

발간등록번호

11-1541000-000545-01

과제번호 : 108053-2

저 알러지성 쌀 단백질의 분리정제를 통한 고부가 천연 Savory Flavor의 개발

Development of savory flavor
from lower allergenic rice protein

주관연구기관 : (주)유니크

협동연구기관 : 고려대학교 산학협력단

세종대학교 산학협력단

농림수산식품자료실



0018865

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “저 알러지성 쌀 단백질의 분리정제를 통한 고부가 천연 Savory Flavor의 개발”의 보고서로 제출합니다.

2010년 6월 24일

주관연구기관명 : (주)유니크

주관연구책임자 : 윤 병 익

세부연구책임자 : 지 영 민

세부연구책임자 : 김 용 휘

연 구 원 : 오 승 식

연 구 원 : 최 은 정

연 구 원 : 봉 승 민

연 구 원 : 박 애 경

연 구 원 : 권 순 향

연 구 원 : 김 경 주

연 구 원 : 오 경 용

연 구 원 : 박 경 수

협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 세종대학교 산학협력단

요 약 문

I. 제 목

저 알러지성 쌀 단백질의 분리정제를 통한 고부가 천연 Savory Flavor의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 Allergy 및 Atopy 등의 유발물질로 알려져 있는 인공향료 MSG를 대체하기 위하여 쌀 단백질을 이용한 천연 MSG 대체 천연 Savory Flavor 생산을 목표로 한다.

천연 쌀 단백질을 이용한 천연 향료를 개발하여 국제적 향료 시장의 경쟁력을 확보를 목표로 하여 다음과 같은 3개의 연구 과제를 진행한다.

- (1) 저 알러지성 쌀 단백질의 분리 기술 개발 (Hypoallergenic Rice Protein Production): 쌀 단백질 추출율 50% 이상 / 쌀 단백질 함유율 80% 이상
- (2) 저 알러지성 쌀 단백질 HVP를 이용한 MSG 대체용 천연 향료의 개발: Glutamic Acid Index Value 20% 이상 / Savory Flavor Profile / 특허 출원
- (3) 저 알러지성 쌀 단백질 HVP를 이용한 천연 Savory Flavor Formulation: 분리 정제된 쌀 단백질의 이화학적 특성을 이용하여 쌀 단백질 HVP를 이용한 Savory Flavor의 Formulation을 개발한다.

2. 연구개발의 필요성

곡물류는 세계적으로 가장 중요한 농산물로, 전체 칼로리의 60% 이상을 차지하고 있으며, 특히 아시아 지역에서는 중요한 단백질원으로 이용되고 있다. 곡물 중 쌀은 밀과 옥수수과 함께 가장 중요한 곡물로서 전세계 곡물 소비량의 75% 이상을 차지하고 있으나 최근까지는 영양학적으로 쌀 소비에 있어 가장 중요한 문제는 “단백질 부족 (Protein Deficiency)”이었으며 특히 유아 및 여성의 영양 공급의 한계를 지니고 있어 지속적으로 쌀 소비량의 향상시키기에는 한계를 지니고 있다.

또한 국내의 식품소비의 경향에 변화에 따른 곡물 소비량의 변화하여 국내의 쌀 생산량 대비

소비량의 감소로 인하여 2005년 쌀 가격은 전년도 대비 9% 하락함에 따라 농가 소득의 감소를 초래하여, 이에 따른 쌀을 이용한 새로운 식품소재의 개발 및 고부가의 쌀 관련 제품의 개발이 절대적으로 필요하다. 쌀의 소비량의 감소와 FTA를 중심으로 한 국제 자유 무역의 확대에 따른 값싼 쌀을 비롯한 외국 농산물의 수입이 급증하여 쌀 가격의 하락 추세를 지속할 예정이지만, 국민의 식량 자급률 확보를 위한 국내 쌀 농가의 지속적인 유지 및 생산 기반의 확립은 절대적으로 필요하여, 새로운 고부가의 쌀 생산 및 쌀 가격의 하락에 따른 농가의 소득을 보존하기 위한 새로운 가공 기술 및 제품의 개발이 시급하다.

전세계의 쌀 생산량의 증가에 따른 상대적으로 단백질의 함량이 낮지만 양질의 단백질원으로 쌀 단백질에 대한 양적 및 질적 관심이 다시 집중되고 있어 새로운 식품소재로 시장에 새롭게 접근하고 있다. 콩 및 밀 단백질, 우유 단백질은 Allergy 유발물질로 알려져 있으며, 가수분해 될 경우에도 Allergy를 유발하는 물질을 포함하고 있다고 보고되어 있다. 이에 따라 미국 식약청 FDA 및 EU EFSA의 규정에는, 이러한 단백질을 식품에 사용할 경우 식품의 포장지에 표기하도록 규정하고 있다. 이에 반해 쌀은 아시아 지역을 중심으로 가장 많이 소비되는 곡물로, 상대적으로 저 알러지성 단백질 (Hypoallergenic Protein) 을 함유하고 있어, 천연 향료의 원료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 면역체계가 완전하게 구축되지 않은 유아 및 어린아이들을 위한 식품의 개발에 이용되어 아토피 (Atopic Dermatitis)를 비롯한 면역성 질환을 예방할 수 있는 식품에 이용될 수 있다.

양질의 쌀 단백질을 생산하기 위한 노력으로 국내외적으로 쌀 단백질의 생산은 쌀겨 혹은 손상된 벼를 이용하여 부분적으로 생산이 시도되었지만, 쌀겨에 함유된 지방에 의해 단백질 분리가 어려워 상업적으로 양질의 쌀 단백질 분리 생산기술이 개발되지 않아 쌀 단백질의 중요성에 비하여 공급이 극히 제한되고 있다. 이에 따라 **Supercritical Carbon Dioxide Extraction**의 기술과 같은 무독성, 환경 친화적 공정개발이 필요하게 되었다.

또한 식물성 단백질 가수 분해물은 천연 향료 생산에 중요한 한 부분으로 다양한 식품의 Processed Savory Food Product로 사용되고 있으나, 최근 시판되고 있는 MSG 대체 천연 HVP는 대부분 콩 단백질과 밀 단백질을 이용하여 제작되어 미국 등 선진국에서는 콩 단백질 및 밀 단백질에서 유래하는 알러지로 인하여 사용이 제한되어 쌀 단백질을 이용한 저 알러지성 천연 단백질원의 개발에 많은 연구를 집중하고 있다. 그러므로 쌀 단백질을 이용한 천연 Savory flavor의 개발은 한국의 농산물이 제한된 가공을 통하여 소비자에게 공급되어 부가 가치 면에서 제한되어 수익성에 한계를 지니고 있었으나, 새로운 기술을 통해 농산물의 고부가의 새로운 식품소재의 개발로 전환되어 농가의 수익의 안정성을 이룩할 계기를 줄 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 내용

본 연구는 1 차년도 중 실험실 수준의 쌀 단백질 및 천연 HVP 생산 기술의 개발 및 관능평가 기준의 설정을 시작으로, 2 차년도 Pilot Plant 수준의 Scale-up 연구를 거쳐, 저 알러지성 Savory

Flavor 시제품 생산을 목표로 추진하였다.

2. 연구개발의 범위

1) 쌀 단백질 분리 정제 공정의 개발

쌀 단백질은 전체 쌀의 7-10%를 차지하고 있으며 대부분의 쌀 단백질은 쌀의 배아에 집중되어 있고 대부분은 현미를 정백미로 도정하는 과정 중 생성 되는 쌀겨 (Rice Bran)에 집중되어 있어, **쌀 단백질의 분리 정제** 과정은 쌀 단백질의 안정성을 확보하기 위하여 전처리 공정과 쌀 단백질의 분리 정제 기술로 분리되어 개발한다. **쌀겨 속의 lipase**에 의한 지방성분의 분해에 따른 변질에 따라 쌀 단백질의 분리 정제에 어려움이 있어 전처리 공정의 개발로, 초임계 이산화탄소를 이용하여 쌀겨로부터 지방의 효율적 추출을 통해 쌀 단백질의 분리정제의 공정 기술 개발을 위하여 Defatting 공정을 개발하고, 쌀 단백질의 회수율을 높이기 위하여 Glycolytic enzyme을 이용하여 쌀 Glycoprotein의 전처리 공정을 개발 가능성을 확인한다.

2) MSG 대체를 위해 쌀을 이용한 천연 HVP 생산 기술의 개발

천연 HVP를 생산할 경우 HVP의 질에 가장 영향을 많이 미치는 요소는 아미노산의 조성 비율로 쌀 단백질 내의 Glutamic acid는 다양한 Proteinase 혹은 가수분해에 의하여 분해되어 Glutamic acid의 유리함에 따라 HVP의 질이 결정되어, 다양한 단백질 분해 효소를 이용하여 천연 HVP를 생산 기술을 개발하고, Glutamyl transferase, Glutaminase를 이용하여 Savory character에 중요한 Flavor modulation 및 Glutamic acid Index의 향상 기술을 개발한다. **천연 HVP** 생산 공정에 따른 쌀 단백질 HVP의 물리적/화학적 특성 및 기능학적 영양학적인 영향 및 특성에 관한 연구와 함께 **천연 HVP**를 생산을 위하여 고 Proteinase 미생물을 분리 동정하여, 발효를 통한 **천연 HVP**를 생산의 가능성을 확인한다.

3) 천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor의 개발

쌀 단백질은 생산 공정에 따라 크게 비수용성 쌀 단백질 (Crude Rice Protein)과 상대적으로 수용성이 높은 쌀 단백질 분해물 (Protein Hydrolysates)로 구별되어, 천연 HVP의 물리적/화학적 특성에 따른 다른 식품의 응용 및 천연 Hydrolyzed Product의 관능평가에 따른 천연 eHVP의 관능평가 기준을 설정하고 그에 따른 시제품의 개발하며, 천연 조미료 Formulation Process를 이용하여 용도에 따른 다양한 천연 소재의 조합을 통한 천연 Savory Flavor 조미료 생산 가능성을 확인한다.

IV. 연구개발결과

1. 쌀 단백질 분리 정제 공정의 개발

* **쌀 단백질 분리 정제 공정:** 국내 해남산 쌀을 사용하여 쌀 단백질 분리 정제 기술을 개발하였다. 쌀 분리 공정은 물리적 (Drum Milling)과 생물학적 방법 (Glycolytic Enzyme Pretreatment)를 통하여 수율이 향상 되었다. 쌀 단백질 분리과정 중 쌀 단백질의 품질에 가장 큰 영향을 주는 쌀 지방은 **Supercritical Carbon Dioxide**을 통하여 효과적으로 제거될 수 있어 쌀 단백질의 품질 향상에 크게 기여할 수 있다 (예, 색상 및 냄새).

2. MSG 대체를 위해 쌀을 이용한 쌀 단백질 eHVP 생산 기술의 개발

* **천연 쌀 단백질 eHVP 생산:** 천연 쌀 단백질 eHVP의 생산을 식품에 사용하기 위해서는 상업적으로 구입이 가능한 식품첨가물 grade의 Proteinase와 Glutaminase를 사용해야 하므로, 쌀 단백질 분해를 위하여 수집/구매 가능한 효소를 이용하여 천연 쌀 단백질 eHVP를 생산하였다. 천연 쌀 단백질 eHVP의 이화적 및 관능적 평가를 거쳐 기존의 상업 eHVP와 비교될 수 있는 우수한 천연 조미 소재를 개발하였다.

3. 천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor의 개발

* **천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor:** 쌀 단백질을 이용한 천연 쌀 단백질 eHVP는 저 알러지성 천연 조미소재로, 천연 쌀 단백질 eHVP의 관능 평가 기준을 설정하였으며, 다양한 식품에 응용되기 위한 개별 평가 작업이 진행되고 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 저 알러지성 쌀 단백질의 생산 공정 개발

쌀 단백질의 대량생산 기술이 개발되어, 분리 정제된 천연 쌀 단백질의 다양한 물성을 이용하여 다양한 식품군에 적용하여 고부가의 저 알러지성 식품의 개발이 가능하기 때문에 면역체계가 확립의 미비한 유아용 식품개발에 적용한다면 국제 경제력의 확보가 가능하다.

나. 저 알러지성 쌀 단백질 HVP를 이용한 MSG 대체용 천연 향료/조미료의 개발

저 알러지성 쌀 단백질을 이용한 고부가의 HVP를 생산함으로써 쌀 단백질 가수 분해물은 아미노산 중 glutamic acid의 함량이 높아, 최근 식품에 사용이 제한되고 있는 MSG (Mono Sodium Glutamate)의 대체 **고부가의 천연향료**에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 면역성 질환의 일종인 아토피 예방을 위한 식품에 첨가할 수 있어 쌀 소비량의 감소에 따른 농가 소득을 보전할 수 있는 가능성을 제공한다.

다. 저 알러지성 천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 Savory Flavor의 개발

최근 시판되고 있는 MSG 대체 천연 HVP는 대부분 콩 단백질과 밀 단백질을 이용하여 제작되나, 미국 등 선진국에서는 콩 단백질 및 밀 단백질에서 유래하는 알러지로 인하여 사용이 제한되어, 쌀겨를 이용한 저 알러지성 천연 단백질을 이용한 천연향료 및 조미료 개발은 국내외 경쟁력을 갖을 수 있다.

2. 연구성과 활용 계획

가. 국제 경쟁력을 갖을 수 있는 천연향료 및 조미료 생산기술에 활용

전세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 세계적으로나 국내의 국민소득의 증가와 천연 식품 및 향장 소재의 요구, 소비자의 고급화 추세로 인한 천연 향료가 안정성과 기호도에서 선호되는 경향으로 고부가의 천연 향료의 생산은 수입대체 효과와 더불어 국내 향장 업계의 국제화에 활용될 수 있다.

나. 천연 식품 신소재 개발을 통한 국내산 쌀의 소비 증가

국내의 식품 소비 패턴의 변화에 따른 쌀의 소비량의 감소와 FTA를 중심으로 한 국제 자유 무역의 확대에 따른 값싼 쌀을 비롯한 외국 농산물의 수입이 급증하여 쌀 가격의 하락 추세를 지속할 예정이지만, 국민의 식량 자급률 확보를 위한 국내 쌀 농가의 지속적인 유지 및 생산 기반의 확립은 절대적으로 필요하여, 새로운 고부가의 쌀 생산 및 쌀 가격의 하락에 따른 농가의 소득을 보전 방법으로 개발될 수 있다. 저 알러지성 식품개발을 위한 쌀 단백질 및 쌀겨 oil 및 쌀 전분의 생산은 다양한 의 식품 소재 생산을 위하여 사용이 가능하여 미국을 비롯한 선진국에서 개발되고 있는 고부가의 식품 개발 (예, 유아용 식품개발)에 사용될 수 있다. 국내산 쌀의 부가 가치를 추가하여 수익성이 큰 식품소재의 개발로 전환되어 농가의 수익 안정성을 이룩할 계기를 줄 수 있다.

SUMMARY

I. Subject of the Study

Development of high valued and natural savory flavor using hypoallergenic purified rice protein

II. Objectives and Importance of the Study

1. Objectives of the Study

The objectives of this study is the development of natural savory flavor using hypoallergenic rice protein to replace allergy inducible artificial MSG.

