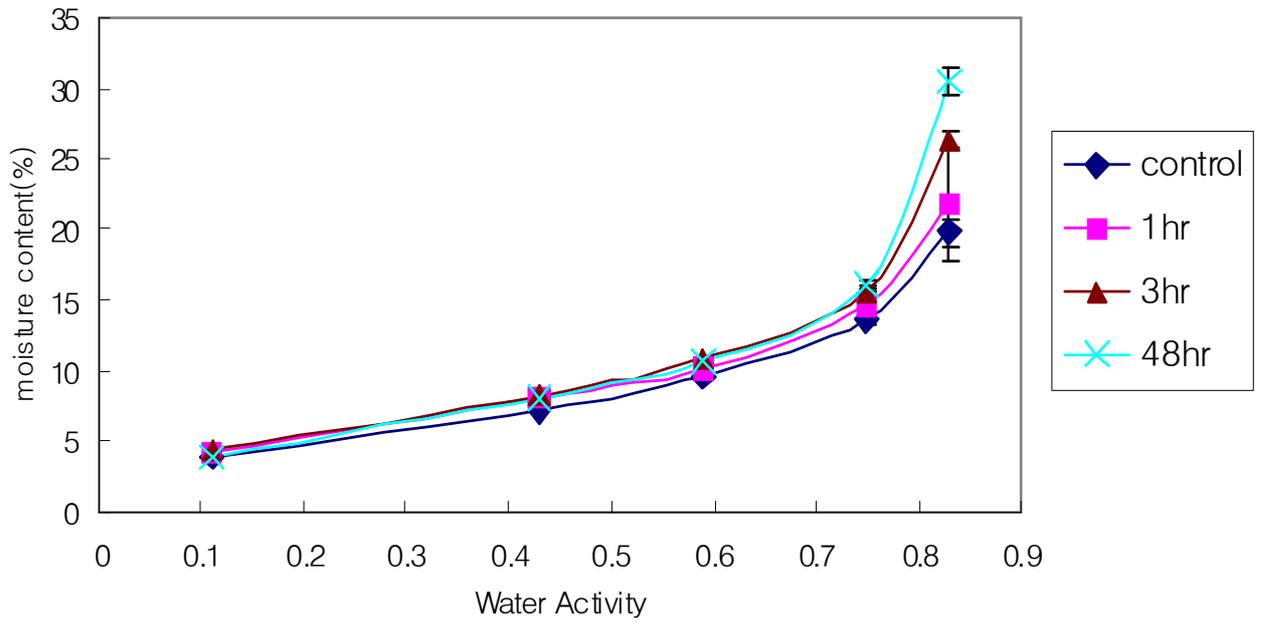


그림 28. 4αGTase-처리 쌀가루를 10% 첨가하여 제조한 떡의 등온흡습곡선

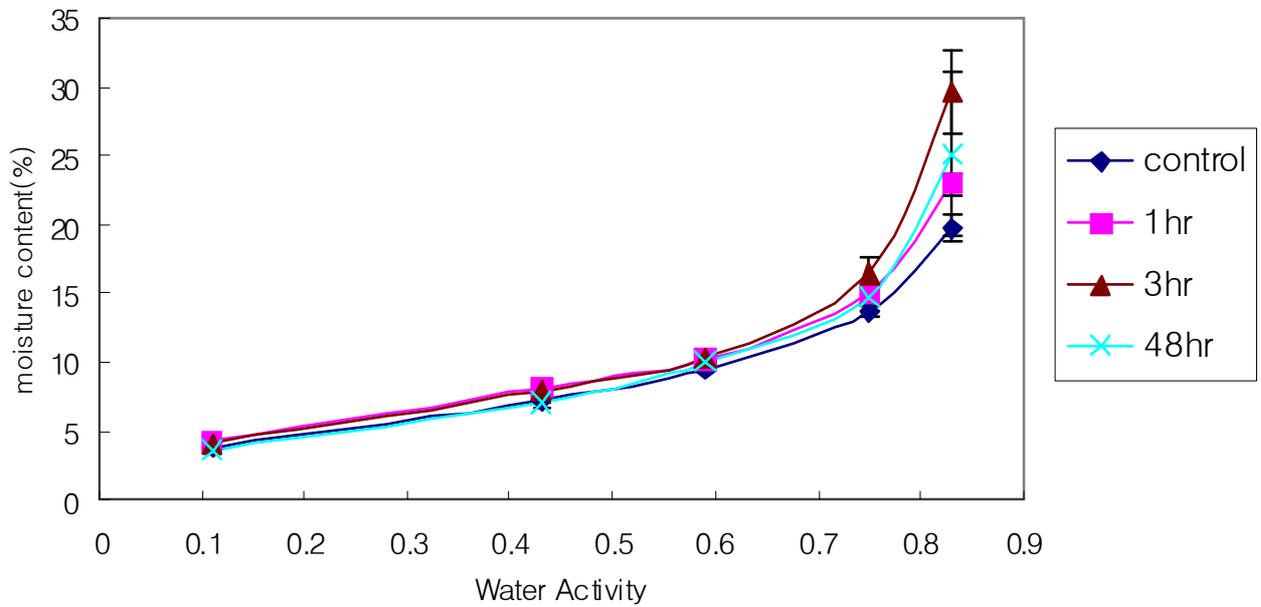


그림 29. 4αGTase-처리 쌀가루를 20% 첨가하여 제조한 떡의 등온흡습곡선

㉔ RVA를 이용한 쌀가루의 호화특성

4αGTase 처리를 한 쌀가루 소재가 쌀가루의 호화특성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 4αGTase 를 1, 3, 48 시간 처리하여 생성된 쌀가루 소재를 쌀가루에 각각 10, 20% 첨가하여 호화특성을 조사하였다 (표 16). 쌀가루 소재가 첨가된 쌀가루가 보통의 쌀가루에 비해 더 낮은 점도를 나타냈는데, 이는 쌀가루 중의 전분 분자들이 효소에 의해 분해되어, 중간 분자량과 작은 분자량을 갖는 분자들이 다량 형성됨으로써, 큰 분자량을 갖는 보통의 쌀가루에 비해 낮은 점도를 나타내었을 것으로 생각되었다. 점도는 효소반응 시간이 증가함에 따라 그리고 소재 첨가량이 많을수록 감소하였다. 효소반응 시 생성되는 작은 분자들이 쌀가루가 노화될 때, 단단한 전분 matrix가 형성되는 것을 방지하여, 쌀가루의 노화를 지연시킬 수 있을 것으로 생각되었다.

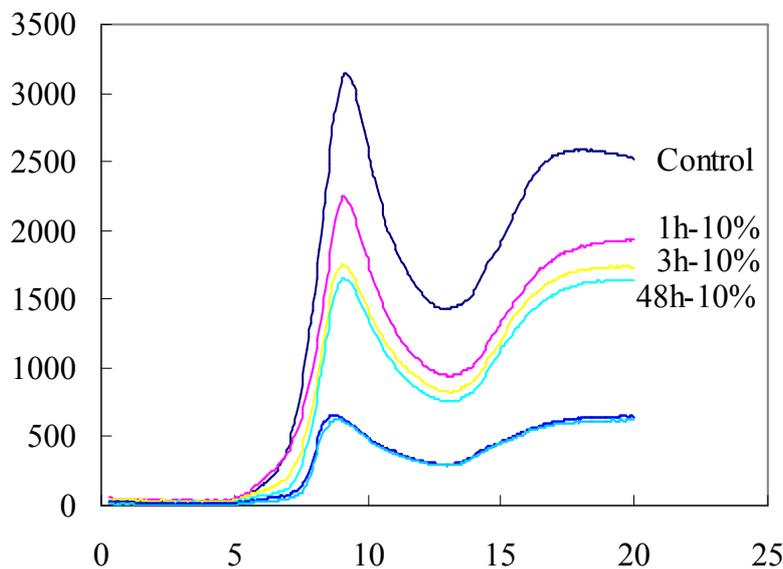


그림 30. RVA를 이용한 쌀가루의 호화특성

㉕ X-ray diffraction을 이용한 떡의 결정성 측정

X-선 회절도에 의한 특성은 그림 31에 나타내었다. 왼쪽은 저장하지 않은 떡의 X-선 회절도이고, 오른쪽은 저장 2일 후의 X-선 회절도이다. 왼쪽의 그림은 떡을 막 썬 다음 측정된 것으로 $2\theta=20^\circ$ 에서 강한 피크를 나타내는 V-결정형을 나타내었다. V형 결정은 아밀로오스와 지방산이 복합체를 형성했을 때 나타나는 결정형으로써 호화된 떡에서 나타낼 수 있는 결정타입이라고 생각되었다. 오른쪽 그림은 저장 후, 측정된 X-회절도로써, $2\theta=17^\circ, 23.2^\circ$ 에서 피크를 나타내는 B-결정형을 보여주었다. B형 결정타입은 노화 시료에서 나타나는 결정형으로, 소재를 첨가한 양이 많아질수록 그리고 효소를 처리한 시간이 길어질수록 $2\theta=17^\circ, 23.2^\circ$ 에서의 피

크가 감소함을 알 수 있었다. 그것은 효소처리를 한 소재를 첨가할 때 저장성이 더 좋아졌다고 볼 수 있다.

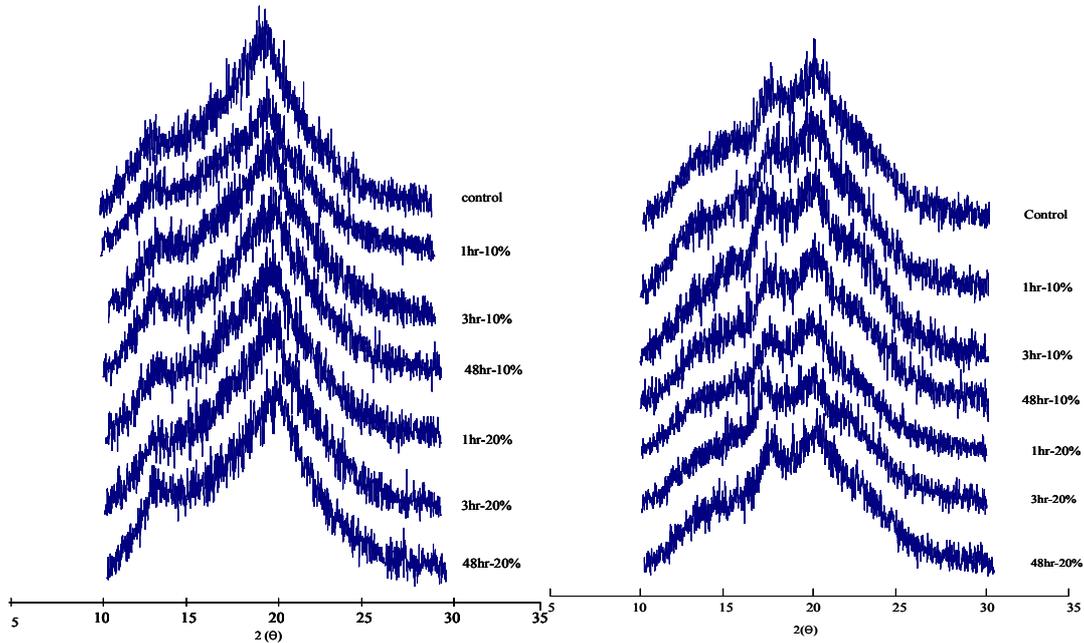


그림 31. X-ray diffraction을 이용한 떡의 결정성 측정
(왼쪽; 저장전, 오른쪽; 저장후)

(다) 2차년도 연구성과 고찰 및 결론

맞춤형 쌀전분, 쌀가루 및 기능성 식품소재 이용 떡제품의 가공적성 및 제품특성을 조사하기 위하여, 전분 효소를 처리한 쌀가루를 떡 제조에 직접 사용하는 방법과 먼저 효소처리에 의해 쌀가루 소재를 제조하고, 이를 떡 제조에 첨가하여 특성을 조사하는 두가지 방법으로써 연구가 진행되었다.

4- α -glucanotransferase와 *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase (BSMA)를 각각 쌀가루에 반응시켜 백설기와 증편을 제조한 후, HPAEC, GPC, Texture Analyzer, DSC를 이용하여 전분 분자 구조, 텍스처, 노화 특성을 분석하였다. TSaGTase를 처리한 떡의 amylose 함량은 대조구에 비해 20% 감소하였으며, 쌀 전분 분자 구조의 변화를 측정한 결과, amylopectin cluster 사이의 α -1,4 결합이 가수분해되어 분자량이 약 10^5 의 cluster가 생성되었고, 올리고당류가 생성되었다. 또한, 짧은 아밀로펙틴 측쇄 (degree of polymerization, DP < 9)는 증가한 반면, 긴 아밀로펙틴측쇄 (DP > 10)는 감소하였다. 4°C 냉장 저장 과정에서의 전분의 노화도는 효소 처리에 의해 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. BSMA 처리에 의한 쌀 전분 분자 구조를 분석한 결과, DP가 19 이하인 측쇄의 분포는 증가되었고, DP 20 이상인 긴 측쇄의 분포는 현저히 감소되었으며, 전분의 노화도는 감소하였다. BSMA와 α -GTase를 액화된 옥수수 시럽에 반응

시켜 isomaltooligosaccharides (IMO)를 제조하고, 생산된 IMO를 첨가하여 떡을 제조하였다. 4℃ 냉장 저장 및 냉해동 반복 후 떡의 노화 억제 효과를 관찰 한 결과, 대조구에 비해 IMO를 첨가한 떡의 노화도가 유의적으로 감소하였다. 효소처리에 의해 쌀가루 소재를 제조하고, 이를 떡 제조에 첨가한 경우 역시 쌀가루 소재를 첨가하지 않고 제조한 떡에 비해 노화가 저하될 수 있음을 보여주었고, 소재를 첨가한 떡은 효소처리시간이 증가할수록 견고해지는 경향이 있으나, 소재를 첨가하지 않은 떡에 비해서 씹힘성이 좋고 복원성이 다소 높은 특성을 가짐을 알 수 있었다. 이상의 결과들로 부터 다양한 탄수화물 효소에 의한 쌀 전분의 amylopectin 측쇄 분포 변화와 amylose 함량의 감소 및 IMO 등이 떡의 저장 중 전분 노화를 효과적으로 억제하고 품질을 향상시키는 데 기여했음을 확인할 수 있었고, 효소에 의한 전분 구조 수식은 떡을 비롯한 전분질 식품의 제조에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

(라) 4αGTase 처리 쌀가루를 첨가한 떡의 관능적 특성 조사

① 재료 및 방법

㉔ 관능검사용 떡의 제조

멥쌀가루는 삼립식품에서 제공받아 사용하였다. 대조군 및 4αGTase를 1시간, 3시간, 48시간 처리한 쌀가루를 각각 5% (dry basis) 수준으로 첨가하였고, 소재와 쌀가루 혼합물의 최종 수분함량은 38%가 되게 하였다. 아래와 같은 배합비로 재료를 혼합한 뒤 체에 내려 찜기에서 30분동안 찌 후, 10분동안 뜸을 들여 떡을 제조하였다.

표 16. 떡의 배합비

Ingredients (g)	Control	GT ¹⁾
Rice flour	200	193.3
α-GTase treated rice flour	0	6.7
Sugar	30	30
Salt	2	2
Water	31.5	34.6

¹⁾4αGTase 처리된 쌀가루가 첨가된 떡

㉔ 시료의 준비 및 제시

제조된 떡 시료를 밀봉하여 상온에서 4시간 및 24시간 방치하여 각각 저장 0일과 저장 1일 떡시료로 사용하였다. 평가시에는 제조된 떡을 2×2×1cm로 잘라 투명한 유리용기에 4조각씩 담아 상온에서 제시하였다. 무작위로 추출한 3자리 숫자를 각 용기에 표기하였으며, 매 평가 시 번호를 바꾸었다. 또한, 감각의 둔화를 방지하기 위하여 입을 가실 물을 함께 제시하였다. 관능검사는 칸막이가 있는 개별 검사대에서 수행되었다.

㉕ 패널 요원 선정 및 훈련

식품을 전공하는 대학원생 9명 (남자 2명, 여자 7명)을 선발하여 4주 동안 주 5회, 1회에 1시간 이상 다양한 텍스처를 가진 떡 제품 및 식품으로 훈련하여 다양한 텍스처 특성들을 익혔다. 또한 평가특성, 평가방법 및 평가 척도 사용에 익숙하도록 하였다. 각 특성에 대한 각 평가 특성에 대한 식별력과 특성의 강도에 대한 재현성을 확립한 후 관능검사에 임하도록 하였다.

㉖ 묘사분석 수행절차

평가할 떡에 대해 평가 특성을 추출하고, 특성들의 출현 순서, 평가 방법 및 표준시료를 확립하였다. 관능적 특성은 0에서 15점까지의 16 항목 척도를 사용하여 평가하였으며, 특성의 강도가 약한 것을 왼쪽에, 강한 것을 오른쪽에 나타내도록 하였다. 시료와 시료의 평가 사이에는 물로 충분히 입안을 가시도록 하였다. 평가된 특성과 특성 정의, 평가방법은 표 17에 제시하였다. 각 특성에 대하여 특성을 대표할 수 있는 표준시료를 선정하였다.

㉗ 통계분석

저장 0일과 1일 각각 4회 반복 평가한 결과에 대해 분산분석과 Duncan의 다중비교방법을 사용하여 통계분석을 실시하였다. 또한 텍스처 특성에 대해 주성분분석을 시하였다. 모든 통계분석은 SPSS 통계 package (version 12.0)을 사용하였다.

표 17. 평가할 떡에 대한 평가특성과 각 특성의 정의, 평가방법

Attribute	Definition	Evaluation technique
Texture		
Moistness of surface	Amount of water perceived	
Springiness	Amount the sample recovers when force is removed	Compress sample between the thumb and index finger.
Firmness	Force to attain a given deformation, usually force to bite completely through sample with incisors or molars	Bite down on sample with even pressure. Evaluate sample.
Toughness ¹⁾	Force required to bite through sample	Bite through sample with incisors until the sample is sheared.
Roughness of surface	Amount of irregularities, protrusions, grains, or bumps on sample surface	Place the sample between palate and tongue. Rub the surface of sample with tongue
Adhesiveness	Degree to which sample sticks to mouth surfaces or teeth	Bite through sample once with molars. Evaluate oral cavity.
Chewiness	Number of chews required to prepare sample for swallowing.	Chew sample at a constant rate and pressure until ready for swallowing; measure time or count chews to base intensity on.
Cohesiveness of Mass	Degree to which the mass holds together	Chew sample with molars to bolus, evaluate sample.
Starch-like (Residual)	Amount of starch-like residue perceived in oral cavity	After swallowing or expectoration of sample, evaluate mouth surfaces with tongue.
Crumbliness ²⁾	Possessing the textural property manifested by a tendency to break down easily into small, irregular particles	Bite through sample once with molars. Evaluate oral cavity.
Flavor and taste		
Steamed rice	The typical flavor from readily-prepared steamed rice	
Off-flavor	The flavor which was not expected from rice cakes, such as chemical flavor	
Sweetness	The typical taste of sucrose	

¹⁾ Only evaluated for rice cakes prepared on the day

²⁾ Only evaluated for rice cakes stored for 24hrs

② 연구결과

㉠ 제조 당일 떡의 관능적 특성

당일에 제조한 떡의 관능적 특성은 표 18에 나타내었다. 표면의 촉촉한 정도는 대조군에서 GT처리 쌀 첨가군 보다 유의적으로 높았다. 탄성은 GT48에서 가장 높게 나타났으며, GT1이 유의적으로 낮았다. 단단한 정도와 질긴 정도는 모든 시료 간에 유의적인 차이가 나타났으며, GT48이 가장 단단하며 질긴 것으로 나타났고, GT1은 이들 특성이 가장 약하였다. 표면의 거친 정도는 큰 차이가 나타나지 않았으나, GT48에서 높게 나타났다. 부착성은 GT48에서 다른 세 시료보다 유의적으로 높게 나타났다. 씹힘성과 응집성은 GT48과 대조군이 유의적으로 높았다. 가루기는 GT1에서 가장 높고 GT48에서 가장 낮았다. 밥 향미와 단맛은 유의적으로 차이가 없었다. 이취는 매우 낮은 값을 나타내었으며, 대조군과 4αGTase처리 시료군 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않았으므로, 4αGTase 처리 쌀가루의 첨가로 이취가 발생하지 않는다고 생각된다.

표 18. 4αGTase 처리 쌀가루가 첨가된 떡의 관능적 특성¹⁾

	Control	GT1	GT3	GT48
Moistness of surface	7.92 ^a	6.86 ^{ab}	6.42 ^b	5.58 ^b
Springiness	6.75 ^b	5.11 ^c	5.83 ^{bc}	8.17 ^a
Firmness	7.19 ^b	3.28 ^d	5.50 ^c	9.61 ^a
Toughness	7.56 ^b	3.44 ^d	5.39 ^c	9.72 ^a
Roughness of surface	6.00 ^b	6.08 ^b	7.11 ^{ab}	7.86 ^a
Adhesiveness	6.75 ^b	6.50 ^b	6.00 ^b	8.39 ^a
Chewiness	8.56 ^a	6.00 ^b	6.31 ^b	8.97 ^a
Cohesiveness	7.69 ^a	4.75 ^c	5.89 ^b	8.31 ^a
Starch-like	6.03 ^{bc}	9.25 ^a	6.97 ^b	5.61 ^c
Steamed rice flavor	5.00 ^a	4.44 ^a	4.92 ^a	4.94 ^a
Sweetness	4.28 ^a	4.19 ^a	4.17 ^a	4.28 ^a
Off flavor	2.22 ^a	1.78 ^a	1.83 ^a	1.86 ^a

¹⁾ GT1, GT3 and GT48은 4αGTase 처리 쌀가루가 첨가된 떡을 의미하며 각각의 숫자는 효소 처리 시간을 의미함

떡의 텍스처 특성에 대해 주성분분석을 한 결과는 그림 32에 나타내었다. PC 1과 PC 2는 각각 59.58% 와 22.31%를 설명하여, 첫 번째 두 개의 주성분으로 전체 변동의 81.89%를 설명하였다. 단단한 정도, 씹힘성, 질긴 정도 및 응집성은 PC 1 에 대해 양의 방향에 매우 가까이 부하되어, 이들 특성

간에 높은 양의 상관관계를 나타내었다. 이에 반해 가루끼는 PC 1에 대해 음의 방향에 위치하여 양의 방향에 위치한 특성들과 강한 음의 상관관계를 나타낸다고 할 수 있다. 한편, PC 2에 대해 가장 큰 양의 값을 가지는 표면의 거친 정도와 가장 큰 음의 값을 나타내는 표면의 촉촉한 정도는 PC 2에 대해 설명하는 주요 특성이며, 이 두 특성 간에는 강한 음의 상관관계가 있다고 할 수 있다. GT48의 4회 반복 평가 값들은 PC 1에 대해 양의 방향으로 강하게 부하되어 있으며 탄성, 부착성, 단단한 정도, 질긴 정도, 부착성, 씹힘성 및 응집성과 가깝게 위치하여 이들 특성이 가장 강함을 나타내었다. 반면 GT1과 GT3는 PC 1에 대해 음의 방향에 부하되어 있으며 가루끼 특성과 가까이 위치하여 가루끼 특성이 강하고, PC1에 양으로 부하되어 있는 특성들에서 낮은 것을 알 수 있다. 대조군은 PC 2에 음으로 부하되어 있으며, 표면의 촉촉한 정도와 가까이 위치하여 이 특성이 강한 반면, PC 2에 대해 강하게 양으로 부하되어 있는 거친 정도 및 부착성 특성이 낮은 것을 알 수 있다.

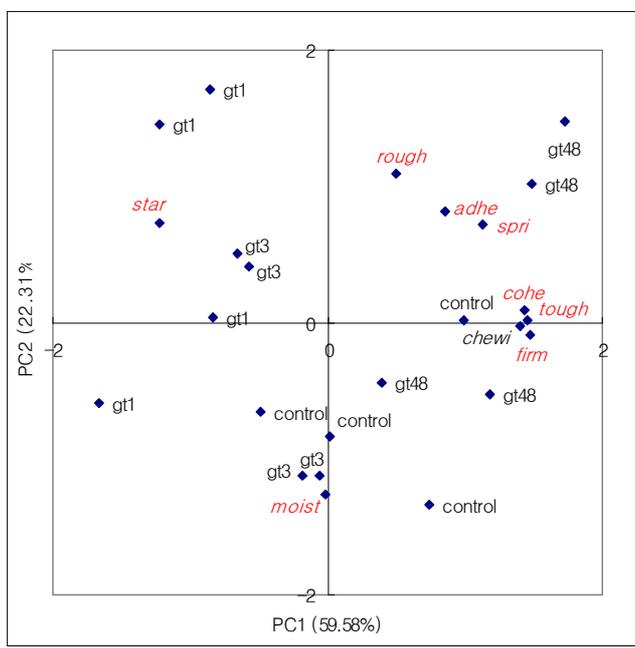


그림 32. 4aGTase 처리 쌀가루가 첨가된 떡의 텍스처 특성¹⁾에 대한 주성분분석

¹⁾ adhe, adhesiveness; cohe, cohesiveness; chew, chewiness; firm, firmness; moist, moistness of surface; rough, roughness of surface; spri, springiness; star, starch-like; tough, toughness

㉔ 4aGTase 처리 쌀가루 첨가 떡의 24시간 저장 후 관능적 특성

제조 후 24시간 저장한 떡의 관능적 특성은 표 19에 나타내었다. 표면의 촉촉한 정도는 GT1과 대조군이 유의적으로 높게 나타났다. 탄성은 GT48에서 유의적으로 높고, GT1과 GT3에서 유의적으로 낮았다. 단단한 정도는 GT48에서 유의적으로 높게 GT1이 유의적으로 낮았다. 표면의 거친 정도는 GT3과 GT48에서 높게 나타났고 대조군과 GT1에서 낮게 나타났다. 부서짐성은 GT1이 유의적으로 높게 나타났으며 GT48 및 대조군이 유의적으로 낮았다. 부착성, 씹힘성 및 응집성은 GT48이 가장 높게 나타났으며 GT1과 GT3은 유의적으로 낮았다. 가루끼는 GT1과 GT3가 유의적으로 높았다. 밥 향미, 단맛 및 이취는 유의적으로 차이가 없었다.

표 19. 4αGTase 처리 쌀가루 첨가 떡의 24시간 저장 후 관능적 특성

	Control-1	GT1-1	GT3-1	GT48-1
Moistness of surface	6.39 ^{ab}	6.75 ^a	5.08 ^b	6.06 ^{ab}
Springiness	7.72 ^b	5.44 ^c	6.22 ^c	9.39 ^a
Firmness	7.86 ^b	3.64 ^c	4.53 ^c	8.89 ^a
Roughness of surface	5.17 ^b	6.17 ^b	8.69 ^a	8.69 ^a
Crumbliness	6.00 ^c	10.14 ^a	8.08 ^b	5.39 ^c
Adhesiveness	7.14 ^a	5.14 ^b	6.06 ^{ab}	7.39 ^a
Chewiness	8.64 ^a	5.78 ^b	5.94 ^b	9.19 ^a
Cohesiveness	7.67 ^a	4.94 ^b	4.86 ^b	8.50 ^a
Chalkiness	5.86 ^b	9.36 ^a	8.39 ^a	5.44 ^b
Steamed rice flavor	3.22 ^a	2.92 ^a	3.31 ^a	3.47 ^a
Sweetness	3.39 ^a	3.36 ^a	3.56 ^a	3.44 ^a
Off flavor	0.81 ^a	0.83 ^a	0.75 ^a	0.75 ^a

1) GT1, GT3 and GT48은 4αGTase 처리 쌀가루가 첨가된 떡을 의미하며 각각의 숫자는 효소 처리 시간을 의미함

4αGTase를 처리한 쌀가루를 5%첨가한 떡을 24시간 저장한 후의 텍스처 특성에 대해 주성분분석을 한 결과는 그림 33에 나타내었다. PC 1과 PC 2는 각각 76.77% 와 11.28%를 설명하여, 첫 번째 두 개의 주성분으로 전체 변동의 88.05%를 설명하였다. 탄성, 부착성, 단단한 정도, 응집성 및 씹힘성은 PC1에 대해 양의 방향으로 강하게 부하되었으며 매우 가까이 위치하여, 이들 특성 간에 높은 양의 상관관계를 나타내었다. 이에 반해 가루끼 및 부서짐성은 PC 1에 대해 음의 방향에 위치하여, 이들 특성 간에 강한 양의 상관관계를 나타내었으며, PC 1에 대해 양의 방향에 위치한 특성들과 강한 음의 상관관계를 나타내었다. 한편, PC 2에 대해 가장 큰 양의 값을 가지는 거친 정도와 가장 큰 음의 값을 나타내는 촉촉한 정도는 PC 2에 대해 설명하는 주요 특성이며, 이 두 특성 간에는 강한 음의 상관관계가 있다고 할 수 있다. GT 48의 반복 평가 값들은 PC 1에 대해 양의 방향으로 강하게 부하되어 있으며 탄성, 부착성, 단단한 정도, 씹힘성 및 응집성과 가깝게 위치하여 이들 특성이 가장 강함을 나타내었다. 반면 GT1과 GT3는 PC 1에 대해 음의 방향에 부하되어 있으며, 가루끼 특성과 가까이 위치하여 가루끼 특성이 강하고, PC1에 양으로 부하되어 있는 탄성, 단단한 정도, 응집성, 씹힘성 및 부착성이 낮은

것을 알 수 있다. 대조군은 PC 2에 음으로 부하되어 있으며, 표면의 촉촉한 정도와 가까이 위치하여 이 특성이 강한 반면, PC 2에 대해 강하게 양으로 부하되어 있는 표면의 거친 정도 특성이 낮은 것을 알 수 있었다.

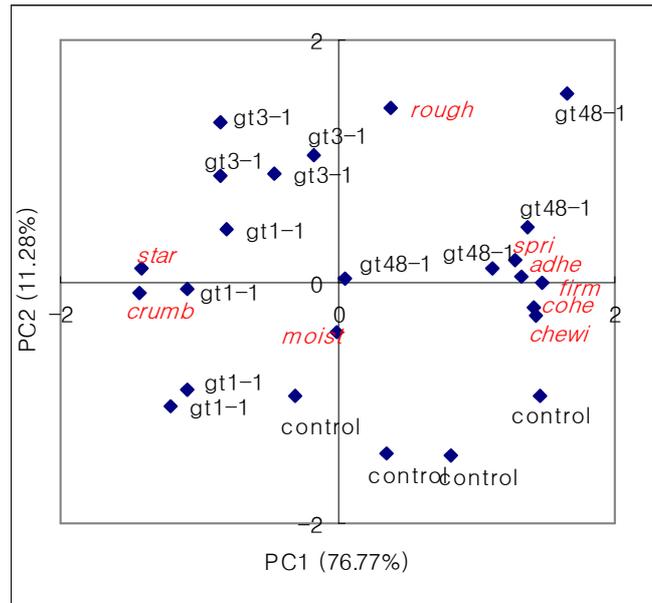


그림 33. 4αGTase 처리 쌀가루 첨가 떡의 24시간 저장 후 텍스처 특성¹⁾에 대한 주성분분석

¹⁾ adhe, adhesiveness; chew, chewiness; cohe, cohesiveness; crum, crumbliness; firm, firmness; moist, moistness of surface; rough, roughness of surface; spri, springiness; star, starch-like;

③ 요약 및 결론

이 연구에서는 4αGTase를 1시간, 3시간 및 48 시간 처리한 쌀가루를 5% 수준으로 첨가한 떡의 관능적 특성을 제조 당일과 저장 1일에 평가하였다. 제조 당일에는 4αGTase를 48시간 처리한 쌀가루를 첨가한 떡이 대조군에 비해 단단하고, 탄성이 있으며, 질기고, 응집성 및 씹힘성이 높은 것으로 나타났으나, 다른 처리군들은 대조군에 비해 단단한 정도, 탄성, 질긴 정도 응집성 및 씹힘성이 낮은 것으로 나타났다. 제조 0일의 떡은 서로 단단히 결합되어 질긴 특성이 나타났고, 제조 1일에는 부서지는 특성이 나타났다. 4αGTase를 48시간 처리한 쌀가루를 첨가한 떡은 제조 1일 후에도 가장 높은 탄성, 부착성, 단단한 정도, 씹힘성 및 응집성을 나타내어, 저장시에도 대조군 및 다른 시료에 비해 서로 잘 결합되고 부서짐이 덜한 것으로 나타났다. 이와 같이 4αGTase를 처리한 쌀가루를 첨가하였을 때 제조 당일 및 저장 1일에 떡의 관능적 특성에 있어 나타난 유의적인 차이에 대해, 분자의 구조 및 기타 물성학적인 지표들과 연관하여 해석하면 개발된 소재의 특성 및 활용 가능성을 좀 더 명확히 할 수 있을 것

이라 생각된다.

(3) 3차년도

(가) 재료 및 방법

① 4aGTase 처리한 쌀가루의 제조방법

쌀가루에 건조 중량으로 5% 분산액이 되게 물을 첨가한 후, 100°C 수욕조에서 30분 동안 교반하면서 가열하였다. 제조된 호화액을 75°C까지 냉각시킨 후, 4aGTase (5 U/g, dry basis)를 첨가하여 각각 다른 시간별로 반응 시켰다. 반응 후 효소의 활성을 막기 위해 100°C에서 30분간 가열한 다음, 효소를 불활성화하여 효소 처리된 쌀가루 소재를 제조하였다.

② HPLC를 이용한 4aGTase 처리 쌀가루의 분자량 분포도

4aGTase 처리 쌀가루 120 mg에 90% dimethyl sulfoxide (DMSO) 12 ml를 넣고 100°C 수욕조에서 1시간동안 교반하며 가열하였고, 다시 25°C에서 24시간동안 교반하여 전분과 쌀가루를 DMSO 용액에 완전히 분산시켰다. 분산액 (시료농도 1.0%, w/v)을 에탄올 용액과 혼합하고, 원심분리하였으며, 원심분리하여 생긴 침전물을 다시 끓는 물에 분산시키고, 필터를 이용하여 필터한 후, 50 mM NaNO₃를 이동상으로 하여 분당 0.4 ml의 속도로 흘러 분리한 후, RI detector를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 Tosoh사 제품 G5000과 G3000을 함께 사용하였다.

③ 얼음결정의 용융 엔탈피

얼음결정의 용융 엔탈피는 DSC를 이용하여 측정하였고, 측정된 용융 엔탈피 값으로 얼지 않는 물의 양을 시료들 간에 비교하였다. 얼음결정의 용융 엔탈피를 측정하기 위하여, 4aGTase 처리하지 않은 쌀가루와 처리한 쌀가루를 DSC 팬에 넣고 일정량 (총 수분함량 59%)의 물을 넣은 다음 온도를 -40°C까지 2°C/min 속도로 냉각한 후 다시 -40°C에서 130°C까지 5°C/min 속도로 가열하여 호화 전 얼음결정의 용융 엔탈피를 측정하였다 (1st scan). 호화 전 얼음결정 용융 엔탈피 측정 후 바로 시료를 0°C까지 냉각한 다음 다시 -40°C까지 2°C/min 속도로 냉각하고 -40°C에서 130°C까지 5°C/min 속도로 가열하여 호화 후 얼음결정 용융 엔탈피를 측정하였다 (2st scan).

④ 4aGTase 처리 쌀가루를 첨가한 국수의 제조 특성

국수는 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하여 제조하였으며, 국수 제조 시 4aGTase 처리한 쌀가루는 표 19와 같이 쌀가루의 0, 5, 10%를 대체하여 첨가하였다. 4aGTase 처리한 쌀가루와 밀가루의 혼합된 재료를 반죽기에 넣은 후 투입할 소금을 물에 녹여 만든 반죽수를 반죽기에 조금씩 투입하면서 실온에서 반죽하였다. 1시간 동안 실온에서 숙성시킨 후, 제면기(Dong Nam, Korea)를 이용하여 면을 제조하였다. 최종 국수의 크기는 6 mm× 2mm 였다.

⑤ 4αGTase 처리 쌀가루를 첨가한 국수의 조리 특성

국수 20g을 200 ml 끓는 물에 넣어 4분간 익힌 후에 찬물로 즉시 냉각시킨 후 물기를 제거하고 국수의 무게를 측정하였다. 국수의 부피는 500 ml 용량의 메스실린더에 상온의 물 250 ml를 넣고 생국수 80g을 넣은 후 늘어난 물의 부피로 측정하였다. 수분 흡수력은 조리 전 국수의 무게에 대한 조리 후 증가된 국수의 무게 증가율로서 계산하였다.

표 19. 제조한 국수의 조성

	WF	RF	substituent	salt	water
RF:WF=1:1	20	20.0	0.0	0.8	13.20
1hr 5%	20	19.0	1.0	0.8	12.74
1hr 10%	20	18.0	2.0	0.8	13.17
3hr 5%	20	19.0	1.0	0.8	12.74
3hr 10%	20	18.0	2.0	0.8	13.17
48hr 5%	20	19.0	1.0	0.8	12.74
48hr 10%	20	18.0	2.0	0.8	13.17

WF:RF 1:1 ; 밀가루와 쌀가루를 1:1 비율로 혼합하여 제조한 국수

1hr 5% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 5%를 1시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

3hr 5% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 5%를 3시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

48hr 5% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 5%를 48시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

⑥ 4αGTase 처리 쌀가루를 포함하는 국수의 냉해동 특성

국수 시료들을 -20°C에서 20시간 동안 동결시킨 후, 실온 (25°C)에서 1시간 동안 방치하여 해동시켰고, 이러한 냉해동 과정을 3번까지 반복하였다. 냉해동 과정을 거친 국수 20g을 200 ml 끓는 물에 넣어 1분간 익힌 후에 찬물로 즉시 냉각시킨 후 물기를 제거하고 조리된 국수의 기계적 조직감을 Texture Analyzer (TA-XT2, Stable Microsystems, Surrey, UK)를 사용하여 측정하였다. 3cm의 국수가닥을 plate에 올려놓은 다음 cylinder probe (∅50 mm)를 사용하여 조리면의 표면에서 70%의 변형이 일어나도록 1.0 mm/sec의 속도로 두 번 압착-복원하였다.

(나) 연구결과

① 분자량 분포도

HPLC를 이용하여 4αGTase 처리한 쌀가루의 분자량 분포도의 변화는 그림 34에 나타내었다. 4αGTase를 처리하지 않은 쌀가루의 경우에는 아밀로펙틴과 아밀로오스의 부분이 분리되어 나타났으나, 4αGTase 처리한 쌀가루의 경우에는 4αGTase 처리 시간이 증가함에 따라 아밀로펙틴이 분리되어 나오는 것으로 생각되는 첫 번째 분획 (Ve: 30-40 ml)의 크기는 감소하고, 두 번째 분획 (Ve: 40-52 ml)과 세 번째 분획 (Ve: 53-65 ml)의 크기가 점점 증가하였다. 쌀가루가 65 시간 동안 4αGTase에 의해 변성된 후에는 첫 번째와 두 번째 분획은 사라지고, 평균 분자량 $\sim 2.28 \times 10^4$ 를 갖는 구조로 변화되었다.

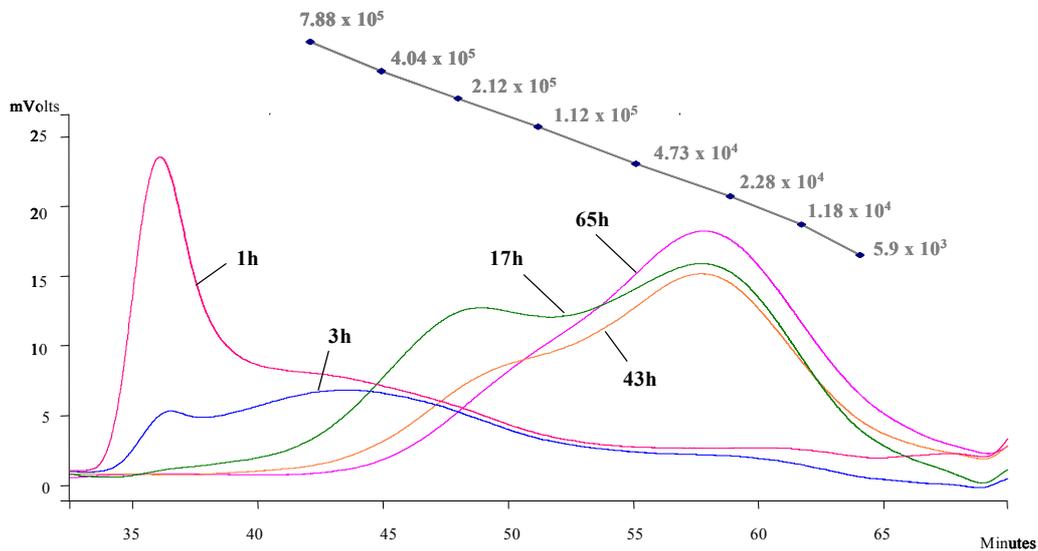


그림 34. 4αGTase 처리한 쌀가루의 분자량 분포도 (5 U/g)

② 얼음결정의 용융 엔탈피

얼수 있는 물은 식품 내에서 유리될 수 있는 물로 충분하게 냉각되었을 때, DSC에 의해 얼음결정의 용융 엔탈피로써 측정될 수 있다. 쌀가루 시료들의 얼음결정 용융 엔탈피의 결과는 표 20과 그림 35에 나타내었다.

호화 전 측정된 얼음결정 엔탈피는 4αGTase 처리하지 않은 쌀가루가 4αGTase 처리한 쌀가루보다 높았으며, 효소 반응 시간이 증가함에 따라 엔탈피 값은 감소하였다. 호화 후에 측정된 엔탈피 값 역시 4αGTase 처리하지 않은 쌀가루가 처리한 쌀가루보다 높았으며, 이는 4αGTase 처리하지 않은 쌀가루가 더 많은 양의 얼수 있는 물 즉 유리수를 포함하고 있음을 나타내 주었고, 4αGTase 처리한 쌀가루가 처리하지 않은 대조군에 비해 얼지 않는 물 즉 결합수를

더 많이 함유하고 있음을 나타내 주었다. 이상의 사실로 4aGTase 처리 쌀가루 소재가 냉동변성안정제로서 이용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

표 20. 쌀가루의 얼음결정 용융 엔탈피 (unit : J/g)

	4aGTase			
	처리하지 않은 쌀가루	1시간-4aGTase	3시간-4aGTase	48시간-4aGTase
1 st scan	284±3.5	259±5	254±2	243±4
2 nd scan	266±5.1	255±1.1	235±3.4	226±3

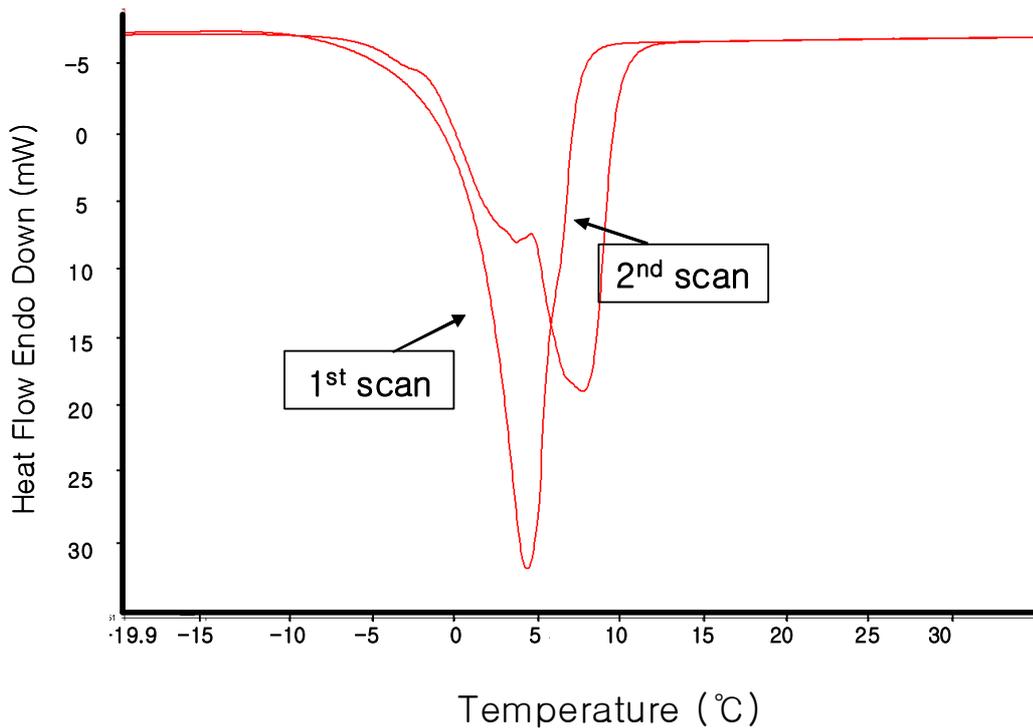


그림 35. 48시간동안 4aGTase 처리한 쌀가루의 얼음결정 용융 엔탈피

③ 국수의 조리 특성

4aGTase 처리한 쌀가루를 첨가한 국수의 무게증가 및 부피 증가와 수분흡수력은 표 21에 나타내었다. 조리 때 국수의 무게와 부피의 증가정도, 수분 흡수정도는 48시간 동안 4aGTase 처리한 쌀가루를 첨가한 국수에서 가장 높았다. 무게증가정도가 커지는 것은 48시간 동안 4aGTase 처리한 쌀가루가 조리 과정 중에 더 많은 수분을 흡수했기 때문이고, 이러한 결과는 등온흡습곡선에서 $A_w > 0.8$ 에서 4aGTase 처리하지 않은 쌀가루보다 더 많은 수분을 흡수했던 것과 연관이 있는 것으로 추정되었다. 4aGTase를 1시간 3시간 처리한 쌀가루보다는 48시간 처리한 쌀가루를 포함하는 국수에서의 무게증가 및 부피 증가와 수분흡수력이 가장 크게 증가하였다. 4aGTase 처리 쌀가루의 첨가로 무게와 부피증가율이 높아지는 것은 제품 생산 업체로서는 수율이 높아져 바람직한 현상으로 여겨지며, 또 상대적으로 조리하는 시간과 섭취 후의 소화 시간을 단축할 수 있는 장점이 있다.

④ 국수의 냉해동 특성

Texture Analyzer를 이용하여 측정된 조리면의 여러 가지 조직감에 대한 결과는 표 22에 나타내었다. 국수의 견고성(hardness)의 경우, 냉해동 과정을 1번 실시했을 때 4aGTase 처리한 쌀가루를 포함하지 않은 국수가 4aGTase 처리한 쌀가루를 포함하는 국수보다 낮은 값을 보였으며, 냉해동 사이클이 증가함에 따라 1791에서 1660까지 견고성이 감소하였다. 반면 4aGTase 처리한 쌀가루를 포함하는 국수는 냉해동 과정을 2번 반복하는 과정 중에도 견고성이 오히려 증가하였으며, 특히 48시간 4aGTase 처리한 쌀가루를 포함하는 국수의 견고성이 가장 컸고, 2번 냉해동 과정을 반복했을 때 1941의 견고성을 나타내었다. 4aGTase 처리한 쌀가루를 포함하는 국수 역시 냉해동 과정을 3번 반복했을 때는, 견고성이 낮아지는 결과를 나타냈으나, 낮아진다고 하더라도, 3 또는 48시간 4aGTase 처리한 쌀가루 5%를 포함하는 국수의 견고성은 1706에서 1784 범위로서 4aGTase 처리한 쌀가루를 포함하지 않은 대조군 국수의 처음 견고성(1791)과 크게 다르지 않은 결과를 나타내었다. 탄성(springiness)의 경우는 4aGTase 처리한 쌀가루를 포함하지 않은 대조군 국수가 냉해동을 3번 반복하는 과정 중에 0.91에서 0.74까지 감소한데 반해, 48시간 4aGTase 처리한 쌀가루 5%를 포함하는 국수의 경우는 0.90에서 0.85로 다소 감소하였으나, 대조군에 비해 더 큰 탄성을 보였다. 응집성 역시 대조군 국수의 응집성이 0.60에서 0.56으로 감소한데 반해, 48시간 4aGTase 처리한 쌀가루 5%를 포함하는 국수는 0.59에서 0.60으로 응집성을 그래도 유지시켰다.

아시아 사람들은 탄력성이 크고 쫄깃쫄깃한 성질의 국수나 탄력성이 크면서도 부드러운 성질의 국수에 대한 선호도가 크다는 것을 고려할 때, 쌀가루의 일부를 3시간 또는 48시간 4aGTase 처리한 쌀가루로 대체하는 것은 국수의 조직감에 바람직한 영향을 줄 것으로 사료된다.

또한 전분을 함유하는 식품을 냉해동 반복시켰을 때 일어나는 얼음결정의 생성과 증가는 식품 조직을 파괴함으로써 소비자의 기호성을 감소시키는 문제를 초래할 수 있다. 그러나 앞서 설명한 4aGTase 처리한 쌀가루 또는 전분 소재들을 대체하여 사용했을 때, 냉해동 변성을

방지하는데 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.

표 21. 4αGTase 처리한 쌀가루를 포함하는 국수의 조리 특성

시료	증가된 국수 무게 (g)	증가된 국수 부피 (ml)	수분흡수율	국물의 탁도 (670 nm)	조리 손실 (%)
WF:RF 1:1	29.4±0.4	25.7±1.2	147.1±1.9	0.330±0.151	3.86±0.3
1hr-5%	29.4±0.6	25.8±1.4	147.1±3.1	0.472±0.080	4.31±0.3
3hr-5%	29.9±0.7	27.5±0.0	149.7±3.6	0.485±0.101	4.40±0.5
48hr-5%	30.9±1.5	27.3±0.3	154.3±7.3	0.483±0.040	4.42±0.0
1hr-10%	29.1±0.7	26.5±1.3	145.5±3.6	0.439±0.077	4.91±0.6
3hr-10%	29.1±1.5	26.8±1.8	145.6±7.5	0.469±0.036	4.99±0.6
48hr-10%	29.5±1.3	26.0±1.0	147.5±6.3	0.449±0.106	4.78±0.6

WF:RF 1:1 ; 밀가루와 쌀가루를 1:1 비율로 혼합하여 제조한 국수

1hr 5% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 5%를 1시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

3hr 5% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 5%를 3시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

48hr 5% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 5%를 48시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

1hr 10% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 10%를 1시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

3hr 10% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 10%를 3시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

48hr 10% ; 밀가루와 쌀가루를 1:1로 혼합하고, 그 중 쌀가루의 10%를 48시간 효소처리 쌀가루로 대체한 국수

표 22. 냉 해동 후의 텍스처 특성

냉해동 1회	hardness	adhesiveness	cohesiveness	springiness	chewiness
WF:RF 1:1	1791±168	-371±16	0.60±0.01	0.91±0.01	982±64
1hr-5%	1851±197	-397±57	0.59±0.01	0.89±0.01	979±132
3hr-5%	1886±192	-383±49	0.58±0.02	0.89±0.01	970±151
48hr-5%	1940±241	-421±19	0.59±0.01	0.90±0.00	1024±156
1hr-10%	1668±28	-355±74	0.57±0.00	0.85±0.03	823±3
3hr-10%	1736±200	-372±38	0.57±0.02	0.87±0.02	857±149
48hr-10%	1886±99	-402±69	0.58±0.03	0.88±0.02	962±20
냉해동 2회	hardness	adhesiveness	cohesiveness	springiness	chewiness
WF:RF 1:1	1784±254	-347±159	0.58±0.03	0.82±0.07	870±255
1hr-5%	1840±371	-387±176	0.59±0.03	0.88±0.07	970±312
3hr-5%	1966±256	-411±148	0.58±0.04	0.83±0.13	977±323
48hr-5%	1941±162	-350±19	0.59±0.02	0.85±0.04	978±155
1hr-10%	1819±40	-403±16	0.58±0.01	0.85±0.03	909±57
3hr-10%	1805±251	-451±72	0.59±0.03	0.89±0.04	967±227
48hr-10%	2046±47	-490±125	0.58±0.04	0.86±0.08	1032±146
냉해동 2회	hardness	adhesiveness	cohesiveness	springiness	chewiness
WF:RF 1:1	1660±35	-196±4	0.56±0.01	0.74±0.03	701±38
1hr-5%	1643±254	-176±47	0.57±0.03	0.72±0.04	683±178
3hr-5%	1706±8	-264±4	0.60±0.02	0.81±0.00	836±35
48hr-5%	1784±277	-269±91	0.60±0.01	0.85±0.07	920±233
1hr-10%	1427±131	-194±46	0.55±0.01	0.73±0.01	583±48
3hr-10%	1475±59	-239±52	0.58±0.01	0.81±0.04	703±63
48hr-10%	1586±137	-232±93	0.56±0.00	0.79±0.07	709±142

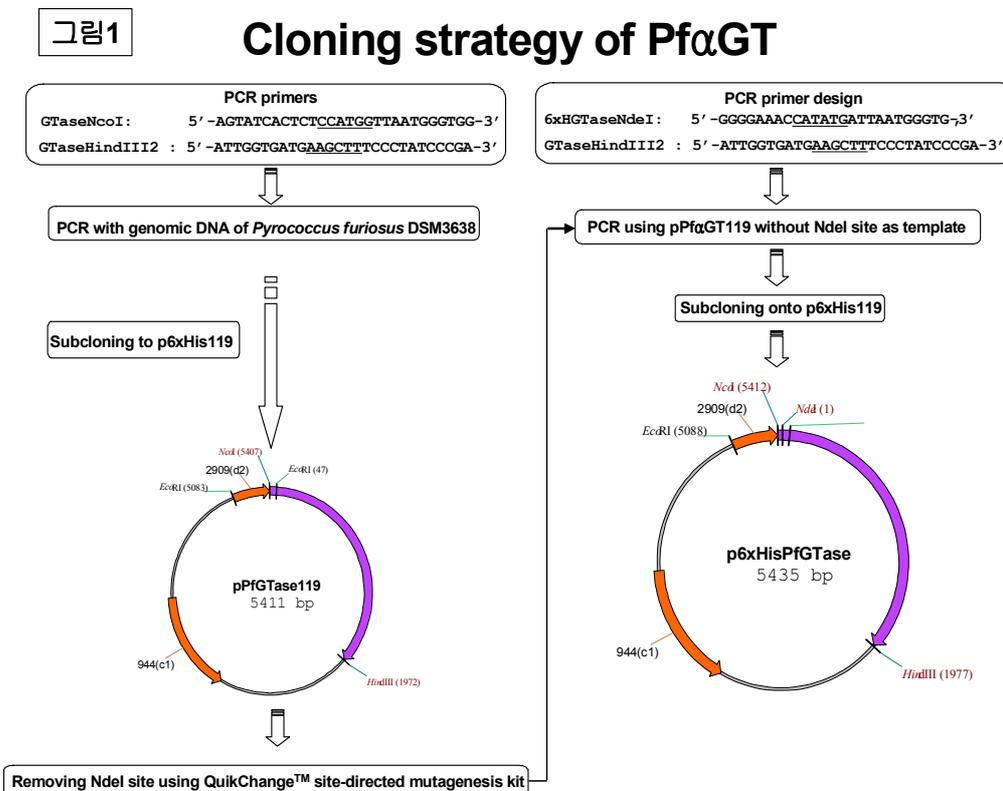
2. 제 2 세부과제

가. 연차별 연구방법 및 결과

(1) 1차년도

① 신규 α -GTase의 클로닝 및 발현

맞춤형 쌀전분 제조를 위한 효소의 생산을 위해 초 내열성 균주인 *Pyrococcus furiosus*로부터 내열성 4- α -glucanotransferase(이하 PfaGT)의 유전자를 분리하고 대장균에서 생산정제한 후 특성을 연구하였다. 그림 1에서 보듯이, genomic DNA 서열과 일치하면서 동시에 *Nco*I과 *Hind*III를 갖는 primer를 제작하고 이것을 *Pyrococcus furiosus* DSM3638 genomic DNA와 PCR을 하였고, 약 1.9kb의 PfaGT gene을 얻을 수 있었다. 이 gene 조각에 제한효소 *Nco*I과 *Hind*III를 처리하고, 동일 효소로 처리된 p6xHis119 vector (44) 에 라이게이션 하였다. 그 후, 정제를 용이하게 하기 위해 6xhistidine이 발현되도록 *Nde*I과 *Hind*III를 갖는 primer를 다시 제작하였고, 이것을 QuickChange™ site-directed mutagenesis kit를 이용하여 PfaGT상에 *Nde*I site가 없어진 pPfaGT백터와 PCR을 통하여 *Nde*I과 *Hind*III를 갖는 PfaGT gene을 얻었고, 이것을 *Nde*I과 *Hind*III에 처리된 p6xH119백터와 라이게이션하였다.



형질전환을 위하여, 5ml LB 액체 배지에 숙주 세포인 *E. coli* MC1061를 접종하여 37°C에서 12시간 배양하고, 배양액 1.0ml을 새로운 LB액체 배지 50ml에 접종하여 600nm에서 흡광도가 0.5가 될

때까지 배양하였다. 배양액 1.5ml을 4°C에서 원심분리(7000 xg, 5분)하여 균체를 회수한 뒤 0.75ml의 형질전환용액 I (50mM CaCl₂)로 현탁하여 얼음 속에서 30분간 방치하였다. 현탁액 0.15ml에 500ng의 상기 라이게이션한 용액을 혼합하고, 얼음 속에서 1시간 방치한 후 42°C에서 2분간 열충격을 주었다 (42). 여기에 0.8ml의 LB 액체 배지를 넣고 37°C에서 1시간 배양시킨 후, 암피실린을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.

1차 선별된 균주를 암피실린이 포함된 LB액체 배지 5ml에 접종하여 37°C에서 12시간 배양하고, 원심분리하여 균체를 수득하였다. 플라스미드 분리 키트로 회수된 균체로부터 플라스미드를 분리하고 *Nde*I과 *Hind*III제한 효소로 절단하여, 약 1.9kb의 PfaGT 유전자가 포함되어있음을 확인하였다.

②신규 α -GTase의 생산

상기에서 제조한 p6xHPfGTase 플라스미드를 *E. coli* MC1061로 형질전환 시킨 후 암피실린 내성 균주를 선별하였다. 선별한 형질전환체는 암피실린이 함유된 LB액체 배지 3.5리터에 접종하여 16시간동안 배양하였다. 배양 후, 원심분리(4°C, 7000 xg, 30분)하여 균체를 회수하고, 300mM NaCl과 10mM 이미다졸이 함유된 50mM Tri-HCl 완충용액(pH 7.5)에 현탁한 후 초음파 분쇄하였다. 원심분리하여 상등액을 취하고, 75°C에서 10분간 열처리한 다음 원심분리(10,000 xg, 30분)하여 상등액을 수득하였다. 상등액은 Ni-NTA 친화력 크로마토그래피에 주입하여 정제하였다. 정제후 SDS-PAGE를 수행하여 정제도를 확인 하였고, 단백질량과 역가를 측정 (35, 39)하여 그림 2와 같은 정제테이블을 완성하였다.

역가를 측정하기 위해 50mM 포스페이트 완충용액(pH 6.0)에 용해된 0.2% 아밀로오스 기질용액 250 μ l에 동일 완충용액 600 μ l을 넣고, 50%말토오스 용액 50 μ l을 첨가한 후, 효소 100 μ l를 넣어 85°C에서 10분간 반응시킨 후, 루골솔루션(요오드)용액을 넣어 반응정지 및 발색을 하여 620nm에서 흡광도 측정을 하였다 (17, 36). 흡광도는 아밀로오스 표준 곡선과 비교하여 1분당 1mg/ml의 아밀로오스가 줄어들 때의 효소량을 1Unit으로 정하였다. 그림 2는 정제단계별 specific activity를 구한 정제테이블이다.

③신규 α -GTase의 특성

㉑ 온도의 효과

온도가 효소의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 70°C부터 100°C까지 5°C내지 10°C 차이를 두어 효소의 역가를 알아보았다. 모든 반응은 50mM 소듐포스페이트 완충용액 pH 6.0에서 이루어졌다. 그 결과, 그림3에서 보듯이 85°C에서 최적활성을 보이고 있다.

그림2

Purification of PfaGT from *E. coli*

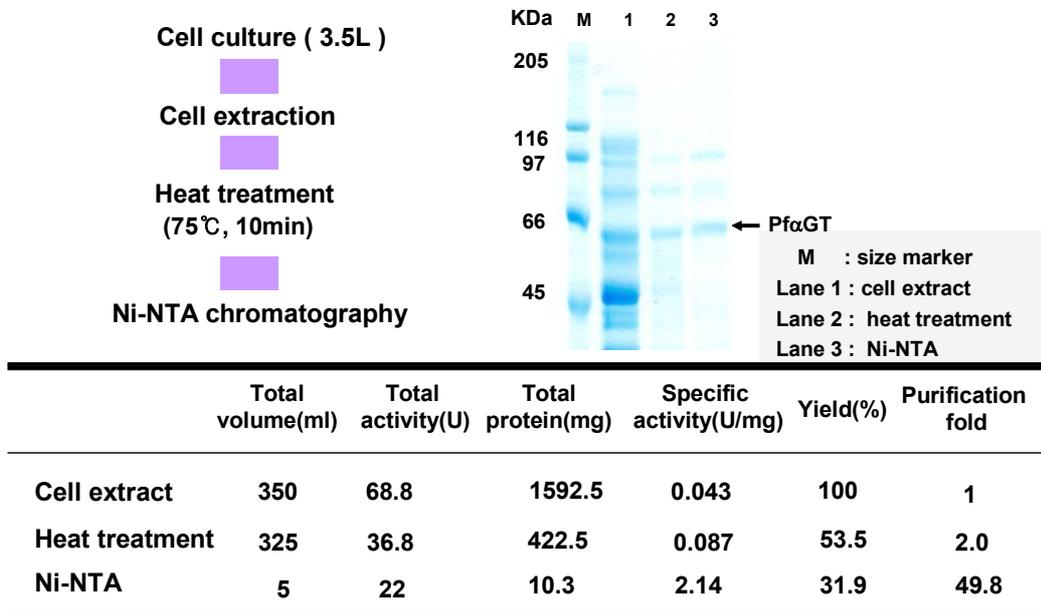
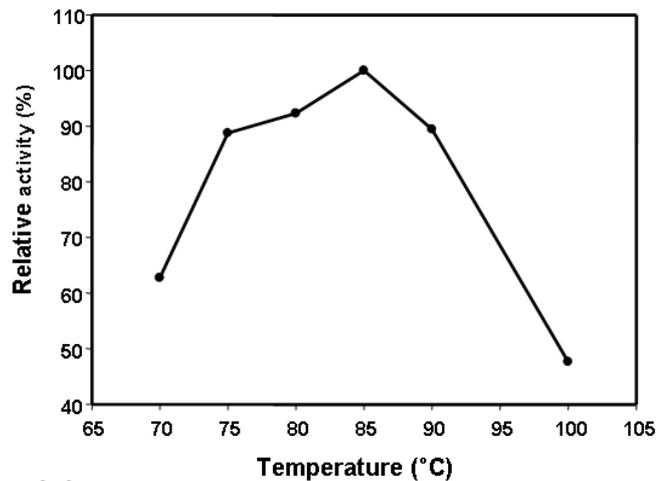


그림3



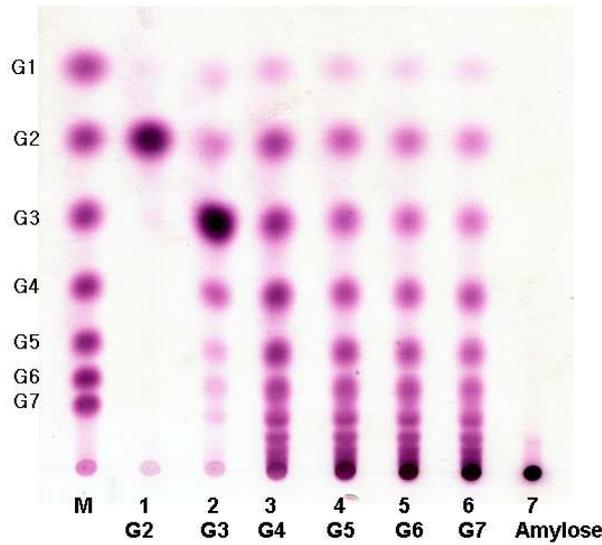
㉔ PfaGT의 기질 특이성

PfaGT의 기질특이성을 조사하기 위해, 85°C에서 12시간동안 여러 가지 기질에게 PfaGT를 처리하였다. 반응물은 그림 4에서 보듯이 얇은막 크로마토그래피(TLC)에 의해 분석되었다. 그 결과, PfaGTase의 당전이 활성은 말토오스부터가 아닌 말토티리오스부터 을 떼는 것을 확인할 수 있었고, 아밀로오스로부터의 반응물은 높은 분자량을 띄어서 loading position에 남겨져 있음을 확인할 수 있었다.

㉕ PfaGT의 맞춤형 전분 제조이용 특성

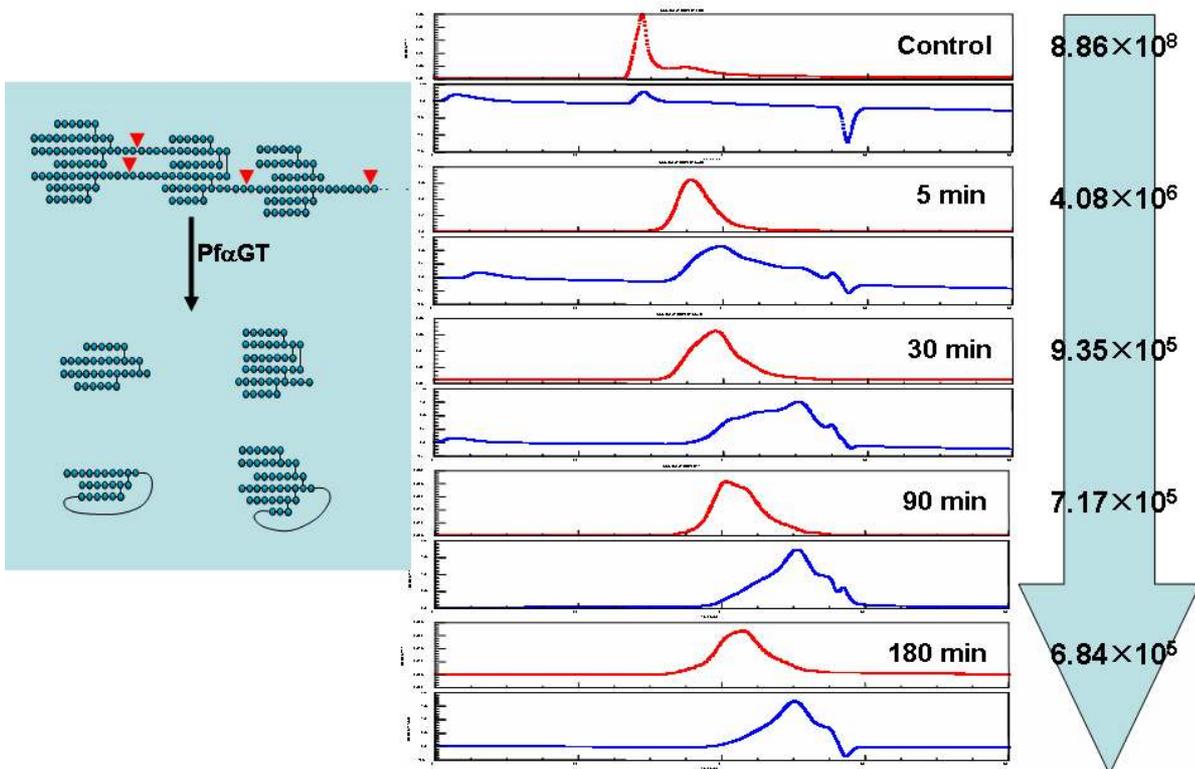
전분 구조를 수식하기 위하여 (주)삼립식품으로부터 제공받은 찹쌀전분5%에 PfaGT 0.05Unit/mg을 처리하여 85°C에서 180분 동안 반응하였다. 반응 도중, 5분, 30분, 90분, 180분에서 시료를 취하였고, 두배

그림4 Reaction pattern of PfaGT



부피의 에탄올 침전을 하여 정제하였다. 그 후, 시간대 별로 아밀로펙틴의 분자량 변화를 확인하였다. 분자량은 MALLS(multi angle light laser scattering)로 분석되었다 (16, 40). 그 결과, 그림 5에서 보듯이 아밀로펙틴의 분자량이 시간이 지남에 따라 점차적으로 줄어들음을 확인 할 수 있었다. 이는 PfaGT가 아밀로펙틴 클러스터간의 사이를 가수분해 하여 아밀로펙틴이 아밀로펙틴 클러스터 단위로 가수분해 된 것을 확인하였다.

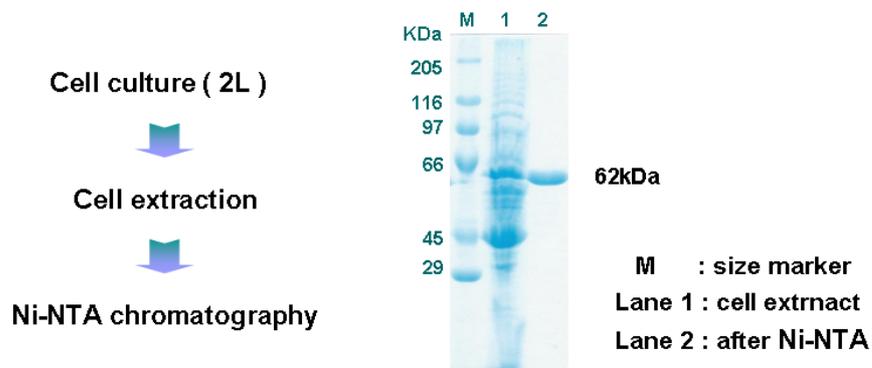
그림5 Molecularweight change of modified waxy rice starch



㉔ MAase의 생산

말토제닉 아밀레이즈(MAase)는 다양한 기질을 가수분해 하여 주로 maltose를 생산하거나 glucose나 maltose를 알파-1,6결합으로 당전이 하는 효소이다 (30, 38, 44). 본 실험에서는 *Bacillus stearothermophilus*로부터 MAase gene을 클로닝하여 재조합 DNA를 제조하였고, 이것을 GRAS 미생물인 *B. subtilis* LKS87에 형질전환하여 효소를 대량 생산하였다. 이렇게 생산한 효소는 Ni-NTA chromatography를 통해 정제하여 specific activity를 측정하고 SDS-PAGE를 수행하여 정제도를 확인하였고, 단백질량과 역가를 측정하여 그림 6과 같은 정제테이블을 얻었다.

그림6 Expression of BSMA from *Bacillus*



	Total volume(ml)	Total activity(U)	Total protein(mg)	Specific activity(U/mg)	Yield(%)	Purification fold
Cell extract	200	17917	2357.5	7.6	100	1
Ni-NTA	13.4	9032.9	93.8	96.3	50.4	12.7

㉕ MAase의 쌀 분지올리고당 제조 특성

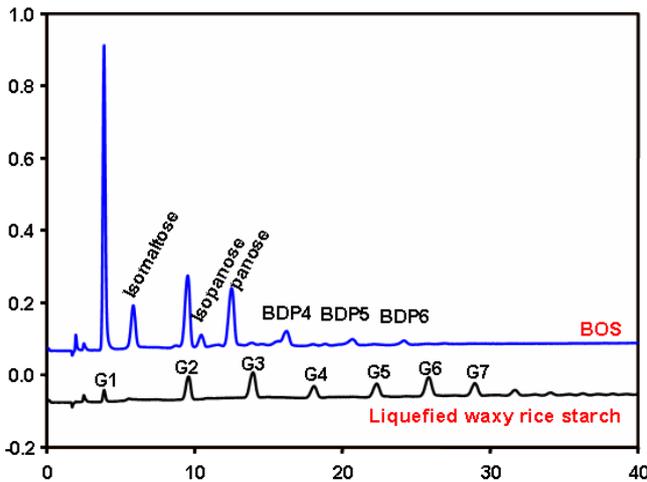
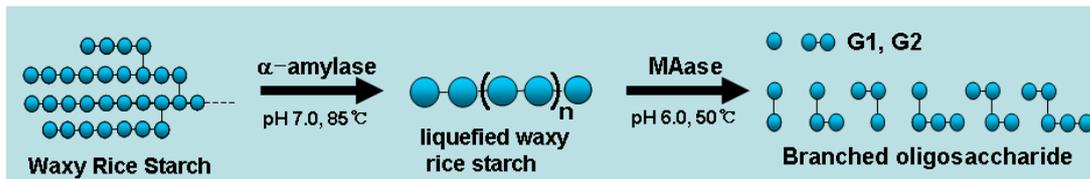
MAase를 이용해 쌀전분으로부터 분지올리고당을 제조하기에 앞서, 전분의 액화를 위해 호화된 50mM 소듐시트르산 완충용액 pH 6.0에 30% 찹쌀전분에 Termamyl(Novozyme사) 0.2U/mg을 넣고 90°C에서 1시간동안 반응하였다. 반응 후, MAase를 0.15U/mg(기질 1mg당 0.15unit)을 넣고 50°C에서 12시간 반응하였다. 반응액은 고성능 음이온교환 크로마토그래피로 분석되었다. 그림 7에서 보듯이 MAase는 액화된 찹쌀전분으로부터 분지말토올리고당을 형성하였고, 최종적인 분지 올리고당의 함량은 52.64% 였다.