In addition, this study is carried out to improve economical competitiveness in natural flavor production. This study is divided into 3 sub-categories as follows;

- (1) **Development of Hypoallergenic Rice Protein Production Processes:** Extractable rice protein >50% / Rice protein content > 80%
- (2) **Development of Hypoallergenic Rice Protein HVP Processes for MSG Replacement:** Glutamic Acid Index Value >20% / Savory Flavor Profile / Patent Application
- (3) **Development of Natural Savory Flavor Formulation using Hypoallergenic Rice Protein HVP:** Chemical & physical analysis of rice protein for the natural savory flavor formulation using purified rice protein HVP.

2. Importance of the Study

Grains are important agricultural products providing 60% of total calories worldwide. Specially, grains are major sources of proteins in Asia. While rice, wheat and corn among grains consists over 75% of a total grain production, the consumption of rice is limited due to protein deficiency, specially for infants, young children and women.

And a total consumption of rice is continuously decreased as consumer's diet patten is change while the production of rice is continuously increased in Korea. As consequence, the price of rice was plumed down to 9% over the previous year in 2005. It is necessary to develop new technologies for the production of new food ingredients using rice and the

production of high-valued rice containing products. However, the continuous production of rice is necessary to maintain independent food supply chains despite the decreased rice consumption and the supply of cheap rice imported from foreign countries under FTA agreement.

Recently, the interests in rice has been renewed due to new application of rice as ingredients used in main food products. Rice has high quality of protein. Not just soy, wheat and milk proteins also their hydrolyzed products have been known to induce allergic reactions. Therefore FDA and EU EFSA require labeling of their proteins in the package of foods. On the other hand, rice is produced/consumed mainly in Asia, and can be used as a source of natural flavor ingredients because of its hypoallergenic protein. Rice also could be used to produce foods for patients with Atopy and other immune deficient disease. It could be also beneficial for infants and young child who do not have mature immune systems.

To produce high quality rice protein, it has been isolated from rice bran and/or damaged rice in Korea as well as other countries. However, the production of rice protein has been limited due to a lack of efficient protein extraction methods from rice bran with high oil contents resulting shortage of supplying in related to the important of rice protein. As a result, new extraction methods are being developed, such as **Supercritical Carbon Dioxide Extraction** that can be used for the development of safe and environmentally friendly extraction processes. Therefor the development of natural savory flavor will stablize the income of Korean farmers who have been hit hard from the importation of cheap agricultural products from abroad.

III. Scopes and Contents of the Study

1. Scopes of the Study

The study was carried out as follows;

- 1) **1st year:** Development of rice protein extraction & natural rice protein HVP production processes, and Setting sensory evaluation criteria for natural rice protein HVP.
- 2) **2nd year:** Development of scale-up processes for rice protein extraction & natural rice protein HVP production, and Production of natural hypoallergenic rice protein HVP's and their sensory evaluation.

2. Contents of the Study

1) Development of hypoallergenic rice protein extraction and purification processes

Rice protein consists 7-10% of its body of rice and is mostly present in rice germ. Most rice protein is co-separated with rice bran during the production of highly milled "white rice". The oxidation of rice oil by activated lipase during milling process usually cause defects in rice proteins, such as color and off-smell. Therefore, it was necessary to develop a 2-step process for the production of rice protein; 1) Pretreatment of rice bran and 2) Isolation and purification of rice protein. A defatting process, Supercritical carbon dioxide extraction, and a glycolytic enzyme digestion process was examined for the potential application in the production of rice protein.

2) Development of hypoallergenic rice protein HVP production processes for MSG replacement

When producing HVP, amino acid composition is most influential in making the HVP. Glutamic acid (glutamic acid & glutamine) in rice protein is released from rice protein by an enzymatic hydrolysis using proteinase, and produced by an enzymatic deamination reaction using glutaminase. Commercially available various enzymes were examined for the production of natural HVP's with good umami flavor profiles. In addition, the applicability of microbial fermentation using high proteinase, and glutaminase transferase and/or glutamine deaminase expressing microorganisms separated for Korean traditional soybean pastes.

3) Development of natural savory flavor formulations using hypoallergenic rice protein HVP

Rice proteins can be divided to 2 groups, soluble and insoluble Crude. Insoluble rice proteins is usually resistant to the enzymatic hydrolysis. The degrees of enzymatic hydrolysis are main contributors for the development of umami flavor profiles. To optimize umami flavor profiles of rice protein HVP, sensory evaluation criteria were established. The applicability of rice protein HVP's in various food categories was examined.

IV. Results of the study

1. Development of hypoallergenic rice protein extraction and purification processes

* **Rice protein purification process:** An efficient process for the production of rice protein using Haenam rice was developed. The productivity was greatly improved by applying a physical method such as drum milling process, and a biological method, such as glycolytic enzymic digestions as the pretreatment of rice bran. Supercritical carbon dioxide extraction method was applied for the production of high quality rice protein in terms of color and smell.

2. Development of hypoallergenic rice protein HVP production processes for MSG replacement

* **Natural rice protein eHVP production:** When producing HVP, amino acid composition was most influential in making the HVP. Glutamic acid (glutamic acid & glutamine) in rice protein was released from rice protein by an enzymatic hydrolysis using proteinase, and produced by an enzymatic deamination reaction using glutaminase. Commercially available various enzymes were examined for the production of natural HVP's with good umami flavor profiles.

3. Development of natural savory flavor formulations using hypoallergenic rice protein HVP

* **Natural savory flavor formulations using hypoallergenic rice protein HVP production:** The degrees of enzymatic hydrolysis were main contributes for the development of umami flavor profiles in rice protein HVP's. To optimize umami flavor profiles of rice protein HVP's, sensory evaluation criteria were established. The applicability of rice protein HVP's in various food categories is being examined by Unique Flavor Co. and Sejong University. It is being heavily examined by a food company that is interested in technology transfer for the production of natural flavor formulation.

V. Achievements & Applications of the Study

1. Achievements of the Study

가. Development of hypoallergenic rice protein extraction and purification

processes

When rice protein mass production is developed, various natural rice protein extracts will be applied in producing Hypoallergenic food products. These Hypoallergenic products can be used in infant/toddler food products, which will result in strong economy.

나. Development of hypoallergenic rice protein HVP production processes for MSG replacement

When using Hydrolyzed Rice protein, high value HVP can be produced. Extracts from rice protein has high Glutamic acid content which can replace MSG. Therefore rice protein HVP can be used as high quality natural savory flavor ingredient in food products that are safe for Atopic Dermatitis patients and other immune deficient disease. Also beneficial for infants or toddlers who may not have developed full immune system.

다. Development of natural savory flavor formulations using hypoallergenic rice protein HVP

Current product of MSG of other natural HVP is from soybean and wheat protein. USA and other countries have limited usage of soybean/wheat protein due to allergy inducing agent. However, the use of rice bran to develop natural HVP will provide economical competitiveness.

2. Applications of the Study

가. Application in the production globally, economically competitive natural flavor and taste enhancing ingredients

70% of world wide favoring ingredients is from organic synthesized products. Demand of natural products and progress improvements exist in world wide due to safety and preference of consumer trend. Production of high value natural savory flavor ingredient can improve competitiveness in global market.

4. Increased consumption of Korean rice by production of natural food ingredients

Reduction of domestic rice products due to fluctuation of product consumption and Free Trade Agreement of agriculture products have threaten the price of rice. On way to maintain the price of rice is to create new usage of rice products. This will ensure domestic rice consumption to stabilize profits for farmers and production of natural savory flavor ingredients. Hypoallegenic food product using rice protein, rice oil, and rice starch can be developed and exported to USA and other countries around the world for high quality food products including infant/toddler allergent safe food product. This will increase the value of rice hence stabilize profits for farmers.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the Study

Chapter 2. The State of Art in Korea and Abroad

Chapter 3. Contents & Results of the Study

Chapter 4. Accomplishments and Contributions of the Study to related
Fields

Chapter 5. Achievements and Applications of the Study

Chapter 6. Information on the Science and Technology collected from Abroad
during the Study

Chapter 7. References

Addendum) Enzyme Digestion Profiles of Rice Protein

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	16
제 1 절	연구개발의 최종목표 및 성격	16
제 2 절	연구개발의 필요성	16
제 3 절	연구개발의 범위	24
1.	쌀 단백질 분리 정제 공정의 개선	24
2.	MSG 대체를 위해 쌀을 이용한 천연 HVP 생산 기술의 개발	26
3.	천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor의 개발	26
제 2 장	국내외 기술개발 현황	28
제 1 절	연구개발 대상 기술의 국내·외 현황	28
제 2 절	본 연구 결과의 기대효과	29
1.	기술적 측면	29
2.	경제적·산업적 측면	29
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과	31
제 1 절	쌀 단백질 분리 공정의 개발	31
1.	쌀 전처리 기술 개발	31
2.	쌀 단백질 분리 정제 기술 개발	45
제 2 절	MSG 대체를 위해 쌀을 이용한 천연 HVP 생산 기술의 개발	55
1.	쌀 단백질을 이용한 HVP 생산 공정 기술의 개발	55
2.	상업적 쌀 단백질을 이용한 HVP 생산 공정 기술의 개발	68
3.	천연 쌀 단백질 eHVP의 이화학적 특성 평가	74
4.	된장 샘플에서 고효성 Proteinase 미생물 분리	87
5.	미생물을 이용한 쌀 단백질 HVP 생산 공정	95
6.	쌀 단백질 Glutamic Acid Index 향상을 위한 Glutaminase 활성 균주 선별	101
7.	쌀 단백질 Umami 특성 향상을 위한 Transglutaminase 활성 균주 선별	104
제 3 절	천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor의 개발	111
1.	쌀 단백질을 이용한 HVP의 관능검사 기준 설정 및 제품 생산 기준 설정	111
2.	쌀 단백질 eHVP의 기기분석 및 관능평가	115

3. 천연조미료 Formulation Process	120
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	121
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	126
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	128
제 7 장 참고문헌	132
첨부) 쌀 단백질의 Enzyme Digestion Profiles	

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 최종목표 및 성격

1. 연구개발의 최종목표

가. 천연 MSG 대체 천연 Savory Flavor 생산

본 연구의 목적은 Allergy 및 Atopy 등의 유발물질로 알려져 있는 인공향료 MSG를 대체하기 위하여 쌀 단백질을 이용한 **천연 MSG 대체 천연 Savory Flavor 생산을 목표로 함**. 쌀 단백질의 대량생산 기술이 개발된다면, 분리 정제된 천연 쌀 단백질의 다양한 물성을 이용하여 다양한 식품군에 적용하여 고부가의 저 알러지성 식품의 개발이 가능하기 때문에 면역체계가 확립의 미비한 유아용 식품개발에 적용한다면 국제 경쟁력의 확보가 가능함.

나. 국제적 향료 시장의 경쟁력을 확보

천연 쌀 단백질을 이용한 천연 향료를 개발하여 국제적 향료 시장의 경쟁력을 확보를 목표로 하여 다음과 같은 3개의 연구 과제를 진행함.

- (1) 저 알러지성 쌀 단백질의 분리 기술 개발 (Hypoallergenic Rice Protein Production): 쌀 단백질 추출율 50% 이상 / 쌀 단백질 함유율 80% 이상
- (2) 저 알러지성 쌀 단백질 HVP를 이용한 MSG 대체용 천연 향료의 개발: Glutamic Acid Index Value 20% 이상 / Savory Flavor Profile / 특허 출원
- (3) 저 알러지성 쌀 단백질 HVP를 이용한 천연 Savory Flavor Formulation: 분리 정제된 쌀 단백질의 이화학적 특성을 이용하여 쌀 단백질 HVP를 이용한 Savory Flavor의 Formulation을 개발함.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

가. 곡물

곡물류는 세계적으로 가장 중요한 농산물로, 전체 칼로리의 60% 이상을 차지하고 있으며, 특히 아시아 지역에서는 중요한 단백질원으로 이용되고 있음.

나. 쌀

쌀은 밀, 옥수수 등과 함께 가장 많이 생산되는 농산물로서,

- (1) 곡물 중 쌀은 밀과 옥수수와 함께 가장 중요한 곡물로서 전세계 곡물 소비량의 75% 이상을 차지하고 있음.
- (2) 전세계적으로 쌀은 연간 560,000,000 metric ton 이상 (2003년도 기준) 생산되고 있으며, 한국에서도 연간 5,000,000 metric ton 이상을 생산하고 있음.
- (3) 밀과 옥수수등과 비교하여, 쌀은 대부분 식용으로 사용되어, 잠재적으로 경제적 가치를 제공할 수 있는 양질의 쌀 단백질에 대한 연구 및 식품 개발에 대한 노력이 미진함.
- (4) 최근까지는 영양학적으로 쌀 소비에 있어 가장 중요한 문제는 “단백질 부족 (Protein Deficiency)”이었으며 특히 유아 및 여성의 영양 공급의 한계를 지니고 있어 지속적으로 쌀 소비량의 향상시키기에는 한계를 지님.

다. 쌀 소비량의 감소

국내의 식품소비의 경향에 변화에 따른 곡물 소비량의 변화하여 국내의 쌀 생산량 대비 소비량의 감소로 인하여 2005년 쌀 가격은 전년도 대비 9% 하락함에 따라 농가 소득의 감소를 초래하여, 이에 따른 쌀을 이용한 새로운 식품소재의 개발 및 고부가의 쌀 관련 제품의 개발이 절대적으로 필요함.

라. 국가 안보를 위한 지속적인 쌀농사의 유지

국내의 식품 소비 패턴의 변화에 따른 쌀의 소비량의 감소와 FTA를 중심으로 한 국제 자유 무역의 확대에 따른 값싼 쌀을 비롯한 외국 농산물의 수입이 급증하여 쌀 가격의 하락 추세를 지속할 예정이지만, 국민의 식량 자급률 확보를 위한 국내 쌀 농가의 지속적인 유지 및 생산 기반의 확립은 절대적으로 필요하여, 새로운 고부가의 쌀 생산 및 쌀 가격의 하락에 따른 농가의 소득을 보존하기 위한 새로운 가공 기술 및 제품의 개발이 시급함.

마. 쌀 단백질 (Rice Protein)

전세계의 쌀 생산량의 증가에 따른 양질의 단백질원으로 쌀 단백질에 대한 양적 및 질적 관심이 다시 집중되고 있어 새로운 식품소재로 시장에 새롭게 접근하고 있음.

- (1) **쌀 단백질의 조성:** 쌀 단백질은 다른 유단백질, 콩 단백질 및 밀단백질과 비교하여 영양학적으로 가장 좋은 단백질원으로 인식되고 있음. 특히 쌀 단백질 내 총 아미노산 함량 중 15-20% 정도의 glutamic acid (glutamic acid + glutamine)의 함량을 지니고 있어 천연 Savory flavor 생산에 적합한 단백질원으로 알려짐 (표 1).
- (2) **저 알러지성 쌀 단백질:** 콩 및 밀 단백질, 우유 단백질은 Allergy 유발물질로 알려져 있으며, 가수분해 될 경우에도 Allergy를 유발하는 물질을 포함하고 있다고 보고되어 있다. 이에 따라 미국 식약청 FDA 및 EU EFSA의 규정에는, 이러한 단백질을 식품에 사용할 경우 식품의 포장지에 표기하도록 규정하고 있다. 이에 반해 쌀은 아시아 지역을 중심으로 가장 많이 소비되는 곡물로, 상대적으로 저 알러지성 단백질 (Hypoallergenic Protein) 을 함유하고 있어, 천연 향료의 원료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 면역체계가 완전하게 구축되지 않은 유아 및 어린아이들을 위한 식품의 개발에 이용되어 아토피 (Atopic Dermatitis)를 비롯한 면역성 질환을 예방할 수 있는 식품에 이용될 수 있음 (표 2).
- (3) **새로운 식품소재로서의 쌀 단백질:** 쌀 단백질은 인간의 모유에 가장 가까운 아미노산 조성 비율을 지니고 있어 유단백질 및 콩 단백질에 알러지를 보이고 있는 영아 (Infant) 의 모유 대체유 (Infant Formula)의 생산에 가장 많이 이용될 수 있음.