㉖ Yeast display of CGTase mutant

CGTase는 전분으로부터 cyclodextrin(CD)을 생성하는 효소이다. 본 연구진은 CD를 생성하는 대신 전분의 가수분해능이 좋은 CGTase mutant (31-43)을 만들었다. 이 효소는 전분에 처리했을 때 CGTase wild type을 처리했을 때 보다 덜 노화가 진행됨을 확인하였고, 따라서 노화억제효소로서의 이용가능성을 확인하였다. 이 효소를 제빵용 효모에서 발현시킨다면 제빵 도증, CGTase mutant가 전분의 구조를 수식

하여 노화가 더디게 진행되는 전분구조로 바뀌어질 것이고, 또한 가수분해되어 생성되는 글루코오스나 말토오스를 yeast가 이용하여 더 많은 CO₂와 에탄올을 생성하여 빵의 품질에 더 좋은 영향을 미칠 것이라는 가설을 세웠다. yeast에 CGTase mutant 발현 플라스미드를 transformation 하였으나, 효소의 발현율과 DNA의 안전성이 상당히 떨어졌다. 따라서 yeast에 직접 CGTase mutant gene을 integration 방법을 통해 yeast cell 표면에 display하는 실험을 하였다. 이 실험을 위해 그림 8과 같이 *Kpn* I과 *Xho* I을 처리한 pYD1 벡터에 역시 *Kpn* I과 *Xho* I이 처리된 *cgt* 3.18 gene을 라이게이션 하여 pYCGTmut 재조합 DNA를 제조한다. 그 후 이 재조합 DNA를 재빵용 효모인 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환 시키면 cell 내에서 AGA2 cassette를 포함하는 *cgt* 3.18 gene이 genomic DNA상에 들어가 그림 9과 같이 yeast 표면에 CGTase를 display하는 형질전환 균주가 제조된다. 현재, 본 연구팀은 떡제조실험을 진행 중에 있다.

그림7 Branched oligosaccharide production from waxy rice starch



Components	Weight percentage (%)
G1	23.67
G2	21.18
BDP2	12.61
G3	1.14
BDP3	24.50
G4	0.66
BDP4	8.00
G5	0.70
BDP5	4.90
G6	0.05
BDP6	2.61
Total % fractions for IMO	52.64

그림 8

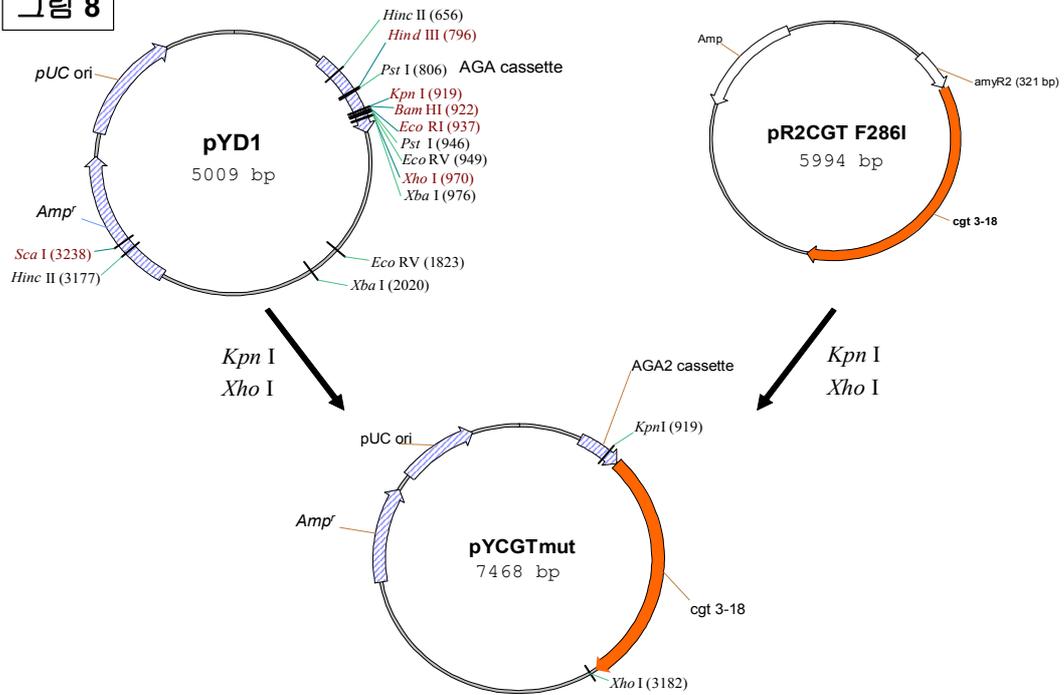
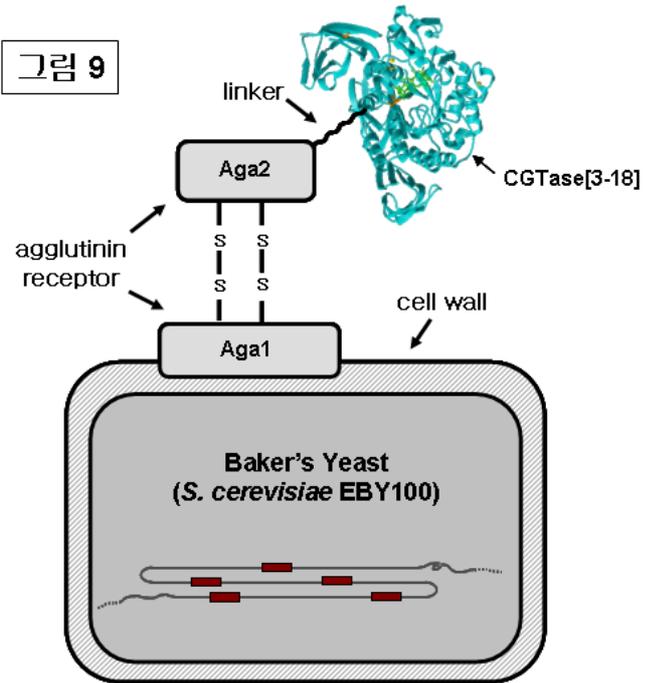


그림 9



(2) 2차년도

① PfaGT를 이용한 맞춤형 전분의 생산

PfaGT는 초고온성 미생물인 *Pyrococcus furiosus*에서 유래한 초내열성 당전이 효소이다. 여러 문헌에서 보고된 바와 같이 PfaGT는 α -1,4-결합을 당전이하여 재배열역가를 가지며 특히 그 중합도가 큰 기질인 amylose와 반응하여 환상아밀로스를 생산한다 (17, 30, 36). 이러한 효소를 전분에 반응시킬 경우 amylose를 소비하여 그 함량을 감소시킬 수 있고 amylopectin의 가지결합 길이의 재배열을 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 초내열성 효소인 PfaGT를 전분과 반응시켜 아밀로스 함량을 조절하고 아밀로펙틴의 구조변화를 유도하여 특정 식품 용도에 알맞은 맞춤형 변형전분을 생산하고자 하였다. 그림 1. 은 본 연구의 총괄흐름도이다.

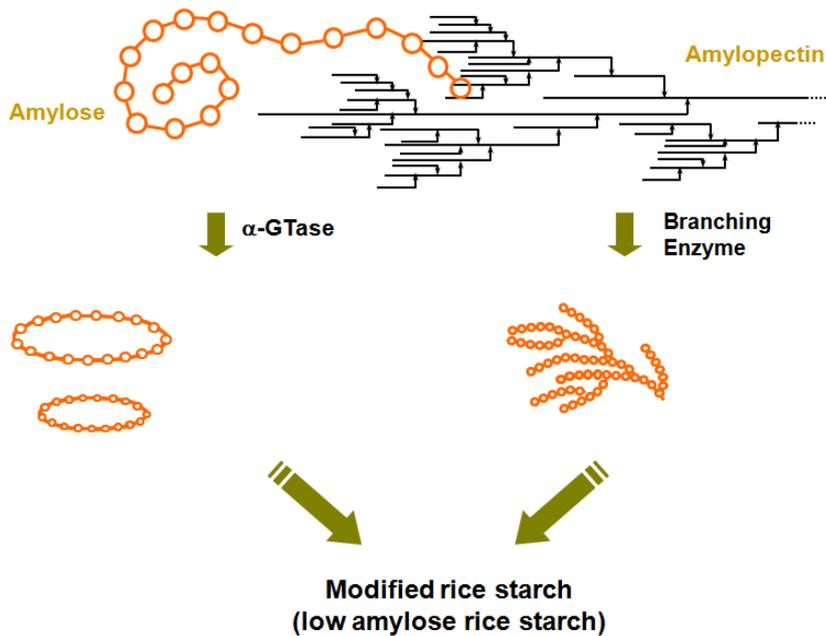


그림 1. 당전이 효소를 이용한 맞춤형 전분의 생산

㉞ PfaGT의 발현 및 정제

E. coli MC1061을 호스트로 하여 PfaGT를 대량생산하였다. 5L LB 배지에 12시간 전배양한 재조합 대장균을 1% 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양 후 세포를 원심분리를 이용하여 상등액으로부터 분리하고 배양부피의 1/10 부피의 lysis buffer(pH 7.5 50mM Tri-HCl, 10mM imidazole, 300mM NaCl)에 풀어 준 후 초음파 파쇄기로 파쇄 하였다. 이 후 원심분리를 통해 수용성 부분만을 분획하고 75°C에서 10분간 열처리 하여 대장균 유래의 단백질을 불활성화 시킨 후 Ni-NTA affinity chromatography를 수행하여 정제하였다. 역가측정과 단백질 농도를 구하여 정제표 (35, 39)를 완성하고 정제도는 SDS-PAGE를 수행하여 확인하였다 (그림 2, 표 1).

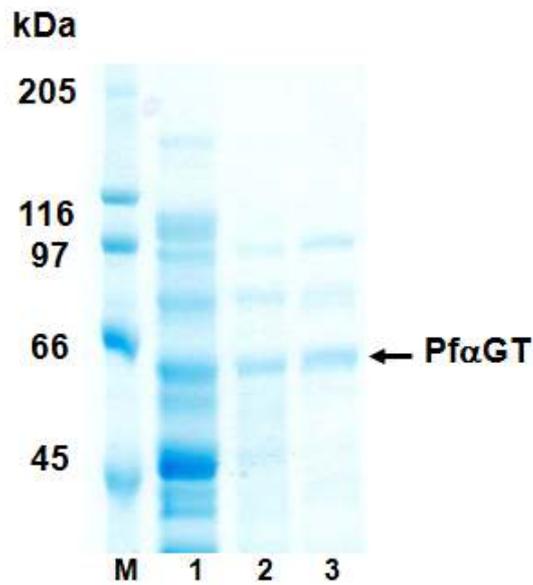


그림 2. SDS-PAGE를 이용한 PfaGT의 정제도 확인. M, size marker; 1, cell extract; 2, 75°C heat treatment; 3, Ni-NTA affinity chromatography

표 1. PfaGT의 정제 표. 효소의 역가는 Lugol's solution method (10, 11)를 사용하였으며 단백질의 농도는 Bradford method (14)를 이용하여 측정하였다.

	Total volume(ml)	Total activity(U)	Total protein(mg)	Specific activity(U/mg)	Yield(%)	Purification fold
Cell extract	350	68.8	1592.5	0.043	100	1
Heat treatment	325	36.8	422.5	0.087	53.5	2.0
Ni-NTA	5	22	10.3	2.14	31.9	49.8

㉔ PfaGT의 전분에 대한 효소작용 메커니즘

정제된 PfaGT를 쌀전분에 처리하여 그 효과를 분석하였다. 10mg/ml 농도의 전분수용액을 준비하고 이를 0.1U PfaGT를 처리하여 85°C에서 효소반응을 수행하였다. 이 반응시료를 시간에 따라 채취하여 분자량과 가지길이분포 등을 연구하였다 (16, 40, 45).

○ PfaGT 처리 쌀전분의 분자량 변화

반응시간에 따라 채취한 시료를 SEC-MALLS/RI(Size exclusion chromatography-Multi Angle Laser Light Scattering/Refractive Index) 시스템을 이용하여 분자량을 분석하였다 (16, 40). 반응시료를 분자량에 따라 분리하기 위하여 일본 Shodex사의 SUGAR KS-804와 806을 차례로 연결한 size exclusion chromatography를 이용하여 분석을 진행하였다 (그림 3).

쌀전분의 평균분자량은 효소처리 5분 후 본래 분자량에 비하여 1/200 가량으로 급속히 감소하였다. 이 후에도 점차 감소하였으나 그 감소폭은 매우 작았고 시간이 갈수록 감소폭은 줄어드는 경향을 나타내었다. 180분 처리 후 평균분자량은 약 6.84×10^5 이었는데 이는 본래 분자량의 1/1000 가량에 불과하다. PfaGT 처리 시 나타나는 쌀전분의 분자량 변화는 일반적으로 amylopectin이 cluster단위로 분해될 때의 그것과 완전히 일치한다. 반응 초반에는 급격한 분자량감소를 보이거나(cluster의 B3 chain 등이 분해됨에 따라) 시간이 갈수록 감소폭은 줄어들며 일정수준이하에서는 더 이상의 변화가 나타나지 않는다. 6.84×10^5 을 나타낸 180분 반응 시료는 전형적인 cluster의 분자량에 가까운 것으로 볼 수 있다. 따라서 초고온성 효소인 PfaGT는 쌀전분으로부터 amylopectin cluster를 성공적으로 생산하며 그 반응 메커니즘은 기존의 중온성 효소들과 큰 차이가 없는 것으로 생각되며 초내열성 특성은 산업적 응용가능성을 높여주는 큰 장점이라 할 수 있다.

○ PfaGT 처리 쌀전분의 가지길이분포 분석

위에서 평균분자량을 분석한 amylopectin cluster의 가지결합분포를 연구하였다. PfaGT의 효소반응을 정지시킨 후 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 큰 분자량의 전분을 침전시켰다. 원심분리를 통하여 침전된 전분을 회수하고 수용액속의 소당류는 제거하였다. 침전된 전분을 37°C 정치배양기에서 완전히 건조시키고 이를 pH 4.5 50mM sodium acetate buffer에 용해시켰다. 이에 isoamylase를 처리하여 α -1,6-결합을 완전히 분해하였다. 이 후 끓는 물에 5분간 가열하여 isoamylase를 제거하고 filtering 한 후 Carpac PA-1 column (Dionex, 미국)을 장착하여 HPAEC(High Performance Anion Exchange Chromatography)를 수행하였다(16, 40, 45).

180분간 효소처리 한 시료를 분석한 결과는 아래 그래프로 나타내었다 (그림 4). 분석결과 중합도가 40 이상의 가지는 소폭 감소하였고 중합도 8 이하의 짧은 가지들은 크게 증가했음을 알 수 있다. 이를 통해 PfaGT 처리 시 쌀전분의 평균분자량의 감소와 더불어 아밀로펙틴의 가지길이의 재배열이 일어남을 알 수 있다. 이러한 짧은 가지의 증가는 amylopectin cluster의 이화학적 특성을 변화시킬 것으로 추측 할 수 있다. 노화에 대한 저항성 증가나 열가역적 젤의 형성 등 다양한 특성 변화를 기대할 수 있으므로 추 후 이에 대한 분석을 진행하여 특성변화를 연구하는 것이 필요할 것으로 본다.

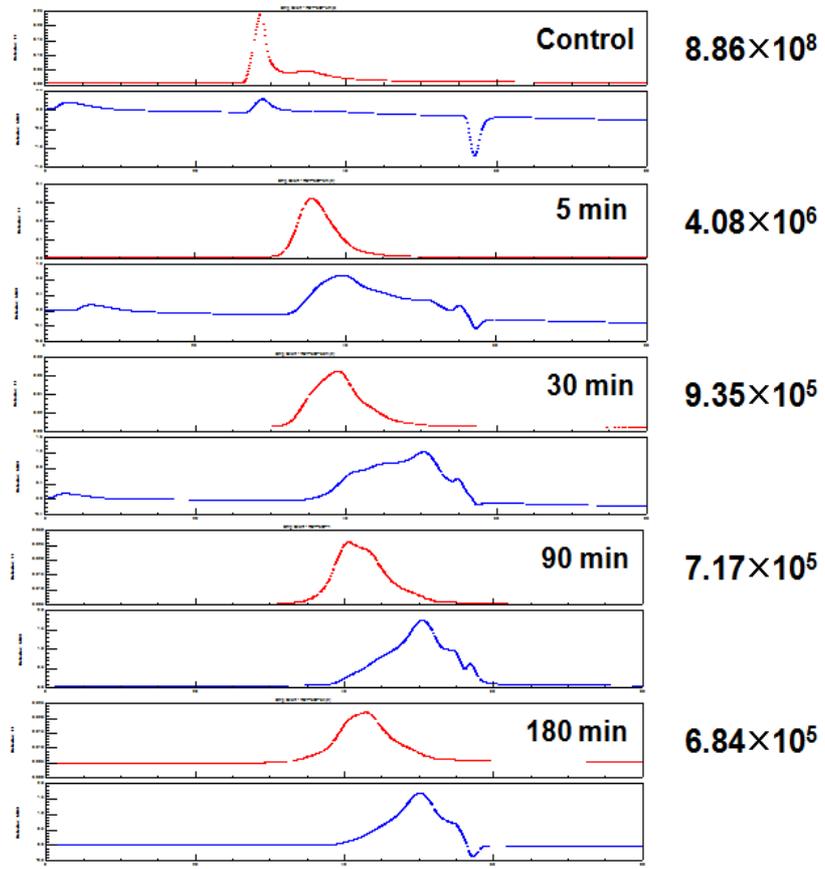
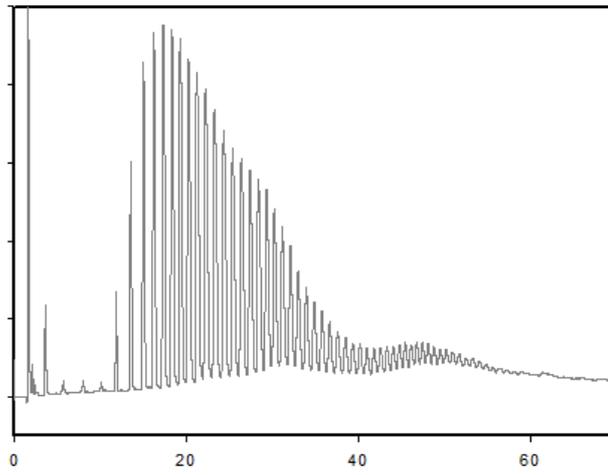


그림 3. PfaGT 처리 싨전분의 반응시간에 따른 평균분자량 변화. control, Pfa GT 처리 전 시료; 붉은선, LS; 푸른선, RI

A)



B)

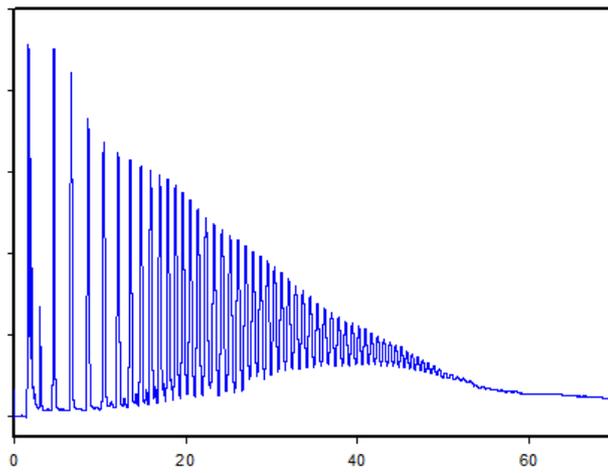


그림 4. HPAEC를 이용한 PfaGT처리 쌀전분의 가지길이분포 분석. 효소를 180분 처리한 시료를 분석. A) PfaGT 처리 전 시료를 isoamylase 처리; B), PfaGT 처리 후 시료를 isoamylase 처리

② *E. coli* K12 유래의 Branching enzyme(BE)의 클로닝 및 전분에 대한 효소 특성 연구

BE는 α -1,6-결합으로 당전이를 수행하는 대표적인 효소이다. 일반적으로 BE는 glycogen synthesis operon의 일부로서 글루코겐 생합성에서 중요한 역할을 담당한다. *Bacillus E. coli* 등 다양한 미생물이 BE를 생산하며 식물과 포유류 등 거의 모든 생물종에서 발견된다 (40).

최근 BE는 단순히 α -1,6-결합 형태의 당전이 뿐만이 아니라 전분을 독특한 방식으로 변형시켜 분자량이나 구조의 변화를 유도하는 것이 보고된 바 있다. α GT와 유사하게 amylopectin cluster를 생성하나 그 이화학적 특성은 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 중온성 미생물인 *E. coli* K12부터 BE를 cloning하고 이의 전분에 대한 효소적 특성을 밝혀 BE를 이용한 맞춤형전분 생산을 위한 자료를 구축하고자 하였다.

㉠ BE(GlgB)의 cloning

먼저 *E. coli* K12를 LB 배지에 배양하여 이의 전체염색체를 분리하였다. 전체 genome sequence 데이터를 분석하여 BE를 coding 하는 *glgB* 유전자를 찾고 이로부터 PCR primer를 디자인 한 후 PCR을 수행하여 *glgB* 유전자를 증폭하였다. 이렇게 증폭한 유전자를 적절한 제한효소로 처리한 후 p6xH119 vector (44)와 ligation을 수행하여 p6xHGlgB 재조합 플라스미드를 제조하였다. 이 재조합 플라스미드는 ampicillin 저항성을 나타내며 6개의 histidine을 N-terminal에 결합시킨 재조합 BE(GlgB)를 생산한다. 이 후 p6xHGlgB를 *E. coli* MC1061에 재조합시켜 BE를 대량 발현하였다. 개략적인 방법은 그림 5와 같다.

㉡ BE의 발현 및 정제

E. coli MC1061을 호스트로 하여 BE를 대량생산하였다. 3L LB 배지에 12시간 전배양한 재조합 대장균을 1% 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양 후 세포를 원심분리를 이용하여 상등액으로부터 분리하고 배양부피의 1/10 부피의 lysis buffer(pH 7.5 50mM Tri-HCl, 10mM imidazole, 300mM NaCl)에 풀어 준 후 초음파 파쇄기로 파쇄하였다. 이 후 원심분리를 통해 수용성 부분만을 분획하고 Ni-NTA affinity chromatography를 수행하여 정제하였다. 정제 후 역가측정과 단백질 농도를 구하여 정제표 (35, 39)를 완성하고 정제도는 SDS-PAGE를 수행하여 확인하였다 (표 2, 그림 6).

SDS-PAGE 확인 결과 BE는 발현정도가 매우 우수하여서 cell extract 상태에서도 단백질의 위치를 확인 할 수 있었다. Ni-NTA affinity chromatography 후 정제도가 매우 높은 순수한 BE를 분리하였다. 이 후 Ultra filtration (Mw cutoff 10kDa)을 통하여 고농도로 농축한 후 실험을 진행하였다.

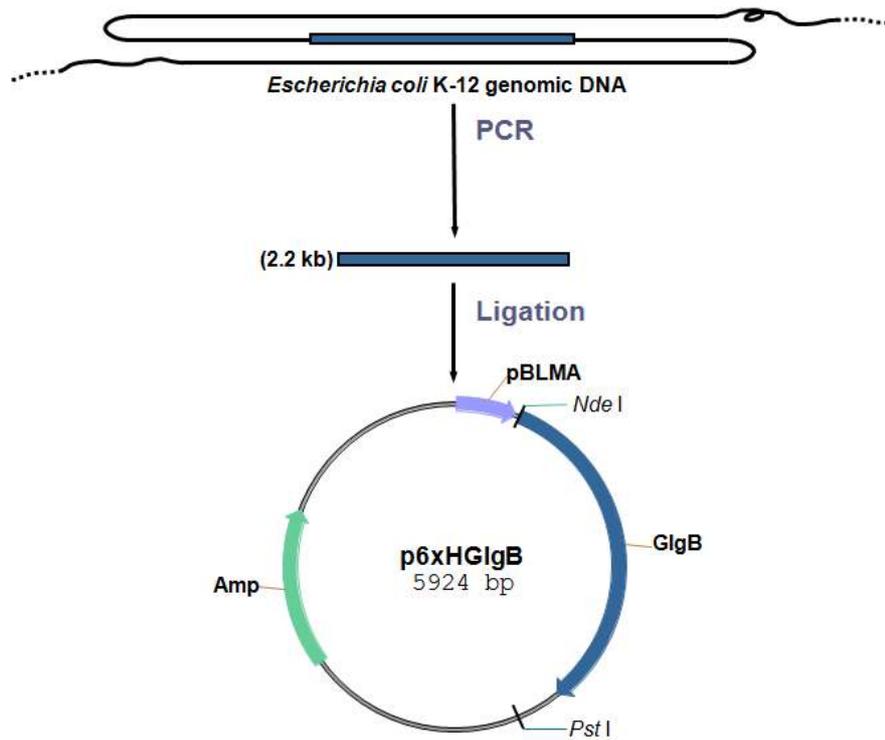


그림 5. BE(GlgB)의 cloning

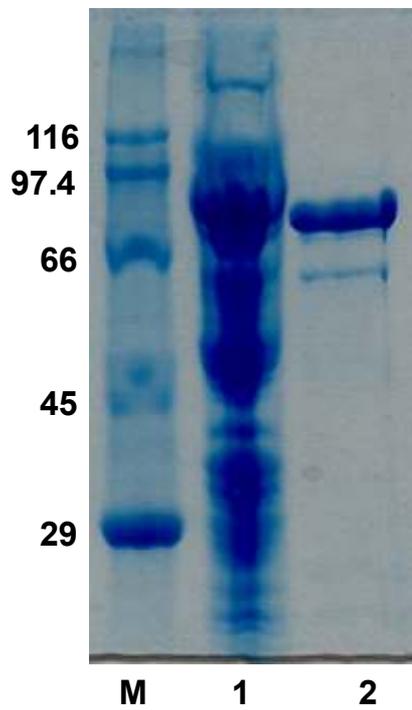


그림 6. BE의 SDS-PAGE 분석. M, size marker; 1, cell extract; 2, Ni-NTA affinity chromatography.

표 2. BE의 정제.

Purification steps	Total Volume(ml)	Total Protein(mg)	Total activity (U)	Specific activity(U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell extract	100	1137	70193.21	61.74	100	1
Ni-NTA	28	151.76	28048.81	184.82	39.96	3

* 효소의 역가는 amylose를 기질로 하여 iodine solution 처리 후 640nm에서 흡광도의 감소량으로 측정하였으며 효소의 농도는 Bradford method 로 결정하였다.

㉔ BE를 이용한 amylose의 변형

정제된 BE를 amylose에 처리하여 그 변화를 연구하였다. amylose의 농도를 각각 0.3%, 0.5%, 0.7%로 준비하여 BE를 첨가하고 15시간 동안 37°C에서 반응을 진행하였다. 끓는 물에서 5분간 가열하여 효소반응 중지시키고 원심분리를 통하여 불활성화시킨 단백질을 제거하였다. 이 후 2배 부피의 에탄올을 처리하여 상등액에 녹아있는 소당류를 제거하고 침전물을 건조시켰다. 완전히 건조한 시료를 pH 4.5 50mM sodium acetate buffer에 녹여 isoamylase를 처리하였다. 이 후 HPAEC를 이용하여 분석을 진행하였다 (16, 40, 45).

먼저 BE처리 후 에탄올을 처리하기 전 TLC를 이용하여 반응산물을 분석하였다. 그림 7에서 볼 수 있듯이 BE 처리 후에도 소당류의 거의 생성되지 않았다. 기질의 농도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다.

Isoamylase 처리 전에는 peak가 거의 나타나지 않는 것으로 보아 효소 처리 후 나타난 peak는 가지결합이 분해된 결과물이라고 할 수 있다 (그림 8의 맨 윗 크로마토그램). Isoamylase 처리 후 시료를 HPAEC를 이용하여 분석한 결과, 중합도 6 이상의 다양한 길이의 peak가 나타났다. Isoamylase 처리 전에는 peak가 거의 나타나지 않는 것으로 보아 효소 처리 후 나타난 peak는 가지결합이 분해된 결과물이라고 할 수 있다. 중합도 5이하의 가지결합은 거의 나타나지 않았고 중합도 10을 중심으로 한 종모양의 가지결합분포 형태를 나타내었다 (그림 8). 이는 *B. subtilis* 유래의 BE(BBE)와는 큰 차이를 보인다. BBE의 경우 DP6 peak가 가장 높고 서서히 그 높이가 감소하는 형태를 나타낸다. 그러나 *E. coli* BE에 비하여 DP20 이상의 긴 가지의 비율은 훨씬 높게 나타났다 (본 연구실의 실험결과와 비교하였음). 기질의 농도에 따른 branching pattern은 거의 차이가 없었으나 0.5% 이상에서는 0.3%에 비해 상대적으로 긴 가지가 많이 나타났다 (그림 9).

위의 결과에 따라 BE의 종류에 따라 전혀 다른 형태의 branching pattern을 나타냄을 알 수 있다. 앞으로 실험을 통해 BE의 기질의 중합도에 대한 선택도의 차이를 연구하여 이러한 특성이 전분변환에 응용 될 때 미치는 영향을 연구해야 할 것이다.

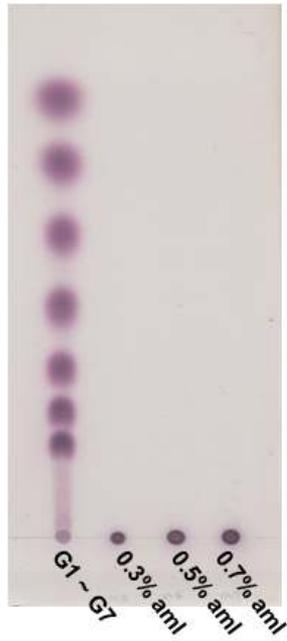


그림 7. amylose에 BE 처리 후 TLC 분석.

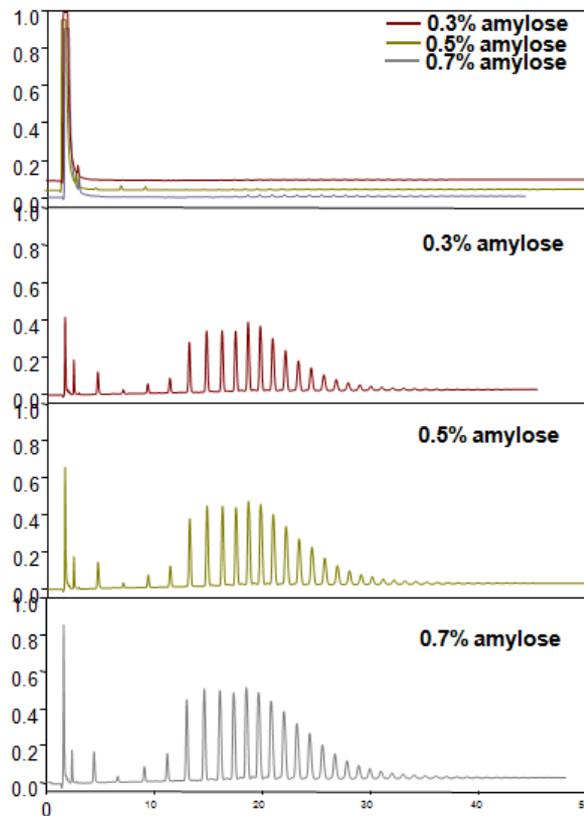


그림 8. BE처리 시료에 HPAEC. 맨 위 그래프는 각 시료를 isoamylase로 처리하기 전 HPAEC로 분석한 크로마토그램 임.

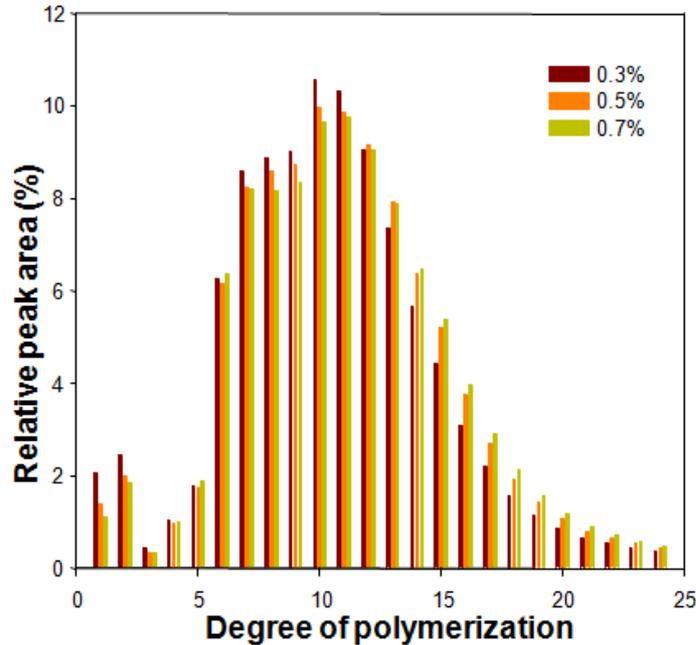


그림 9. BE처리 후 생성된 전분의 가지길이분포. (면적비율)

㉔ BE를 이용한 tapioca starch의 수식

BE의 전분구조에 대한 영향을 연구하기 위하여 tapioca starch를 BE로 효소처리를 하였다. 5% tapioca starch 수용액을 준비하고 160U/g 단위로 BE를 처리하여 반응시간에 따라 시료를 채취한 후 가지결합분포변화를 조사하였다. BE 처리 후 2배 부피의 에탄올을 처리하여 원심분리 후 상등액을 제거하고 침전물을 회수하였다. 회수된 침전물은 이 후 isoamylase처리를 거쳐 HPAEC 분석을 수행하였다 (31, 40).

분석결과 BE 반응 시간이 증가함에 따라 40 이상의 긴 중합도를 가지는 가지가 감소하고 중합도 10 이하의 짧은 가지들이 증가한 것으로 나타났다 (그림 10). 6시간 처리 후에도 가지결합길이분포의 큰 변화는 없었으며 6시간 처리 시료의 크로마토그램의 형태는 BBE 처리 시의 그것과 매우 유사한 모습을 나타내었다. 추가 실험을 통하여 이러한 구조변형이 가져오는 이화학적 특성변화 등을 연구할 필요가 있을 것으로 생각된다.

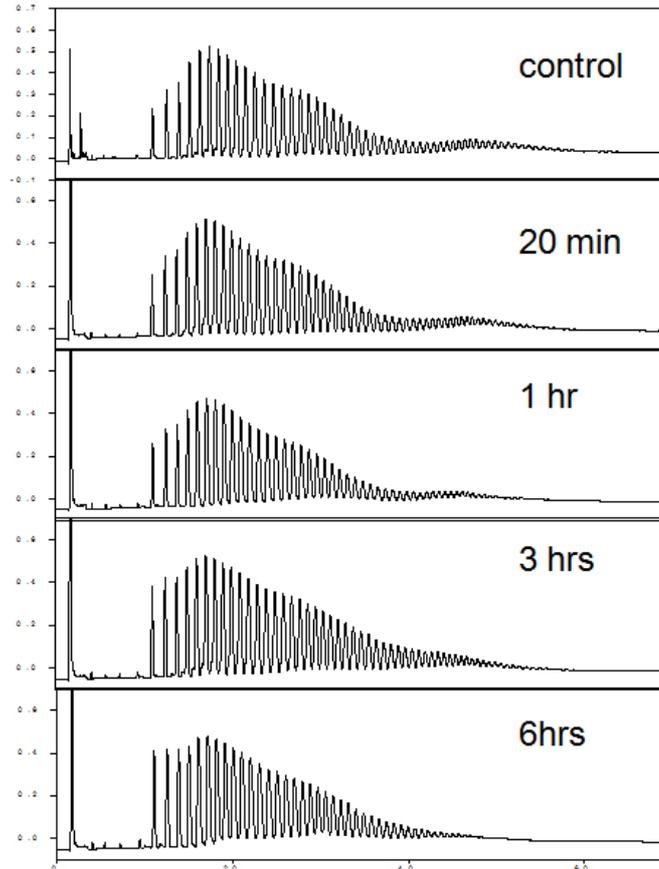


그림 10. BE를 처리한 tapioca starch의 가지결합길이분포 변화. control, BE 처리 전 시료

③ BSMA 처리를 통한 찹쌀전분으로부터 맞춤형 전분의 생산

Maltogenic amylase (MA)는 저농도의 기질 존재 시에는 α -1,4-결합 가수분해 반응을 수행하여 maltose를 주산물로 생성하는 효소이다. 하지만 기질의 농도가 5% 이상일 때는 다양한 형태의 당전이 산물을 생성하며 고농도의 액화전분으로부터 분지올리고당을 생성할 수 있는 특성이 보고된바 있다 (38, 44).