바. 쌀 단백질의 생산 기술의 어려움에 따른 공급의 제한

국내외적으로 쌀 단백질의 생산은 쌀겨 혹은 손상된 벼를 이용하여 부분적으로 생산이 시도되었지만, 쌀겨에 함유된 지방에 의해 단백질 분리가 어려워 상업적으로 양질의 쌀 단백질 분리 생산기술이 개발되지 않아 쌀 단백질의 중요성에 비하여 공급이 극히 제한되었음. 현재 쌀겨는 대부분이 사료나 비료로 사용되고 있으며, 쌀겨 내에 존재하는 강한 Lipase의 작용으로 가공 및 저장 중에 쉽게 산패되기 쉬어 이용에 제한됨.

사. Supercritical Carbon Dioxide Extraction

각 물질에는 고유한 임계점이 있으며, 이 임계점 이상의 온도 및 압력 영역에 있어서는 액체와 기체의 양상태는 공존할 수 없게 되고, 물질은 초임계유체라 불리는 상태에 돌입하게 됨. 즉, 초임계유체란 "임계온도와 압력이상에서 존재하는 유

체” 로 정의되며 기존의 용매에서 나타나지 않는 독특한 특성을 나타낸다. 초임계 유체는 밀도를 이상기체에 가까운 희박상태에서부터 액체밀도에 가까운 고밀도 상태까지 연속적으로 변화시킬 수 있기 때문에, 유체의 물성을 효과적으로 조절하여 단일용매로 여러 종류의 액체용매에 상응하는 용매특성을 얻을 수 있음. 또한 이산화탄소와 같이 상온에서 기체 상태인 물질을 초임계유체로 선정함으로써 추출물질에 용매가 잔존하는 문제를 해결할 수 있으며, 특히 이산화탄소는 인체에 무해하고 환경오염에 영향이 거의 없으므로 이를 이용하면 무독성, 환경 친화적 공정 개발이 가능하다. 이러한 초임계유체의 물리적 성질은 추출용매로서 다른 용매와 비교할 수 없는 장점을 가진 것으로 사료됨 (표 3).

아. 단백질 가수 분해물 (Hydrolyzed Vegetable Protein (HVP))

단백질 가수 분해물은 천연 향료 생산에 중요한 한 부분으로 다양한 식품의 Processed Savory Food Product로 사용되고 있으며,

- (1) **천연 향료:** 단백질 가수 분해물은 아미노산 중 glutamic acid의 함량에 따라, 최근 식품에 사용이 제한되고 있는 MSG (Mono Sodium Glutamate)의 대체 **고부가의 천연향 신료**로 그 사용량이 급격하게 증가하고 있음.
- (2) **MSG 대체 천연 HVP:** 최근 시판되고 있는 MSG 대체 천연 HVP는 대부분 콩 단백질과 밀 단백질을 이용하여 제작되나, 미국 등 선진국에서는 콩 단백질 및 밀 단백질에서 유래하는 알러지로 인하여 사용이 제한되어 대체 농작물을 이용한 저 알러지성 천연 단백질원의 개발에 많은 연구를 집중하고 있음.
- (3) **쌀 단백질을 이용한 고부가의 천연 HVP:** 저 알러지성 쌀 단백질을 이용한 고부가의 HVP를 생산함으로써 면역성 질환의 일종인 아토피 예방을 위한 식품에 첨가할 수 있어 쌀 소비량의 감소에 따른 농가 소득을 보전할 수 있는 가능성을 제공함.

자. 천연 향료의 생산의 경제적 가치

전세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 세계적으로나 국내의 국민소득의 증가와 천연 식품 및 향장 소재의 요구, 소비자의 고급화 추세로 인한 천연 향료가 안정성과 기호도에서 선호되는 경향으로 고부가의 천연 향료의 생산은 수입대체 효과와 더불어 국내 향장 업계의 국제화를 기대할 수 있음.

차. 농가의 수익성 향상

최근까지 한국의 농산물은 제한된 가공을 통하여 소비자에게 공급되어 부가 가치 면에서 제한되어 수익성에 한계를 지니고 있었으나, 새로운 기술을 통해 농산물의 고부가의 새로운 식품소재의 개발로 전환되어 농가의 수익의 안정성을 이룩할 계기를 줄 수 있음.

표 1. 쌀 단백질의 아미노산 조성 비율

Amino Acid	Contents (g/100g)	Amino Acid	Contents (g/100g)
Asp	7.99	He	2.93
Thr	2.58	Leu	5.80
Ser	3.88	Tyr	3.58
Glu + Gln	15.54	Phe	4.14
Gly	3.79	Lys	2.51
Ala	4.61	His	1.84
Cys	0.64	Arg	7.09
Val	4.36	Pro	4.10
Met	1.88	Total	77.26

참고) 농업통계보고서

표 2. 주요 곡물에 존재하는 Allergens

곡물	Allergen
Soybean	Trypsin inhibitor
	Gly m Bd 68K (α -subunit of β -conglycinin)
	Gly m Bd 30K (34-kDa oil-body-associated protein)
	Gly m Bd 28K
	Gly m 1A
	Gly m 1B
	Gly m 2
	Gly m 3
Wheat	Tetrameric α -amylase inhibitor CM16
	Tetrameric α -amylase inhibitor CM17
	47-kDa protein
	36-kDa protein (Peroxidase)
	31-kDa protein
	27-kDa protein
	20-kDa protein
	17-kDa protein
Barley	Tetrameric α -amylase inhibitor CMb
	38-kDa protein (found in beer, from barley)
	16-kDa protein (found in beer, from barley)
	10-kDa protein (found in beer, from barley)
Rice	33-kDa protein (plant glyoxalase I)
	16-kDa protein
	14-kDa protein

표 3. 초임계 유체의 물리적 성질

구 분	밀도 (g/ml)	점도 (g/cm s)	확산계수 (cm ² /s)
기체	(0.6~2)x10 ⁻³	(1~3) x10 ⁻⁴	0.1~0.4
초임계 유체	0.2~0.5	(1~3) x10 ⁻⁴	0.7x10 ⁻³
액체	0.6~1.6	(0.2~3) x10 ⁻²	(0.2~2)x10 ⁻⁵

제 3 절 연구개발의 범위

본 연구는 1 차년도 중 실험실 수준의 쌀 단백질 및 천연 HVP 생산 기술의 개발 및 관능평가 기준의 설정을 시작으로, 2 차년도 Pilot Plant 수준의 Scale-up 연구를 거쳐, 저 알러지성 Savory Flavor 시제품 생산을 목표로 추진함.

1. 쌀 단백질 분리 정제 공정의 개발

- 가. **쌀 단백질**은 전체 쌀의 7-10%를 차지하고 있으며 대부분의 쌀 단백질은 쌀의 배아에 집중되어있음. 쌀 단백질의 대부분은 현미를 정백미로 도정하는 과정 중 생성 되는 쌀겨 (Rice Bran)에 집중되어 있으며, 전체 현미의 6-8%를 차지하며, 13-15%의 단백질을 함유하고 있음.
- 나. **쌀 단백질**은 Prolamins (alcohol soluble), Albumins (수용성), Globulins (Salt-soluble)와 Glutelins (diluted alkali- or acid soluble)의 4 그룹으로 나뉘어 졌으며, Prolamins와 Glutelins 그룹이 전체 단백질의 90%를 차지하고 있음.
- 다. **쌀겨 속의 lipase**에 의한 지방성분의 분해에 따른 변질에 따라 쌀 단백질의 분리 정제에 어려움이 있어 전처리 공정의 개발이 필수적임.
- 라. **Supercritical Carbon Dioxide**: 초임계 이산화탄소를 이용하여 쌀겨로부터 지방의 효율적 추출을 통해 쌀 단백질의 분리정제의 공정 기술 개발한다. 내용적 200ml의 추출조를 통하여 쌀겨로부터 지방 성분의 추출 분리공정을 최적화한 후 차후에는 2ℓ 규모의 추출조로 현장에서 대용량의 Defatting 공정을 실시한다. 추출용매로 사용되는 이산화탄소를 5번 정도 재사용할 경우 생산 비용은 1/5로 저하되어 생산 비용 감소를 통한 경제성 측면에서도 효과적이다. 이미 본 연구실에 설치되어 있는 초임계 이산화탄소를 이용한 추출장치를 사용할 경우, 미미한 정도의 설비개량으로도 본 연구에서 목적하고 있는 효율적인 Defatting 공정이 이루어질 것으로 사료됨.
- 마. **쌀 단백질의 분리 정제** 과정은 쌀 단백질의 안정성을 확보하기 위하여 전처리 공정과 쌀 단백질의 분리 정제 기술로 분리됨.
- 사. **쌀 단백질의 생산기술의 전처리 공정** (Physical / Chemical / Biological Treatments, Supercritical Gas Extraction) 및 **단백질의 분리 기술** (Alkaline Extraction, Enzyme-aided Extraction Process)로 분리됨 (표 4).

표 4. 쌀 단백질 생산 공정의 최적화

쌀 단백질 생산 공정 단계	공정 영향 인자
1. 쌀 전처리 공정	Grounding/ Milling
	Defatting Process
	- Solvent Extraction
	- Supercritical Carbon Dioxide
2. 쌀 단백질 분리 공정	생물학적 방법을 통한 단백질 분리
	- 단백질 Breaching 기술
	- Phytase/ Xylanase/ Cellulase/ Protease
	- Enzyme/ Microorganism Screening
	효소 반응 최적 조건
	- pH, 온도, 시간
3. 쌀 단백질 분리 정제 공정	단백질 Extraction
	- pH, 온도, 시간
	단백질 분리 기술
	- Drying Process

2. MSG 대체를 위해 쌀을 이용한 천연 HVP 생산 기술의 개발

가. 천연 HVP를 생산할 경우 HVP의 질에 가장 영향을 많이 미치는 요소는 아미노산의 조성 비율로 쌀 단백질 내의 Glutamic acid는 다양한 Proteinase 혹은 가수분해에 의하여 분해되어 Glutamic acid의 유리함에 따라 HVP의 질이 결정됨.

나. 천연 HVP의 식품의 적용은 HVP 생산 과정 중 일어나는 아미노산과의 환원당사이의 Maillard Reaction의 결과에 따른 Maillard Reaction Product에 의하여 소비자의 기호도에 커다란 영향을 미침.

다. 천연 HVP 생산 공정: 생산 공정에 따른 쌀 단백질 HVP의 물리적/화학적 특성 및 기능학적 영양학적인 영향 및 특성에 관한 연구 (표 5).

3. 천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor의 개발

가. 쌀 단백질을 이용한 식품의 개발: 쌀 단백질은 생산 공정에 따라 크게 비수용성 쌀 단백질 (Crude Rice Protein)과 상대적으로 수용성이 높은 쌀 단백질 분해물 (Protein Hydrolysate)로 구별됨.

나. 천연 소재 개발: 천연 HVP의 물리적/화학적 특성에 따른 다른 식품의 응용 및 천연 Hydrolyzed Product의 관능평가에 따른 시제품의 개발.

다. 천연 조미료 개발: 천연 조미료 Formulation Process: 용도에 따른 다양한 천연 소재의 조합을 통한 천연 Savory Flavor 조미료 생산.

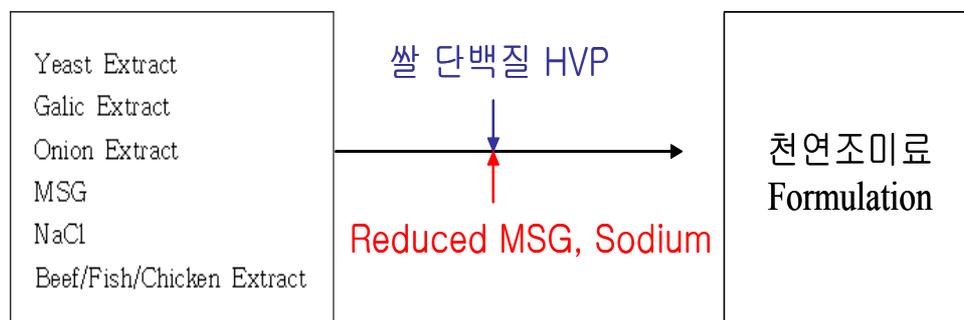


표 5. 천연 HVP 생산 공정의 최적화

천연 HVP 생산 공정 단계	공정 영향 인자
1. 쌀겨 전처리 공정	Grounding/ Milling
	Defatting Process
	- Solvent Extraction
	- Supercritical Carbon Dioxide
2. 천연 HVP 생산 공정	Proteinase를 이용한 가수 분해
	Acid/ Alkali 가수 분해
	효소 반응 최적 조건 - pH, 온도, 시간
3. 천연 HVP 분리 정제 공정	Extraction 및 분리 기술
	- pH, 온도, 시간
	- Drying Process
4. 쌀 단백질의 물리적 및 화학적 기능성의 평가	전체 질수 함량 (TN%)
	Amino acid composition (Casein/ Soy protein)
	HPLC/ GC Analysis
	GC-MS Analysis (if necessary)
5. 쌀 단백질의 관능 검사 기준 설정	Color/ Taste/ Flavor
	Sensory evaluation

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 연구개발 대상 기술의 국내·외 현황

1. 세계적 기술 개발 수준

가. 저 알러지성 식품개발: 저 알러지성 식품개발을 위한 쌀 단백질의 식품 소재 생산을 위하여 미국을 비롯한 선진국 (소비자 중심)과 중국을 비롯한 동남아시아의 쌀 생산국 (생산자 중심)을 중심으로 정제미 제작 중 부산물로 생산되는 쌀겨를 이용한 쌀 단백질 생산 기술이 개발되었으나 대부분 정제 기술의 한계로 인하여 동물 사료 첨가제로 사용되고 있음.

나. 쌀 단백질 함유 식품: 2005년도 미국 기업을 통해 효소 반응을 이용한 천연 쌀 단백질의 생산 기술의 개발에 따라 중국 쌀을 이용한 식품소재용 쌀 단백질의 생산이 시작되어 제품의 시장화가 기대됨.

다. MSG 대체 천연 조미료 소재: MSG를 대체할 수 있는 천연 HVP의 생산은 밀과 콩 단백질을 이용한 공정으로 개발되고 있으나, 밀과 콩의 알러지 유발성이 알려져 사용이 제한되고 있으며, 밀 혹은 콩 단백질 HVP를 식품에 사용할 경우 반드시 표기하여야 하는 어려움이 있음. 반면 천연 쌀 단백질을 이용한 HVP의 생산은 고 순도의 쌀 단백질의 공급 제한으로 상업적으로 활발하게 생산되지 않았으나 최근에는 전세계의 최대 향료 회사인 International Flavors and Fragrances 회사를 중심으로 연구가 진행되고 있음.