BSMA는 고온성 미생물인 *B. stearothermophilus*로부터 유래한 MA로서 여러 종류의 MA 중에서 가장 강력한 당전이능을 보이는 효소이다. 본 연구에서는 고농도의 찹쌀전분에 BSMA를 처리하여 전분구조를 변화시키고 분지올리고당을 생성하여 기능성 맞춤형 전분을 생산하고자 하였다. 이 연구의 개략적인 흐름은 아래 그림 11에 나타내었다.

5% 찹쌀전분 수용액을 준비하여 BSMA를 처리하고 반응시간에 따라 시료를 채취하여 isoamylase처리 후 HPAEC 분석을 수행하였다. 분석결과 그림 12에서 보이는 바와 같이, 긴 중합도의 가지결합은 점차 감소하고 짧은 가지결합의 비율이 증가하였다. 또 한 isoamylase의 처리에 의해 쉽게 가수분해되지 않는 glucose 혹은 maltose 단위체가 결합한 가지결합의 형태가 증가하여 크로마토그램 중 분지올리고당의 비율이 늘어남을 알 수 있다. 짧은 길이의 가지결합의 증가는 반응산물의 수용성이 매우 증가시킬 것으로 예상되며 isoamylase에 의해 분해되지 않는 가지결합은 반응산물의 체내분해속도를 현

저히 저하 시킬 것으로 예상할 수 있다 (16, 40). BSMA를 이용하여 생산한 이러한 변형 전분은 그 특성에 따라 다이어트 식품이나 당뇨병 환자의 식이 등에 활용될 수 있는 특성을 지닌 것으로 평가된다.

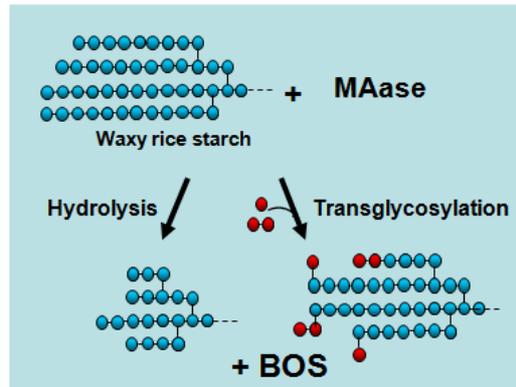


그림 11. BSMA를 이용한 찹쌀전분으로부터 맞춤형 전분의 생산. BOS는 분지올리고당을 나타냄.

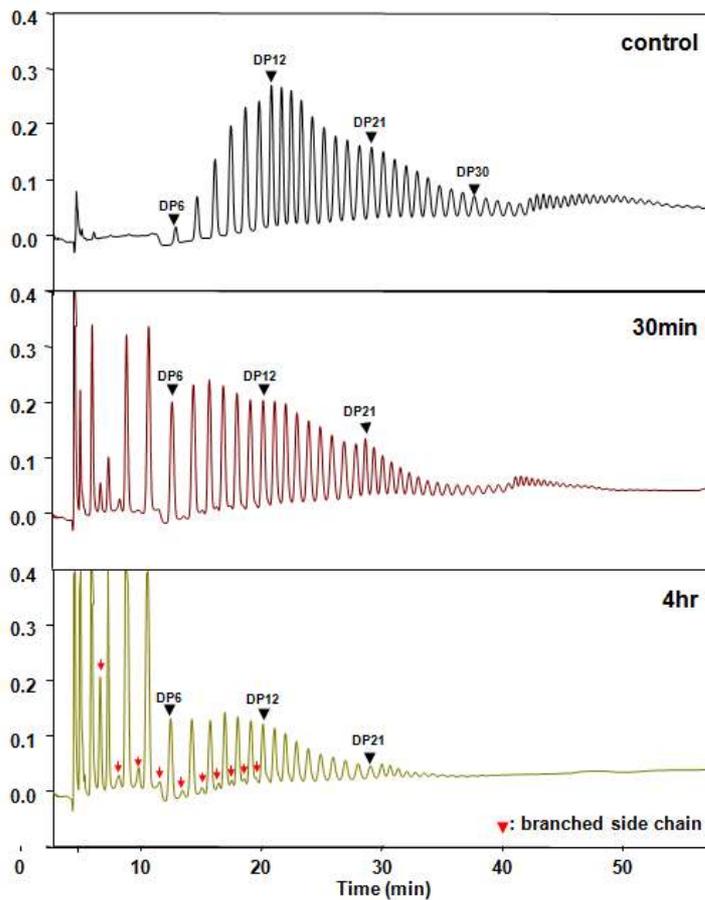


그림 12. BSMA를 처리한 찹쌀전분의 가지결합길이분포. Control은 BSMA 처리 전 시료의 가지길이분포 크로마토그램을 나타냄.

(3) 3차년도

① 초내열성 말토제닉 아밀레이즈의 클로닝 및 특성 규명

말토제닉 아밀레이즈를 이용한 변형전분의 생산은 본 연구실에서 활발히 연구된 바 있으며 수차례 국제학술지에 그 결과를 발표한 바 있다. 대표적인 예로 *Bacillus stearthermophilus* 유래의 말토제닉 아밀레이즈 (BSMA) 를 전분에 처리하여 아밀로스 만을 특이적으로 분해할 수 있음을 밝혔다 (24). 또한 BSMA는 고농도의 전분 슬러리에 처리하여 높은 밀도의 가지결합을 가지는 고분자 아밀로펙틴 클러스터를 생산하는데 이용되기도 하였다. 이처럼 말토제닉 아밀레이즈를 이용하면 아밀로스의 함량을 조절한 변형전분 등 독특한 물성학적 특성을 나타내는 전분소재를 생산할 수 있으며, 초내열성 말토제닉 아밀레이즈는 알파 아밀레이즈와 같은 효소의 추가적인 작용 없이 Jet Cooker 등을 이용하여 곧바로 전분 슬러리에 작용할 수 있으므로 (42) 다양한 용도의 변성전분을 생산하는데 있어 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서는 초내열성 미생물인 *Staphylothermus marinus* 로부터 말토제닉 아밀레이즈를 클로닝하고 그 특성을 밝혀 이를 변형전분 생산에 이용하고자 하였다.

㉞ *Staphylothermus marinus* F1으로부터 말토제닉 아밀레이즈 (SMMA)의 클로닝

S. marinus F1은 1986년 심해의 열점으로부터 분리되었으며 생육 최적온도가 85°C에서 92°C에 이르는 초내열성 혐기성 미생물이다. 이 미생물의 유전체분석은 비교적 최근에야 완료되었는데, 시퀀스 alignment를 통하여 검색한 결과, Smar_0613이 발현하는 단백질이 알파 아밀레이즈 패밀리와 매우 유사하여 4개의 conserved region을 가지며 말토제닉 아밀레이즈류와 비교적 높은 시퀀스 identity를 나타냄을 알 수 있었다. 이와 같은 정보를 바탕으로 Smar_0613 유전자를 클로닝 하고자 다음과 같은 PCR primer를 디자인 하였다. forward primer (SMMA-*Nde* I, 5'-GGCTGTATAGCA TATGTACAAAATTATTGG-3'); reverse primer (SMMA-*Xho* I, 5'-TAGCTCGAGTATATTACAAGGTTTAGAACC-3'). 이러한 두 primer를 이용하여 PCR를 수행 후, 2.1 kb 크기에 달하는 PCR 증폭산물을 얻었다. PCR 산물과 pTKNd6xH (36)를 적절한 제한 효소로 처리한 후 ligation하여 재조합 플라스미드인 pTKSMMA6xH를 제조하였다. pTKNd6xH는 카나마이신 항생제 저항성 마커를 가지며 발현단백질에 histidine tag를 접합시켜 발현시킬 수 있는 단백질 대량 발현용 벡터이다. SMMA cloning의 대략적인 방법은 아래 그림 1에 나타내었다.

㉟ SMMA의 발현 및 정제

pTKSMMA6xH 재조합 플라스미드를 *E. coli* MC1061 (44)에 transformation 하여 2L LB 배지를 이용하여 배양하였다. 18시간 동안 37°C, 250 rpm조건으로 배양 한 후 원심분리를 실시하여 cell을 분리한 후 이를 lysis buffer (50 mM pH 7.5 tris, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole)에 resuspending하고 sonication하여 cell extract를 얻었다. 이 후 70°C에서 20분간 가열하여 대장균의 단백질을 제거하고, Ni-NTA affinity chromatography를 실시하여 최종적

으로 SMMA를 고순도로 정제하였다. 최종 정제 후 γ -CD를 기질로 한 최적조건에서의 specific activity는 11.5 U/mg 가량이었으며, 수득율은 21% 가량이었다. SDS-PAGE 상에서 볼 수 있듯, SMMA의 band는 이론적인 분자량에 근접한 위치에서 나타났으나 그 발현 정도는 전체 단백질량의 10% 이하로서 산업적 이용을 위해서는 만족스럽지 못한 것으로 보였다. SMMA의 산업적 이용을 위해서는 추가 연구를 통해서 발현량을 개선하고, GRAS 미생물을 이용한 발현 시스템 개발도 고려해야 할 것으로 사료된다.

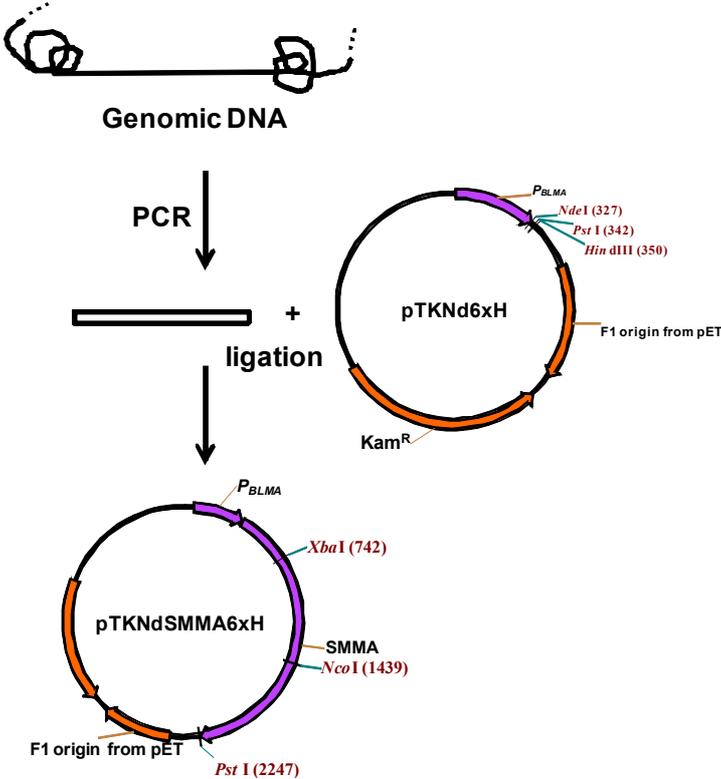


그림 1. S. marinus genomic DNA로부터 SMMA의 클로닝 방법.

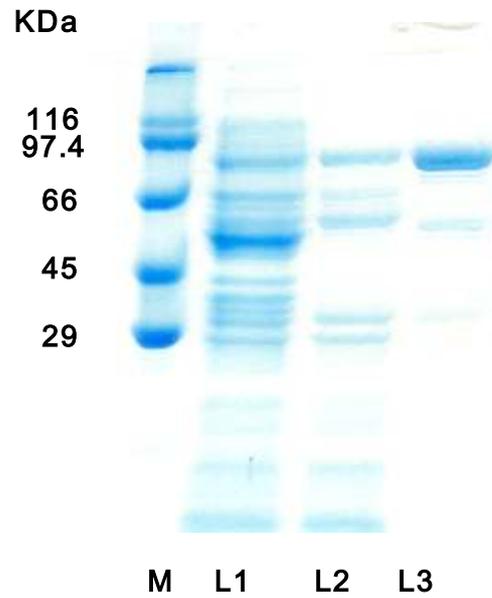


그림 2. SMMA의 SDS-PAGE를 이용한 정제도 분석. M, size marker; L1, cell extract; L2, Heat treatment; L3, Ni-NTA affinity chromatography.

표 1. SMMA의 정제 표.

Purification step	Total Volume(ml)	Total Protein(mg)	Total activity (U)	Specific activity(U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell extract	300	171	441	2.58	100	1
Ni-NTA	25	8.15	93.6	11.5	21.2	4.45

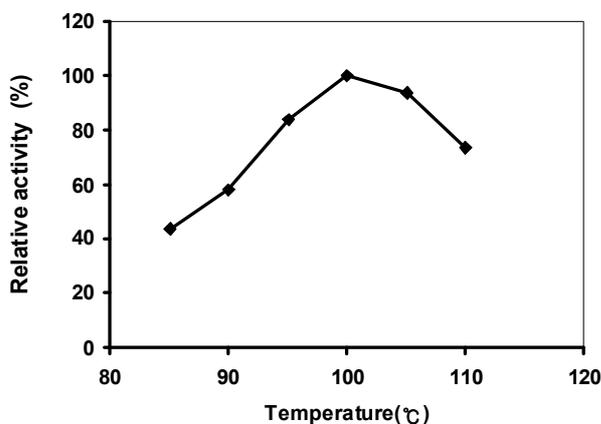
㉔ SMMA의 효소역가 측정 및 최적 반응 조건 탐색

말토제닉 아밀레이즈는 전분으로부터 가수분해를 통하여 말토오스를 생산하는 효소로서 그 역가는 시간당 생산된 환원성 당을 정량함으로써 측정할 수 있다. 본 연구에서는 3,5-dinitrosalicylic acid 방법을 사용하였으며 1분간 1 μmole 의 말토오스를 생산하는 효소의 양을 1 Unit으로 결정하여 역가를 측정하였다 (35).

SMMA 효소반응의 최적 조건을 탐색하기 위하여 γ -cyclodextrin (γ -CD) 을 기질로 하여 실험을 진행하였다. γ -CD를 5%를 증류수에 녹여 여러 종류의 완충액 조건에서 (pH 4.0 - 7.0) 최종농도 0.5%가 되도록 효소반응을 준비하고, 85°C 에서 110°C 사이의 온도에서 각각 반응을 진행하여 SMMA의 최적온도와 pH 조건을 결정하였다. 그림 3에서와 같이 SMMA는 100°C에서 최대의 활성을 나타내었으며 110°C에서도 최대치에 비하여 70%에 가까운 활성을 나타내는 초내열성 말토제닉 아밀레이즈임을 알 수 있었다. 80°C 이하에서는 최적활성에 비하여 40% 이하의 역가를 나타내었다. SMMA의 최적 pH는 5.0으로 나타났는데 현재까지 알려진 다른 말토제닉 아밀레이즈에 비하여 낮은 최적 pH 값을 나타내었다. 일반적으로 전분 슬러리는 물에 녹인 경우 pH 값이 5.5 가량을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 고온에서는 중성 이상의 pH 조건에서 원치 않는 전분의 화학적 변형이 쉽게 일어나는 것으로 알려져 있으므로 SMMA의 pH 따른 활성양상은 전분산업 이용에 매우 유리한 특성의 하나로 사료된다 (42).

SMMA는 현재까지 알려진 말토제닉 아밀레이즈와 비교하여 가장 높은 최적온도를 나타내는 효소이며 pH 5.0과 같은 약산성 조건에서 고효성을 나타내는 말토제닉 아밀레이즈인 것을 밝혔다.

A)



B)

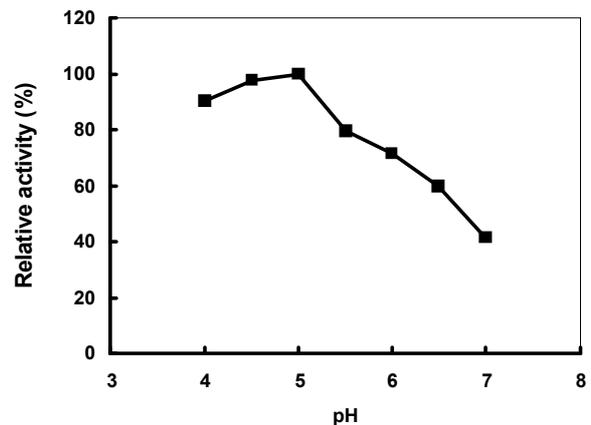


그림 3. SMMA의 온도 및 pH에 따른 활성 변화 측정

㉔ Differential Scanning Calorimetry (DSC)를 이용한 SMMA의 열안정성 분석

초내열성 효소인 SMMA의 열안정성을 측정하기 위하여 DSC를 이용하여 흡열곡선을 측정하였다. SMMA의 DSC를 이용한 분석결과는 아래 그림 4에 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯 약 110°C에 도달했을 때 흡열 피크가 나타나는 것을 관찰할 수 있다. 역가측정에서는 110°C에서도 상당수준의 역가를 나타내는 것으로 나타났으나, DSC 분석과는 효소액의 구성 조건이 다르므로 직접적으로 비교할 수는 없는 것으로 생각된다. SMMA는 오직 하나의 흡열 피크만을 나타내는 것으로 보아 정제 후 효소의 접힘 상태는 비교적 균일한 것으로 판단 내릴 수 있다. 이 같은 결과를 바탕으로 SMMA가 현재까지 보고된 말토제닉 아밀레이즈 중 가장 높은 열안정성을 나타내는 것을 다시 한 번 확인 할 수 있었다.

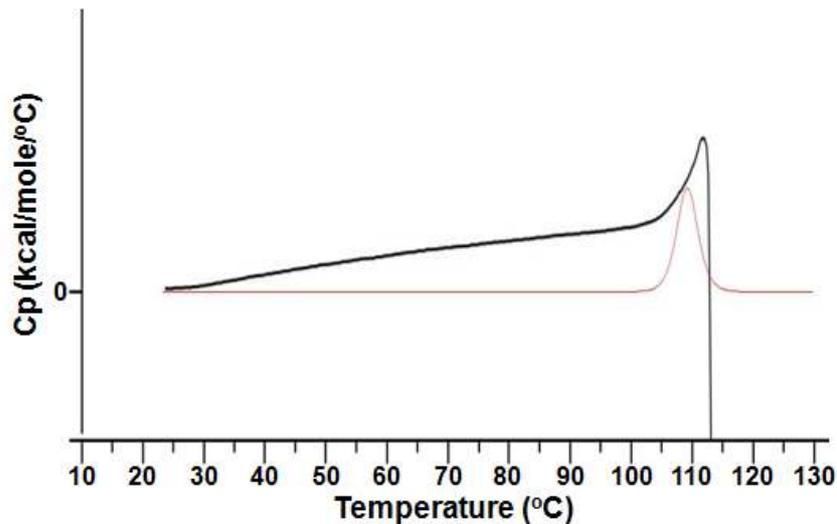


그림 4. DSC를 이용한 SMMA의 열안정성 분석. 검정색 실선, SMMA의 실제 흡열 곡선; сал색 가는 실선, 실제 흡열 곡선을 바탕으로 계산된 SMMA의 흡열 패턴.

㉔ SMMA의 기질특이성 분석

○ 다양한 기질에 대한 기질 특이성 분석

SMMA의 효소반응 특성을 분석하기 위하여 다양한 종류의 기질과 반응시켜 그 반응 산물을 분석하는 기질특이성 분석을 실시하였다. 각각의 기질을 최적 완충액에 1% 농도로 녹이고 적절하게 희석한 효소액을 투입한 후 90°C에서 3시간 동안 반응 시킨 후, 0°C 얼음물을 이용하여 반응 정지시켰다. 이 후 원심분리를 통하여 불순물을 제거하고 Thin Layer Chromatography (TLC)를 이용하여 반응 산물을 분석하였다. Maltotriose (G3), maltotetraose (G4), maltopentaose (G5), maltohexaose (G6) 및 maltoheptaose (G7)을 기질로 하였을 때, SMMA는 소량의 포도당과 함께 말토오스를 가수분해 주산물로 생성하였다. G3-G7을 이용한 0.5% 기질농도에서는 당전이 반응산물과 같은 물질은 전혀 발견되지 않았다. SMMA의 효소반응 특성 중 특기할 만한 사실은, 이 효소는 γ -CD는 효율적으로 분해하였으나 α -, β -CD는 거의 분해하지 못했다는 것이다. 일반적으로 말토제닉 아밀레이즈는 세 종류의 CD를 모두 잘 가수분해하거나 β -CD에 더욱 높은 기질 특이성을 나타내는 것으로 알려져 있다 (38, 44). 그러나 SMMA는 이와는 달리 γ -CD 만을 특이적으로 분해하여 다른 효소와는 차별적인 특성을 나타내었다. 최근의 연구보고에 따르면 몇 종류의 아밀레이즈류 효소가 유사한 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이 같은 특성은 효소의 catalytic site의 형태적 특성, 혹은 독특한 아미노산 구조에 의해 나타나는 것으로 추측되고 있다 (32, 43, 44, 46). SMMA는 풀룰란을 분해하여 판노스와 약간의 말토오스 및 포도당을 생성하였으며 soluble starch와도 반응하여 말토오스를 가수분해 산물로 생성하였다. 알과 아밀레이즈 저해물질로 잘 알려져 있는 아카보오스 또한 SMMA에 의해 가수분해되어 포도당과 PTS (PseudoTriSaccharide)를 생성하였는데 이는 풀룰란 분해 특성과 함께 말토제닉 아밀레이즈의 전형적인 효소특성 중 하나이다 (44).

위와 같은 SMMA의 기질 특이성을 그림 6에 정리하였다. 이로 볼 때, SMMA는 전형적인 말토제닉 아밀레이즈의 효소 특성을 나타내나, CD류에 대한 역가특성과 같이 일반적으로 많이 알려진 말토제닉 아밀레이즈와 구별되는 독특한 특성도 함께 지니고 있는 것으로 판단된다.

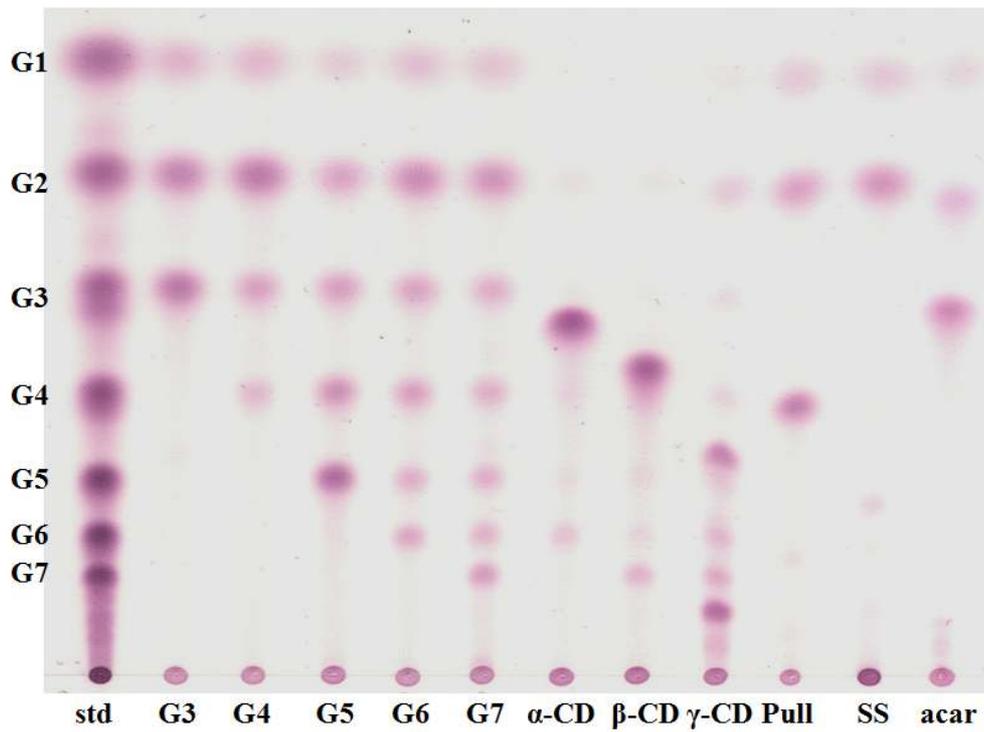


그림 5. 다양한 기질에 대한 SMMA의 반응 산물 분석. Pull, 풀룰란; SS, soluble starch; acar, acarbose.

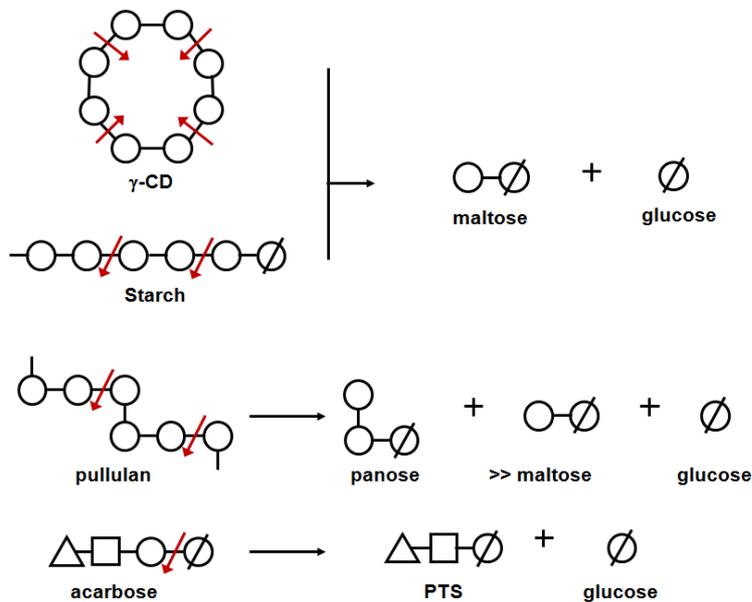


그림 6. SMMA의 기질 가수분해 특성. 붉은 화살표는 SMMA의 가수분해 결합 위치를 나타낸다. PTS, pseudotrisaccharides.

○ 방사성 동위원소 기질을 이용한 SMMA의 효소작용방향 분석

14C-labeled G7을 이용하여 SMMA의 선형 말토올리고당에 대한 방향 선택성을 분석하였다. 기질로 사용된 14C-labeled G7은 환원성 말단에 존재하는 포도당잔기 만이 14C 방사성 동위원소로 라벨링 되어 있어 가수분해 산물을 분석하면 효소가 기질을 환원성 혹은 비환원성 말단에서부터 가수분해하는지 알 수 있다. 그림 7에서와 같이 SMMA는 14C으로 라벨링 된 포도당과 말토오스를 생성하였는데, 그에 비하여 G6나 G5 스팟은 auto-radiogram에서 거의 나타나지 않았다. 이로 미루어 보아 SMMA는 G7과 같은 선형 말토텍스트린을 가수분해 할 때 환원성 말단부터 작용하여 말토오스를 생성하는 것을 알 수 있다. 선형 말토텍스트린의 환원성 말단을 먼저 가수분해하는 효소작용 방식은 대부분의 말토제닉 아밀레이즈에서 동일하게 나타나는 특성이다 (38). 베타 아밀레이즈와 글루코아밀레이즈는 기질의 말단으로부터 가수분해를 하는 것으로 알려져 있는데, 이 둘은 모두 비환원성 말단으로부터 기질을 분해하는 특성을 보인다 (30). 환원성 말단으로부터 가수분해하는 SMMA의 특성은 말토제닉 아밀레이즈의 중요한 특징 중 하나이다.

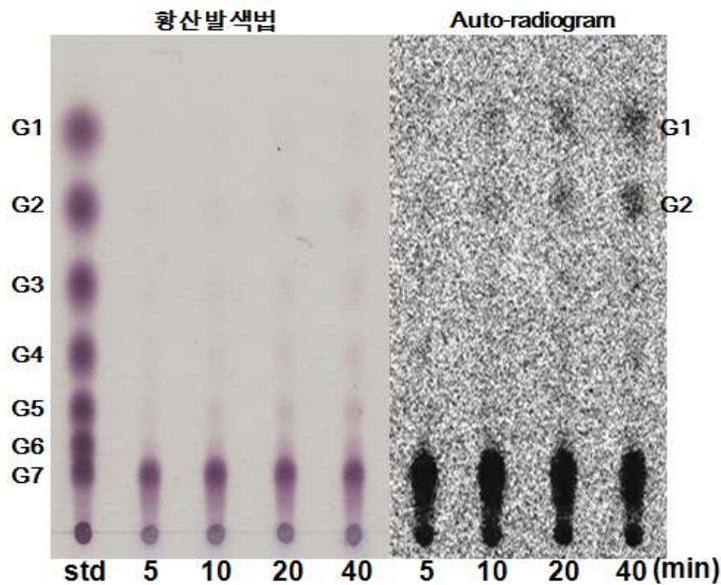


그림 7. 14C-labeled G7을 이용한 SMMA의 선형 말토올리고당에 대한 효소작용 방향 분석.

○ 다양한 기질에 대한 SMMA의 가수분해 속도 비교

SMMA의 가수분해 효소작용에 대한 최적기질을 탐색하고 기질종류에 대한 특성을 분석하기 위하여 다양한 기질을 대한 이 효소의 역가를 결정하였다. 해당 기질의 최종농도

는 모두 0.5%로 하고 95°C, pH 5.0에서 반응을 수행하였다. 표 2에서 나타난 바와 같이 SMMA의 최적 기질은 G6인 것으로 나타났다. 특이하게도 SMMA의 G3에 대한 역가는 G6에 비하여 5%에 불과한 것으로 측정되었다. 일반적으로 말토제닉 아밀레이즈는 G3에 대한 역가가 낮은 것으로 알려져 있으나 SMMA는 그 중에서도 그 정도가 가장 큰 것으로 생각된다. *E. coli* 유래의 maltodextrin glucosidase인 MalZ는 말토제닉 아밀레이즈와 상당히 높은 아미노산 서열 상동성을 가지는데, MalZ는 G3가 가수분해반응의 최적기질로 알려져 있다 (41). 흥미롭게도 SMMA는 G6를 정점으로 하여 그보다 긴 말토덱스트린에 대해서는 역가가 점점 감소하는 양상을 나타내었다. 이러한 특성은 catalytic site의 3차구조적 특성 및 subsite의 구조적 특성에 의한 것으로 생각되는데, 동역학적 연구를 이용하여 SMMA의 subsite 구조를 연구하는 것도 의미가 있을 것으로 사료된다 (32, 43). 앞서 언급한 바와 같이 CD류 중에서는 γ -CD가 가장 높은 가수분해 속도를 나타냈으며 α -, β -CD는 그것의 1/5 가량에 불과한 것으로 측정되었다. DP=20~30 가량으로 이루어진 cycloamylose (CA)는 CD류보다 높은 가수분해 속도를 나타냈는데 그 정확한 원인에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

표 2. 다양한 기질에 대한 SMMA의 가수분해 속도 비교

Substrate	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
G3	0.9	4.1
G4	15.5	70.7
G5	19.1	87.0
G6	22.0	100.0
G7	17.5	79.7
G8	7.7	35.0
α -CD	1.8	8.1
β -CD	2.0	8.9
γ -CD	9.5	43.1
CA ^a	12.9	58.5

㉔ SMMA를 이용한 고농도 말토오스 시럽 생산

말토오스는 포도당에 비하여 적당한 당도와 함께 높은 보수성과 안정성 등 좋은 물성학적 특성을 지닌다. 때문에 다양한 식품산업에서 말토오스 시럽이 광범위하게 사용되고 있으며 그 산업 규모도 크다. 현재 말토오스 시럽은 효소를 이용하여 생산되고 있으며, 보리에서 분리된 베타 아밀레이즈가 주로 사용되고 있으나 그 가격이 워낙 비싸 경제성에 문제가 생기고 있다. 말토오스를 생성하는 효소는 말토오스 시럽 생산 뿐 만이 아니라 제과나 제빵에

도 활용될 수가 있는데, 전분을 분해하여 적당량의 말토오스를 생성함으로써 조직의 노화를 방지할 수 있는 효과가 있기 때문이다. 본 연구에서는 SMMA를 말토오스 시럽 생산에 활용하기 위하여 실험을 진행하였으며 추후 제빵산업에 노화억제효소로서 이용될 수 있는지에 대한 연구도 진행할 예정이다.

SMMA에 의한 전분의 가수분해 및 말토오스로의 전환정도를 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저 최종 2%농도로 전분 슬러리를 준비하고 SMMA, 전분액화 용알파아밀레이즈인 Termamyl (Novo 사), TreX (*Sulfolobus solfataricus* 유래의 debranching enzyme) (31, 34, 37)를 여러 조합으로 투입하여 110°C 에서 autoclave를 이용하여 3시간 동안 반응을 진행하였다. 그림 8에서와 같이 SMMA는 감자전분으로부터 말토오스를 주산물로 생성하는 가수분해반응을 진행하였으며 2번 시료에서 볼 수 있듯이 단독으로 작용하여도 효과적으로 감자전분을 분해할 수 있는 것으로 나타났다. Termamyl과 함께 처리한 시료와 비교해서는 어느 정도 전분이 분해되지 않고 남아 있는 것을 발견할 수 있으나 최적조건을 찾아낸다면 해결 할 수 있는 문제점으로 생각된다. 5번 시료는 SMMA와 Termamyl 및 debranching 효소인 TreX를 동시에 처리하였는데 다른 시료와 비교하여 가장 효과적으로 감자전분이 말토오스 및 포도당으로 전환되었음을 발견할 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 앞으로 SMMA를 전분산업에 이용하기 위한 다양한 실험을 진행할 수 있을 것으로 기대한다.

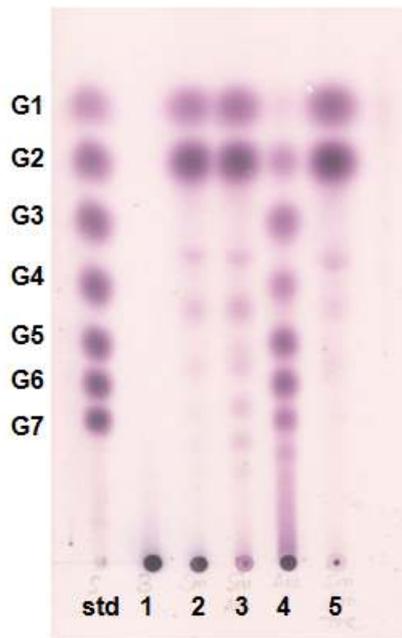


그림 8. SMMA를 이용한 전분으로부터 말토오스 생산. 1, 2% 감자전분; 2, 2% 감자전분 + SMMA; 3, 2% 감자전분 + SMMA + Termamyl; 4, 2% 감자전분 + Termamyl; 5, 2% 감자전분 + SMMA + Termamyl + TreX.

② 효소의 산업적 이용을 위한 대량생산 체제 구축

효소를 이용하여 쌀전분의 구조를 변형시키고 이를 산업적으로 이용하기 위해서는 해당 효소의 산업화가 우선적으로 시행되어야 한다. 때문에 본 연구에서 이용된 다양한 효소들의 산업화를 위하여 대량생산 및 정제 시스템 구축을 시도하였다.

㉠ BSMA 및 TSaGT의 대량생산 시스템 구축

지난 연구를 통하여 BSMA와 TSaGT의 GRAS 미생물인 *B. subtilis*를 이용한 발현시스템을 성공적으로 구축한 바 있다. 본 연구에서는 이 두 종류의 효소를 pilot scale 생산을 위하여 현재 벤처기업 등과 협의를 진행 중에 있다.

㉡ PfaGT 및 GlgB의 대량생산 시스템 구축

전년도 연구를 통하여 본 연구팀은 PfaGT 및 GlgB를 *E. coli* system을 이용하여서 발현에 성공하였고 그 효소적 특성을 규명한바 있다. 이들 효소의 산업적 이용을 위해서는 GRAS 미생물을 이용한 발현시스템 구축이 필요하다. 이를 위해 *B. subtilis*를 단백질 생산 균주로 이용하기 위한 재조합 플라스미드를 제조하고 있으나 현재까지는 단백질을 발현하여 얻어내는 데는 실패하였다. 향후 다른 GRAS 시스템을 활용하는 방안을 검토 중이다.