2. 국내 기술 개발 수준

가. 쌀 단백질 분리 기술: 국내 중소기업에 의해 전통적인 Alkali Extraction 및 분말 건조 공법을 이용한 동물사료용 쌀 단백질이 중국 현지 공장을 통해 생산되어 국내에 보급되고 있음. (참고: 본 과제의 추진과 함께, 기업에 대한 쌀 단백질의 유용성을 설명하여 2009년 대기업 C사가 중국의 쌀 농장을 인수 후, 쌀 단백질 생산을 위한 공정 개발과 시제품을 2010년 출시하였음.)

나. HVP 생산 기술: 국내 향료 회사의 HVP 생산은 극도로 제한되어 있어, 국내에 보급되는 HVP는 콩 혹은 밀 단백질을 중심으로 생산되어 대부분 미국을 비롯한 국제 향료회사를 통하여 수입하여 사용되고 있어, 천연 쌀 단백질 HVP 생산 기술은 전무함.

제 1 절 본 연구 결과의 기대 효과

1. 기술적 측면

- 가. 천연 쌀 단백질의 분리 정제 기술이 개발되어, 분리 정제된 천연 쌀 단백질의 다양한 물성을 이용하여 다양한 식품군에 적용할 수 있으며, 특히 고부가의 저 알러지성 식품의 개발이 가능하기 때문에 면역체계가 확립의 미비한 유아용 식품개발에 적용할 수 있음.
- 나. Supercritical Carbon Dioxide을 이용한 전처리 공정: 쌀겨 속의 lipase에 의한 지방성분의 분해에 따른 변질에 따라 쌀 단백질의 분리 정제에 어려움이 있어 Supercritical Carbon Dioxide을 이용한 전처리 공정의 응용기술의 개발이 가능함.
- 다. 전통적 및 고유의 단백질 분리정제 기술을 개발함으로써 기존의 쌀 단백질의 생산기술의 전처리 공정 (Physical / Chemical / Biological Treatments) 및 단백질의 분리 기술 (Alkaline Extraction, Enzyme-aided Extraction Process)로 차별화됨.
- 라. 천연 HVP를 생산할 경우 효소 분해 HVP의 질에 가장 영향을 많이 미치는 요소는 아미노산의 조성 비율로 쌀 단백질 내의 Glutamic acid는 다양한 Proteinase 가수 분해 및 glutamine의 Deamination 반응을 통하여 Glutamic acid의 함량을 증가 시켜 천연 쌀 단백질 HVP의 질을 향상시킴.

2. 경제적 · 산업적 측면

- 가. 천연 향료의 생산의 경제적 가치: 전세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 한국을 포함한 선진국의 국민소득의 증가에 따른 천연 식품 및 향장 소재의 요구 및 소비자의 소비 고급화 추세로 천연 향료의 상대적으로 안전성이 소비자로부터 선호되는 경향으로 고부가의 천연 향료의 생산은 수입대체 효과와 더불어 국내 향료/향장 업계의 국제화를 기대할 수 있음.
- 나. 국가 안보를 위한 지속적인 쌀농사의 유지: 경제 발전 및 선진국화를 통한 국내의 식품 소비 패턴의 변화에 따른 쌀 소비량의 감소 및 FTA를 중심으로 한 국제 자유 무역의 확대에 따른 값싼 쌀을 비롯한 외국 농산물의 수입이 급증하여 쌀 가격의 하락 추세가 지속될 상황이지만, 국가 안보 차원의 국민의 식량 자급률 확보를 위한 국내 쌀 농가의 지속적인 유지 및 생산 기반의 확립은 절대적으로 필요하여, 새로운 고부가의 쌀 생산 및 쌀 가격의 하락에 따른 농가의 소득을 보존을 위한 쌀을 이용한 새로운 고부가 식품소재의 생산 방법으로 개발될 수 있음.

다. 농가의 수익성 향상: 최근까지 한국의 농산물은 제한된 가공을 통하여 소비자에게 공급되어 부가 가치 면에서 제한되어 수익성에 한계를 지니고 있었으나, 새로운 기술을 통해 농산물의 고부가의 새로운 식품소재의 개발로 전환되어 농가의 수익의 안정성을 이룩할 계기를 줄 수 있음.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 쌀 단백질 분리 공정의 개발

- ◆ **쌀 단백질의 빠른 분리 정제를 위한 쌀 도정 공정의 개발:** 쌀 단백질은 전체 쌀의 7-10%를 차지하고 있으며 대부분의 쌀 단백질은 쌀의 배아에 집중되어 있다. 쌀 단백질의 대부분은 현미를 정백미로 도정하는 과정 중 생성 되는 쌀겨 (Rice Bran)에 집중되어 있으며, 전체 현미의 6-8%를 차지하며, 13-15%의 단백질을 함유하고 있다. 쌀 단백질은 Prolamins (alcohol soluble), Albumins (수용성), Globulins (Salt-soluble)와 Glutelins (diluted alkali- or acid soluble)의 4 그룹으로 나뉘어 졌으며, Prolamins와 Glutelins 그룹이 전체 단백질의 90%를 차지하고 있다. 이에 따라 효율적/경제적 쌀 단백질 분리 정제를 위한 쌀 도정 공정을 도입하였다.
- ◆ **쌀 단백질 분리를 위한 쌀겨의 전처리를 위한 Supercritical Carbon Dioxide Extraction 기술의 적용 가능성 연구:** 쌀겨 속의 lipase에 의한 지방성분의 분해에 따른 쌀 단백질의 품질 변질에 따라 쌀 단백질의 분리 정제에 어려움이 있어 전처리 공정의 개발이 필수적으로, 본 연구에서 목적하고 있는 효율적인 Defatting 공정이 이루어질 것으로 사료되어 초임계 이산화탄소를 이용하여 쌀겨로부터 지방의 효율적 추출을 통해 쌀 단백질의 분리정제의 공정 기술 개발의 가능성을 연구하였다.
- ◆ **쌀 단백질 분리 정제를 위한 전처리 및 쌀 단백질 분리 정제 기술의 개발:** 쌀 단백질의 분리 정제 과정은 쌀 단백질의 안정성을 확보하기 위하여 전처리 공정과 쌀 단백질의 분리 정제 기술로 분리하여 개발하였다.

1. 쌀 전처리 기술 개발

가. 벼 수집 및 구입

벼 수집 및 구입: 쌀 사용의 다양화를 통한 국내 영농 농가의 수익을 창출할 수 있는 방법으로, 쌀 단백질을 분리 정제하여 천연 조미료를 포함한 새로운 식품소재를 개발하기 위하여 국산 벼를 이용하여 쌀 단백질을 분리 정제하였다. 현재 **국내산 벼는 품질 개량 및 지역적 특성에 따라 품종이 다양하여 국내 특유의 벼가 존재하지 않아** 다양한 지방의 벼를 수집하여 그 분류학적 특성을 조사하고 이에 따른 쌀 단백질 함량을 확인하였다. 쌀 단백질을 분리하기 위한 기술개발을 위하여 1차년도에는 벼를 경기도 파주시 청정 농업단지 및 경기도 안양시 박달동 재배 벼를 구입하여 사용하였고, 2차년도에는 농협 중앙연구소의 도움으로 쌀 단백질을 충분히 분리 정제할 수 있는 양을 공급할 수 있는 **해남에서 재배된**

벼를 수매 구입하여 쌀 단백질 분리 정제 공정을 개발 하였다. 본 연구에 사용된 벼의 분류학적 특성 및 조단백질 총 함량은 표 5에 정리하였다.

나. 벼 도정기 설치

벼 도정기 설치: 쌀 단백질을 분리 정제하기 위하여 단백질을 함유하고 있는 일반 정미소의 쌀겨를 수거/수집하여 실험실에서 쌀 단백질을 분리하여 사용하기로 하였으나, 일반 정미소의 쌀겨는 왕겨와 함께 쌀 지방 및 먼지 등의 오염으로 위생적이지 않을 뿐만 아니라 단백질 함유율이 일정하지 않으며 식품소재 개발에 한계를 가지고 있다. 또한 동물 사료로 사용하기 위해 모아둔 쌀겨 및 왕겨는 관리 부족으로 인하여 쌀 지방 산패에 따른 제종 제품의 산패취문제로 인하여 사용하기가 불가능하였다. 이에 따라 지방 산패 및 품질의 최적화를 위하여 세종대학교 생물공정 연구소 내에 자체적으로 벼 도정 속도 및 분도를 조절할 수 있는 벼 도정 기계 “대동 현미/석발 정미기(대동 농기계주식회사)”를 설치하여 벼 도정에 이용하였다 (그림 1). 설치된 벼 도정기는 2중날 구조의 도정기이며 필요에 따라 대부분의 쌀 단백질을 함유하고 있는 쌀겨 층의 회수율을 결정할 수 있는 분도별 도정이 가능하며, 벼를 도정할 경우 왕겨층(껍질), 쌀겨, 및 백미로 구분하여 도정을 할 수 기능을 가지고 있다. 도정의 첫 번째 단계는 벼에서 왕겨만을 제거할 수 있도록 도정기 내의 날을 조정하여 왕겨를 제거한 후, 단백질을 함유하고 있는 쌀겨와 쌀로 구분할 수 있도록 2단계 도정 단계를 개발하였다.

다. 벼 도정 및 쌀 단백질 분리 정제를 위한 쌀 분도의 결정

벼 도정 및 쌀 단백질 분리 정제를 위한 쌀 분도의 결정: 쌀 단백질의 분리 정제를 위하여 해남에서 구입한 벼를 이용하였다. 도정기 내 설치된 2중날 구조의 벼 도정기를 이용하여 왕겨를 제거한 후, 쌀 단백질을 함유하고 있는 쌀겨층 (쌀겨 및 배아)을 회수하기 위하여 다양한 분도별로 도정하였다 (그림 2). 분도별로 분리된 왕겨 / 쌀겨 / 쌀의 회수율을 결정한 후 각 부위의 Nutritional Proxy Analysis를 실시하여, 분도별 단백질 함량을 측정하였다.

(1) 벼 도정 분도별 쌀겨 회수율

(가) 쌀 단백질을 함유하고 있는 쌀겨층의 회수

쌀 단백질을 함유하고 있는 쌀겨층의 회수: 1 단계 도정 공정을 통하여 왕겨를 제거한 벼를 수집하여 2 단계 도정 공정을 통하여 쌀 단백질을 함유하고 있는 대부분 쌀겨층과 쌀 배아를 함께 분리하여 도정하였다. 단백질을 많이 함유하고 있는 쌀 배아를 포함한 쌀겨를 얻기 위하여 도정기를 이용하여 분도별로 벼를 도정하여

표 5. 국내 생산 벼의 특성 및 단백질 함량

벼 재배지	벼 품종	쌀겨 조단백질 함량(%)
경기도 파주시	대안 품종	8.33
경기도 안양시	아끼바리 품종	7.29
전라남도 해남군	호평 품종	9.0

참고) 조단백질 분석: kjeldahl 질소 정량법 (% = 총 질소량 X 질소계수 6.25)



그림 1. 벼 도정기

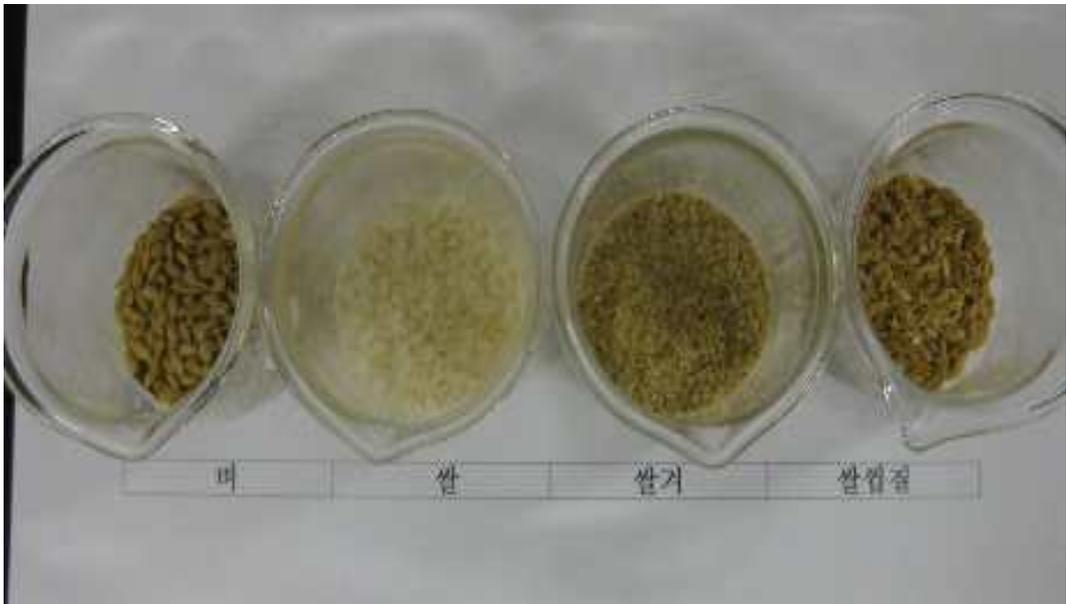


그림 2. 벼 도정 후 얻어진 왕겨, 쌀겨와 쌀

쌀겨의 회수율을 측정하였다 (표 6). 벼 도정 정도에 따라 최소 6%(w/w)부터 17%(w/w)의 쌀겨 회수율을 가지고 있으며, 회수율이 높을수록 전분층이 함께 회수되어 색도가 줄어들었다 (누린 색상에서 하얀 색상으로 변환). 쌀의 도정과정 중 도정 분도와 관계없이 대부분의 쌀 단백질은 쌀겨와 함께 분리되었다. 벼 도정 분도율이 높을수록 쌀겨 회수율이 높았다. 벼 도정 분도율이 높을수록 도정 과정 중 소량의 백미가 정미기 밖으로 분진처럼 바람에 날아가는 현상으로 약간의 손실률이 발생하였다.

(나) 분리된 왕겨 / 쌀겨 및 쌀의 성분 분석

분리된 왕겨 / 쌀겨 및 쌀의 성분 분석: 도정기를 이용하여 각 분도별로 분리된 왕겨 / 쌀겨 / 쌀의 성분 분석을 하였다. 조성성분의 분석은 일반적으로 사용되고 있는 분석 방법을 이용하였다. 분석 방법은 아래와 같다. 벼를 포함한 쌀 껍질, 쌀겨 및 백미의 조성 성분 분석 결과는 다음과 같다 (표 7). 벼를 8분도로 도정하여 얻어진 쌀겨에서 가장 높은 조단백질 함량을 포함하였다 (78% 조단백질 함량). 왕겨 껍질에 포함된 조단백질은 높은 분도수로 가공할 경우 쌀겨 및 백미의 분진에 의한 오염에 의한 것으로 추정된다.