3. 제 3 세부과제

가. 서론

탄수화물은 생체 구성 물질 또는 에너지원으로서의 기초적인 역할 뿐만 아니라, 식품의 기능적 물성 개선, 영양생리적인 대사 활성화, 생체 정보 전달과 인식, 면역의 매개 물질로 관여하여 의약 및 식품 기능성 소재로서 폭넓은 활용성을 지닌 고부가가치 생물산업 소재이다. 국내에서는 쌀을 원료로 과자류, 면류 등 가공식품이 개발되어, 그 규모가 1조원 이상으로 계속 성장할 것으로 평가되어 왔다. 전분 식품에서는 전분의 특성이 식품의 물성을 결정하므로, 전분을 물리화학적인 방법으로 변형하여 노화 억제, 냉해동 안정성 등의 기능적 특성을 개선하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 전분으로부터 저칼로리, 당노 및 대장암 개선 등의 생리적 효과를 얻고자 하는 연구도 지속적으로 진행되어오고 있다. 전분은 영양적인 측면에서 급속히 소화되는 전분(rapidly digestible starch; RDS), 장내에서 서서히 소화되는 지소화성 전분(slowly digestible starch; SDS) 및 소장에서 소화되지 않는 난소화성 전분(resistant starch; RS)으로 나눈다(10). 식이섬유로 분류되는 난소화성 전분은 장내 미생물의 활성화, 부티르산 등 단쇄 지방산 생성으로 대장 pH의 저하, 면역 기능 강화, 대장암 예방, 분변량의 증대, 혈당 증가의 억제 등과 같은 생체 조절 기능을 수행한다(12-15). 그러나 사람의 소화기관 내에서 전분의 아밀로오스와 아밀로펙틴의 가지가 서서히 분해되어 혈당의 급속한 상승을 방지함으로써 당뇨 환자의 혈당을 조절하거나, 지속적 열량 공급 및 고지혈증 완화, 심혈관계 질환 예방 등의 생리기능적 효과가 있는 지소화성 전분에 대한 연구는 매우 제한적이다(50-53). 전분 내의 난소화성 및 지소화성 분획의 함량은 물리적, 화학적 및 효소적 처리에 의해 조절할 수 있는데, 기존의 난소화성 및 지소화성 전분의 생성에 관한 연구는 주로 화학적 처리 및 수분-열처리, annealing 등의 물리적 방법 및 노화에 의한 재결정화에 한정되어 있다(50-53). 반면, 기존의 전분당 생산에 한정적으로 사용되고 있는 효소공학적인 방법은 식품 및 생명공학산업에서 응용성과 창의성이 높은 핵심 기반 기술로서 제안되고 있을 뿐 아니라, 부산물 및 회분의 저감, 착색 감소, 반응 조절의 용이성, 에너지 절감 등 산업적 적용에 있어 장점이 많으며 경제성이 크다. 탄수화물 효소 중 amylosucrase (EC 2.4.1.4)는 sucrose를 가수분해하여 fructose는 방출하고 남은 glucose를 서로 연결시켜 α -(1 \rightarrow 4)-glucan을 합성한다. 이 효소는 수용체의 바깥쪽 사슬의 비환원성 말단에 glucose를 연결시킨다. 전분의 amylose와 amylopectin을 수용체로 사용하면 이들 사슬의 길이를 신장시키므로, 소화 효소의 작용을 어렵게 하여 전분의 소화율에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 시트르산은 전분 분자 간에 가교결합을 형성하여 소화 효소의 작용을 저해한다고 알려져 있다. 이 연구에서는 amylosucrase를 사용한 효소적 방법 및 시트르산을 사용한 화학적 방법에 의해 지소화성 및 난소화성 분획이 높은 변형 전분의 제조 조건을 탐색, 최적화하고, 그 구조 및 물성을 조사하고자 하였다. 또한, 쌀을 이용한 식품인 백설기에 적용하여 소화율의 변화 및 가공 적성을 조사함으로써, 이를 이용한 기능성 식품의 제조 가능성을 제

시하고자 하였다.

나. 연차별 연구방법 및 결과

(1) 1차년도

(가) 재료 및 방법

① 효소적 방법을 사용한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 제조

이 연구에서는 태국산 찹쌀 전분을 삼양제넥스로부터 제공받아 사용하였다. 효소 처리를 위하여 100mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에 전분을 각각 1, 2 및 3% 농도로 현탁하여 10분 간 끓여 호화시킨 후 냉각하여 전분 용액을 준비하였다. *Neisseria polysaccharia* 유래의 amylosucrase를 각각 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000 및 30000 U를 사용하여 30°C 항온 수조에서 43시간 반응을 진행시켰다. 효소 처리를 통해 얻은 산물은 3배의 에탄올로 반응을 정지시키고, 증류수로 수용성 부분을 제거하고 냉동 건조하여 시료를 조제하였다. 난소화성 및 지소화성 전분 함량은 전분 30mg에 100mM sodium acetate buffer(pH 5.2) 0.75mL와 효소 용액(α -amylase, amyloglucosidase) 0.75mL를 넣고 37°C에서 각각 10분, 240분 간 소화시켰다. 이어서 10분 간 끓여 효소 반응을 정지시키고, 상층액의 포도당을 GOD-POD방법으로 측정하였다. 240분 이후에도 소화되지 않는 전분을 난소화성 전분, 10분과 240분 사이에 소화된 전분을 지소화성 전분으로 계산하였다.

② 화학적 방법에 의한 난소화성 쌀 전분 제조

전분은 효소 처리 시와 동일한 태국산 찹쌀 전분을 사용하였다. 전분(20g)과 0.1M 시트르산 용액(26.8mL)을 혼합하여 121°C에서 30분 간 압열 처리한 뒤, 128°C의 열풍 오븐에서 14시간 동안 가열하였다. 이렇게 처리한 전분을 1M NaOH로 중화하고 3회의 원심분리(8770×g)를 통해 증류수로 남아 있는 용액을 씻어 내었고, 실온 건조 후 분쇄(150 μ m) 하여 산 처리 전분을 조제하였다. 전분의 소화율은 Brumovsky와 Thompspon의 방법을 변형하여 측정하였다.

압열로 제조한 전분의 낮은 난소화성 전분 함량 및 수율로 인하여 건열을 사용하는 시트르산 처리 방법을 모색하였다. 즉, 20% 및 40% 시트르산 용액(5mL, pH 3.5)을 전분(5g)과 혼합하고 실온에 방치(16시간)하여 전분 입자에 산 용액이 잘 스며들도록 하였고, 50°C 오븐에서 일정한 수분 함량(5-10%)에 도달할 때 까지 건조(24시간)시켜 분쇄(150 μ m)하였다. 이것을 열풍 오븐에서 가열(130°C, 3-7시간) 하여 시트르산의 카복실 잔기에서 물 분자가 떨어져 나가고 전분과

가교결합을 형성하도록 유도하였다. 제조된 산 처리 전분은 증류수(250mL)에 현탁하고, 원심분리 (1500×g)하여 반응이 끝나고 남아 있는 산 용액을 중화, 세척하였다. 침전된 전분은 회수하여 실온에서 건조하고 분쇄(150µm)하였다.

(나) 결과

① 효소적 방법을 사용한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 제조

실험에서 사용한 찹쌀 전분의 소화율은 생전분 상태의 경우 10분 후 40%가 소화되었고 60분 후에 80%가 소화되었다. 조리한 전분의 경우 10분 후 70% 이상이 소화되었다(Figure 1). 생전분은 15.1%의 난소화성 전분과 44.5%의 지소화성 전분을 함유하고 있다. 우리가 보통 섭취하는 형태의 조리한 전분은 12.3%의 난소화성 전분, 13.7%의 지소화성 전분 함량을 나타냈으며, 가열 후 지소화성 전분의 함량이 급격히 감소하였다(Table 1). 이것은 생전분의 결정 구조가 가열로 인하여 붕괴되어 소화 효소의 접근성이 더 용이해졌기 때문이다.

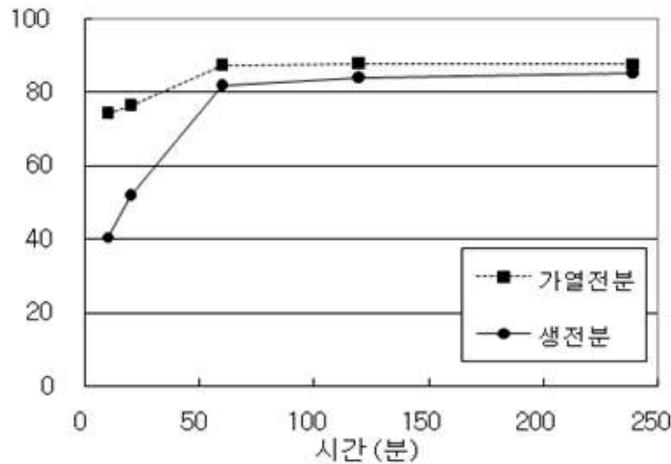


Figure 1. Digestibilities of raw and cooked waxy rice starches

Table 1. RDS, SDS and RS fractions of raw and cooked waxy rice starches

	RDS	SDS	RS
Raw starch	40.4±0.1	44.5±1.2	15.1±1.2
Cooked starch	74.0±2.3	13.7±0.5	12.3±1.8

¹⁾ RDS, SDS and RS represent rapidly digestible starch, slowly digestible starch and resistant starch, respectively.

난소화성 및 지소화성 전분 함량을 증가시킬 수 있는 방법을 모색하기 위하여 찹쌀 전분에 amylosucrase를 처리하였다. 최적 조건을 탐색하기 위하여 다양한 효소 농도 (500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000, 30000 U)를 처리하였고, 전분의 농도는 1, 2, 3%로 하였다. 각 시료의 난소화성 및 지소화성 전분의 함량을 측정된 결과 효소 농도나 전분 농도에 따라 일정한 경향성을 보이지 않았지만, 난소화성 및 지소화성 전분 함량이 가장 높은 시료는 효소 농도 2000 U, 전분 농도 2% 시료였다. 이 시료의 난소화성 전분 함량은 42.5%, 지소화성 전분은 28.0%로, 효소 처리 전의 함량보다 난소화성 전분은 30.2%, 지소화성 전분은 14.3%가 증가하였다(Table 2, Figure 2). 이 실험에서 사용한 amylosucrase는 쌀 전분의 아밀로오스와 아밀로펙틴 바깥사슬의 비환원성 말단에서부터 glucose를 결합시킨다 (Figure 3). 결과적으로 사슬 길이가 증가된 아밀로오스와 아밀로펙틴이 생성되고 효소 반응 시간 동안 이러한 사슬의 신장과 그들 간의 재결정으로 인해 소화율이 낮아진 것으로 사료된다.

Table 2. RDS, SDS and RS fractions of amylosucrase-treated waxy rice starches

Starch solution	Amylosucrase (U)						
	500	1000	2000	5000	10000	20000	30000
RDS							
1%	33.4±1.8	34.9±3.1	21.9±3.1	29.9±1.2	27.6±3.4	29.0±2.2	28.1±2.1
2%	35.8±0.6	33.2±1.4	29.5±5.8	27.6±1.8	27.1±6.2	29.7±6.2	34.2±1.0
3%	35.6±3.6	46.2±1.2	35.0±3.0	35.4±3.3	35.9±1.5	42.1±2.1	41.8±1.8
SDS							
1%	26.4±1.9	23.6±4.5	22.1±1.3	18.9±1.4	19.0±4.0	20.0±5.4	16.5±1.0
2%	22.6±2.6	23.1±1.2	28.0±5.2	23.7±1.2	21.6±4.9	19.7±1.5	19.5±2.0
3%	23.7±1.7	171.±3.5	22.2±2.4	20.6±3.3	22.3±4.0	17.4±3.7	15.6±0.4
RS							
1%	40.2±3.8	41.6±1.0	46.0±1.8	51.2±0.2	53.4±0.6	51.0±3.3	55.4±3.1
2%	41.6±2.0	43.7±2.6	42.6±2.0	48.7±0.6	51.4±1.3	50.6±4.7	46.3±3.1
3%	40.6±1.8	36.1±2.3	42.8±0.6	43.0±0.0	41.8±2.5	40.5±1.6	42.7±1.4

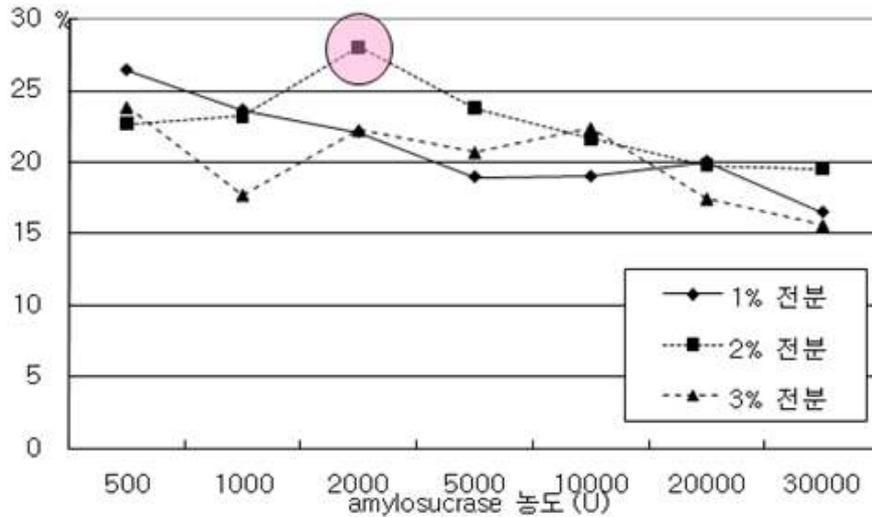


Figure 2. SDS fractions of amylosucrase-treated waxy rice starches

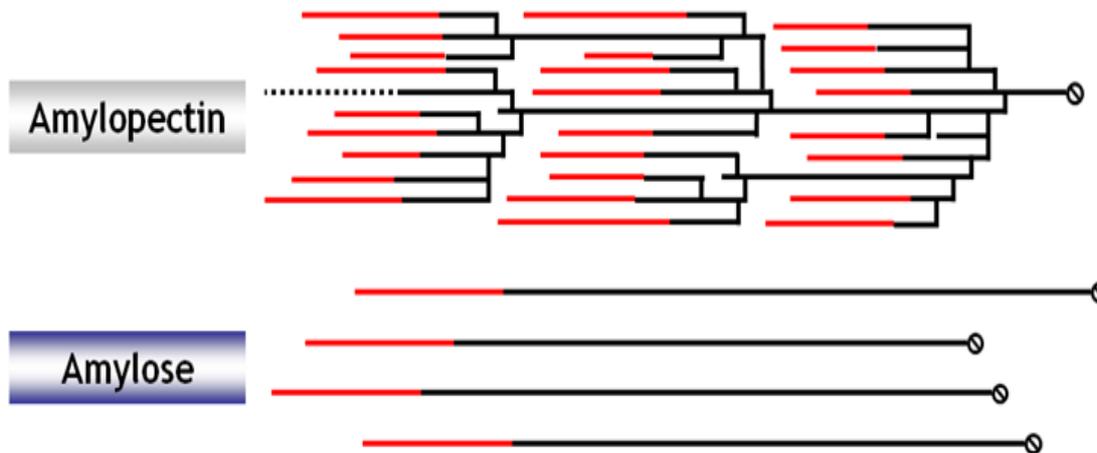


Figure 3. Schematic drawing of amylosucrase reactions upon amylose and amylopectin acceptors

② 화학적 방법에 의한 난소화성 쌀 전분 제조

㉞ 압열을 사용하여 제조한 시트르산 전분의 소화율

소화율 측정 결과, 생 참쌀 전분은 지소화성 전분의 함량이 47.5% 수준이었으나, 100°C에서 20분 간 가열한 다음 소화율을 측정하였을 때 그 함량이 14.7%로 감소하여 열 안정성이 약한 지소화성 전분 고유의 특성을 확인할 수 있었다(Table 1). 반면에, 산 처리 전분은 초기에 6.5%

의 낮은 지소화성 전분 함량을 보였지만 가열 후에도 6.7%를 유지하는 것으로 나타나 가공되지 않은 생 전분보다 높은 열 안정성을 나타내었다(Table 3). 또한, 난소화성 전분 함량은 11.9%에서 71%로 크게 증가하였고 열에 안정함을 확인하였다. 증류수를 산 용액과 동량 첨가하여 제조한 대조구는 지소화성 전분 함량이 50.5%에서 3.9%로 크게 감소되었고 난소화성 전분은 11.8%로 생 전분과 유사한 것으로 나타나, 변형 전분이 함유한 지소화성 전분의 열 안정성과 난소화성을 확인할 수 있었다(Table 1). 그러나, 변형 전분의 낮은 수율(~1%)을 보완하기 위해 pH를 3.5로 높인 산 용액을 이용한 전분을 제조하였다. 이 변형 전분은 생 전분과 비교하여 지소화성 전분의 함량에 큰 차이가 없었으며, 난소화성 전분 함량은 71.0%에서 10.7%로 크게 감소하였다. 수율 또한 30%를 넘지 않아 경제적인 측면을 고려하여 압열로 전분 입자를 파괴하지 않는 다른 방법을 모색하였다.

Table 1. Digestibilities of citric acid-treated waxy rice starches with or without autoclaving

Starch	RDS	SDS	RS
Raw	40.6	47.5	11.9
Autoclaved	72.9	14.7	12.4
Control	37.8	50.4	11.8
Autoclaved control	80.8	3.9	15.3
Citric acid-treated, pH 1.9	22.5	6.5	71.0
Autoclaved/citric acid-treated, pH 1.9	23.8	6.7	69.4
Citric acid-treated, pH 3.5	83.5	5.8	10.7
Autoclaved/citric acid-treated, pH 3.5	88.0	6.3	5.7

㉔ 건열을 사용하여 제조한 시트르산 전분의 소화율

전분 입자 형태를 유지하면서 시트르산과 전분의 가교결합이 형성된 변형 전분은 20% 산 용액을 첨가하여 130°C에서 3, 5, 7시간 가열했을 때, 각각 4.8%, 2.4%, 6.6%의 지소화성 전분 함량을 보였다(Table 2). 40% 산 용액으로 제조한 전분의 경우는 130°C에서 각각 3.4%, 11.7%, 17.9%의 함량을 나타내어(Table 2) 20%보다 40% 시트르산용액으로 처리했을 때 더 높은 지소화성 전분 함량을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 산이 침투된 전분을 가열하는 시간에 따라서도 지소화성 전분 함량이 증가하는 경향을 나타내어 40% 산 용액으로 제조하여 7시간 가열한 전분이 가장 높은 지소화성 전분 함량을 가지고 있음을 확인하였다. 난소화성 전분 함량을 살

펴보면, 20% 산 용액으로 제조한 전분은 열처리 시간에 따라 각각 26.5%, 35.6%, 47.7%로 증가하였고, 40% 산 용액으로 제조한 전분에서도 동일 열처리 시간에서 47.7%, 41.4%, 55.9%로 역시 비슷하거나 증가하였다. 수율 또한 평균 60%를 넘는 것이 확인되어 생산의 경제적 측면과 지소화성 및 난소화성 기능적 측면 모두 이전 방법으로 제조된 전분보다 향상된 결과를 보였다.

Table 2. Digestibilities of citric acid-treated waxy rice starches

Citric acid (g/ g starch)	Time (hr)	RDS	SDS	RS
0.2	3	68.7	4.8	26.5
0.2	5	62.0	2.4	35.6
0.2	7	61.9	6.6	47.7
0.4	3	48.9	3.4	47.7
0.4	5	46.9	11.7	41.4
0.4	7	26.2	17.9	55.9
Raw starch		57.5	38.7	3.8
Cooked starch		81.3	14.1	4.6

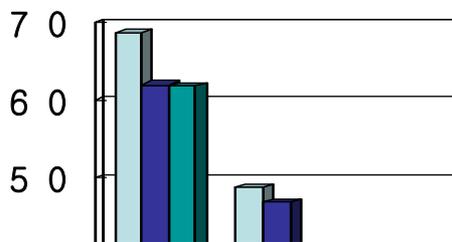


Figure 1. Changes in digestibilities of citric acid-treated rice starches according to time

(2) 2차년도

(가) 재료 및 방법

① 효소적 방법으로 제조한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석

㉠ Amylosucrase 처리 쌀 전분의 제조

이 연구에서는 *Naiisseria polysaccharia* 유래의 amylosucrase를 사용하였으며, 찹쌀 및 멥쌀 전분은 태국산으로 삼양제넥스로부터 제공받아 사용하였다. 2% (w/w)의 쌀 전분과 100mM sucrose를 100mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에 현탁하여 10분 간 호화시켰다. 2000단위의 amylosucrase를 첨가하여, 30°C 항온수조에서 수크로오스가 전량 소비되는 시간인 40시간 동안 반응시켜 제조하였다.

㉡ 소화율 측정

전분의 소화율을 측정하기 위하여, 쌀 전분 30mg을 0.75mL sodium acetate buffer(pH 5.2)에 분산시키고 10분 간 방치 후 0.75mL의 효소액을 첨가하여 37°C에서 10분 및 240분 간 반응시켰다. 효소액은 판크레아틴(pancreatin) 2g을 24mL의 증류수에 넣고 교반한 다음 원심분리하고, 상층액 20mL를 0.4mL의 amylo- glucosidase 및 3.6mL의 증류수와 섞어 제조하였다. 효소 반응을 정지시킨 후 원심분리하여, 상층액의 글루코오스를 GOD-POD방법으로 측정하였다. 이로부터 10분 이내에 소화되는 것을 급속히 소화되는 전분(RDS), 10분과 240분 사이에 소화되는 것을 지소화성 전분(SDS), 240분 이후에도 소화되지 않는 것을 난소화성 전분(RS)으로 분류하였다.

㉢ 아밀로펙틴 사슬 분포

10mg의 쌀 전분을 90% DMSO(0.5mL)에 분산시켜 가열한 후 0.5mL 증류수를 첨가하였다. 이 용액 0.5mL에 0.49mL의 0.2M sodium citrate buffer(pH 3.5)를 섞고, isoamylase(Sigma)를 넣어 40°C에서 16시간 반응시켜 debranching하였다. 이를 원심분리하여 그 상층액을 Carbo-pack PA100 anion exchange column(4 X 250mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 장착한 HPAEC-PAD system을 이용하여 분석하였다. DP 1부터 DP 7의 값은 maltooligosaccharide standard(DP1~7, Sigma)를 사용하여 결정하였다.

㉣ 분자량 측정

25mg의 쌀 전분을 5mL DMSO에 분산시킨 후 가열하고 ethanol을 첨가하여 전분을 침전시켰다. 원심분리한 후 침전물을 100mM NaNO₃에 용해시켜 15분 간 끓이고 여과한 다음 HPSEC-MALLS-RI system(Model PU-2080, Jasco, Tokyo, Japan; DAWN DSP/OptiLab, Wyatt

Technology, Santa Barbara, CA, USA)과 Shodex OH-Pak 804 and 806 column을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이동상으로는 100mM NaNO₃를 0.4mL/min의 유속으로 사용하였다.

㉞ X선 회절도 및 상대적 결정화도

X선 회절 유형은 X-ray diffractometer(Model D5005, Bruker, Karlsruhe, Germany)를 이용하여 분석하였다. 시료는 2θ 범위를 3°에서 30°까지 측정하였다. 상대적 결정화도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{상대적 결정화도 (\%)} = [Ac/Aa+Ac] \times 100$$

Ac : 무정형 영역의 면적

Aa : 결정형 영역의 면적

㉟ DSC를 이용한 열적 특성 조사

시차주사열량계(Diamond DSC, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 amylosucrase 처리 전후의 열적 특성 변화를 알아보았다. 시료 팬의 온도를 30°C에서 130°C까지 1분당 5°C씩 상승시키면서 측정하였다.

㊱ 전분 젤의 유변학적 특성

전분 젤의 유변학적 특성은 oscillatory rheometer(Rheostress 1, Thermo HAAKE, Karlsruhe, Germany)를 사용하여 측정하였다. 전분 현탁액 2, 4, 6%를 121°C에서 15분 간 고압 가열한 다음, 이를 plate에 올리고 25°C에서 한 시간 동안 방치하여 젤을 형성시킨 후 측정하였다. 주파수(frequency) 범위는 0.1~10Hz였으며, 25°C에서 수행하였다.

② 화학적 방법으로 제조한 난소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석

㉠ 시트르산 전분 제조의 최적 조건 확립

태국산 찹쌀 전분은 삼양 제넥스에서 공급받아 사용하였다. 난소화성 전분이 가장 많이 생성되는 시트르산 전분의 제조 조건을 확립하기 위하여 반응표면분석을 실시하였다. 시트르산 농도, 반응 시간 및 반응 온도의 3요인을 각각 5수준으로 결정하였다(Table 1). 3 요인 5수준에 대한 처리 조합 중에서 15개의 시료를 선택하고 가운데 처리 조합을 두 번 더 첨가시켜 17개의 실험 시료를 구성하였다. 실험 시료는 다음과 같이 제조하였다. 8~40%의 시트르산 용액 5 mL를 5g의 전분과 혼합하고 실온에 16시간 동안 방치한 후, 50°C 오븐에서 24시간 건조하여 분쇄하였다. 이를 70~150°C 열풍 오븐에서 1~11시간 동안 가열하였다. 제조한 전분은 증류수에

현탁하고 원심분리한 후, 실온에서 건조하여 분쇄하였다. 반응표면분석은 SAS 통계 package(version 8.0, SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 수행하였다.

㉔ 전분 입자의 형태 조사

디지털 카메라를 탑재한 광학 현미경(DE/Axio Imager A1, Zeiss, Germany)을 이용하여 입자 형태를 관찰하였다. 시료의 구조적인 특징은 주사전자현미경(JSM 5410lf, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다.

Table 1. Coding levels of variables, citric acid concentration, reaction temperature, and reaction time

Independent variables	-2	-1	0	1	2
Citric acid concentration (%)	0.08	0.16	0.24	0.32	0.4
Reaction temperature (°C)	70	90	110	130	150
Reaction time (hr)	1	3.5	6	8.5	11

㉕ FT-IR 측정

IR 분광은 FT-IR(Nicolet 6700, Midac, Costa mesa, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 분광 변속 형식은 4000부터 400cm⁻¹에서 4cm⁻¹의 감도로 기록되었다. 시료는 전분을 KBr에 1:100의 농도로 희석하여 준비하였다. 측정된 분광은 데이터 분석 소프트웨어(OMNIC)을 이용하여 분석하였다.

㉖ 아밀로펙틴의 사슬 분포

10mg의 쌀 전분에 1M KOH 100μL와 증류수 200μL를 넣어 분산시켰다. 1M HCl을 넣어 중화하고 증류수를 첨가하여 총 부피가 1mL가 되게 하였다. 이 용액 0.5mL를 취하여 0.49mL의 0.2M sodium citrate buffer(pH 3.5)를 섞고, isoamylase (Megazyme)를 넣어 45°C에서 2시간 반응시켜 debranching하였다. 반응 종료 후 원심분리하여 그 상층액을 HPAEC-PAD system을 이용하여 분석하였다.

㉗ X선 회절도 및 상대적 결정화도, DSC를 이용한 열적 특성

효소적 방법으로 생산한 전분의 구조 분석과 동일한 방법을 사용하여 측정하였다.

(나) 결 과

① 효소적 방법으로 제조한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석

㉔ Amylosucrase 처리에 의한 소화율의 변화

호화 쌀 전분은 RDS 함량이 70% 이상으로 매우 높은 소화율을 보였는데, 이는 호화 과정 중 생전분 입자의 결정 구조 파괴에 기인한 것으로 볼 수 있다. 호화 후 효소 반응 조건과 동일한 조건인 30℃에서 40시간 동안 방치하였던 대조군의 RDS 함량은 찹쌀 전분의 경우 54.6%, 멥쌀 전분의 경우 52.7%로 호화 전분에 비해 감소하였다. 이는 호화 전분이 장시간 동안 방치되어 노화가 발생하였으며, 이에 따라 소화율이 낮아진 것으로 보인다. Amylosucrase 처리한 전분의 RS 함량은 대조군에 비해 약간 증가하였으나, 섭취 후 10분 이내에 소화되는 RDS는 현저히 감소하였으며, 서서히 소화되는 SDS가 크게 증가하였다. 이와 같은 소화율의 변화는 멥쌀 전분과 찹쌀 전분 모두에서 유사하였으나, 찹쌀 전분에서 SDS 및 RS의 함량이 더 많이 증가한 것으로 나타났다.

Table 1. The contents of RDS, SDS, and RS¹⁾

Starch	Cooked			Control			AS ²⁾		
	RDS	SDS	RS	RDS	SDS	RS	RDS	SDS	RS
Waxy rice	73.9	7.8	18.4	54.6	4.9	40.5	21.2	29.1	49.8
Normal rice	72.4	6.5	20.1	52.7	4.7	42.6	41.4	12.4	46.2

¹⁾RDS, SDS and RS denote rapidly digestible starch, slowly digestible starch, and resistant starch, respectively. ²⁾ Amylosucrase-treated starch.

㉕ Amylosucrase 처리에 의한 전분 사슬 분포의 변화

HPAEC-PAD system을 이용하여 쌀 전분의 사슬 길이 분포를 측정된 결과는 Figure 1 및 Table 2에 나타내었다. 찹쌀과 멥쌀의 생전분에서는 짧은 사슬(DP6~12)이 각각 38.0%와 33.7%, 긴 사슬(≥DP37)이 2.5%와 3.5%이었으나, AS처리 전분에서는 짧은 사슬은 1.2%와 3.6%, 긴 사슬은 19.9%와 23.3%로 나타났다(Table 2). 생전분에서 가장 많은 함량을 차지한 부분은 찹쌀과 멥쌀 모두 DP13~24였지만, amylosucrase 처리 후에는 DP25~36으로 나타났다. 측정할 수 있는 가장 긴 사슬은 찹쌀과 멥쌀의 생전분에서는 각각 DP52와 DP54로 나타났고, AS처리 전분에서는 DP71과 70으로 나타나, amylosucrase 처리 후 DP값이 16이상 증가한 것을 알 수 있었다. Amylosucrase는 수용체 외부 사슬의 비환원성 말단을 신장시키는 것으로 알려져 있으며, 아밀

로펙틴의 사슬 길이 분포는 전분의 호화온도, 엔탈피 변화, 노화 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이 연구 결과로부터 amylosucrase에 의한 아밀로펙틴 사슬 길이의 신장이 전분의 지소화성 분해를 증가시키는 것으로 보인다.

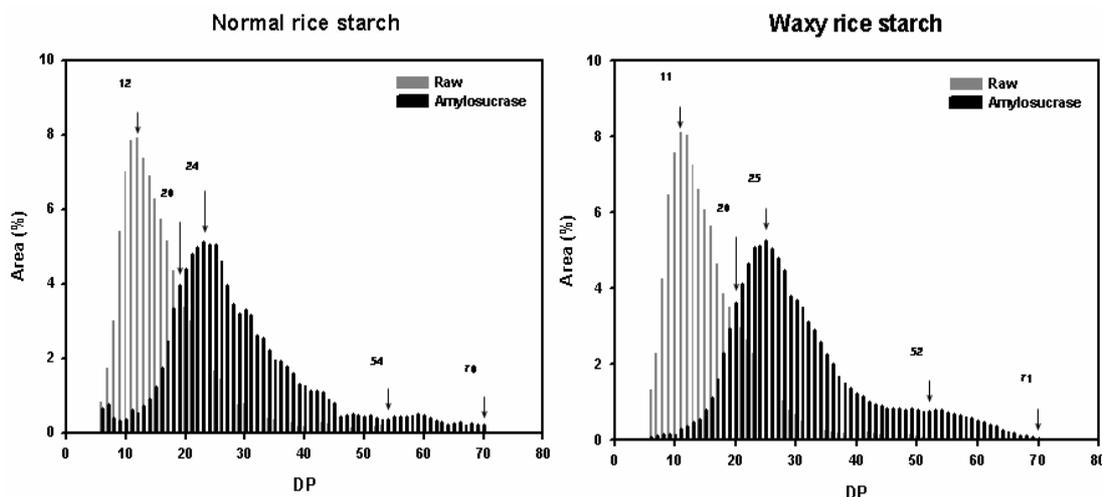


Figure 1. The side chain distributions of amylosucrase-treated starches

Table 2. Side chain distributions of amylopectins

Starch		Relative area (%)				Highest detectable DP
		DP6~12	DP13~24	DP25~36	≥DP37	
Waxy rice	Raw	38.0	50.6	8.9	2.5	52
	AS ¹⁾	1.2	32.2	43.3	23.3	71
Normal rice	Raw	33.7	52.9	10.0	3.5	54
	AS	3.6	38.6	37.9	19.9	70

¹⁾ Amylosucrase-treated starch

Ⓢ Amylosucrase 처리에 의한 분자량의 변화

Amylosucrase 처리에 의한 분자량의 변화는 Table 3에 나타내었다. 생 찹쌀 전분과 멥쌀 전분의 분자량은 각각 9.59×10^7 과 3.53×10^7 g/mol이었으나, AS처리 후에는 13.79×10^7 및 10.21×10^7 g/mol로 증가하였다. 이는 amylosucrase 처리에 의해 사슬이 신장되어 증가한 것으로

생각된다. 한편, 멍쌀 전분의 refractive index chromatogram은 주로 아밀로펙틴으로 구성되는 분획 I과 아밀로오스 및 중간 분자로 구성되는 분획 II로 나눌 수 있는데, 분획 I의 분자량은 크게 증가하였으나 분획 II의 분자량의 증가는 상대적으로 작아, amylosucrase 처리에 의한 사슬 신장은 가지가 많은 아밀로펙틴에서 아밀로오스보다 더 많이 일어난 것을 알 수 있었다.

Table 3. MALLS parameters of rice starches

Starch		Mw (10^7 g/mol)	Rg (nm)
Waxy rice	Raw	9.59 ± 1.44	174 ± 22
	AS ¹⁾	13.79 ± 2.46	203 ± 26
Normal rice	Raw	3.53 ± 0.51	178 ± 22
	AS	10.21 ± 1.95	230 ± 26

¹⁾ Amylosucrase-treated starch

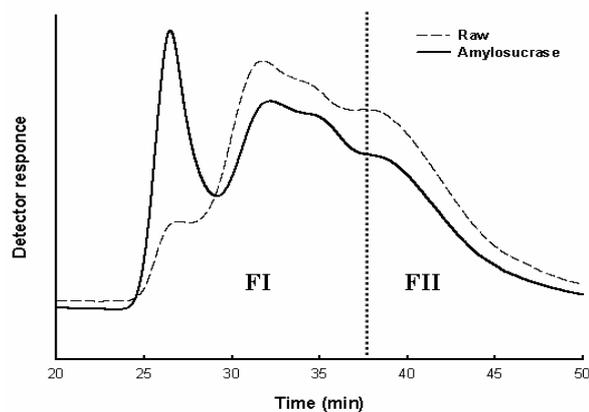


Figure 2. The refractive index chromatograms of normal rice starches

㊦ Amylosucrase 처리에 의한 X선 회절도 및 상대적 결정화도 변화

쌀 전분의 X선 회절도는 Figure 3에 나타내었다. 찹쌀 및 멍쌀의 생전분의 X선 회절도는 15, 17, 18, 23°에서 피크가 나타나는 전형적인 A형을 나타내었다. 한편, 가열 후 효소 반응과 같은 조건에서 방치한 대조군에서는 피크가 전혀 나타나지 않았는데, 이는 가열 과정 중 결정성을 잃었기 때문으로 보인다. AS 처리 전분은 찹쌀 및 멍쌀 전분 모두 B형으로 변화한 것으로 나타났으며, 이는 사슬의 신장과 효소 반응 동안에 진행된 전분의 노화로 인한 것으로 생각

된다.

한편, 상대적 결정화도는 Table 4에 나타냈는데, 대조군의 경우 생전분보다 낮은 상대적 결정화도를 보였으나, amylosucrase 처리한 전분은 생전분과 유사한 결정화도를 보였다. 이로부터 amylosucrase 처리는 쌀 전분의 무정형 영역을 감소시키고 결정성 영역을 증가시킨다고 할 수 있으며, amylosucrase 처리된 전분의 구조가 더 강하고 치밀하게 형성되었다고 볼 수 있다.