- ① 조단백질 분석: kjeldahl 질소 정량법
(%= 총 질소량 X 질소계수 6.25)
- ② 회분 분석: 회분 분석법 (550℃, 12hr)
- ③ 조지방 분석: 회수된 Soxhlet's 추출법
- ④ 탄수화물 및 기타성분 분석:
조단백, 조지방 및 회분을 제외한 총량

(다) 2 단계 도정 공정의 개발

2 단계 도정 공정의 개발: 모든 단백질의 회수를 위하여 낮은 분도 조절을 통하여 벼 껍질을 제거하고 쌀겨를 분리하는 2 단계 벼 도정 공정을 개발하였다. 벼를 2 분도의 도정 공정을 통하여 단백질을 함유하지 않는 왕겨를 제거한 재도정하여 단백질을 함유하고 있는 쌀겨와 쌀로 분리하였다. 쌀 단백질 분리를 위하여 쌀겨층을 회수하기에는 쌀 단백질 함량이 높은 8분도에 의한 벼 정미가 가장 효과적으로 평가되어 쌀 단백질 정제를 위하여 8분도 벼 정미를 setting 하였다. 벼 도정 후, 쌀겨는 쌀겨에 포함되어 있는 Lipase의 도정에 의한 효소의 activation에 따라 쌀 지방이 쌀 지방산으로 분해되어 지방산의 산화가 촉진되어 쌀겨의 산패를 촉진하게 되어 이를 억제하기 위하여 단백질 분리 전까지 -80℃에 냉동 보관하였다.

표 6. 분도별 쌀겨 회수율

분도	벼 (Kg)	쌀 (g)	쌀 껍질 (g)	쌀겨 (g)	계 (g)	손실 (g)	쌀겨 회수율 (%)
4분도	2.0	1,405.63	363.57	134.79	1,903.99	96.01	6.7
8분도	2.0	1,336.51	388.09	217.86	1,942.46	57.54	10.9
12분도	2.0	1,255.85	388.42	326.29	1,970.56	29.44	16.3

표 7. 벼 도정 분도별 왕겨 / 쌀겨 / 쌀의 조성 분석

a) 4분도로 도정 후 얻어진 쌀겨의 조성 분석 (wet weight based)

	조단백질 %	조지방 %	회분 %	기타 (탄수화물) %
벼	32.90	2.40	3.50	61.20
쌀	43.87	1.40	1.00	53.73
쌀겨	65.80	14.20	7.00	13.00
쌀 껍질	0	0.80	8.00	91.20

b) 8분도로 도정 후 얻어진 쌀겨의 조성 분석 (wet weight based)

	조단백질 %	조지방 %	회분 %	기타 (탄수화물) %
벼	32.90	2.40	3.50	61.20
쌀	43.87	0.20	0.50	55.43
쌀겨	76.77	15.00	0.50	0.23
쌀 껍질	5.48	1.00	7.00	86.52

c) 12분도로 도정 후 얻어진 쌀겨의 조성 분석 (wet weight based)

	조단백질 %	조지방 %	회분 %	기타 (탄수화물) %
벼	32.90	2.40	3.50	61.20
쌀	32.91	0.20	0.50	66.39
쌀겨	65.80	11.60	4.50	18.10
쌀 껍질	54.84	0.80	8.00	36.36

(라) 쌀 지방의 산패 방지를 위한 쌀 지방 제거 기술 개발

쌀 지방의 산패 방지를 위한 쌀 지방 제거 기술 개발: Lipase Inactivation / Defating Process by CO₂ Supercritical Extraction: 보통 쌀 단백질을 분리하기 위하여 정미소등에서 분리 배출된 쌀겨를 구입 혹은 수집하여 쌀 단백질을 분리 회수할 경우, 쌀겨의 신선도가 떨어져 쌀겨에 있는 lipase에 의한 쌀 지방의 산패에 의한 Organoleptic evaluation의 off-flavor가 발생하는 것으로 보고되었다. 현재 세종대학교 내 생물공정실험실에 벼 도정기를 설치하여 쌀 도정 후 (혹은 지방 산패를 억제하기 위해 -80 °C에 보관 후), 바로 **쌀 지방 제거와 함께 쌀 단백질을 분리함으로써 off-flavor발생이 억제되어 쌀 단백질의 관능 평가는 양호한 것으로 평가되었다.** 하지만 경제적이며 상업적으로 이용이 가능한 쌀 단백질을 분리 정제하기 위해서는 쌀겨 내 lipase를 inactivation을 위한 공정 단계의 개발이 필요하다. 현재 상업적으로 사용되고 있는 쌀겨 전처리 방법은 >80°C 이상의 고열처리를 통한 lipase의 inactivation process가 보편적으로 적용되고 있으나, 열처리에 의한 쌀겨 내 성분 특히 단백질과 전분 (당)의 열변성에 의한 갈변화 (Browning)를 초래하여 쌀 단백질의 질을 저하 시키고 있다. 이를 극복하기 위하여 lipase의 inactivation을 대체하기 위하여 저온에서 쌀겨 내 쌀 지방을 제거함으로써 쌀 지방의 산패 방지 및 쌀 단백질의 질을 향상시키기 위하여 **CO₂ Supercritical Extraction** 방법이 적용 가능성을 확인하였다.

① Haxane 지방 추출법

Haxane 지방 추출법: 현재는 유기 용매인 Haxane을 이용하여 쌀 단백질을 쌀겨로부터 제거한다. 벼를 도정한 후 각 분류된 왕겨, 쌀겨 및 백미를 Wang Blender로 분쇄한 후, 3배의 Haxane을 첨가한 후, 60°C에서 1시간 동안 쌀 지방을 분리하였다. 분리된 쌀 지방은 분획플라스크를 이용하여 Haxane층을 분리 정제하였다 (**Upper lay of organic phase**). 쌀 지방은 Rotary Evaporator를 이용하여 Haxane을 완전히 제거한 후, 쌀 단백질을 분리 정제하였다. 정제된 쌀 지방은 산패를 방지하기 위하여 -80°C에 냉동 보관하였다. 하지만 Haxane Extraction기술이 쌀 단백질을 포함한 곡물 단백질의 분리 정제에 보편적 / 전통적 / 효율적으로 사용되고 있으나, 유기 용매로 사용된 Haxane의 독성에 의하여 (i.e., Haxane-사용 & Haxane Residue-쌀 단백질 분리 정제 후, 남아 있을 수 있는 Haxane) 새로운 기술의 개발이 필요하였다. 이를 위하여 고려대학교 효소공정연구소 내에 설치된 **CO₂ Supercritical Extraction Machine (그림 3)**을 이용하여 인체에 무해한 초임계이산화탄소를 추출용매로 사용하여 쌀 지방 제거를 시도하였다.



그림 3. Apparatus for supercritical carbon dioxide extraction

② 초임계를 이용한 쌀 지방 분리 기술 개발 (CO₂ Supercritical Extraction)

초임계를 이용한 쌀 지방 분리 기술 개발 (CO₂ Supercritical Extraction): 쌀 단백질의 분리 정제 과정의 Scale-up을 할 경우, 쌀겨 내의 lipase에 의한 쌀 지방의 산패를 방지하기 위한 방법을 개발하여야한다. 일반적으로 heat inactivation 방법이 많이 사용되고 있으나, 열처리에 의한 off-flavor 발생과 색감이 떨어져 초임계를 이용하여 쌀 지방의 저온 초임계 추출법을 개발하여 경제적 / 상업적 쌀 단백질 분리 정제 공정의 사용 가능성을 확인하였다.

㉞ **초임계이산화탄소를 이용한 쌀겨 내 지방제거:** 쌀겨에 존재하는 origenol 및 쌀 지방에서 분해된 불포화지방산은 보존 및 가공과정 중 lipase에 의한 분해나 변질에 따라 쌀 단백질의 분리 정제에 어려움 및 쌀 단백질의 품질 저하를 초래하여 경제적인 쌀 분리 공정의 개발의 어려움을 가중시키는 요인이 된다. 따라서 단백질의 분리정제 공정을 최적화하기 위해서는 쌀겨 내부에 존재하는 지방의 제거가 필수적이다. 이를 위하여 인체에 무해한 초임계이산화탄소를 추출용매로 사용하여 지방제거를 시도하였다.

㉟ **초임계이산화탄소 running 조건:** 그림 4와 같이 초임계이산화탄소 추출장치를 이용하여 벼 도정 과정 중 생산된 쌀겨를 시료로 사용하여 지방제거를 시도하였다. 시료는 4분도, 8분도, 12분도로 가공된 쌀겨이며 이 시료 각 20 g를 내용적 80 ml의 추출조에 투입 후 **35 °C에서 200기압, 250기압과 300기압**에서 30분간 방치시킨 후 초임계이산화탄소를 metering valve를 통하여 분리조로 이송시킴으로서 지방을 제거하였다. 그 후 추출조에 잔존하는 쌀겨속의 조지방을 분석함으로써 제거된 지방의 총량을 계산하였다. 한편, 4분도로 가공된 쌀겨속의 조지방 함량은 14.2 %, 8분도의 경우는 15 %, 12분도로 가공된 경우는 11.6 %이었으며, 이를 초임계이산화탄소 추출전의 쌀겨속의 총 조지방 함량으로 계산하였다 (그림 5).

㊱ **쌀 단백질 분리를 위한 초임계장치를 이용한 쌀겨 내 지방제거:** 쌀겨가 가공된 정도(4분도, 8분도 및 12분도)가 초임계이산화탄소를 이용한 조지방추출효율에 미치는 영향은 거의 관찰되지 않았다 (그림 5). 그러나 추출압력에는 영향을 받는 것으로 관찰되었다. 즉, 35°C 200기압에서 추출하였을 시는 약30%의 추출효율을 나타내었으나 동일온도 300기압에서 추출하였을 시는 약40%의 추출효율을 나타내었다. 이것으로부터 동일온도의 경우 추출효율은 추출조에 투입되는 이산화탄소의

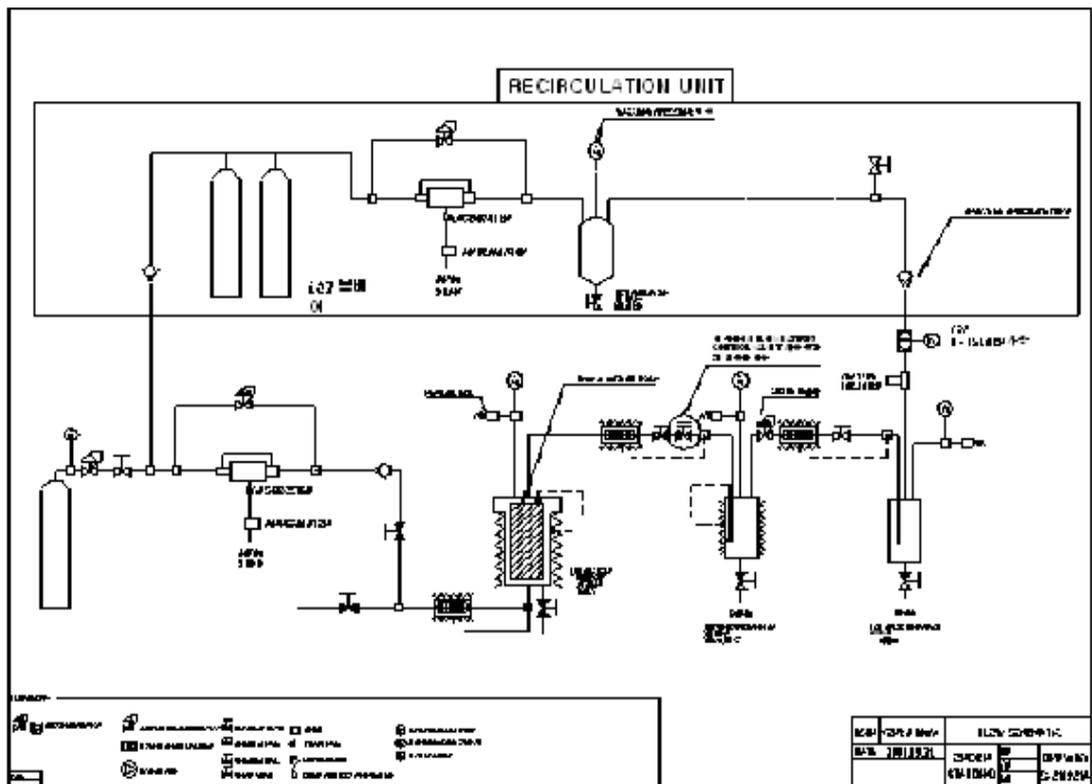


그림 4. Diagram of Supercritical CO₂(SC-CO₂) extraction apparatus

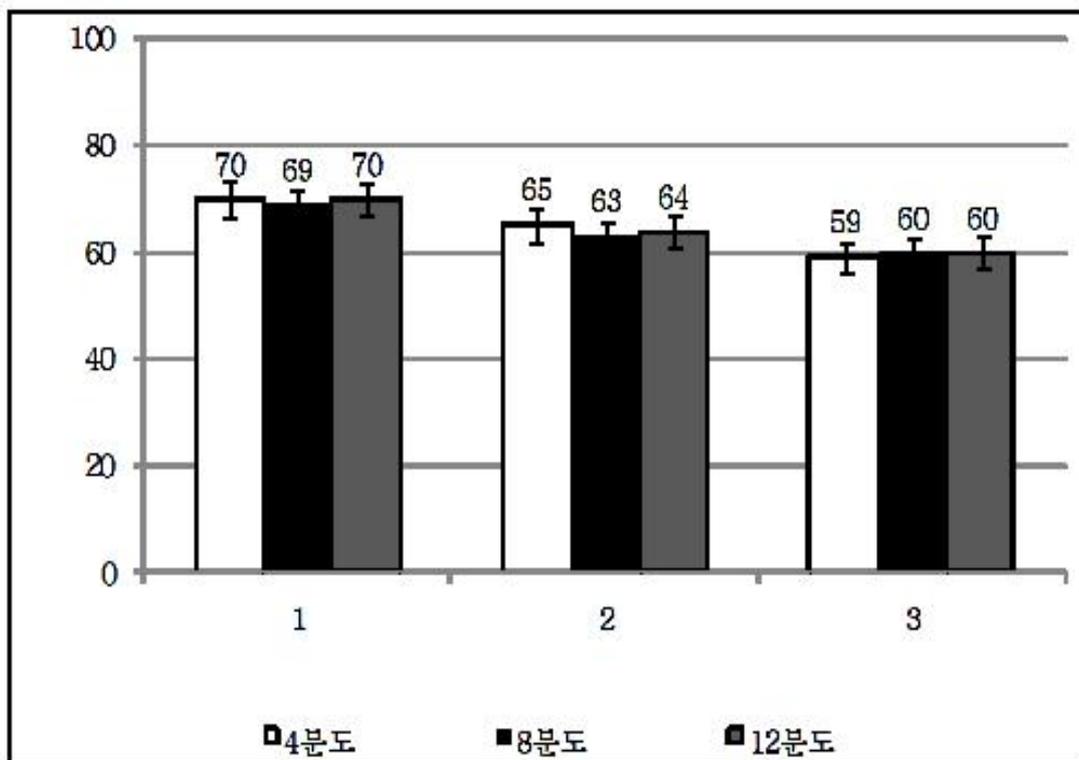


그림 5. Supercritical CO₂(SC-CO₂) extraction에 의한 조지방 제거율
 (1 : 40°C, 200기압 2 : 40°C, 250기압 3 : 40°C, 300기압)

양에 비례하는 것으로 밝혀졌다. 향후 온도를 높여 추출 할 때에는 추출효율이 향상될 것으로 사료된다.