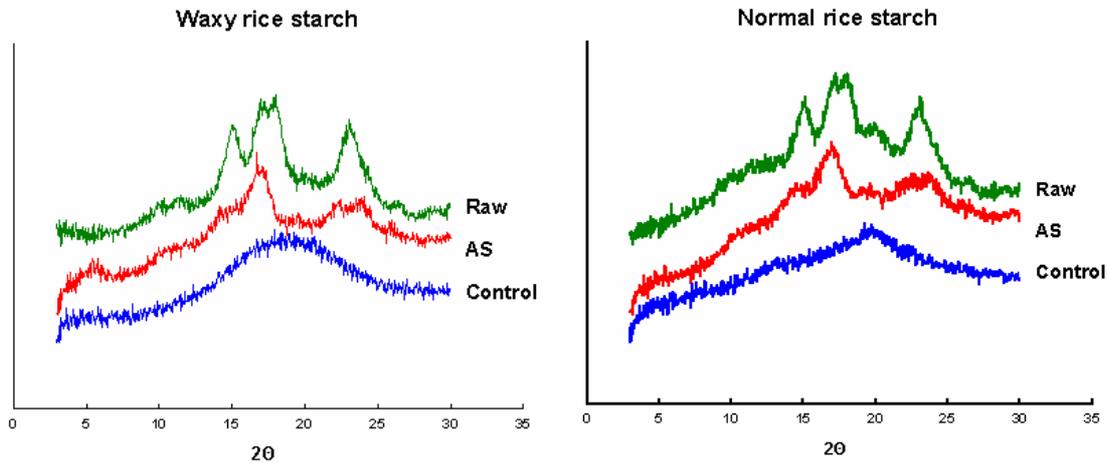


Figure 3. X-ray diffractograms of amylosucrase-treated starches

Table 4. Relative crystallinities of rice starches

Starch	Raw(%)	Control (%)	AS ¹⁾ (%)
Waxy rice	48.1	10.7	47.5
Normal rice	40.7	18.6	39.1

¹⁾ Amylosucrase-treated starch

㉞ Amylosucrase 처리에 의한 열적 특성의 변화

DSC를 이용하여 분석한 생전분, 대조군 및 AS처리 전분의 열적 특성은 Table 6에 나타내었다. 생전분은 전형적인 호화 특성을 나타내는 피크를 보였다. 대조군과 amylosucrase 처리 전분은 호화 후 30°C에서 40시간 동안 노화시킨 시료이므로 노화 특성을 나타내는 피크를 보여야 하는데, 대조군의 경우 피크가 나타나지 않았으므로 대조군은 노화 정도가 측정될 수 없을 정도로 작았다고 판단된다. 한편, amylosucrase 처리 전분은 증가된 사슬 길이 때문에 노화도가 증가된 것인데, amylosucrase 처리 전분은 엔탈피 변화 값이 찹쌀과 맵쌀에서 각각 7.3과 5.3 J/g, T_p값이 각각 88.7°C와 88.8°C로 높게 나타났다. 이는 amylosucrase 처리 전분의 결정

구조가 생전분이나 대조군에 비해 더 안정하다는 것을 뜻한다. 일반적으로 아밀로오스 결정은 아밀로펙틴 결정보다 더 안정하며, 긴 사슬을 가진 아밀로펙틴 사슬은 아밀로오스와 유사한 특성을 보이는 것으로 알려져 있다. 이 실험에서는 amylosucrase로 인해 사슬이 신장된 아밀로펙틴 사슬이 아밀로오스와 유사한 강하고 치밀한 결정 구조를 형성하였다고 볼 수 있다.

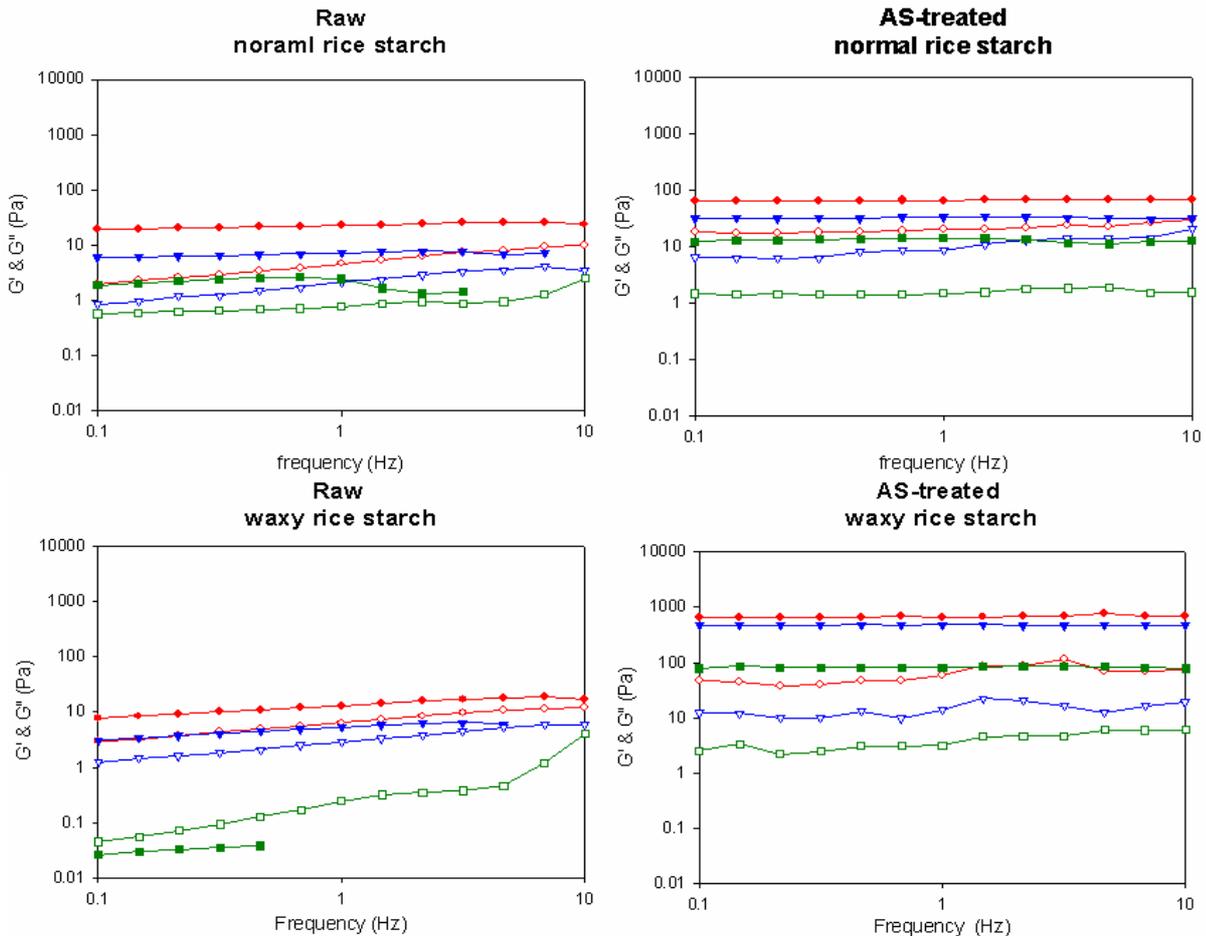
㉞ Amylosucrase 처리 후 전분의 유변학적 특성의 변화

생전분과 amylosucrase 처리 전분의 농도에 따른 유변학적 특성은 Figure 4에 나타내었다. 모든 전분에서 전분 농도가 증가할수록 modulus 값이 증가하였으며, amylosucrase 처리 후에는 전분의 modulus 값이 증가하여 젤 형성 능력이 향상되었다. 이는 신장된 아밀로펙틴 사슬이 젤 형성 능력이 좋은 선형의 아밀로오스와 비슷한 특성을 나타낸 것으로 보인다. 생전분은 6%일 때 찹쌀과 멥쌀 전분 모두에서 고체형($G' > G''$) 특성을 지닌 반면, amylosucrase 처리 전분의 경우 2%에서 모두 고체형 특성을 보였다. 따라서, amylosucrase 처리에 의해 쌀 전분의 젤 형성 능력이 향상된 것으로 판단된다.

Table 5. Thermal properties of rice starches

Starch	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc-To	$\Delta H(J/g)$	
Raw	58.3±0.1	64.9±0.2	76.0±0.4	17.6±0.3	11.6±0.2	
Waxy rice	AS ¹⁾	75.6±0.5	88.7±0.1	100.1±0.4	24.4±0.8	7.3±0.5
	Control	N. D.				
Normal rice	Raw	55.8±0.7	62.6±0.1	76.5±0.1	20.7±0.7	9.8±0.2
	AS ¹⁾	73.7±0.8	88.8±0.2	101.8±1.0	28.1±0.9	5.3±0.3
	Control	N.D				

¹⁾ Amylosucrase-treated starch



1) ● and ○: 6%, ▼ and ▽: 4%, ■ and □: 2% starch gels

The closed symbols: G' , the open symbols: G''

Figure 4. The rheological properties of rice starches¹⁾

㉔ 화학적 방법으로 제조한 난소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석

㉕ 시트르산 전분 제조의 최적 조건 확립

소장내에서 소화되지 않는 난소화성 전분(RS) 함량이 높은 시트르산 전분의 최적 제조 조건을 확립하고자 반응표면분석을 실시하였다. 시트르산 0.4 g, 150°C, 11시간의 조건이 95.2%의 최고 RS 함량을 가질 것으로 예측되었다. 시트르산 함량과 반응 온도가 증가할수록 RS의 수율이 증가하는 것으로 나타났다. 반응 시간에 따른 RS 함량은 6시간까지는 비례적으로 증가하다가 이후 감소하여 11시간에는 오히려 감소하는 양상을 나타내었다. 따라서, 경제성을 고려하여 산 함량 0.4 g/g에서 반응 온도 150°C, 반응 시간 6시간을 시트르산 전분의 최적 제조 조건으로 확립하였다.

Table 1. The RDS, SDS, and RS contents of citrate starches¹⁾

	Citric acid (g/ g)	Reaction temp. (°C)	Reaction time (hr)	RDS (%)	SDS (%)	RS (%)
Native				53.9	30.3	15.8
1	0.16 (-1)	90 (-1)	3.5 (-1)	79.7 ± 0.6	6.4 ± 5.9	13.9 ± 5.5
2	0.16 (-1)	90 (-1)	8.5 (1)	76.2 ± 3.1	4.1 ± 3.6	19.6 ± 2.7
3	0.16 (-1)	130 (1)	3.5 (-1)	59.7 ± 0.5	5.0 ± 5.4	35.3 ± 5.9
4	0.16 (-1)	130 (1)	8.5(1)	54.5 ± 1.5	2.6 ± 1.0	42.9 ± 0.5
5	0.32 (1)	90 (-1)	3.5 (-1)	78.5 ± 2.3	4.3 ± 2.6	17.1 ± 0.9
6	0.32 (1)	90 (-1)	8.5 (1)	74.0 ± 4.9	7.9 ± 6.1	18.0 ± 1.2
7	0.32 (1)	130 (1)	3.5 (-1)	48.6 ± 1.3	4.0 ± 1.8	47.4 ± 0.5
8	0.32 (1)	130 (1)	8.5 (1)	42.1 ± 3.5	1.0 ± 2.5	56.9 ± 1.1
9	0.24 (0)	110 (0)	6 (0)	70.9 ± 3.5	1.9 ± 5.5	27.2 ± 3.7
10	0.08 (-2)	110 (0)	6 (0)	67.3 ± 3.9	1.3 ± 3.6	31.3 ± 1.1
11	0.4 (2)	110 (0)	6 (0)	81.0 ± 1.6	6.1 ± 0.3	12.9 ± 1.3
12	0.24 (0)	70 (-2)	6 (0)	79.3 ± 3.6	3.4 ± 3.0	17.3 ± 1.3
13	0.24 (0)	150 (2)	6 (0)	15.2 ± 0.1	3.5 ± 1.4	81.3 ± 1.6
14	0.24 (0)	110 (0)	1 (-2)	81.0 ± 4.6	2.9 ± 3.7	16.1 ± 0.9
15	0.24 (0)	110 (0)	11 (2)	61.9 ± 3.9	3.1 ± 5.3	35.0 ± 2.4

¹⁾RDS, SDS, and RS denote rapidly digestible starch, slowly digestible starch, and resistant starch, respectively.

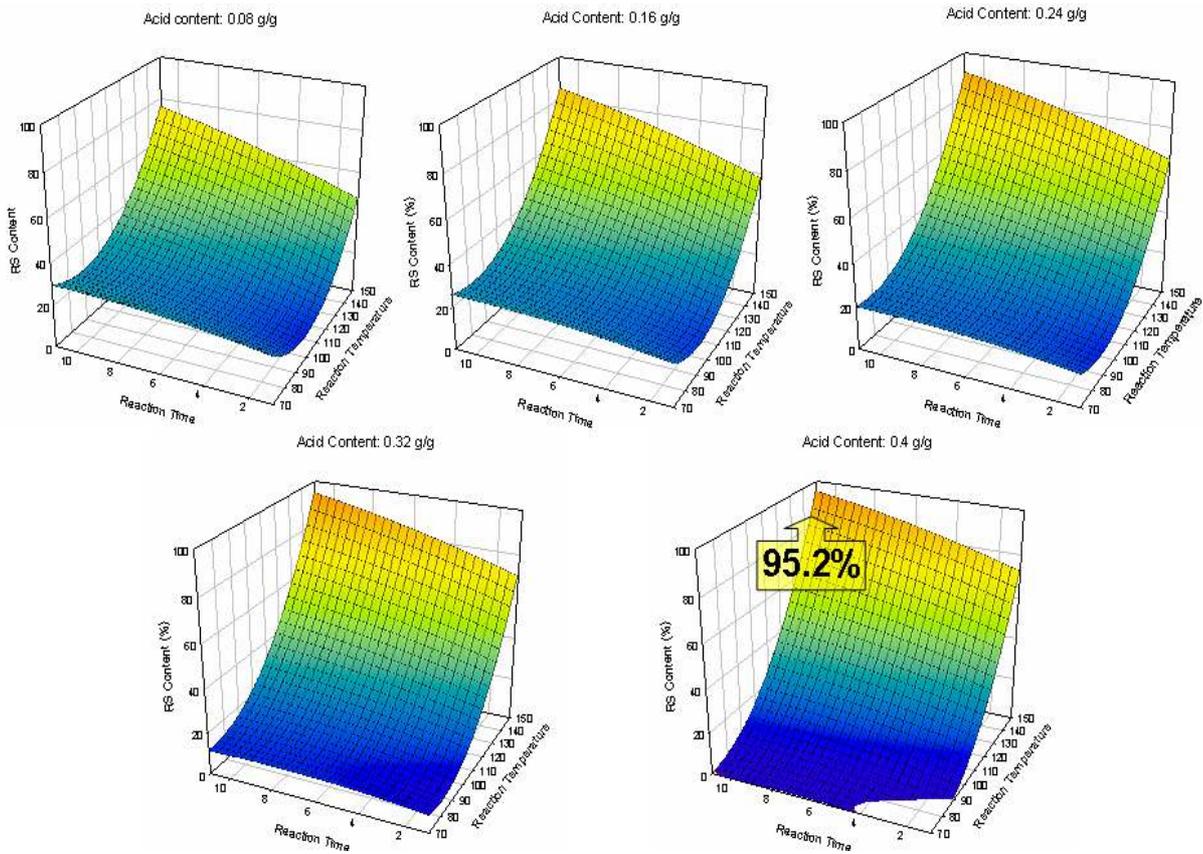


Figure 1. Spline interpolation of response surface for resistant starch contents of citrate starches treated with different citric acid concentration

㊤ 전분 입자의 형태 변화

광학 현미경으로 관찰한 생 찹쌀 전분은 다각형의 원형을 가지고 있는 것이 확인되었다. 그러나 시트르산 전분과 대조군은 입자 형태를 유지하지 못하고 입자 구조가 파괴되었다. 이는 산 처리 과정에서 산으로 인한 가수분해가 진행되고, 150°C의 높은 반응 온도에 기인한 것으로 보인다. 또한, 일반적으로 찹 전분이 메 전분보다 산 분해에 약한 것으로 알려져 있어 입자 구조가 많이 파괴된 것으로 보인다.

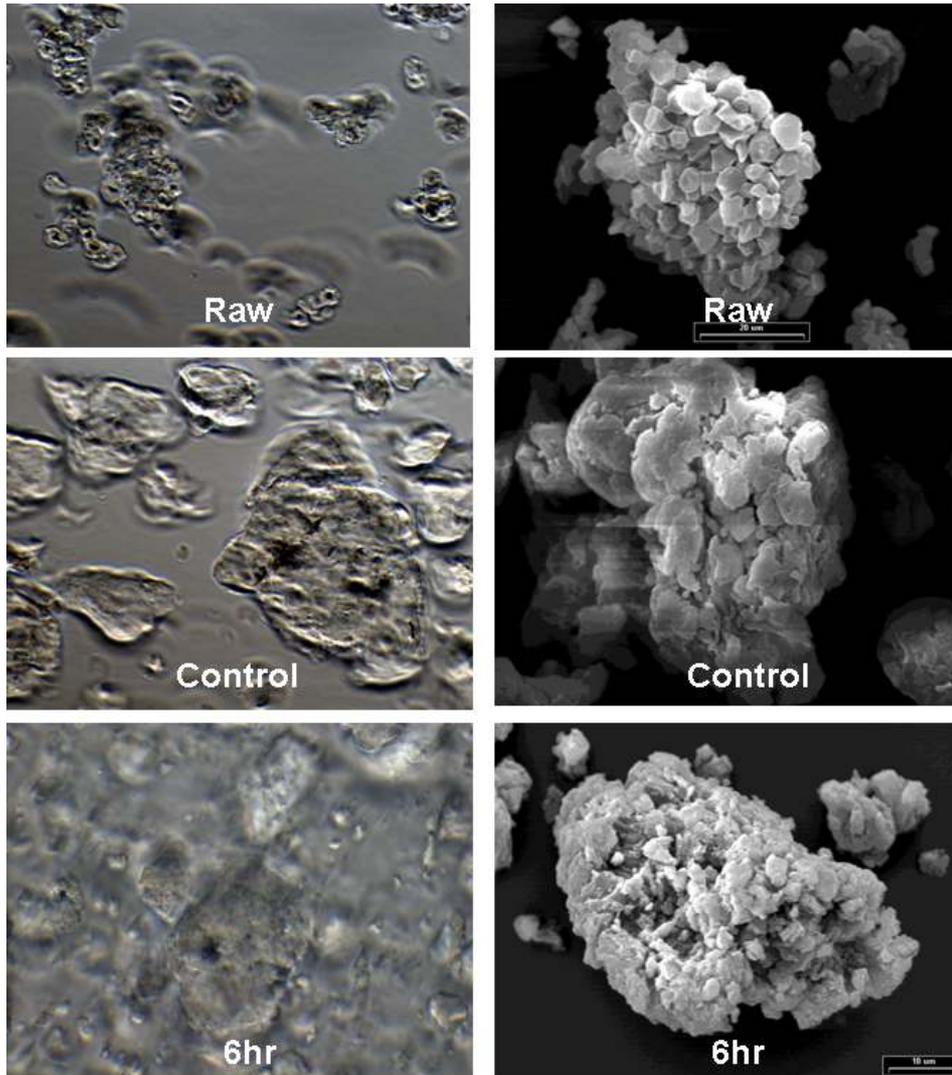


Figure 2. Light micrographs (left) and scanning electron micrographs (right) of waxy rice starches

⊕ FT-IR 분석을 통한 가교결합 확인

푸리에 변환 적외선 분광법으로 분석한 결과, 여러 종의 특징적인 작용기의 존재를 확인하였다. 찹쌀 전분 및 대조군과 동일하게 시트르산 전분도 전형적인 전분의 구조를 나타내는 피크를 나타내었다. -OH를 나타내는 3000-3500 cm^{-1} 에서 넓은 범위의 피크를 보였다. 2930 cm^{-1} 에서 C-H를 나타내는 피크, 그리고 2930 cm^{-1} 에서 글라이코사이드 결합의 주된 C-O-C를 나타내는 피크를 보였다. 시트르산 전분에서는 찹쌀 전분과 대조군에서 찾아볼 수 없는 1730 cm^{-1} 의 카보닐 흡수 영역에서 강한 피크를 가지고 있어 에스터화가 일어난 것을 확인할 수 있었다.

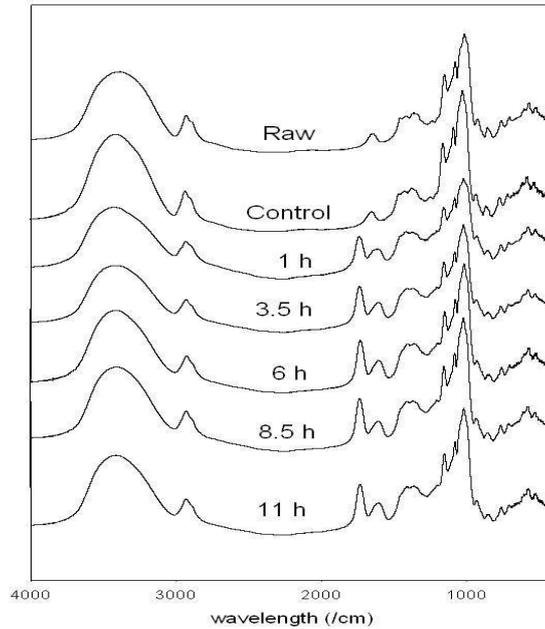


Figure 3 . FT-IR spectra of citric acid-treated waxy rice starches with different reaction time

㉔ 시트르산 전분의 사슬 분포의 변화

시트르산 전분의 사슬 분포를 측정된 결과, 짧은 사슬(DP6~12) 17.1%, 중간 사슬(DP13~34) 58.3%, 긴 사슬(DP25~36) 18.5%로 나타났다(Table 3). 이는 생 찹쌀 전분의 22.7%, 53.5%, 14.8%와 비교했을 때, 긴 사슬이 산에 의한 가수 분해로 인해 중간 사슬로 넘어간 것으로 보인다. 특히적으로 매우 짧은 사슬($\leq DP6$)이 2.2% 나타난 것을 볼 수 있는데 이 또한 산 가수분해의 영향으로 짧은 사슬이 잘린 것으로 생각된다. 측정할 수 있는 가장 긴 사슬은 생전분과 산 변성 전분에서 각각 DP64 및 DP46으로 나타나, 산 가수분해의 효과로 산 변성 전분의 가장 긴 사슬이 짧아진 것을 확인할 수 있었다. 대조군의 경우 사슬 길이 분포나 측정할 수 있는 가장 긴 사슬이 생 전분과 시트르산 전분의 중간 값으로 나타났는데, 이는 제조 공정 중 열 처리의 영향으로 보인다.

Table 2. Side chain distributions of amylopectins

	Relative area (%)					Highest detectable DP
	$\leq DP6$	DP6~12	DP13~24	DP25~36	$\geq DP37$	
Raw	-	22.7	53.5	14.8	8.9	64
Control	0.7	22.9	42.6	16.8	16.9	56
Citrate	2.2	17.1	58.3	18.5	6.3	46

㉞ X-ray 회절 분석과 전분 결정화도의 변화

참쌀 전분은 X-선 회절도에서 15, 17, 18, 23°에 피크가 나타나는 전형적인 A형이었다(Figure 4). 반면에, 시트르산 전분과 대조군은 모두 피크가 나타나지 않는 무정형의 곡선을 보여, 결정성 영역이 완전히 파괴된 것으로 나타났다. 이는 반응 조건인 150°C의 고온에서 전분 내에 남아있던 소량의 수분(5-10%)에 의한 전분의 호화 때문인 것으로 보인다. X-선에서 전분 형태에 따라 나타나는 전형적인 피크는 호화 과정 중 전분의 젤 형성이 진행됨에 따라 결정성 영역이 사라지면서 분자 구조의 파괴에 의해 소실된다.

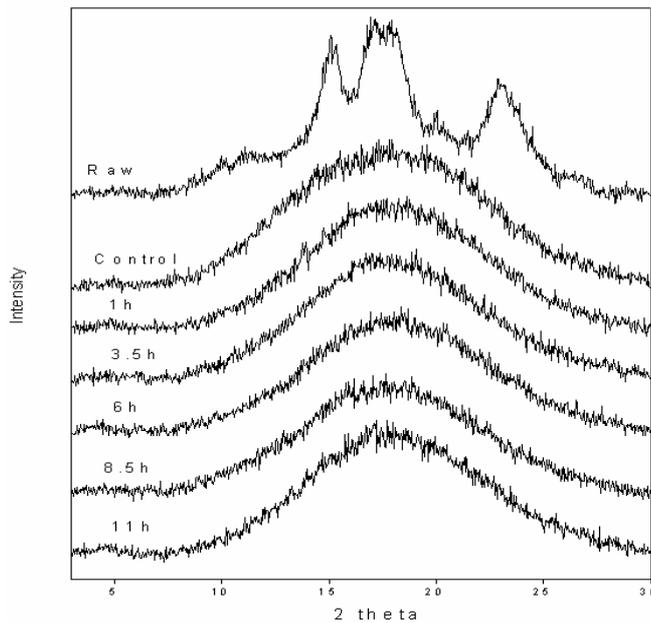


Figure 4. X-ray diffractograms of citric acid-treated waxy rice starches with different reaction time

㉞ 시트르산 처리에 의한 전분의 열적 특성 변화

시차주사열량계(DSC) 분석으로 시트르산 변성 전분의 열적 특성을 조사한 결과, 어떠한 흡열 피크도 나타나지 않아서 호화 반응이 일어나지 않은 것으로 보인다(Table 3). 이는 전분 입자가 모두 깨어진 현미경 관찰 결과를 통해서 알 수 있었듯이, 전분 변성 과정에서 분자 구조가 파괴되어 전분 내 결정성 영역이 존재하지 않기 때문에 호화가 일어나지 않았거나, 가교 결합으로 인해 전분의 팽윤이 일어나지 않았기 때문으로 판단되었다.

Table 3. Thermal properties of waxy rice and citrate starches

	To	Tp	Tc-To	ΔH
Raw	61.3±1.0	67.6±0.8	15.2±0.4	13.6±0.6
Control		N. D.		
Citrate starch		N. D.		

(3) 3차년도

1) 효소적 방법을 이용한 난소화성 및 지소화성 쌀 전분 제조 조건의 최적화 및 백설기의 품질 특성

(가) 재료 및 방법

㉔ 반응표면분석을 이용한 amylosucrase 처리 조건의 최적화

화선찰벼는 농촌진흥청 작물시험장에서 구입하여 알칼리 침지법(Wilson and others 1978)을 이용하여 전분을 분리한 후에 사용하였다. 효소로는 *Naisseria polysaccharea*에서 유래한 amylosucrase를 사용하였다. 3%(w/w)의 쌀 전분과 100mM sucrose를 100mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에 현탁하여 10분 간 호화시켰다. Table1에 제시된 중심합성설계에 따라 지정된 단위의 amylosucrase를 첨가하여, 지정 시간 동안 30°C 항온수조에서 반응시켜 변형 전분을 제조하여, 소화율을 측정하였다.

전분의 소화율은 다음과 같이 측정하였다. 쌀 전분 30mg을 0.75mL sodium acetate buffer(pH 5.2)에 분산시키고 10분 간 방치 후 0.75mL의 효소액을 첨가하여 37°C에서 10분 및 240분 간 반응시켰다. 효소액은 판크레아틴(pancreatin) 2g을 24mL의 증류수에 넣고 교반한 다음 원심분리하고, 상층액 20mL를 0.4mL의 amyloglucosidase 및 3.6mL의 증류수와 섞어 제조하였다. 효소 반응을 정지시킨 후 원심분리하여, 상층액의 글루코오스를 GOD-POD방법으로 측정하였다. 이로부터 10분 이내에 소화되는 것을 급속히 소화되는 전분(RDS), 10분과 240분 사이에 소화되는 것을 지소화성 전분(SDS), 240분 이후에도 소화되지 않는 것을 난소화성 전분(RS)으로 분류하였다. RDS, SDS 및 RS 함량을 반응 변수로 SAS 통계패키지(v9.1)를 이용하여 반응표면분석을 실시하여 RDS를 최소로 하면서, SDS와 RS를 최대화하는 최적 조건을 확립하고자 하였다.

Table 1. Level combinations in central composite response surface design for optimizing amylosucrase treatment conditions

Sample	Amylosucrase (unit)		Time (hr)	
	Coded	Actual	Coded	Actual
1	0	15000	-1.414	2
2	1.414	25000	0	12
3	-1	8000	1	19
4	-1	8000	-1	5
5	0	15000	0	12
6	-1.414	5000	0	12
7	1	22000	-1	5
8	0	15000	1.414	22
9	0	15000	0	12
10	0	15000	0	12
11	1	22000	1	19
12	0	15000	0	12

㉔ Amylosucrase 처리 전분으로 대체한 백설기의 특성

○ 백설기의 제조

확립된 최적 조건으로 제조된 효소 처리 전분을 대량 제조하여 균일하게 혼합한 후 백설기에 적용하는 실험을 수행하였다. 백설기 제조에 사용한 멥쌀가루는 농촌 진흥청, Top rice를 구입하여 3회 씻어 상온의 수돗물에 3시간 침지한 다음 roller mill을 이용하여 2회 체분 후 사용하였다. 이 습식 멥쌀가루에 amylosucrase 처리한 화선찰벼와 쌀가루를 20, 30, 40%로 대체 첨가하여 체를 내린 후 설탕(씨제이 주식회사, 백설설탕) 10%, 소금(해표, 꽃소금) 10%, 수분 15%를 첨가하여 다시 체를 쳐서 백설기 시료로 사용하였다. 전기 찜기 안에 15L의 물을 넣고 스테인레스 시루에 천을 깔고 지름 2.5cm 높이 2.2cm로 만들어진 플라스틱 컵들을 세운 뒤 모든 재료가 혼합된 시료를 흠뻑려 담는다. 젖은 수건을 위에 덮고 30분 간 강한 불로 가열한 뒤 불을 꺼 10분 뜸을 뜬 다음 뚜껑을 열고 천을 덮은 채 상온에서 1시간 방치한 후 저장 0일의 시료로 사용하였다. 1일 및 3일 간 4℃에 냉장 보관하면서 저장 기간에 따른 특성 변화를 조사하였다.

○ 백설기의 색도 측정

효소 처리 찹쌀 전분을 다르게 대체한 백설기와 일반 백설기(control)를 제조한 후 백설기의

중심에서 Color and color difference meter(CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 Hunter Color System의 L, a, b 및 ΔE 를 측정하였으며 이때 standard plate는 L=95.66, a=-0.06, b=2.30 이었다.

○ 백설기의 텍스처 측정

백설기의 텍스처 변화는 백설기 제조 직후 한 시간 방치한 시료와 polyethylene film으로 밀봉하여 4°C에서 1일, 3일 저장한 시료를 가지고 Texture analyzer (TA-XT2i, Surrey, UK)를 사용하여 측정하였으며 측정 조건은 Test type: texture profile analysis, Measuring type: with pre-test speed of 2.0 mm/s and 30% strain for resilience test with test speed and post-test speed of 5.0 mm/s and 30% strain으로 하였다.

○ 백설기의 소화율 측정

소화율은 먼저 단백질을 제거한 후 Brumovsky and Thomson(54) 방법을 응용하여 측정하였다. 제조된 백설기는 단백질 효소인 펩신(pepsin)을 이용하여 분해시켰다. 건조된 백설기 가루 300mg에 30mL 0.1M KCl-HCl buffer(pH 1.5)를 더한 다음 0.6mL 펩신 용액(1g pepsin/10mL 0.1M KCl-HCl buffer)을 넣고 40°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 다시 이 시료 30mg을 0.75mL sodium acetate buffer(pH 5.2)에 분산시키고 10분 간 방치 후 0.75mL의 효소액을 첨가하여 37°C에서 10분 및 240분 간 반응시켰다. 효소액은 판크레아틴(pancreatin) 2g을 24mL의 증류수에 넣고 교반한 다음 원심분리하고 상층액 20mL를 0.4mL의 amyloglucosidase 및 3.6mL의 증류수와 섞어 제조하였다. 효소 반응을 정지시킨 후 원심분리하여, 상층액의 글루코오스를 GOD-POD 방법으로 측정하였다. 데이터 분석은 산 처리 전분의 경우와 동일하게 수행하였다.

○ 노화도 측정

백설기의 노화도는 시차주사열량계를 이용하여 측정하였다. 백설기 제조 직후 1시간 방치한 시료와 polyethylene film으로 밀봉하여 4°C에서 1일, 3일 저장한 시료를 급속 동결기에서 -70°C로 2시간 급속 동결시킨 후 동결 건조기에서 24시간 건조시켜 같은 후 100 mesh 체에 내려 사용하였다. 이렇게 분말화한 떡 시료 15mg을 pan에 넣고 증류수 45 μ L를 첨가하여 밀봉한 다음 상온에서 하룻밤 방치한 후 분당 5°C의 승온 온도로 30°C에서 150°C까지 가열하여 흡열곡선을 얻었다.

○ 통계 분석

모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다. ANOVA 및 Duncan's multiple range test는 SPSS(12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 실시하였다.

(나) 결 과

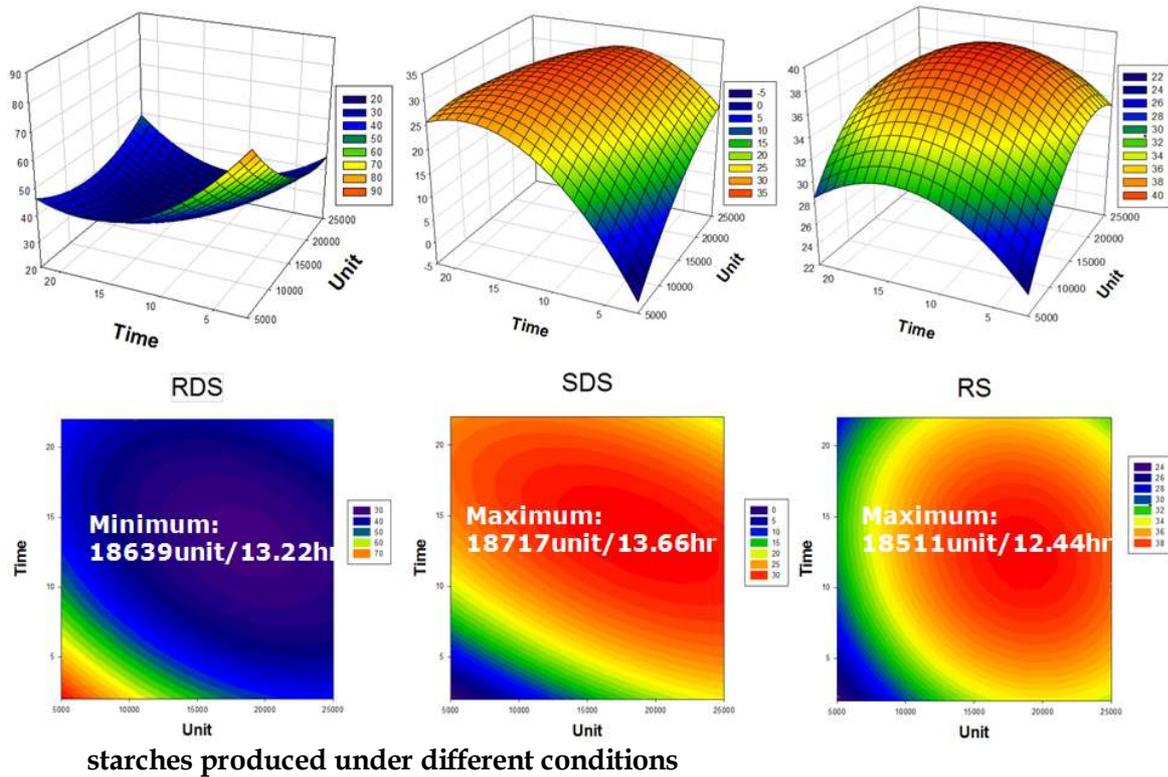
㉔ Amylosucrase 반응 조건의 최적화

중심합성설계에 따라 amylosucrase를 처리하여 제조한 전분의 소화율은 Table 2에 나타내었다. 각 조건에 따라 다양한 RDS, SDS 및 RS 분획을 가지는 전분을 제조하였으며, 이를 반응표면분석으로 분석한 결과를 Figure 1에 나타내었다. RDS는 18639 unit, 13.22시간 처리 시 최소의 값을 나타내었으며, SDS는 18717 unit, 13.66시간 처리 시 최대의 값을, 그리고 RS는 18511 unit, 12.44시간 처리 시 최대의 값을 나타내었다. 이 실험에서 목적인 RDS를 최소화하면서, SDS 및 RS 분획을 최대로 하는 조건은 모두 실험 조건 영역 내에서 나타났으며, 조건을 동시에 만족하는 최적 조건으로 amylosucrase 18700 unit을 첨가하여, 13시간 40분 동안 반응을 지속하는 조건을 확립하였다.