(마) 쌀 단백질 회수율 증가를 위한 전처리 기술: 물리적 및 생물학적 방법

생물학적 방법을 이용한 쌀 단백질 회수율 증가 - 쌀 단백질 분리를 위해 당분해 효소를 이용한 쌀겨 내 Glycoprotein 분해 기술 개발: 쌀 단백질을 포함하고 있는 쌀 배아를 제외한 쌀겨 내 쌀 단백질은 구조적으로 단단한 쌀겨층을 형성하기 위하여 glycoprotein 형태로 존재하고 있어, glycolytic enzyme을 사용하여 탄수화물을 제거함으로써 쌀 단백질의 분리 회수율을 높였다. 또한 쌀 단백질의 분리정제 효율은 쌀겨에 쌀 단백질과 함께 존재하는 전분을 제거하는 기술로 정미방법의 개선 및 Drum-milling과 같은 물리적 가공 공정과 효소 및 미생물을 이용한 당분해를 통한 전처리 공정을 개발하였다. 다양한 glycolytic 효소의 반응성을 높이기 위하여 a) 쌀겨를 Drum Milling machine을 이용하여 물리적으로 Milling 처리한 후, b) Glycoprotein 분해 및 탄수화물의 분해를 위해 Phytase, Xylanase, Cellulase을 (주)바이오시스에서 구입하여 효소를 이용한 효율적인 쌀 단백질 회수공정을 개발하였다.

① Drum Milling Machine을 이용한 전처리 기술: 물리학적 방법

쌀 단백질을 포함하고 있는 쌀 배아를 제외한 쌀겨 내 쌀 단백질은 구조적으로 단단한 쌀겨층을 형성하기 위하여 glycoprotein 형태 및 cellulose 와 hemicellulose 로 구성된 쌀겨층에 존재하고 있어, 쌀 단백질의 분리정제 효율은 쌀겨에서 쌀 배유 부분의 쌀 단백질과 함께 존재하는 전분을 제거하기 위한 정미방법의 개선 및 Drum-milling과 같은 물리적 가공 공정과 cellulose 와 hemicellulose를 분해하여 쌀겨층 내 단백질의 분리를 위한 생물학적 방법이 필요하게 된다. 이를 위하여 도정기에서 분리된 쌀겨를 일반 정미공장에서 사용되고 있는 Drum Milling Machine을 이용하여 미세 분자로 분쇄하였다. 미세 분쇄된 쌀겨 입자를 이용할 경우 물에 쉽게 Dispersion되어 cellulose 와 hemicellulose를 분해할 수 있는 효소 반응율이 증가하였다.

② Glycoprotein 분해를 위한 효소처리 기술: 생물학적 방법

미세 분쇄된 쌀겨 입자를 이용하여 Glycoprotein 분해 및 탄수화물의 분해를 위해 Phytase, Xylanase, Cellulase을 (주)바이오시스에서 구입하여 효소를 이용한 효율적인 쌀 단백질 회수공정을 개발하였다.

㉞ **효소처리 조건:** Hexane으로 오일을 제거한 12분도로 도정한 쌀겨 10 g에 Viscozyme (120 FBG unit)과 Celluclast (360 NC unit)를 처리하여 acetate buffer와 함께 40°C, 150 rpm에서 5시간 교반하여 반응시켰다. 이후 60ml 증류수를 첨가하여 1시간 더 반응시킨 후, 쌀 단백질을 분리하였다. 쌀 단백질 분리를 위해, NaOH를 이용하여 pH 9.0으로 조절하였다. 원심 분리 후 상등액을 회수하여 pH 4.5로 조절한 후, 원심 분리를 통해 탄수화물과 단백질을 분리하였다. 분리된 쌀 단백질 (pH 7.0으로 조절함)은 동결 건조 방법을 이용하여 회수하였다. 각 glycoprotein의 분해효소 반응 최적 조건은 표 8에 정리하였다.

㉟ **효소처리 후 쌀 단백질의 회수율 증가:** Glycoprotein 분해 및 탄수화물의 분해를 위해 Phytase, Xylanase, Cellulase을 (주)바이오시스에서 구입하여 효소를 이용한 효율적인 쌀 단백질 회수공정 개발에 따른 쌀 단백질의 회수율은 표 9에 정리하였다. Phytase, Xylanase, Cellulase 활성을 가지고 있는 Viscozyme과 Celluclast를 구입하여 본 연구 사용하였다. Viscozyme과 Celluclast는 각종 식품 생산 시에 분해가 어려운 cellulose 및 hemicellulose등을 분해하여 점성을 낮추는 효소로 알려져 있다. 쌀겨 분해 반응은 개별 효소를 이용하여 쌀 단백질의 회수율을 증가 시킬 경우, 회수 단백질의 양에는 큰 변화가 없었지만, 두 효소를 동시에 이용하여 쌀겨를 분해할 경우 쌀 단백질의 회수율은 0.8%에서 1.2%로 증가하였다 (0.4g/10g vs. 0.6g/10g, 표 9). 하지만, 쌀 단백질 회수율을 향상시키기 위해 사용된 개별 효소 및 공동 효소의 반응 기작 반응은 정확하게 규명되지 않았다. Viscozyme과 Celluclast가 쌀겨 내 존재하고 있는 단단한 cellulose 및 hemicellulose층의 구조를 변화시켜 각기 다른 반응을 통하여 전체적인 쌀겨층의 구조를 이완시켜 (예, cleavage site differences and/or exposure of cleavage sites) 쌀 단백질이 추가적으로 회수되는 것으로 사료된다. 쌀겨의 물리적 및 화학적 방법을 통한 전처리 공정은 쌀 단백질의 전체 회수율을 향상시켜, 상대적으로 적은 단백질을 함유하고 있는 쌀의 쌀 단백질 분리 공정에 도움이 될 것으로 사료된다.

2. 쌀 단백질 분리 정제 기술 개발

가. 쌀겨 내 쌀 단백질 분리 공정 - 미강유의 분리 및 정제

분도별 단백질 분리 정제: 벼 도정기를 4, 8 그리고 12 분도로 조정하여 벼를 도정하여 왕겨, 쌀겨 및 백미에 함유되어 있는 단백질을 분리 정제하여 조단백질을 포함한 전체 쌀 단백질의 분리하였다. 벼를 도정한 후 각 분류된 왕겨, 쌀겨 및 백미에는 Wang Blender로 분

표 8. Glycoprotein의 쌀겨 분해효소 반응 조건

	시간	pH	온도
1. Control	5	3.8	40℃
2. Viscozyme (120 FBG unit)	5	3.8	40℃
3. Celluclast (360 NC unit)	5	3.8	40℃
4. Viscozyme + Celluclast	5	3.8	40℃

표 9. 쌀 단백질 회수율

	회수 단백질 (/10g)	회수율 (%)
1. 쌀겨	0.44	0.8%
2. 쌀겨에 viscozyme처리	0.45	0.9%
3. 쌀겨에 Celluclast	0.45	0.9%
4. 쌀겨에 Viscozyme + Celluclast	0.60	1.2%

참고) 회수 단백질의 조단백질 성분함량을 측정하기 위하여 kjeldahl 질소 정량법을 이용하였다.

쇄한 후, Hexane을 이용하여 60℃에서 1시간 동안 쌀 지방을 분리하였다. 분리된 쌀 지방은 분획플라스크를 이용하여 분리 정제하였다. Origenol을 포함 미강유는 최근 tocopherol을 대신하여 천연 항산화 물질로 평가되어 분리 정제한 후, 냉동고에 보관하였다. 미강유의 식품 내 사용용도는 추가적인 연구가 필요하다.

각 분도별로 도정된 쌀겨를 hexane을 이용하여 미강유를 추출한 후 분획플라스크를 이용하여 미강유를 제거하였다. 쌀 단백질을 함유하고 있는 hexane불용성 물질을 회수하여, drying process를 통하여 침전물 내 Hexane을 제거한 후, 건조된 침전물은 1 M NaOH를 이용하여 pH 9.0로 조절하였다. 쌀 단백질을 함유하고 있는 상등액을 고속 원심분리기를 이용하여 회수하여 pH 4.5로 조절한 후, 원심 분리를 통해 탄수화물과 단백질을 분리하였다. Alkaline solution에서 분리된 쌀 단백질은 낮은 pH에서 분리되어 denaturation 및 aggregation 반응을 통하여 침전물로 분리되었다. 분리된 pH 7.0로 조절된 쌀 단백질은 동결 건조 방법을 이용하여 회수하였다. 동결 건조 방법은 경제적인 이유로 상업적으로 사용할 수 없으나, 상업적으로 사용되고 있는 Spray-drying process제품보다도 열에 의한 변성이 적어 맑은 색상을 가지고 있다.

나. 쌀 단백질의 조단백질 함량 분석 및 분리 회수율

(1) **분도별 쌀겨의 조단백질 함량:** 동결건조로 실험실에서 분리한 분도별 쌀 단백질의 쌀겨 내 쌀 단백질의 분리 회수율 및 회수된 쌀 단백질의 조단백질 함량을 아래와 같이 계산하였다.

- ① **조단백질 분석:** kjeldahl 질소 정량법 (%= 총 질소량 X 질소계수 6.25)
- ② **회분 분석:** 회분 분석법 (550 °C, 12 hr)
- ③ **조지방 분석:** 회수된 Soxhlet's 추출법
- ④ **탄수화물 및 기타성분 분석:** 조단백, 조지방 및 회분을 제외한 총량

(2) **분도별 쌀겨의 조단백질 회수율:** 분도별 쌀 단백질 분리 회수량 및 회수율은 표 10에 정리하였다. 쌀 단백질의 분리 회수율은 쌀의 도정 정도가 올라 갈수록 쌀겨의 총 조단백질 함량이 증가하여, 상대적으로 쌀 단백질 분리 회수에 효과적 이었다 (**4분도; 18.6g vs. 12분도; 45.1g의 조단백질 함량**). 12분도 도정된 쌀겨를 이용할 경우 2.0Kg의 벼에서 총 326의 쌀겨가 회수되어 총 45g (Dw) 의 조단백질이 회수되었다. 쌀 단백질의 천연 HVP생산은 12분도로 도정된 쌀겨를 이용하여 쌀 단백질을 분리하였다.

다. 쌀 단백질의 분리 정제

쌀 단백질 회수/분리 정제하기 위해 쌀 단백질은 쌀겨에서 탄수화물을 제거한 후 분리 정제되어 본 실험에서는 Spray Dry 대신에 동결 건조 방법을 이용하여 회수하였다. 쌀겨에서

분리 정제된 쌀 단백질의 분도별 회수율을 표 10에 정리하였다. 분리 정제된 쌀 단백질은 추후 분석 혹은 천연 HVP 생산을 위한 공정에 사용되기 전까지 물성의 변화 및 화학 성분의 변화를 최소화하기 위하여 -80℃ 냉동고에 보관하였다.

라. 상업적 쌀 단백질의 분리 정제 공정의 개발

(1) 상업적 쌀 단백질 분리 정제 공정 개발

쌀 단백질의 대량 생산을 위하여 대단위 쌀 단백질의 분리 정제는 12분도로 동정된 쌀겨를 이용하여 개발된 쌀 단백질 분리 공정을 통해 생산되었다. 본 연구의 차별화된 쌀 단백질 분리 정제 기술은 그림 6에 도식화 하였다. 동결 건조된 12분도로 도정된 벼의 쌀 단백질의 일반 성분은 최근 생산되는 국내 C사의 쌀 단백질의 일반성분을 비교 분석하였다 (표 11). 전체적으로 실험실에서 분리 정제된 쌀 단백질과 시중에서 판매되고 있는 쌀 단백질의 함량의 차이는 크지 않으나, 분리 정제 방법의 차이에 의한 색상의 차이가 있었다. C사의 쌀 단백질은 상대적으로 색상이 진했으며 쌀 지방의 산패에 의한 낮은 농도의 산패취를 가지고 있다. 또한 실험실에서 분리 정제된 쌀 단백질은 C사의 쌀 단백질과 비교하여 측정 가능한 탄수화물을 함유하지 않고 있었다. 이는 쌀겨의 물리적 및 생물학적 전처리 공정을 통하여 회수된 쌀겨 내 쌀 전분이 완전히 제거되는 것으로 추정된다. 쌀 도정비율이 높을수록 분리 회수된 쌀 단백질의 색상은 더욱 밝았으며 냄새도 적었다. 낮은 분도의 쌀 단백질의 색상 증가 (Darkness)는 쌀겨 내 존재하는 polyphenol류의 함량이 상대적으로 쌀 단백질의 분리 과정 중 산화 및 pH에 의하여 진한 색으로 변화함에 기인하는 것으로 사료된다.

(2) 상업적 쌀 단백질의 색도 비교 분석

벼의 품종 및 지역적 차이와 쌀 단백질의 분리 정제 방법에 따른 쌀 단백질의 색상 차이를 비교하기 위하여, Color difference meter(CR-300, Minolta Co. Ltd., Japan)를 사용하여 쌀 단백질의 색도를 측정하였다 (표 12). 이때 시료의 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 3회 반복하여 측정하여 평균값을 나타내었으며, 총 색차(ΔE , overall color difference)는 다음 식을 이용하여 산출하였고, 표준판(standard plate)은 L=98.07, a=-0.18, b=1.57의 값을 가진 백색판을 사용하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

벼의 품종 및 지역적 차이에 따른 쌀 단백질의 색도를 비교했을 때는 과주산 쌀 단백질

표 10. 쌀 단백질 회수율

분도	벼 (Kg)	총 조단백질 (Kg)	쌀겨 (g)	총 조단백질(g) ¹	회수 조단백질(g) ²
4분도	2.0	0.8774	134.79	88.69	18.62
8분도	2.0	0.8774	217.86	167.25	35.12
12분도	2.0	0.6582	326.29	214.70	45.09

1 : Wet weight

2 : Dry weight following freeze dry(Bradford Method)