Table 2. Digestibilities of amylosucrase-treated waxy rice starches produced under different conditions for response surface analysis

Sample	Amylosucrase (unit)	Time (hr)	RDS	SDS	RS
1	15000	2	53.32	13.76	32.93
2	25000	12	29.73	30.3	39.97
3	8000	19	39.12	21.75	39.13
4	8000	5	56.99	7.24	35.77
5	15000	12	30.52	30.43	39.05
6	5000	12	53.47	17.52	29
7	22000	5	38.87	23.54	37.59
8	15000	22	29.73	33.69	36.58
9	15000	12	30.13	29.73	40.14
10	15000	12	30.09	29.65	40.26
11	22000	19	35.35	21.57	43.09
12	15000	12	28.61	30.86	40.53

Figure 2. Response surfaces for RDS, SDS and RS contents of amylosucrase- treated



최적 조건에서 제조된 amylosucrase 처리 찹쌀 전분은 RDS가 대조구에 비해 현저히 감소하였으며, SDS와 RS의 함량은 각각 43%와 39%로 크게 증가하였다. 반면, 동일 조건에서 amylosucrase를 처리한 멥쌀 전분의 경우 찹쌀 전분에 비해서 RDS의 감소와 SDS의 증가가 적었다. 생전분 상태의 찹쌀, 멥쌀 전분은 RDS와 SDS의 함량이 많았다. 이는 호화되지 않아 그 전분 형태가 소화 효소의 침투를 용이하지 않기 때문이었다. 30분 간 호화 후 효소 반응과 동일한 조건에서 방치한 대조군은 RDS가 증가하였다. 이는 호화 과정 중 생전분 입자의 결정 구조 파괴에 따른 것으로 보인다. 또한, RS의 증가는 호화 전분이 장시간 동안 효소 반응 조건에 방치되어 노화가 발생한 데에 기인한다고 볼 수 있다.

Table 3. The contents of RDS, SDS, and RS

Starch		RDS	SDS	RS
Waxy rice	Raw	38.2 ^c	50.2 ^d	11.6 ^a
	Control ¹⁾	68.4 ^d	13.4 ^{a,b}	18.2 ^c
	AS ²⁾	17.3 ^a	43.3 ^c	39.3 ^d
Normal rice	Raw	25.0 ^b	61.0 ^e	14.1 ^{a,b}
	Control ¹⁾	73.0 ^e	11.1 ^a	15.9 ^{b,c}
	AS ²⁾	37.1 ^c	14.6 ^b	48.3 ^e

¹⁾Cooked and kept under the same enzyme treatment condition without enzyme

²⁾Amylosucrase-treated

Ⓞ Amylosucrase 처리 전분으로 대체한 백설기의 특성

○ Amylosucrase 처리 전분으로 대체한 백설기의 색도

Amylosucrase 처리 전분으로 대체한 백설기의 경우 Table 2와 같이 명도를 나타내는 L값이 대조구 백설기에 비해 높았다. Amylosucrase 처리한 멥쌀 및 찹쌀 전분의 대체량이 증가할수록 명도가 밝아지는 것으로 나타났다. a값은 대체량이 많을수록 기존 백설기에 비해 적색이 줄어드는 양상을 보였으며, b값은 효소 처리한 전분의 대체량이 늘어날수록 황색도가 점차 감소되었다. 결론적으로 효소 처리한 전분의 대체량이 증가할수록 명도가 높아지고 적색도 및 황색도가 낮아지는 것으로 나타났다.

Table 4. Color of rice cakes with and without amylosucrase-treated starch

Sample	Substitution rate (%)	L	a	b
Control ¹⁾	0	84.8 ^d	-1.09 ^c	6.99 ^f
ASWR ²⁾	20	90.7 ^e	-1.01 ^d	5.99 ^d
	30	92.0 ^{f,g}	-0.92 ^e	5.29 ^c
	40	91.7 ^f	-0.67 ^f	4.50 ^b
ASR ³⁾	20	92.0 ^f	-0.70 ^f	5.24 ^c
	30	92.8 ^g	-0.65 ^f	4.70 ^b
	40	94.6 ^h	-0.50 ^g	3.84 ^a

¹⁾Rice cake without any amylosucrase-treated starch

²⁾Amylosucrase-treated waxy rice starch

³⁾Amylosucrase-treated rice starch

○ Amylosucrase 처리 전분으로 대체한 백설기의 저장 기간에 따른 텍스처 특성

백설기 제조 당일 및 4°C에서 24시간 저장한 백설기의 texture profile analysis의 결과를 Table 5 및 6에 나타내었다. 경도는 대조구 백설기와 비교해서 amylosucrase로 처리한 전분의 대체량이 많을수록 감소하는 경향이였다. 저장 기간 0일에 비해서 1일 후에 그 특성이 더욱 크게 나타났으며, 효소 처리 멥쌀 전분 보다 효소 처리 찹쌀 전분의 첨가량이 많을수록 이 같은 특성이 커졌다.

Table 5. Texture parameters of rice cakes with and without different amylosucrase-treated starch contents without storage

Sample ¹⁾	Substitution rate (%)	Hardness	Springiness	Cohesiveness	Chewiness
Control	0	6.18 ^{a,b}	0.85 ^c	0.71 ^d	3.74 ^b
ASWR	20	6.47 ^{a,b}	0.79 ^{a,b}	0.64 ^c	3.28 ^b
	30	6.12 ^{a,b}	0.83 ^{b,c}	0.62 ^c	3.15 ^b
	40	5.58 ^a	0.77 ^a	0.54 ^b	2.34 ^a
ASR	20	6.95 ^b	0.80 ^{a,b}	0.68 ^d	3.78 ^b
	30	6.77 ^b	0.87 ^c	0.64 ^c	3.77 ^b
	40	5.52 ^a	0.84 ^{b,c}	0.49 ^a	2.27 ^a

¹⁾See descriptions below Table 4.

Table 6. Texture parameters of rice cakes with and without different amylosucrase-treated starch contents after storage for 24 hr at 4°C

Sample ¹⁾	Substitution rate (%)	Hardness	Springiness	Cohesiveness	Chewiness
Control	0	20.3 ^c	0.99 ^a	0.61 ^e	12.3 ^c
ASWR	20	18.02 ^c	0.97 ^d	0.56 ^d	9.79 ^{b,c}
	30	14.4 ^{b,c}	0.93 ^c	0.45 ^c	6.09 ^{a,b,c}
	40	8.66 ^{a,b}	0.92 ^a	0.36 ^a	2.90 ^{a,b}
ASR	20	9.42 ^{a,b}	0.95 ^{b,c}	0.44 ^{b,c}	3.99 ^{a,b}
	30	7.63 ^a	0.92 ^b	0.41 ^b	2.90 ^{a,b}
	40	6.06 ^a	0.85 ^a	0.38 ^a	1.94 ^a

¹⁾See descriptions below Table 4.

○ Amylosucrase 처리 전분을 대체 첨가한 백설기의 열적 특성 변화

모든 시료들이 100°C 부근에서 피크가 생겼으나, 이는 amylosucrase 처리 전분의 특성으로 인하여 생기는 것으로 Table 7는 4°C에서 24시간 동안 저장한 시료의 50-60°C 부근의 노화 피크를 분석한 것이다. 엔탈피는 ASWR 40%와 ASR40%가 각각 1.0과 0.5 J/g으로 대조구에 비해서 낮게 나타났다.

Table 7. Thermal properties of rice cakes with and without amylosucrase- treated starch stored for 24 hr at 4°C

Samples ¹⁾	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc-To (°C)	ΔH (J/g)
Control	45.3 ^a	51.7 ^a	57.9 ^a	12.6 ^a	1.60 ^c
ASWR 40%	45.2 ^a	52.7 ^a	59.0 ^{a,b}	13.8 ^{a,b}	1.00 ^b
ASR 40%	47.1 ^a	54.0 ^a	61.9 ^b	14.9 ^b	0.50 ^a

¹⁾See descriptions below Table 4.

○ Amylosucrase 처리 전분으로 대체한 백설기의 소화율 변화

Amylosucrase 처리 전분의 대체량이 많아질수록 대조군에 비해서 RDS가 감소하고 RS가 증가하였다(Table 8). 이에 비해 SDS는 대체 첨가량과 상관없이 모든 시료에서 유사하게 나왔는데, 이는 백설기를 만드는 과정에서 열이 가해지면서 소실된 것으로 보인다. 따라서 효소 처리에 의해 생성된 SDS 분획은 열에 대한 안정성이 없는 것으로 사료되며, 이의 활용에 있어 떡과 같이 장시간 고열에서 가열하는 식품보다는 낮은 온도에서 단시간 가열하는 제품에 적용할 경우 지소화 가능성을 유지하는 제품의 생산이 가능할 것으로 사료된다.

Table 8. The contents of RDS, SDS, and RS of rice cakes with and without different amylosucrase-treated starch contents without storage

Sample ¹⁾	Substitution rate (%)	RDS	SDS	RS
Control	0	74.4 ^e	14.3 ^a	11.4 ^a
ASWR	20	68.9 ^d	13.2 ^a	17.9 ^{b,c}
	30	67.8 ^c	16.3 ^a	15.9 ^b
	40	59.7 ^a	16.7 ^a	23.6 ^d
ASR	20	68.8 ^c	13.7 ^a	17.5 ^{b,c}
	30	68.9 ^c	12.5 ^a	18.6 ^{b,c}
	40	64.8 ^b	13.6 ^a	21.6 ^{c,d}

2) 화학적 방법으로 제조한 난소화성 쌀 전분 대체 백설기의 제조 및 특성 규명

(가) 재료 및 방법

㉔ 시트르산 전분의 제조 및 특성

○ 시트르산 전분의 제조

화선찰벼를 구입하여 백미로 도정 후 분쇄기로 가루로 만든 다음 알칼리 침지법(55)을 이용하여 전분을 분리하였다. 분리한 찹쌀 전분에 지난해 실험을 통해 최적화된 조건으로 시트르산 처리를 하여 난소화성 전분을 제조하였다. 최적 조건은 반응 온도 150°C, 반응 시간 6시간 그리고 전분 1g당 시트르산 0.4g이었다. 준비된 40% 시트르산 용액을 찹쌀 전분에 부어 잘 섞어 준 뒤 상온에서 16시간 방치한 후 50°C 오븐에서 24시간 동안 건조하고 분쇄하였다. 이를 150°C 열풍 오븐에서 6시간 동안 가열한 다음 증류수로 세척하고 원심분리한 후 실온에서 건조하여 분쇄하였다. 산 용액 대신 증류수로 동일한 반응을 거친 것을 대조구로 사용하였다. 찹쌀 전분의 수분, 단백질, 지질 및 회분 함량은 각각 AACC 44-15A, AACC 46-13, AACC 30-20, AACC 08-17의 방법을 사용하여 분석하였고, 아밀로오스 함량은 Jayakody and Hoover(56)의 방법을 사용하였다.

Table 1. Proximate composition and amylose content of waxy rice starch (Hwasunchalbyeo)

(%)	Moisture ¹⁾	Protein ²⁾	Lipid ³⁾	Ash ⁴⁾	Amylose content ⁵⁾
Hwasunchalbyeo	10.39± 0.01	0.02± 0.03		0.99± 0.00	1.01± 0.02

○ 시트르산 전분의 소화율 측정

전분의 소화율은 효소 처리 전분의 소화율 측정과 동일한 방법을 사용하여 측정하였다.

○ 시트르산 전분의 열적 특성

시차주사열량계(Diamond DSC, Perkin-Elmer, Waltham, MA, U.S.A)를 이용하여 시트르산 처리 전후의 열적 특성 변화를 살펴보았다. 건조된 시료 10mg을 pan에 넣고 증류수 40μL를 첨가하여 밀봉한 후 상온에서 하룻밤 방치한 후 분당 5°C의 승온 온도로 30°C에서 130°C까지 가열하여 흡열 곡선을 얻었다. 이 흡열 곡선으로부터 호화개시온도(To), 호화점온도(Tp), 종결온도(Tc) 및 호화엔탈피(ΔH)를 구하였다. Reference pan은 빈 상태로 사용하였다.

○ 시트르산 전분의 사슬 분포의 변화

10mg의 찹쌀 전분에 1M KOH 100μL와 증류수 200μL를 넣어 분산시켰다. 1M HCl을 넣어 중화하고 증류수를 첨가하여 총 부피가 1mL이 되게 하였다. 이 용액 0.5mL를 취하여 0.49mL의

0.2M sodium citrate buffer(pH3.5)를 섞고, isoamylase(Magazyme)를 넣어 45°C에서 2시간 반응시켜 debranching하였다. 반응 종료 후 원심분리하여 그 상층액을 Carbo-pac PA 1 column(4*250 mm)을 이용한 HPAEC-PAD(Dionex, Sunnyvale, CA, USA) system으로써 분석하였다.

㉔ 시트르산 전분으로 대체한 백설기의 제조 및 특성

○ 시트르산 전분으로 대체한 백설기의 제조

백설기는 효소 처리 전분을 첨가한 백설기와 동일한 방법을 사용하여 제조하였다. 백설기에 대한 15% 수분 첨가율, 시트르산 처리 전분의 대체 첨가 비율 조정 및 최적 재료 배합비는 Table 2와 같이 설정하였다.

Table 2. Formula for the preparation of Baksulkies

Wet basis (g)					
Sample	Rice flour	Substitution	Sugar	Salt	Water
Control ¹⁾	100.0	0.0	10.0	1.0	15.0
CS 10%	90.0	10.0	10.0	1.0	15.0
CS 20%	80.0	20.0	10.0	1.0	15.0
CS 30%	70.0	30.0	10.0	1.0	15.0
CS 40%	60.0	40.0	10.0	1.0	15.0

¹⁾ Rice cake without citrate starch

○ 시트르산 처리 전분으로 대체한 백설기의 색도 측정

시트르산 처리 찹쌀 전분의 비율을 다르게 대체한 백설기와 대조구 백설기를 제조한 후 Color and color difference meter(CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 Hunter Color System의 L, a, b 및 ΔE를 측정하였다. Standard plate의 L, a 및 b 값은 각각 95.66, -0.06 그리고 2.30이었다.

○ 시트르산 처리 전분으로 대체한 백설기의 texture profile analysis

백설기의 텍스처는 백설기 제조 직후 한 시간 방치한 시료와 polyethylene film으로 밀봉하여 4°C에서 1일, 3일 저장한 시료를 가지고 Texture analyzer (TA-XT2i, Surrey, UK)를 사용하여 측정하였으며, 측정 조건은 Test type: texture profile analysis, Measuring type: with

pre-test speed, test speed and post-test speed of 2.0 mm/s and 30% strain for resilience test with pre-test speed, test speed and post-test speed of 1.0 mm/s and 20% strain으로 하였다.

○ 시트르산 처리 전분으로 대체한 백설기의 소화율 측정

소화율은 먼저 단백질을 제거한 후 Brumovsky and Thomson (54) 방법을 응용하여 측정하였다. 제조된 백설기 중 단백질은 단백질 가수분해 효소인 펩신(pepsin)을 이용하여 분해시켰다. 건조된 백설기 가루 300mg에 0.1M KCl-HCl buffer(pH 1.5) 30mL를 더한 다음 펩신 용액(1g pepsin/10mL 0.1M KCl-HCl buffer) 0.6mL를 넣고 40°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 다시 이 시료 30mg을 0.75mL sodium acetate buffer(pH 5.2)에 분산시키고 10분간 방치 후 0.75mL의 효소액을 첨가한 다음 37°C에서 10분 및 240분 간 반응시켰다. 효소액은 판크레아틴(pancreatin) 2g을 24mL의 증류수에 넣고 교반한 다음 원심분리하고 상층액 20mL를 0.4mL의 amyloglucosidase 및 3.6mL의 증류수와 섞어 제조하였다. 효소 반응을 정지시킨 후 원심분리하여, 상층액의 글루코오스를 GOD-POD 방법으로 측정하였다. 데이터 분석은 효소 처리 전분과 동일하게 수행하였다.

○ 시트르산 처리 전분으로 대체한 백설기의 노화도 측정

백설기의 노화도는 시차주사열량계를 이용하여 측정하였다. 백설기 제조 직후 한 시간 방치한 시료와 polyethylene film으로 밀봉하여 4°C에서 1일, 3일 저장한 시료를 -70°C로 2시간 동안 급속 동결시킨 후 동결 건조기에서 24시간 건조시켜 갈아 100 mesh 체에 내려 사용하였다. 이렇게 분말화한 떡 시료 10mg을 pan에 넣고 증류수 40μL를 첨가하여 밀봉한 후 상온에서 하룻밤 방치한 다음 분당 5°C의 승온 온도로 20°C에서 130°C까지 가열하여 흡열 곡선을 얻었다.

○ 통계 분석

모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다. ANOVA 및 Duncan's multiple range test는 SPSS(12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 실시하였다.

(나) 결과

㉔ 시트르산 전분의 특성

○ 시트르산 처리 전분의 소화율

최적 조건인 반응 온도 150°C, 반응 시간 6시간 그리고 전분 1g 당 시트르산0.4g에서 처리 후 찹쌀 전분의 RS 함량이 83.5%로 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 이는 150°C의 높은 온도에서의 처리가 시트르산의 탈수를 도움으로써 더 많은 가교결합이 생성되고 높은 치환율로 말미암아 전분 가수분해 효소의 침투가 저해되었기 때문인 것으로 사료된다. 15분 이상 가열한 다음 측정된 RS 함량은 71.0%로 낮아졌지만 생전분에 비해서 비교적 안정함을 확인할 수 있었다.

Table 3. The contents of RDS, SDS, and RS¹⁾ in citric acid-treated waxy rice starch produced under optimum condition

	RDS	SDS	RS	RS after heating
Raw	41.2 ^c	49.8 ^c	9.1 ^c	19.2 ^b
Control	72.6 ^b	20.2 ^b	7.2 ^b	8.7 ^a
Citrate starch	13.0 ^a	3.5 ^a	83.5 ^a	71.0 ^c

¹⁾Means of triple replicates. Means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test). RDS, SDS, and RS represent rapidly digestible starch, slowly digestible starch, and resistant starch, respectively (57).

○ 시트르산 전분의 열적 특성 변화

시차주사열량계를 이용하여 얻은 생전분, 대조구, 시트르산 처리 찹쌀 전분의 흡열 곡선은 Figure 1에 나타내었다. 또한 그 열적 특성 변화는 Table 4에 나타내었다. 생전분은 전형적인 호화 특성을 나타내는 피크를 보였으며, 호화 개시 온도(T_o), 호화 정점 온도(T_p) 및 호화 종결 온도(T_c)는 각각 59.7, 68.8 그리고 75.8°C였다. 대조구의 경우 호화 개시 온도는 유사하나 종결 온도가 낮아져 호화 범위 온도($T_c - T_o$)가 감소하였으며 엔탈피(ΔH) 또한 감소하였다. 반면 시트르산 전분은 호화 피크가 전혀 나타나지 않았는데, 이는 고온에서 산처리 변성 과정 중 분자 구조가 파괴되어 전분내 상대적 결정도가 상당히 감소하여 호화가 일어나기 힘들거나 가교결합 생성으로 인해 팽윤이 일어나지 않았기 때문으로 판단된다.

Figure 1. DSC thermograms of raw, control and citrate starch

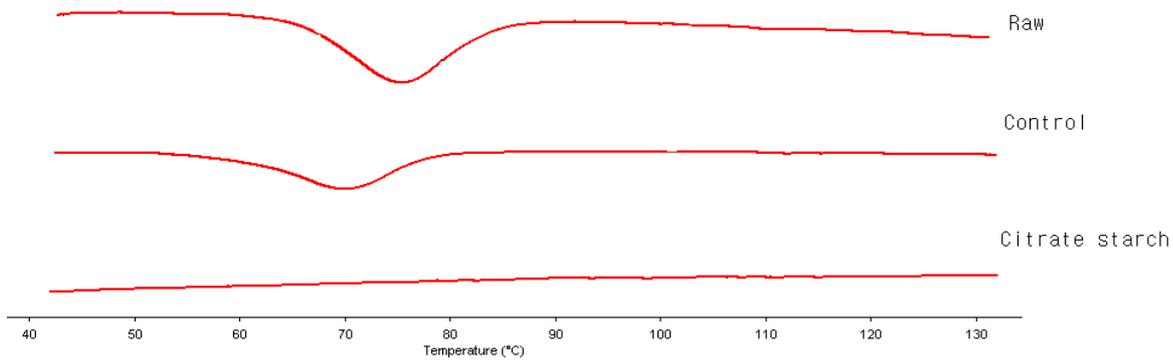


Table 4. Gelatinization parameters¹⁾ of raw, control and citrate starch

	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc-To (°C)	ΔH (J/g)
Raw	59.7±0.3	68.8±0.3	75.8±0.4	16.1±0.1	12.6±0.2
Control	59.5±0.6	65.6±0.3	72.6±0.3	13.1±0.7	7.9±0.2
Citrate starch	N.D. ²⁾				

¹⁾ To, Tp, Tc and Tc-To depict onset, peak, conclusion temperatures and gelatinization temperature range, respectively.

²⁾ (Peaks were) not detected.

○ 시트르산 전분의 사슬 분포의 변화

알칼리에 전분을 용해하여 가교결합을 제거한 상태에서 시트르산 처리 전분의 가지 길이 분포를 분석하였다. 산 처리 전분의 곁가지 길이 분포는 매우 짧은 가지와 짧은 가지 함량이 증가하고 긴 가지 함량이 감소하는 방향으로 변화하는 경향을 보였다. 이는 산 가수분해의 효과로 생각되며 생전분보다 산 처리 전분이 보다 많은 짧은 가지를 가지게 된다는 기존 연구 결과(55)와도 일치하였다. Control의 경우 사슬 길이 분포가 시트르산 전분과 유사하나, 시트르산전분에 비해 매우 짧은 가지는 적으며 긴 가지 함량은 높은 결과를 보였는데, 이는 산 처리 변성 공정 중 고온 처리의 영향으로 보인다.

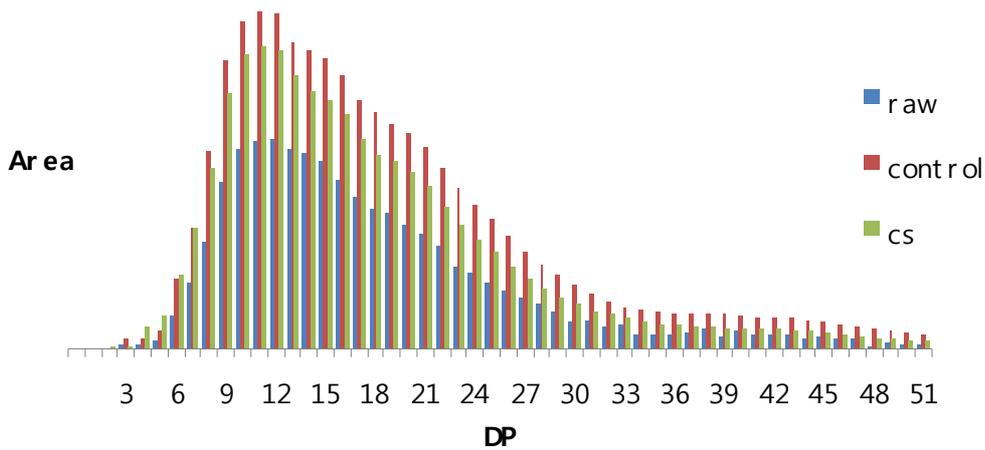


Figure 2. Side chain distributions of raw, control and citrate starch

㉔ 시트르산 처리 전분 대체 백설기의 특성 변화

○ 시트르산 처리 전분 대체 백설기의 색도

Table 5에 백설기의 색도를 나타내었다. 그 결과를 살펴보면 시트르산 전분 대체량이 많아 질수록 L값이 점점 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 다른 비교군인 시트르산 대신 증류수로 반응시킨 시트르산에 해당되는 control로 대체한 백설기나 어떠한 처리도 하지 않은 찹쌀 전분 자체로 대체한 백설기와는 현저히 차이를 볼 수 있었다. 또한 전분질 식품은 일반적으로 L값이 증가할수록 소비자의 선호도가 높아지는 것으로 알려져 있다(56). 적색도를 의미하는 a값은 다른 비교군과는 달리 시트르산 전분 대체량이 증가할수록 녹색이 연해짐을 알 수 있었다. 황색도인 b는 시트르산 대체 백설기와 시트르산의 control 대체 백설기의 경우 그 대체량이 많아질수록 커져 황색이 짙어지는 경향을 나타내었다.

Table 5. Hunter's color values of rice cakes

Sample ¹⁾	L	a	b	ΔE
Control	84.82 ^g	-1.19 ^e	7.23 ^b	11.96 ^b
CS 10%	87.82 ^f	-0.90 ⁱ	7.30 ^b	9.35 ^a
CS 20%	88.25 ^e	-0.83 ^{ijkl}	8.11 ^{cd}	9.44 ^a
CS 30%	89.93 ^d	-0.76 ^m	8.14 ^{cde}	8.21 ^a
CS 40%	89.24 ^b	-0.78 ^{lm}	9.02 ^f	9.32 ^a
CS-cont ³⁾ 10%	81.46 ^h	-1.15 ^f	7.78 ^c	15.25 ^c
CS-cont 20%	80.09 ^{ij}	-1.11 ^g	8.28 ^{de}	16.71 ^d
CS-cont 30%	76.09 ^{kl}	-0.98 ^h	8.40 ^{de}	20.51 ^e
CS-cont 40%	71.88 ^m	-0.86 ^{jk}	8.58 ^e	24.61 ^g

Means of triple replicates. Means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

1) See Table 2.

2) Baeksulki substituted with control of citrate starch

○ 시트르산 처리 전분 대체 백설기의 텍스처 특성

저장 기간 경과(0~3일)에 따른 백설기의 텍스처 변화를 Table 6, 7 및 8에 나타내었다. 경도는 원하는 변형에 도달하는 데 필요한 힘으로 기계적인 측정에서 첫 번째 압축 과정에서 나타나는 최대 peak이며 단위는 N으로 계산하였고, 응집성은 두 번째 압축 과정에서의 면적(A_2) 대 첫 번째 압축 과정의 면적(A_1)의 비 A_2/A_1 으로써 나타내며 덩어리 상태로 계속 유지하려는 정도로 정의하였다. 탄력성은 변형된 시료가 힘이 제거된 후에 원래 상태로 돌아가려는 성질로서, 두 번째 그래프의 x절편에서 peak까지의 시간을 첫 번째 그래프의 원점에서 peak까지의 시간으로 나눈 값이다. 씹힘성은 시료를 삼킬 수 있는 정도로 분쇄하는 데 필요한 에너지의 양으로 정의되며, 경도, 응집성, 탄력성의 곱으로 나타낸다.

백설기 제조 직후 한 시간 방치한 시료들의 텍스처는 다음과 같았다. 경도는 시트르산 대체량이 10%에서 40%로 증가함에 따라 유의적으로 낮아졌다. 응집성은 대조구와 시트르산 대체군은 유의적 차이를 나타내었으나, 나머지 군은 큰 차이를 나타내지 않았으며 그 값 역시 작았다. 탄력성은 control을 제외하고는 모두 그 대체량이 증가함에 따라 값이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 다른 시료들과의 값 차이가 크게 나지 않아 기존 백설기의 외양이나 텍스처에 큰 변화를 주지 않음으로써 그 기호성을 유지하면서도 난소화성의 기능적 특징을 가질 수 있다는 것을 시사하였다.

Table 7에는 24시간 동안 저장한 백설기의 텍스처를 나타내었다. 백설기 제조 직후 평가한 텍스처 특성(Table 6)에 비해 경도에서 매우 높은 값을 보이고 있으며, 다른 군과 달리 시트르산 대체 백설기만이 대체량이 증가 될수록 경도와 씹힘성이 감소함을 나타내었다. 특히 대체량이 30%와 40%인 경우에는 대조구에 비해 경도가 낮게 나타났다.

4°C에서 3일 간 저장한 백설기의 텍스처는 Table 8에 나타내었다. 모든 시료에서 저장 기간이 길어질수록 경도 및 씹힘성이 매우 증가한 것을 확인할 수 있었으나, 시트르산 대체 백설기의 경우는 그 증가 폭이 작았으며, 시트르산 전분 30% 및 40% 대체군의 경우 대조구에 비해 낮은 경도 값을 나타내었다. 응집성과 탄력성은 저장 기간이 길어질수록 그 값이 감소하여 3일 경과 시 가장 낮은 값을 나타내었다.

Table 6. Texture profile analysis of rice cakes without storage

Sample ¹⁾	Hardness (N)	Cohesiveness (No unit)	Springness (No unit)	Chewiness (No unit)
Control	3.24 ^a	0.73 ^e	0.86 ^g	2.06 ^{ab}
CS 10%	4.96 ^e	0.72 ^d	0.78 ^{def}	2.76 ^f
CS 20%	4.68 ^{de}	0.68 ^c	0.77 ^{cde}	2.42 ^{cde}
CS 30%	4.59 ^{cde}	0.66 ^b	0.70 ^a	2.13 ^{bc}
CS 40%	3.86 ^b	0.63 ^a	0.75 ^{bcd}	1.81 ^a
CS-cont 10%	4.20 ^{bcd}	0.76 ^g	0.82 ^f	2.59 ^{def}
CS-cont 20%	4.21 ^{bcd}	0.75 ^{fg}	0.79 ^{ef}	2.50 ^{def}
CS-cont 30%	4.12 ^{bc}	0.76 ^g	0.79 ^{ef}	2.46 ^{def}
CS-cont 40%	3.96 ^b	0.75 ^g	0.77 ^{de}	2.30 ^{bcd}

¹⁾ See descriptions below Table 5.

Table 7. Texture profile analysis of rice cakes stored for 1 day at 4°C

Sample ¹⁾	Hardness (N)	Cohesiveness (No unit)	Springness (No unit)	Chewiness (No Unit)
Control	15.72 ^b	0.36 ^a	0.92 ^{abc}	5.16 ^{ab}
CS 10%	21.00 ^{dc}	0.43 ^b	0.94 ^{cde}	8.41 ^b
CS 20%	17.35 ^{bc}	0.47 ^b	0.94 ^{cde}	7.70 ^b
CS 30%	13.51 ^b	0.46 ^b	0.93 ^{bcd}	5.80 ^{ab}
CS 40%	7.65 ^a	0.41 ^{ab}	0.91 ^{ab}	2.82 ^a
CS-cont 10%	38.97 ^d	0.61 ^c	0.94 ^{de}	22.36 ^c
CS-cont 20%	43.78 ^e	0.66 ^c	0.94 ^{de}	27.16 ^d
CS-cont 30%	55.64 ^f	0.72 ^d	0.94 ^{de}	37.54 ^e
CS-cont 40%	71.77 ^h	0.79 ^e	0.89 ^a	50.45 ^g

¹⁾ See descriptions below Table 5.

Table 8. Texture profile analysis of rice cakes stored for 3 days at 4°C

	Hardness (N)	Cohesiveness (No unit)	Springness (No unit)	Chewiness (No unit)
Control ¹⁾	21.56 ^{ab}	0.14 ^a	0.83 ^a	2.44 ^a
CS 10%	29.94 ^b	0.23 ^b	0.87 ^b	5.99 ^a
CS 20%	25.04 ^{ab}	0.21 ^b	0.90 ^{bc}	4.73 ^a
CS 30%	16.49 ^a	0.24 ^b	0.87 ^b	3.48 ^a
CS 40%	12.35 ^a	0.23 ^b	0.88 ^b	2.52 ^a
CS-cont 10%	88.07 ^c	0.34 ^c	0.89 ^{bc}	26.25 ^b
CS-cont 20%	160.97 ^e	0.45 ^{de}	0.87 ^{ab}	62.80 ^c
CS-cont 30%	245.50 ^g	0.60 ^f	0.89 ^{bc}	130.75 ^e
CS-cont 40%	359.29 ^h	0.72 ^g	0.87 ^{ab}	222.42 ^f

¹⁾ See descriptions below Table 5.

○ 시트르산 처리 전분 대체 백설기의 소화율

백설기의 제조 직후 측정된 소화율 중 난소화성 전분(RS) 함량은 시트르산 대체량이 40%일 때 가장 높은 값을 보였으며, 시트르산 대체군 모두 다른 군에 비해 유의적으로 높은 난소화성 전분 함량을 나타내어, 백설기를 제조하는 장시간의 가열 동안에도 난소화성 전분이 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다. 곡류, 두류 및 감자류 등의 조리 가공 식품의 난소화성 전분 함량은 낮아, 높은 경우에도 겨우 3% 정도에 미치는 것으로 알려져 있다(57). 밀가루로 만든 식빵의 경우에도 굽는 온도와 시간, 재료 및 배합 비율에 따라 0.3~1.0%의 난소화성 전분을 함유하는 것으로 밝혀졌으나(58), 대조구 백설기의 경우 난소화성 전분 함량이 상당히 높은 것을 알 수 있었다.

Table 9. The contents of RDS, SDS, and RS¹⁾ of rice cakes (%)

Sample ²⁾	RDS	SDS	RS
Control	76.0	7.5	16.5
CS 10%	74.9	5.6	19.5
CS 20%	69.7	6.6	23.7
CS 30%	65.8	3.1	31.2
CS 40%	60.2	2.5	37.3
CS-cont 10%	75.6	8.9	15.5
CS-cont 20%	76.6	6.7	16.7
CS-cont 30%	75.9	6.2	17.9
CS-cont 40%	74.5	11.3	14.1

¹⁾ See descriptions below Table 3.

²⁾ See descriptions below Table 5.

○ 백설기의 노화도 측정

제조 당일에는 모든 백설기에서 paek가 나타나지 않았다. 4°C에서 1일 및 3일 경과 후 노화된 떡들의 용융 peak는 흡열 반응을 보였으며 그 온도 범위는 시트르산 대체 백설기들의 경우에는 46.5~57.6°C이었으며, 시트르산의 control 대체 백설기들은 46.5~58.7°C이었다. 개시 온도(To)는 모두 저장 기간이 경과됨에 따라서 온도의 변화는 크게 나타나지 않았으나 조금씩 증가한 것으로 나타나 호화된 amylopectin의 노화로 저장 기간이 길어짐에 따라 개시 온도가 증가

된다는 기존 연구 결과와 비슷한 양상을 보였다. 정점 온도(Tp) 그리고 종결 온도(Tc)는 변화가 거의 없거나 아주 약간의 증가 혹은 감소가 관찰되었다. 노화에 있어서 가장 중요한 엔탈피(ΔH)의 경우, 저장 기간이 경과함에 따라 전분 내의 amylopectin 분자 간의 재결정의 용융으로 인해 흡열 곡선 내의 면적, 즉 엔탈피가 증가하게 되며 떡 조직이 단단해지는 속도와 일치한다 (59).

이 실험에서 저장 기간이 경과함에 따라 대조구는 그 값이 1.9에서 3.2로 가장 크게 증가함으로써 다른 그룹에 비해 매우 높은 노화도를 보였다. 시트르산 대체 백설기군이 가장 낮은 증가를 보였으며, 최저값은 0.8에서 1.8로 시트르산 40% 대체 백설기였다. 이는 시트르산 처리 찹쌀 전분의 첨가가 노화 억제 효과를 나타낸 것으로 볼 수 있다. 전분 노화는 전분의 종류, 전분 내 아밀로오스와 아밀로펙틴의 함량비, 분자의 크기, 온도, 기타 첨가 물질에 의하여 영향을 받는다고 알려져 있다. 또한 전분 분자의 사슬 길이도 영향을 주어 짧은 사슬(특히, 중합도 6~9)이 증가하면 노화가 지연되거나 억제되는데, 이는 사슬 길이가 짧은 분자들이 상호 결합하여 전분의 노화 속도를 지연시키는 데 기인한다(60). 이것은 이미 언급된 바와 같이 시트르산 전분의 사슬 길이 변화, 즉 짧은 사슬 길이가 증가하는 것과 일치하며(Figure 2), 이로 인해 시트르산 찹쌀 전분 대체 백설기의 노화가 지연된다고 할 수 있다.