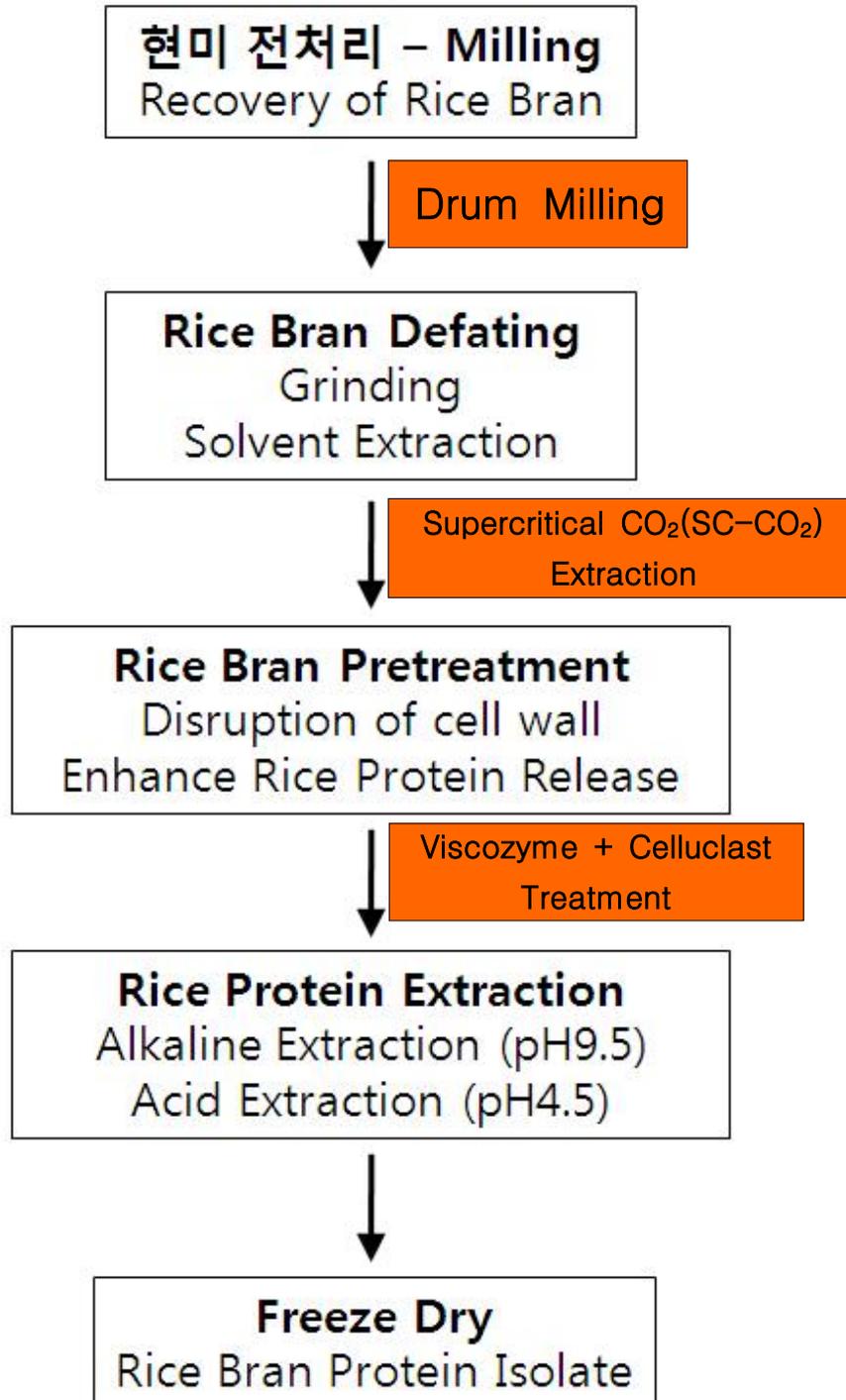


그림 6. 쌀겨의 쌀 단백질 분리 정제 공정도

표 11. 쌀 단백질의 일반성분 분석 (%)

	수분	조단백질	조지방	탄수화물	회분
Sejong	5.27	76.5	8.8	0.0*	14.0
C사	4.17	76.5	4.7	8.43	6.2

* 측정 가능한 탄수화물의 함량이 없음

표 12. 쌀 단백질의 색도 측정

	박달재	파주산	해남산	해남산(효소)	C사
L(명도)	75.4	40.2	92.3	73.9	73.3
a(red)	1.23	8.0	2.2	1.8	2.5
b(yellow)	17.5	9.6	5.1	22.2	22.2
Color difference	27.7	58.9	7.0	31.8	32.3

¹⁾ L: degree of lightness (white +100 ~ 0 black), a: degree of redness (red +100 ~ -80 green),
b: degree of yellowness (yellow +70 ~ -80 blue)

²⁾ Color difference(ΔE) = $\sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$

이 가장 어둡고 a(red) 값이 높게 나타났으며, 해남산이 가장 밝고 흰색이 가까웠다. 그러나 효소 처리하여 해남산 쌀 단백질을 분리 정제했을 경우에는 명도가 조금 낮아지고 b(yellow) 값이 증가하였다. 이는 상업적으로 판매되고 있는 C사의 쌀 단백질 색도 값과 유사하였다. 따라서 식품소재로 사용하기에는 효소처리하지 않은 해남산 쌀 단백질이 밝고 흰색에 가까워 더 도움이 될 것으로 사료된다.

(3) 상업적 쌀 단백질 분리 정제 공정의 경제성 평가

최근 시중에 판매되기 시작하는 C사의 쌀 단백질과 실험실에서 분리 정제된 쌀 단백질의 성분 상 차이가 적어 상업적인 쌀 단백질의 분리 정제 과정은 경제적 비용 절감을 위하여 Supercritical CO₂ extraction을 이용한 defatting process와 Viscozyme과 Celluclast를 이용하여 쌀겨 내 존재하고 있는 단단한 cellulose 및 hemicellulose층의 구조를 변화시켜 쌀 단백질의 회수율을 증가 시킬 수 있는 전처리 공정을 생략될 수 있을 것으로 사료된다. 시중에 유통되고 있는 C사 및 중국산 쌀 단백질과 비교하여 상대적으로 경제적 및 기술적으로 어려운 Supercritical CO₂ extraction을 이용한 defatting process와 Viscozyme과 Celluclast를 이용하는 전처리 공정을 통한 쌀 단백질의 경제성은 현재 공정의 자세한 내용을 알 수 없어 경제성 평가는 불가능 하였다. 본 연구로 개발된 상업적 쌀 단백질 분리 정제 공정의 경제성 평가는 추가 연구가 필요하다.

제 2 절 MSG 대체를 위해 쌀을 이용한 천연 HVP 생산 기술의 개발

- ◆ 천연 HVP를 생산할 경우 HVP의 질에 가장 영향을 많이 미치는 요소는 아미노산의 조성 비율로 쌀 단백질 내의 Glutamic acid는 다양한 Proteinase 혹은 미생물을 이용한 가수분해에 의하여 분해된 Glutamic acid의 유리함에 따라 HVP의 질이 결정된다.
- ◆ 또한 HVP의 식품의 적용은 HVP 생산 과정 중 일어나는 아미노산과의 환원당사이의 Maillard Reaction의 결과에 따른 Maillard Reaction Product에 의하여 소비자의 기호도에 커다란 영향을 미친다.
- ◆ 생산 공정에 따른 쌀 단백질 HVP의 물리적/화학적 특성 및 기능학적 영양학적인 영향 및 특성에 관한 연구를 하였다.

1. 쌀 단백질을 이용한 HVP 생산 공정 기술의 개발

쌀 단백질을 이용하여 천연조미료 소재를 개발하기 위해서는 단백질 효소 및 미생물을 이용하여 쌀 단백질을 분해하여 glutamic acid를 포함한 amino acid를 생산하여야 한다. 효소 및 미생물을 이용한 단백질의 분해는 사용되는 단백질의 분해 효소의 활성에 따라 amino acid의 생산성이 결정되며, 일부 단백질은 완전 분해되지 않고 amino acid의 생산과 더불어 small peptide를 만들게 된다. 대두 단백질의 효소 가수분해물의 small peptide는 Bitter peptide로 불리며 천연 조미료 품질에 나쁜 영향을 미치게 된다. 쌀 단백질의 완전한 분해를 위하여 다양한 단백질 분해 효소의 선택 및 조합과 반응 조건의 결정은 많은 실험을 요구하기 때문에 이 실험은 본 과제의 빠른 결과의 도출을 위하여 쌀 단백질 분리 정제 기술 개발과 동시에 진행하기 위하여 국내산 쌀과 유사한 조성 성분을 가지고 있는 상업용 쌀 단백질 (80%단백질 함유)을 이용하여 함께 진행하였다.

가. 쌀 단백질의 일반 성분 비교 분석

쌀 단백질을 이용한 천연 HVP를 생산할 경우 HVP의 질에 가장 영향을 많이 미치는 요소는 쌀 단백질의 함량과 아미노산의 조성 비율로 쌀 단백질 내의 Glutamic acid는 다양한 Proteinase 혹은 미생물의 가수분해에 의하여 분해되어 Glutamic acid의 유리함에 따라 HVP의 질이 결정된다. 이에 따라 실험실에서 분리 정제된 쌀 단백질과 현재 HVP 생산에 사용되고 있는 식물성 단백질의 TN값 (%)과 조단백질 함량을 비교 분석하였다 (표 13). 실험실에서 분리 정제된 쌀 단백질의 TN값 및 조단백질의 함량은 시중에 유통되고 있는 쌀 단백질과 동일한 것으로 평가되었으며, 콩, 밀과 옥수수 단백질과 비교하여 상대적으로 높았다. 이는 쌀 단백질이 상대적으로 높은 가격에 비하여 HVP 생산을 위하여 많은 조 단 단백질을 함유하고 있어 HVP 생산에 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 사료된다.

표 13. 식물성 단백질의 조 단백질 성분 비교

시료	적정에 사용된 HCl양 (ml)	TN값 (%)	총 조단백질량 (%)
Blank	0.1	-	-
Rice Protein (Sejong)	0.65	12.8681	76.5651
Rice Protein (C사)	0.65	12.8681	76.5651
Rice Protein (중국산)	0.65	12.8681	76.5651
Soy Protein (Europe)	0.45	8.1888	46.7580
Wheat Gluten (Europe)	0.6	11.6983	68.2010
Corn Gluten (USA)	0.55	10.5285	65.8031

나. Acid hydrolysis를 이용한 aHVP 생산

천연 HVP를 생산할 경우 HVP의 질에 가장 영향을 많이 미치는 요소는 아미노산의 조성 비율로 쌀 단백질 내의 Glutamic acid는 다양한 Proteinase 혹은 미생물을 이용한 가수분해에 의하여 분해된 Glutamic acid의 유리함에 따라 HVP의 질이 결정된다. HVP 내의 총 glutamic acid의 함량은 쌀 단백질의 glutamic acid와 HVP 생산과정 중 deamination 반응에 glutamic acid를 생성할 수 있는 glutamine의 함량에 의하여 결정된다. 이를 위하여 쌀겨에서 분리 정제된 쌀 단백질을 천연 조미료 생산에 사용하기 위해서는 Acid Hydrolysis를 이용하여 쌀 단백질을 분해하여 쌀 단백질의 총 아미노산의 성분 및 조성 분석이 우선되어야 한다. 쌀 단백질의 분해 반응은 온도 조절이 가능한 생화학 반응기 (그림 9)를 이용하여 다음과 같은 공정으로 쌀 단백질을 가수분해 하였다 (그림 10).

(1) Acid Hydrolysis 공정

쌀 단백질의 acid hydrolysis는 쌀 단백질을 완전 분해하기 위하여 HCl (4N)에 녹여 95°C에서 72시간 반응하였다. 쌀 단백질 hydrolysate(분해물)는 NaOH를 이용하여 중화한 후 원심 분리를 통하여 산분해가 되지 않은 고형분을 제거하였다. 원심 분리 후 상등액은 Celite Bed Filtration을 통하여 미량의 고형성분을 제거한 후 Spray Dryer동결 건조를 통하여 고형화 하였다.

(2) aHVP 제조 공정을 통한 쌀 단백질 분해도 측정

산 분해를 위하여 첨가한 염산의 양과 중화를 위해 첨가하는 수산화나트륨은 일반적으로 산분해 간장 등의 HVP제조시 이용되는 공식에 의하여 다음과 같이 계산되었다.

(가) 순염산 필요량

$$\text{순염산 필요량} = (\text{넣는 쌀 단백질 양} \times \text{쌀 단백질의 TN값} \times \text{염산의 분자량} \times \text{Mole ratio}) / \text{단백질량}$$

넣는 쌀 단백질 양 : 400g

Total nitrogen(TN) value of rice protein : 12.00 %

HCl M.W. : 36.5

Mole ratio : 1.05

단백질량 : 14

순염산 필요량 : 131.40 g



그림 9. Acid Hydrolysis 화학 반응기

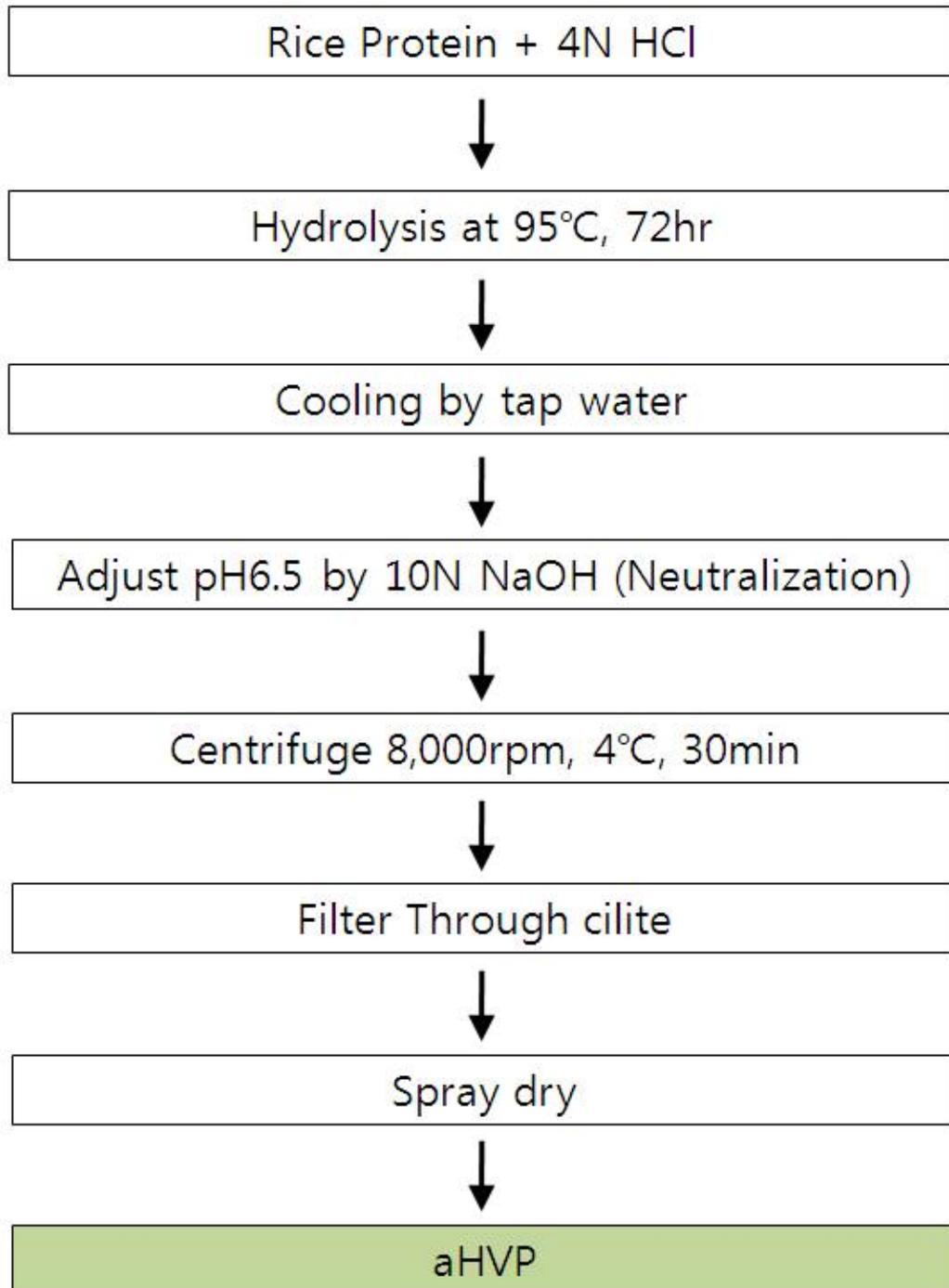


그림 10. Rice protein을 이용한 aHVP 생산 공정도

(나) 염산원액 투입량

$$\text{염산원액 투입량} = \text{순염산 필요량} / \text{원액염산의 농도}$$

원액염산의 농도 : 35% (w/w)

염산원액 투입량 : 375.43 g

(다) 희석염산 투입량

$$\text{희석염산 투입량} = (\text{순염산 필요량}/35\% \text{ 염산 비중}) / \text{희석 염산 농도}$$

Specific gravity of 35% HCl : 1.18

희석 염산의 농도 : 12 % (= 4N)

희석 염산 투입량 : 927.97 ml

(라) 염산 희석 시 물 투입량

$$\text{염산 희석 시 물 투입량} = \text{희석 염산 투입량} - \text{원액 염산 투입량}$$

Specific gravity of 12% HCl : 1.05

희석염산투입량 : 927.97 ml x 1.05

염산 희석시 물 투입량 : 598.94 g

(마) 중화 시 NaOH 투입량

$$\text{중화 시 NaOH 투입량} = (\text{순염산 필요량}/\text{염산의 분자량}) \times \text{수산화나트륨의 분자량}$$



(36.5) (40)

중화 시 NaOH 투입량 : 144 g

(3) 쌀 aHVP 회수 및 보관

위와 같은 방법으로 제조된 aHVP는 spray dryer/동결건조기를 이용하여 건조하여 분석 전까지 4℃에 보관 하였으며, 이화학적 특성 분석 및 관능적 특성을 조사하였다. 쌀 단백질 aHVP생산을 위한 acid hydrolysis에는 조 단백질의 함량과 아미노산의 함량이 비슷한 실험실에서 분리한 쌀 단백질과 C사에서 개발 쌀 단백질이 사용되었다. 총

아미노산의 함량은 HPLC Acid hydrolysis를 통해 생산된 aHVP의 총 아미노산 함량을 기준으로 (100%) 효소 및 미생물 분해 HVP의 아미노산 함량을 계산하여 분해도 측정에 이용되었다. 쌀 단백질 aHVP의 총 아미노산의 함량과 조성 비율은 표 14에 정리하였다.