Table 10. Retrogradation properties¹⁾ of rice cakes stored for 1 day at 4°C

Sample ²⁾	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc-To (°C)	ΔH (J/g)
Control	47.6 ^{ab}	52.3 ^{ab}	57.6 ^{de}	10.0 ^{ab}	1.9 ^{bc}
CS ²⁾ 10%	46.5 ^a	51.9 ^a	56.4 ^a	9.9 ^{ab}	1.8 ^{bc}
CS 20%	46.9 ^{ab}	52.2 ^{ab}	56.4 ^b	9.5 ^{ab}	1.4 ^b
CS 30%	46.9 ^{ab}	52.6 ^{ab}	57.4 ^{cde}	10.5 ^b	1.1 ^a
CS 40%	48.7 ^b	52.8 ^{ab}	56.8 ^{abc}	8.1 ^a	0.8 ^a
CS-cont ³⁾ 10%	46.9 ^{ab}	52.2 ^{ab}	56.7 ^{ab}	9.7 ^{ab}	2.3 ^c
CS-cont 20%	46.6 ^b	52.3 ^{ab}	57.4 ^{cde}	10.8 ^b	2.0 ^c
CS-cont 30%	48.1 ^{ab}	52.5 ^{ab}	57.7 ^{de}	9.6 ^{ab}	1.9 ^{bc}
CS-cont 40%	47.6 ^{ab}	52.8 ^{ab}	57.5 ^{cde}	9.8 ^{ab}	1.9 ^{bc}

¹⁾ See descriptions below Table 4.

²⁾ See descriptions below Table 5.

Table 11. Retrogradation properties¹⁾ of rice cakes stored for 3 days at 4°C

Sample²⁾	To(°C)	Tp(°C)	Tc(°C)	Tc-To(°C)	ΔH(J/ g)
Control	47.1 ^{ab}	52.1 ^a	56.6 ^b	9.5 ^{abc}	3.2 ^{fg}
CS 10%	47.5 ^{abc}	52.7 ^{abcde}	57.4 ^{cd}	9.9 ^{abcd}	2.5 ^{cde}
CS 20%	48.1 ^{bc}	53.1 ^{cde}	57.4 ^{cde}	9.3 ^{ab}	2.3 ^{bcd}
CS 30%	47.1 ^{ab}	52.2 ^{ab}	57.0 ^{bc}	9.9 ^{abcd}	1.9 ^{abc}
CS 40%	46.7 ^a	52.5 ^{abcd}	56.6 ^b	10.0 ^{abcd}	1.8 ^{ab}
CS-cont 10%	47.0 ^{ab}	52.3 ^{abc}	57.6 ^{de}	10.5 ^{bcd}	3.0 ^{efg}
CS-cont 20%	46.5 ^a	52.8 ^{abe}	58.7 ^g	12.1 ^{de}	2.7 ^{def}
CS-cont 30%	46.8 ^a	53.4 ^e	58.0 ^{ef}	11.1 ^{de}	2.0 ^{abc}
CS-cont 40%	48.2 ^c	53.1 ^{bcde}	57.0 ^{bcd}	8.8 ^a	1.8 ^{ab}

¹⁾ See descriptions below Table 4.

²⁾ See descriptions below Table 5.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구별 연구목표 및 평가착안점

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2006	○ 맞춤형 쌀전분 식품소재 제조 및 특성 규명	25 %	○ 맞춤형 쌀전분 식품소재 제조 조건 확립 및 물리화학적 특성 규명
		○ 맞춤형 기법 이용 떡, 면, 빵류의 품질 평가법 정립	20 %	○ 떡, 면, 빵류의 품질 평가법 정립
		○ 전분효소의 생산	30 %	○ 특성화된 전분 효소의 개발
		○ 난소화성 및 지소화성 쌀전분의 제조 및 특성	25 %	○ 난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 조건 확립
2차 년도	2007	○ 맞춤형 쌀전분 식품소재 이용 떡제품의 가공적성 및 제품특성	30 %	○ 맞춤형 쌀전분 식품소재 이용 떡제품의 최적 제조조건 확립 및 물리화학적 특성 규명
		○ 쌀 가공제품 가공조건 최적화 및 저장중 품질평가	20 %	○ 현장조건에 맞는 효소공정 및 소재이용 공정 조건 최적화
		○ 전분효소의 작용 메카니즘	25 %	○ 맞춤형 소재 개발 위한 효소의 작용 메카니즘 구명
		○ 제조된 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 구조 및 물성 분석	25 %	○ 기능성 식품소재로서의 활용성 규명
3차 년도	2008	○ 맞춤형 쌀전분 식품 소재 이용 면제품의 가공적성 및 제품특성	20 %	○ 맞춤형 쌀전분 식품소재 이용 냉동면의 최적 제조조건 확립 및 물리화학적 특성 규명
		○ 맞춤형 전분 기법을 이용한 신제품개발	30 %	○ 생물공정에 의해 설계된 기능성 떡, 면, 빵제품의 개발
		○ 효소의 대량생산	30 %	○ 발효조건, 정제조건 및 분말화 방법 최적화
		○ 맞춤형 쌀떡의 가공 적성 연구 및 개발	20 %	○ 맞춤형 떡 제조 및 특성 구명
최종 평가		○ 맞춤형 쌀전분 식품 소재의 제조 및 특성 규명	25 %	○ 맞춤형 쌀전분 식품소재의 제조 조건 확립 및 가공적성 규명
		○ 맞춤형 쌀전분 소재 이용 식품의 개발	25 %	○ 쌀전분 기능성 소재 이용 떡, 면, 빵제품의 개발
		○ 맞춤형 쌀전분 제조 효소의 개발 및 특성 규명	30 %	○ 특성화된 맞춤형 전분효소의 개발과 작용의 최적화
		○ 난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 및 응용	20 %	○ 난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 조건 확립과 가공적성 규명

2. 당초 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도

가. 제 1세부과제 : 맞춤형 쌀전분 식품 소재의 제조 및 이를 이용한 식품의 개발

○ 1차년도 연구목표인 맞춤형 식품 소재 제조 및 특성을 구명하기 위하여 *Thermus aquaticus*로부터 분리한 4- α -glucanotransferase (4 α GTase)를 기질 농도별, 효소 농도별, 반응 시간별로 쌀전분과 반응시켜 맞춤형 전분 소재를 제조하였다. 제조한 전분 소재의 물리화학적 특성을 HPLC에 의한 분자량 분포도, 등온흡습곡선, DSC에 의한 비결정 수분함량, Texture analyzer에 의한 겔 특성 등을 조사함으로써 규명하여, 1차년도 연구목표를 100% 달성하였다. 1차년도 연구결과를 통해, 4 α GTase 처리된 전분이 동일한 수분함량일 경우 수분활성도가 낮고 얼음결정 용융 엔탈피 값이 작아짐을 알 수 있었고, 식품에 첨가시 보습제 또는 냉동방지제로서 이용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

○ 2차년도 연구목표는 맞춤형 쌀전분 식품 소재 이용 떡제품의 가공적성 및 제품 특성을 규명하고, 쌀 가공제품 가공조건 최적화 및 저장 중 품질을 평가하는 것으로, 이를 달성하기 위하여 효소를 처리한 쌀가루를 떡 제조에 직접 사용하는 방법과 먼저 효소처리에 의해 쌀가루 소재를 제조하고, 이를 떡 제조에 첨가하여 특성을 조사하는 두 가지 방법으로써 연구를 진행하였다. 또한 제조한 떡의 가공조건 최적화와 저장 중 품질 평가를 위하여 관능검사를 실시하였다. 연구 결과들로 부터 탄수화물 효소에 의한 쌀 전분의 아밀로펙틴 측쇄 분포 변화와 아밀로오스 함량의 감소 및 isomaltooligosaccharides (IMO) 등이 떡의 저장 중 전분 노화를 효과적으로 억제하고 품질을 향상시키는 데 기여했음을 확인할 수 있었고, 효소에 의한 전분 구조 수식은 떡을 비롯한 전분질 식품의 품질을 향상시키기 위해 사용할 수 있을 것으로 생각되었다.

○ 3차년도 연구목표는 맞춤형 쌀전분 식품 소재 이용 면제품의 가공적성 및 제품특성을 규명하는 것으로, 4 α GTase 처리 쌀가루를 첨가하여 국수를 제조하고, 조리 특성, 반복적인 냉·해동 과정 후 국수 조직감의 변화 등을 조사함으로써 당초 연구목표의 100%를 달성하였다. 국수를 냉·해동 여러 번 반복하면 냉동변성이 발생할 가능성이 충분하지만 4 α GTase가 처리된 쌀가루를 함유하는 경우 냉동 변성이 거의 발생하지 않음을 알 수 있었으며, 특히 씹힘성이 좋아서, 앞서도 설명한 바와 같이 맞춤형 쌀전분 또는 쌀가루 소재가 보습제 또는 식품의 냉동방지로서 이용될 수 있을 것으로 생각되었다.

나. 제 2세부과제 : 맞춤형 쌀전분 제조 효소의 개발 및 특성

○ 1차년도에는 맞춤형 쌀전분 제조를 위한 여러 종류의 탄수화물 효소를 확보하고 이들의 특성을 연구하였는데, 연구 목표를 100% 이상 달성하였다고 사료된다. *Pyrococcus furiosus*로부터 α -glucanotransferase (PfaGT)를 클로닝하고 이의 효소적 특성을 연구하였다. 또한 *Bacillus stearothermophilus* 유래 말토제닉 아밀레이즈 (BSMA)를 *Bacillus subtilis* 를 단백질 생산 균주로 이용하여 제조하고 변형 전분 생산과 관련된 연구를 진행하였다. 먼저, PfaGT를 쌀전분을 포함한 다양한 전분에 처리한 결과 전분의 분자량이 급속히 감소하는 양상을 나타냄을 보였고 이는 PfaGT가 아밀로펙틴을 수식하여 분자량이 1000배 이상 감소한 아밀로펙틴 클러스터를 생산할 수 있음을 나타내었다. BSMA는 쌀전분에 반응하여 다양한 종류의 분지올리고당을 생성할 수 있음을 확인하였다. 마지막으로 CGTase를 세포표면에 디스플레이 할 수 있는 재조합 효모를 제조하여 이것이 전분의 변형에 이용될 수 있음을 밝혔다.

1차년도 연구를 통하여 여러 종류의 탄수화물 효소 중 맞춤형 전분 제조에 사용될 수 있는 전분 효소를 확보하였고 그것의 전분 반응 특성을 연구하였는데, 이를 통하여 전분 수식 효소의 클로닝 및 반응특성 연구에 대한 노하우를 확보하였다.

○ 2차년도 연구에서는 더 많은 탄수화물 효소를 확보하고 이의 전분에 대한 작용메커니즘을 밝혔다. 먼저, PfaGT를 이용한 전분 수식 시 일어나는 전분의 구조적 변화를 연구하였다. 쌀전분은 PfaGT와 반응하여 클러스터로 가수분해되어 분자량이 급속하게 감소하는데, 이 때 최적의 반응조건을 밝히고 SEC-MALLS/RI를 이용하여 분자량 감소 패턴을 명확하게 분석하였다. 또 클러스터화 된 쌀전분의 가지결합분포를 반응전과 비교하여 효소반응 메커니즘을 밝혔다. 다음으로 Branching enzyme (BE)를 클로닝하고 이의 전분에 대한 반응 특성을 분석하였다. 여러 전분을 이용한 연구를 통하여 BE는 전분과 반응하여 아밀로펙틴으로부터는 클러스터를 생산하고 아밀로스는 글리코겐과 유사한 물질로 전환시키는 것을 밝혔다.

2차년도 연구에서는 서로 다른 반응 조건을 나타내는 다수의 탄수화물 효소를 확보하고 이들의 전분 수식 메커니즘을 성공적으로 분석하였다. 생산된 변형전분의 구조적인 특성을 정확히 분석하여, 전분구조와 물성학적 특성과의 연관관계를 보다 깊이 있게 이해할 수 있었다. 이와 같은 노하우는 다양한 효소와 전분에 대해 적용될 수 있는 보편적인 연구 방법이 될 수 있다. 따라서 2차년도 연구목표는 100% 이상 달성되었다고 사료된다.

○ 3차년도 연구에서는 유용 탄수화물 효소를 대량생산하고 이를 산업적으로 이용할 수 있는 시스템을 구축하고자 하였다. 3차년도 연구 목표인 유용 탄수화물 효소의 대량생산은 현재 진행 중이며, 벤처기업과의 협력연구를 모색하고 있다. 3차년도에도 새로운 탄수화물 효소를 개발하였는데, 초고온성 말토제닉 아밀레이즈로서 다양한 산업적 응용가능성이 있음을 본 연구를 통하여

밝혔다.

비록 탄수화물 효소의 대량 생산 연구는 아직 진행 중이지만, 다양한 탄수화물 효소의 쌀전분에 대한 작용 메커니즘을 이해하고 변형된 전분의 효과적인 분석방법을 확보한 것은 본 연구의 큰 성과로 사료된다. 본 연구팀은 앞으로 이 같은 결과물을 이용하여 상업적인 효소를 능가하는 효용성을 지닌 탄수화물 효소를 계속해서 탐색하여 고부가가치를 창출할 수 있는 맞춤형 전분 효소를 개발 할 수 있을 것으로 기대한다.

다. 제 3세부과제 : 난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 및 응용

○ 1차년도의 연구 목표인 난소화성 및 지소화성 쌀 전분의 제조 및 특성에 대해 amylosucrase 및 citric acid를 이용한 난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 조건 확립하였다. Amylosucrase 반응에 대해서는 기질로 사용되는 전분의 농도, 효소의 농도 및 반응 시간에 따른 난소화성/지소화성 전분의 생성 정도를 파악하였다. 이를 통하여 소재 제조를 위한 기질 및 효소의 농도 비율 및 반응 시간을 확립하였다. Citric acid 전분을 사용하여 난소화성 전분을 생성하기 위해서는 건열 및 압열 방법을 사용하여 난소화성 분획의 생성 정도를 탐색하였으며 월등하게 생성되는 건열 처리 방법을 확립하였다. 이와 같은 결과로써 1차년도의 연구목표를 100% 달성하였다.

○ 2차 년도에는 amylosucrase 및 citric acid를 이용하여 생성된 난소화성 및 지소화성 전분의 구조특성, 이화학적 특성 및 물성을 조사하였다. 1차년도에 확립된 반응 조건으로 amylosucrase를 이용하여 반응을 시킨 찹쌀 및 멥쌀에 있어서, 생성된 소재의 가지사슬이 신장되었으며, 이에 따라 분자량은 현저히 증가하였다. 또한 열적 및 유변학적 특성 조사를 통해 기능성 식품에 적용 가능성을 제시하여, 효소적 반응을 이용하여 제조된 난소화성/ 지소화성 전분의 특성 조사의 목표를 달성하였다. Citric acid를 이용한 난소화성 전분의 제조에 있어서, 1차년도에서 확립된 건열처리 방법을 사용하여, citric acid 첨가량, 열처리 온도 및 시간의 3요인 5수준을 택하여 반응표면 분석방법을 적용하여 조건의 최적화를 하여 제조의 최적 조건을 확립하였다. 최적 으로 제조된 소재의 구조 특성을 분자량, 가지 사슬의 변화, SEM을 사용한 형태학적 변화 및 FT-IR을 사용한 결합의 생성 확인을 통해 명확히 밝혀 목표를 달성하였다.

○ 3차 년도에는 amylosucrase를 이용한 소재의 제조에 반응표면 분석방법을 적용하여, 난소화성/지소화성 분획을 최대로 생성할 수 있는 효소량 및 반응 시간을 국내산 화선찰벼를 사용하여 확립하고, 이를 하여 백설기에 적용하여 식품에의 적용 가능성을 조사하였다. Citric acid를 이용한 난소화성 전분은 2차 년도에 확립된 최적조건으로 제조하여 백설기에 적용하였다. 식품 시스템에서 소화정도를 측정할 수 있는 방법을 확립하여 소화유형을 분석한 결과, amylosucrase

를 이용하여 증진된 지소화성 분획은 열에 안정성이 없어 30분간 높은 온도의 증기로 가열하는 떡 시스템 적용하는 것에는 적절하지 않다고 판단되었으나, 난소화성 분획은 장시간 고열에서 가열하는 조건에서도 파괴되지 않고 존재하여 식품에의 높은 적용 가능성을 보였다. 이로써 맞춤형 쌀떡의 가공 적성 연구 및 개발의 목표를 달성하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 제 1세부과제 : 맞춤형 쌀전분 식품소재의 제조 및 이를 이용한 식품의 개발

○ 효소를 이용한 맞춤형 소재를 제조하고 특성을 연구한 결과, 식품의 보습제 또는 냉동 방지제로의 사용 가능성이 확인되어, 식품의 냉동변성방지제와 관련한 특허를 출원하였고, 산업화 방법을 모색 중이다.

○ 저장 안정성이 향상된 맞춤형 소재 함유 떡을 개발하였고, 이와 관련하여 산업화 방법을 모색 중이다.

○ 냉해동 안정성이 향상된 냉동면 제조가 가능할 것으로 생각되며, 이에 기술이전 가능성을 협의 중이다.

○ 효소 처리된 전분을 함유하는 식품의 냉동변성 방지제와 관련하여 특허를 출원하였으며, 이와 관련된 논문을 준비 중에 있다.

2. 제 2세부과제 : 맞춤형 쌀전분 제조 효소의 개발 및 특성

○ 본 연구에서는 여러 종류의 미생물로부터 탄수화물 효소들을 클로닝하고 정제하여 그 효소반응 특성을 연구하였다. 이를 통해 축적된 지식을 이용하여 유용 효소를 지속적으로 개발하고자 하며 고부가가치 변형 전분 제조에 이용하고자 한다. 본 연구에서는 또한 변형 전분의 구조적 분석법을 확립하였는데 이를 활용하여 전분의 이화학적 특성과 구조와의 상관관계를 명확히 이해하고 특정 특성을 나타내는 변형 전분의 제조할 수 있을 것으로 기대한다.

○ 본 연구에서 확보한 초고온성 말토제닉 아밀레이즈는 전분산업에 활용될 수 있는 여러 특성을 지니고 있음을 밝혔는데 이 같은 연구성과는 곧 논문 (2009년 하반기)으로 발표될 예정이며 산업적 이용부분은 특허를 준비 중이다. 또한 디브랜칭 효소를 이용한 고순도 올리고당 생산에 대한 논문이 Food Science Biotechnology 4월 호에 게재될 예정이다.

3. 제 3세부과제 : 난소화성/지소화성 쌀전분의 제조 및 응용

○ 관련 논문 1편을 SCI급 학회지에 제출하여 수정단계에 있으며, 2편의 논문을 작성 중에 있다.

○ Amylosucrase를 단독으로 처리하거나 다른 효소들과 복합적으로 처리하여 지소화성 및 난소화성 전분을 제조하고 그 구조적 및 물리화학적 특성을 규명하는 연구들을 수행중에 있다.

○ Amylosucrase의 반응 조건에 따라 지소화성 및 난소화성 전분 분획이 달라지는 원인을 규명하기 위한 연구를 수행하고자 계획 중이다. 즉, 변형된 전분의 구조와 난소화성 및 지소화성 분획의 상관관계를 구명하는 연구를 수행할 계획이다.

○ 효소적 및 화학적으로 생성된 난소화성 및 지소화성 전분을 식품에 적용하는 실험들을 계속적으로 수행할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 네델란드의 TNO에서 박테리아로부터 분리한 4- α -glucanotransferase (amylomaltase or D-enzyme)를 이용하여 감자 전분으로부터 열가역적인 전분겔을 제조할 수 있음을 발표한 바 있다(7).
- 4- α -glucanotransferase 이외에도 당전이능이 있는 branching enzyme과 maltogenic amylase를 이용하여 전분 구조를 수식하고 생리적 기능성을 갖는 전분 소재를 제조하는 연구가 보고된 바 있다 (19-21).
- 최근 저지방 요거트의 creaminess를 향상시키기 위하여 지방대체제로써 amylomaltase 처리된 전분을 이용한 연구가 보고 된 바 있으나, 효소에 의해 구조가 수식된 전분을 직접 식품으로 이용하는 연구는 세계적으로 아직 초기 단계이다(64).
- 탄수화물 관련 효소의 산업적 이용은 20세기 중반부터 활발히 연구되어 왔다. 탄수화물 효소를 이용하여 전분으로부터 포도당이나 과당, 말토오스 등을 생산하는 공정은 오랫동안 개선되어 왔으나 여전히 활발히 연구되고 있는 분야 중 하나이다 (44).
- 식품산업에서 전분의 특정 특성을 얻기 위한 이러한 탄수화물 효소의 이용은 대표적으로 제빵 및 떡 산업을 들 수 있다 (37). 이 때 탄수화물 효소는 반죽에 처리함으로써 소당류를 생성하여 전분의 노화를 저해하기 위하여 이용된다. 이러한 전분의 변형은 가장 초보적인 단계이나 최근 일본의 한 논문에서는 효소를 이용하여 생산된 변형전분-특정 구조의 전분이 인체의 면역력 증진 등 기능성을 나타낸다고 발표하였다 (45).
- 또한 본 연구팀이 발표한 연구논문과 유사하게, 다양한 효소를 이용하여 특정 물성학적 장점을 지니는 변성 전분의 제조에 대한 연구가 꾸준히 국제 학술지에 발표되고 있다.
- 한편, 식물분자유전학 쪽에서는 유전자 변이식물을 이용하여 변형전분을 식량자원 식물로부터 생산하고자 하는 시도들이 계속되고 있다. 현재 식물 내 아밀로스 및 아밀로펙틴 덩어리의 생성 메커니즘에 대해서는 다양한 연구를 통해 많은 정보가 알려져 있는데 (43), 이에 관여하는 특정 효소를 과다생성 혹은 생성억제를 통하여 구조적으로 변형된 전분을 생산하는 연구들이 전 세계적으로 진행 중이다.
- 이 같은 연구는 새로운 탄수화물 식품소재의 대량생산은 물론 최근의 바이오에너지 제조에 대한 관심과도 연결되어 있다. 하지만 식물을 이용한 연구는 비교적 긴 연구기간을 요구하고 또한 그 메커니즘의 복잡성으로 인하여 세밀한 구조변형이 아직은 불가능한 것으로 보인다. 탄수화물 식품 소재는 그 활용 방식에 따라 고부가가치 식품소재로 거듭날 수 있는 가능성이 존재한다. 이 때문에 일본 등 선진국에서는 맞춤형 탄수화물 소재 제조를 위한 방

법 확보에 많은 투자를 하고 있는 실정이다.

- 소화기관 내에서 전분의 아밀로오스/아밀로펙틴의 가지가 서서히 분해되어 혈당의 급속한 상승을 방지함으로써 당뇨 환자의 혈당을 조절하거나, 지속적 열량 공급 및 고지혈증 완화, 심혈관계 질환예방 등의 생리기능적 효과가 있는 전분에 대한 국내외 연구는 초기 단계에 있다 (13-15).
- 이러한 지소화성 전분의 생성에 관한 기존의 연구는 주로 전분의 수분-열처리, **annealing** 등의 물리적 방법 및 노화에 의한 재결정화에 한정되어 있다(50-53).
- **Maltogenic amylase** 및 **isoamylase** 등의 효소를 이용하여 지소화성 전분의 생성에 관한 연구도 소수 시도된 바 있다 (53, 65).
- 일본에서는 효소를 이용하여 전분으로부터 고분자 환형 텍스트린을 제조하고 낮은 혈당 지수와 인슐린 반응의 이점을 활용하여 스포츠 음료에 적용하였고, 천천히 소화되는 당알코올 제품인 **Isomalt**도 출시되었으나, 이 제품들은 생리 기능적 측면에서는 지소화성 전분과는 매우 상이하다 (11). 현재 산업적으로 생산되는 지소화성 전분은 전무한 상태이다.
- 최근에는 효소를 이용하여 아밀로오스 함량 및 아밀로펙틴의 가지사슬 구조를 변화시켜 냉해동 안정성이나 열가역성이 탁월한 전분소재를 개발하여 동물성 젤라틴을 대체하고자 하는 연구도 일부 시도되고 있다(66-67).

제 7 장 참고문헌

1. Choi, S.G., & Kerr, W.L. (2003). Effect of hydroxypropylation on retrogradation and water dynamics in wheat starch gels using H-1 NMR. *Cereal Chemistry*, 80(3), 290-296.
2. Lee, C. M. (2002). Role of hydrodynamically active biopolymeric ingredients in texture modification and physical stabilization of gel-based composite foods. *Journal of Food Science*, 67(3), 902-908.
3. Marques, P. T., Perego, C., Le Meins, J. F., Borsali, R., & Soldi, V. (2006). Study of gelatinization process and viscoelastic properties of cassava starch: Effect of sodium hydroxide and ethylene glycol diacrylate as cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*, 66(3), 396-407.
4. Ortega-Ojeda, F. E., Larsson, H., & Eliasson, A. C. (2005). Gel formation in mixtures of hydrophobically modified potato and high amylopectin potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 59(3), 313-327.
5. Raina, C. S., Singh, S., Bawa, A. S., & Saxena, D. C. (2006). Rheological properties of chemically modified rice starch model solutions. *Journal of Food Process Engineering*, 29(2), 134-148.
6. Saartrat, S., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., & Uttapap, D. (2005). Paste and gel properties of low-substituted acetylated canna starches. *Carbohydrate Polymers*, 61(2), 211-221.
7. Kaper, T., van der Maarel, M., Euverink, G. J. W., & Dijkhuizen, L. (2004). Exploring and exploiting starch-modifying amylomaltases from thermophiles. *Biochemical Society Transactions*, 32, 279-282.
8. Yadav, A. R., Mahadevamma, S., Tharanathan, R. N., & Ramteke, R. S. (2007). Characteristics of acetylated and enzyme-modified potato and sweet potato flours. *Food Chemistry*, 103(4), 1119-1126.
9. Jobling, S. A., Westcott, R. J., Tayal, A., Jeffcoat, R., & Schwall, G. P. (2002). Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nature Biotechnology*, 20(3), 295-299.
10. Lehmann U et al. 2007. Slowly digestible starch - its structure and health implications: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 18, 346-355
11. <http://www.gograins.com.au/grainsnutrition/ie/print/print17.pdf>
12. Brouns F. et al. 2002. Resistant starch and the butyrate revolution. *Trends Food Sci. Technol.*

- 13, 251-261.
13. Baghurst P. A. et al. 1996. Dietary fiber, non-starch polysaccharides and resistant starch : review. *Food Australia*, 48(3), S3-S35
 14. Jenkins D. J. A. et al. 1998. Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *J. Am. Coll. Nutr.* 17, 609-616.
 15. Giacco R. et al. 1998. Metabolic effects of resistant starch in patient with type 2 diabetes, *Diab. Nutr. Metab.* 11, 330-335.
 16. Lee, C. K., Le, Q. T., Kim, Y. H., Shim, J. H., Lee, S. J., Park, J. H., Lee, K. P., Song, S. H., Auh, J. H., Lee, S. J., & Park, K. H. (2008). Enzymatic synthesis and properties of highly branched rice starch amylose and amylopectin cluster. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 126-131.
 17. Lee, K. Y., Kim, Y. R., Park, K. H., & Lee, H. G. (2006). Effects of alpha-glucanotransferase treatment on the thermo-reversibility and freeze-thaw stability of a rice starch gel. *Carbohydrate Polymers*, 63(3), 347-354.
 18. Park, J. H., Kim, H. J., Kim, Y. H., Cha, H., Kim, Y. W., Kim, T. J., Kim, Y. R., & Park, K. H. (2007). The action mode of *Thermus aquaticus* YT-1 4-alpha-glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 67(2), 164-173.
 19. Takata, H., Kojima, I., Taji, N., Suzuki, Y., & Yamamoto, M. (2006). Industrial production of branching enzyme and its application to production of highly branched cyclic dextrin (Cluster Dextrin (TM)). *Seibutsu-Kogaku Kaishi*, 84(2), 61-66.
 20. Takii, H., Ishihara, K., Kometani, T., Okada, S., & Fushiki, T. (1999). Enhancement of swimming endurance in mice by highly branched cyclic dextrin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63(12), 2045-2052.
 21. Takii, H., Kometani, T., Nishimura, T., Kuriki, T., & Fushiki, T. (2004). A sports drink based on highly branched cyclic dextrin generates few gastrointestinal disorders in untrained men during bicycle exercise. *Food Science and Technology Research*, 10(4), 428-431.
 22. Takii, H., Takii, Y., Kometani, T., Nishimura, T., Nakae, T., Kuriki, T., & Fushiki, T. (2005). Fluids containing a highly branched cyclic dextrin influence the gastric emptying rate. *International Journal of Sports Medicine*, 26(4), 314-319.
 23. Karel, M. and Lund, D.B. (2nded), *Physical principles of food preservation*. New York: Marcel Dekker , 2003

24. Auh, J.H., Chae, H.Y., Kim, Y.R., Shim, K.H., Yoo, S.H., & Park, K.H. (2006). Modification of rice starch by selective degradation of amylose using alkalophilic *Bacillus Cyclomaltodextrinase*. *J. Agri. Food Chem.* 54:2314-2319.
25. Takaha, T., Yanase, M., Takata, H., Okada, S., & Smith, S.M. (1998). Cyclic glucans produced by intramolecular transglycosylation activity by potato D-enzyme on amylopectin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 247:493-497.
26. Levine, H. & Slade, L. (1986). A polymer physicochemical approach to study of commercial starch hydrolysis products (SHP's). *Carbohydrate Polym.* 6: 213-244.
27. Gujral, H.S., Haros, M., & Rosell, C.M. (2003). Starch hydrolyzing enzymes for retarding the staling of rice bread. *Cereal Chem.* 80:750-754.
28. Auh, J.H., Lee, K.S., Lee, H.G., & Park, K.H. (1999). Cryoprotectancy of branched oligosaccharides in fish actomyosin. *Food Sci Biotechnol* 8(2):103-107.
29. A. Roujeinikova, C. Raasch, S. Sedelnikova, W. Liebl, and D.W. Rice, Crystal structure of *Thermotoga maritima* 4- α -glucanotransferase and its acarbose complex: implications for substrate specificity and catalysis. *J Mol Biol* 321 (2002) 149-62.
30. B.L. Cantarel, P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics, *Nucleic Acids Res* 37 (2009) D233-D238.
31. E.J. Woo, S. Lee, H. Cha, J.T. Park, S.M. Yoon, H.N. Song, K.H. Park. Structural In sight into the Bifunctional Mechanism of the Glycogen Debranching Enzyme TreX from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem.* 283 (2008) 8631-28638.
32. G.J. Davis, K.S. Wilson, B. Henrissat, Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolylases. *Biochem. J.* 321 (1997) 557-559.
33. H. Meissner, W. Liebl, *Thermotoga maritima* maltosyltransferase, a novel type of maltodextrin glycosyltransferase acting on starch and malto-oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* 258 (1998) 1050-1058.
34. H.S. Park, J.T. Park, H.K. Kang, H. Cha, D.S. Kim, J.W. Kim, K.H. Park, TreX from *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092 displays isoamylase and 4- α -glucanotransferase activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 1348-1352.
35. J.D. Fox, J.F. Robyt, Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.* 195 (1991) 93-96.
36. J.H. Park, K.H. Park, J.L. Jane, Physicochemical properties of enzymatically modified maize

- starch using 4- α -glucanotransferase. *Food Sci. Biotechnol.* 16 (2007) 902-909.
37. J.H. Shim, N.S. Seo, S.A. Roh, J.W. Kim, H. Cha, **K.H. Park**, An improved bread-baking process using *Saccharomyces cerevisiae* displayed with engineered cyclodextrin glucanotransferase. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4735-4740.
 38. J.T. Park, H.S. Park, H.K. Kang, J.S. Hong, H. Cha, E.J. Woo, J.W. Kim, M.J. Kim, W. Boos, S. Lee, K.H. Park, Oligomeric and functional properties of a debranching enzyme (TreX) from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Biocatal Biotransformation* 26 (2008) 76 - 85.
 39. K.H. Park, T.J. Kim, T.K. Cheong, J.W. Kim, B.H. Oh, B. Svensson, Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. *Biochim. Biophys. Acta* 478 (2000) 165-185.
 40. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
 41. Q.T. Le, C.K. Lee, Y.W. Kim, S.J. Lee, R. Zhang, S.G. Withers, Y.R. Kim, J.H. Auh, K.H. Park. Amylolytically-resistant tapioca starch modified by combined treatment of branching enzyme and maltogenic amylase. *Carbohydr. Polym.* 75 (2008) 9-14.
 42. S. Tapio, F. Yeh, H.A. Shuman, W. Boos, The *malZ* gene of *Escherichia coli*, a member of the maltose regulon, encodes a maltodextrin glucosidase. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19450-19458.
 43. S.G. Ball and M.K. Morell, From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54 (2003) 207-233.
 44. T.H. Richardson, X. Tan, G. Frey, W. Callen, M. Cabell, D. Lam, J. Macomber, J.M. Short, D.E. Robertson, C. Miller, A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26501-26507.
 45. H. Takata, H. Kajiura, T. Furuyashiki, R. Kakutani, T. Kuriki, Fine structural properties of natural and synthetic glycogens. *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 654-659.
 46. T. Kuriki, H. Kaneko, M. Yanase, H. Takata, J. Shimada, S. Handa, T. Takada, H. Umeyama, S. Okada, Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 17321-17329.
 47. T.J. Kim, M.J. Kim, B.C. Kim, J.C. Kim, T.K. Cheong, J.W. Kim, K.H. Park, Modes of action of acarbose hydrolysis and transglycosylation catalyzed by a thermostable maltogenic amylase, the gene for which was cloned from a *Thermus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 1644-1651.

48. Y.J. Han, J.T. Park, Q.T. Le, J.H. Shim, V.D. Nguyen, Y.R. Kim, K.H. Park, Molecular structure of sorghum and waxy sorghum starches. *Food Sci. Biotechnol.* 17 (2008) 176-179.
49. Y.W. Kim, S.S. Lee, R.A.J. Warren, S.G. Withers, Directed evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium* sp. increases its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42787-42793.
50. Shin S. I. et al. 2005. Effect of hydrothermal treatment on formation and structural characteristics of slowly digestible non-pasted granular sweet potato starch. *Starch/Stärke*, 57, 421-430.
51. Niba L. L. 2003. Processing effects on susceptibility of starch to digestion in some dietary starch sources. *Intl. J. Food Sci. Nutr.* 54, 97-109.
52. Anderson A. K. et al. 2002. Digestibility and pasting properties of rice starch heat-moisture treated at the melting temperature. *Starch/Stärke*, 54, 401-409.
53. Guraya H. S. et al. 2001. Effect of enzyme concentration and storage temperature on the formation of slowly digestible starch from cooked debranched rice starch. *Starch/Stärke*, 53, 131-139.
54. Brumovsky J. O. et al. 2001. Production of boiling-stable granular resistant starch by partial acid hydrolysis and hydrothermal treatments of high-amylose maize starch. *Cereal Chem.* 78, 680-689.
55. Wilson L.A. et al. 1978. Isolation and characterization of starch from mature soybeans. *Cereal Chem.* 55, 661-668.
56. Jayakody L. et al. 2002. The effect of lintnerization on cereal starch granules. *Food Research Intl.* 35, 665-680.
57. Englyst, H. N. et al. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition* 46, 33-50.
58. Kim J.O., Shin M.S., 2003. Effects of RS3 type resistant starch prepared from nonwaxy rice starch on the properties of *Injulmi*. *Korean J. Food Cookery Sci.* 19, 1.
59. Englyst, H. N. et al. 1983. Starch and non-starch polysaccharides in some cereal foods. *Journal of Science Food Agriculture* 34, 1434.
60. Eerlingen, R.C et al. 1994. Enzyme-resistant starch 3. The quality of straight-dough bread containing varying levels of enzyme-resistant starch. *Cereal Chem.* 71, 165.
61. Ward, K.E.J, Hosoney, R.C., and Seib, P.A., 1994. Retrogradation of amylopectin from maize and wheat starches. *Cereal Chem.* 71, 150.
62. Jung H.S., 2002. Sensory Characteristics and Rheological Change of Kongdduk (soybean rice cake) depending on cooking, and Packaging Method. *Korean J. Human Ecology* 5, 55-74.

63. Kalichevsky, M.T., Orford, P.D., and Ring, S.G., 1990. The retrogradation and gelatin of amylopectin from various botanical sources. *Carbohydrate Research* 198:49.
64. Alting, A.C., Velde, F.V.D., Kanning, M.W., Burgering, M., Mulleners, L., Sein, A, & Buwalda, P. (2009) Improved creaminess of low-fat yoghurt: The impact of amyloamylase-treated starch domains. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 980-987.
65. Ao Z. et al. 2007. Starch with a Slow Digestion Property Produced by Altering Its Chain Length, Branch Density, and Crystalline Structure. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4540–4547.
66. Van der Maarel, M. J. E. C. et al. 2005. A novel thermoreversible gelling product made by enzymatic modification of starch. *Starch/Stärke* 57, 465-472.
67. Zheng G. H. et al. 1998. Determination of water separation from cooked starch and flour pastes after refrigeration and freeze-thaw. *J. Food Sci* 63, 134-139.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.