다. 효소를 이용한 eHVP 생산 공정 개발

Proteinase를 이용한 eHVP 생산 공정 개발: 쌀 단백질을 이용한 천연 HVP를 생산하여 천연 조미료를 생산하기 위해서는 쌀 단백질을 가수분해하여 특히 amino acid, 특히 glutamic acid를 생성할 수 있는 proteinase의 확보가 중요하다. 현재 천연 조미료 생산에 사용할 수 있는 proteinase는 식품첨가물 공정내의 개별 허용품목으로 허가된 제품만을 사용할 수 있어 현재 구입이 가능한 proteinase를 수집/구입하여 그 특성을 연구하고 쌀 단백질의 eHVP hydrolysate 생산 반응에 사용하였다.

(1) 쌀 단백질 eHVP 생산에 이용할 Proteinase Screening - Small Scale

현재 천연 eHVP는 상업적으로 구매가 가능한 다양한 proteinase (Endo)와 peptidase (Exo)를 이용하여 생산되고 있다. 단백질 분해 중, Exo-activity를 지니고 있는 proteinase는 단백질을 분해하여 작은 peptide를 생성하게 되며 간혹 bitter peptide를 형성하는 경향이 있다. 반면, Endo-activity를 가지고 있는 peptidase는 작은 peptide의 C-terminal을 시작으로 단백질의 구성 amino acid를 유리하게 된다. MSG를 대체하기 위한 천연 HVP가 우수한 umami 특성을 지니기 위해서는 proteinase에 의한 단백질의 분해율의 최적화와 proteinase에 의해 분해된 작은 peptide의 완전 분해가 필요하다. 쌀 단백질 eHVP생산을 위한 proteinase screening에는 조 단백질의 함량과 아미노산의 함량이 비슷한 실험실에서 분리한 쌀 단백질과 C사에서 개발 쌀 단백질이 사용되었다.

(가) 쌀 단백질 eHVP 생산을 위한 Proteinase 반응 특성

실험실에서 분리한 쌀 단백질과 C사에서 개발 쌀 단백질을 이용하여 Amano Enzyme Inc.에서 판매하는 6종의 proteinase와 Novozyme Inc.에서 판매하는 3종의 proteinase를 구입 혹은 수집하여 사용하였다. 다양한 endo-activity를 가지고 있는 proteinase와 endo/exo-activity의 complex-type proteinase를 이용하여 쌀 단백질의 분해도를 측정하였고, eHVP 생산을 위하여 상대적으로 쌀 단백질 분해도가 높은 2종류의 proteinase를 혼합하여 eHVP 생산 기작을 연구하였다. 쌀 단백질의 분해도는 aHVP의 총 아미노산과 비교하여 측정하였다. 각 proteinase의 최적 반응 온도 및 pH를 포함한 개별 proteinase의 특성은 표 15에 정리하였다.

표 14. Amino Acid Contents of Rice Protein aHVP

아미노산함량	pg/ul	조성 비율
Asp	51408.91	7.16%
Asn+Ser	49454.46	6.88%
Glu	80709.14	11.23%
Gly	38584.95	5.37%
Gln+His	25064.96	3.49%
Arg	83198.51	11.58%
Thr	31362.86	4.37%
Ala	38049.31	5.30%
Pro	43371.99	6.04%
Cys	11576.60	1.61%
Tyr	30547.88	4.25%
Val	34579.14	4.81%
Met	14149.03	1.97%
Lys	57217.94	7.96%
Ile	26123.60	3.64%
Leu	59262.48	8.25%
Phe	41259.75	5.74%
Trp	2481.01	0.35%
total a.a weight (pg/ul)	718402.54	100%
total a.a weight (g/L)	0.72	

아미노산함량	pg/ul	조성 비율
Asp	54540.984	6.36%
Asn+Ser	54768.254	6.39%
Glu	81744.584	9.54%
Gly	49464.904	5.77%
Gln+His	34438.96	4.02%
Arg	99512.788	11.61%
Thr	42896.214	5.01%
Ala	47805.957	5.58%
Pro	51069.389	5.96%
Cys	10447.282	1.22%
Tyr	37708.477	4.40%
Val	45117.008	5.27%
Met	21085.868	2.46%
Lys	62585.431	7.30%
Ile	32890.999	3.84%
Leu	73011.494	8.52%
Phe	55201.511	6.44%
Trp	2623.6992	0.31%
total a.a weight (pg/ul)	856913.80	100%
total a.a weight (g/L)	0.86	

a) 실험실 쌀 단백질

b) C사 쌀 단백질

표 15. Characters of Commercial Proteinase

	Enzyme	opt. pH	opt. Temp.	50℃ relative activity	Type	Activity	1g의 enz.이 1분 당 a.a 몇 mmol을 분해하는가
Novozyme	Flavourzyme	6	50℃	100%	endo/exo	500LAPU/g	=0.5mmol/min*g ⇒ 0.08g
	Neutrase	6	45	80%	endo	0.8AU/g	=0.8mmol/min*g ⇒ 0.05g
	Protamex	5.5~7.5	35~60℃		endo	1.5AU/g	=1.5mmol/min*g ⇒ 0.03g
Amano	Protease A	7	50℃	100%	endo/exo	20000units/g	=1.4mmol/min*g ⇒ 0.03g
	Protease M	4.5	50℃	150%	endo/exo	5500units/g	=0.6mmol/min*g ⇒ 0.07g
	Protease N	7	55℃	90%	endo	150000units/g	=0.2mmol/min*g ⇒ 0.2g
	Protease P	8	45℃	60%	endo/exo	60000units/g	=0.1mmol/min*g ⇒ 0.4g
	Protease S	8	70℃	40%	endo	10000units/g	=0.05mmol/min*g ⇒ 0.8g

Novozyme : Flavourzyme, Neutrase, Protamex

Amano : Protease A, Protease M, Protease N, Protease P, Protease S

(나) 쌀 단백질 eHVP생산을 위한 Proteinase의 반응 조건

쌀 단백질 eHVP 생산 공정은 다양한 식물성 단백질 eHVP생산을 위해 세종대학교 생물공정 연구실에서 개발되고 있는 효소 분해 공정을 기반으로 하여 쌀 단백질의 물성에 따라 변형하여 개발되었다 (그림 11).

① Single Enzyme Digestion

쌀 단백질은 조 단백질 함량과 아미노산 조성 비율이 비슷한 C사와 세종대학교에서 쌀 단백질 분리 공정을 통해 분리한 쌀 단백질을 사용하였다. Proteinase는 Novozyme의 Flavourzyme, Neutrase, Protamex와 Amano의 Protease A, Protease M, Protease N, Protease P, Protease S를 사용하였다. Enzyme을 하나만 넣어 분해하는 실험을 진행하였다 (표 16). 쌀 단백질의 분해는 10 ml vial(단)에 증류수 3.5 ml과 쌀 단백질 0.5 g를 넣고 90℃에서 2시간동안 증자하여 살균한 후 상온으로 방냉하였다. 여기에 각각의 proteinase를 시료량의 2% 넣어 50℃, 110 rpm, 72시간동안 분해하면서 0, 24, 48, 72시간 마다 sample을 채취하였다. 이때 각각의 proteinase는 개별 proteinase의 activity가 다르기 때문에 Flavourzyme을 기준으로 proteinase activity unit을 계산하여 같은 양의 unit을 넣어주었다 (표 17 참조). Proteinase의 분해 반응이 끝나면 30분 동안 85℃에서 효소를 불활성화 시켜 실온으로 방랭한 후 4℃, 8000rpm, 30분 동안 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 celite bed filtration (0.1%(W/V))을 이용하여 분해되지 않은 고형성분을 제거한 후, HPLC 분석용 sample은 vial에 덜어서 4℃에서 보관하고 나머지는 이화학적 분석을 위하여 -20℃에 냉동 보관 하였다.

② Combination of Enzymes for Digestion

쌀 단백질을 분해하기 위하여 endo-type과 endo/exo complex type을 짝 지어서 2종류의 proteinase를 첨가하여 분해하는 실험을 진행하였다 (표 15). 쌀 단백질 분해능이 낮은 Protease M, Protease S는 제외 하였다. 쌀 단백질 분해는 10 ml vial(단)에 증류수 3.5 ml과 Rice protein 0.5 g를 넣고 90℃에서 2시간동안 증자하여 살균한 후 상온으로 방냉하였다. 여기에 proteinase를 시료량의 2% 넣어 50℃, 110 rpm, 72시간동안 분해하면서 0, 24, 48, 72시간 마다 sample을 채취하였다. 이때 각각의 proteinase는 activity가 다르기 때문에 Flavourzyme을 기준으로 unit을 계산하여 같은 양의 unit을 넣어주었다 (표 17 참조). Proteinase의 분해반응이 끝나면

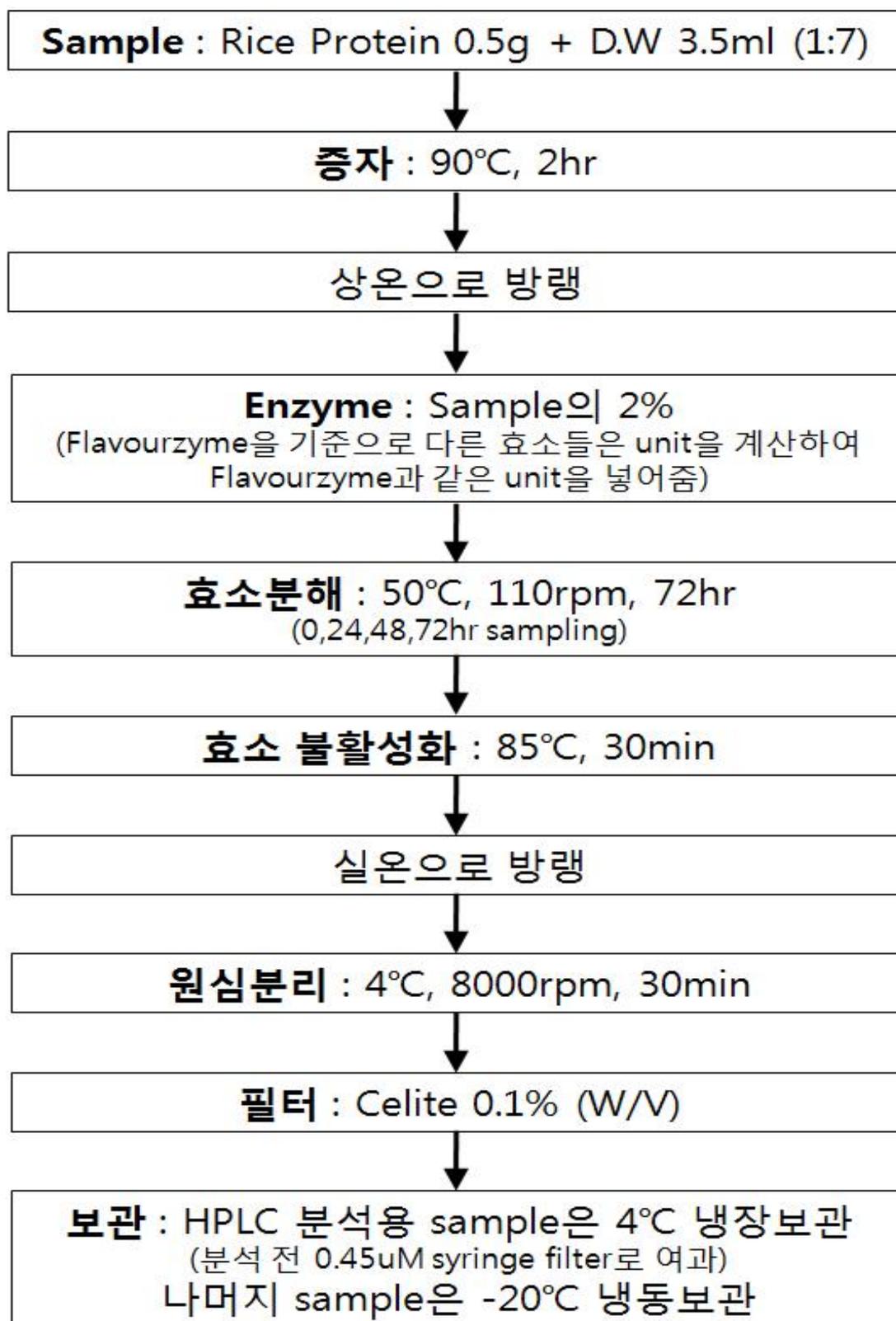


그림 11. 쌀 단백질을 이용한 천연 eHVP 생산 과정 도식도

표 16. 쌀 단백질 eHVP 생산을 위한 효소의 처리 조건

한 종류 효소로 반응하는 조건		
Flavourzyme	Protamex	Neutralse
Protease A	Protease M	Protease N
Protease P	Protease S	
두 종류의 효소로 반응하는 조건		
Protease N + Protease A	Protamex + Protease A	Neutralse + Protease A
Protease N + Protease P	Protamex + Protease A	Neutralse + Protease P
Protease N + Flavourzyme	Protamex + Flavourzyme	Neutralse + Flavourzyme

표 17. 쌀 단백질 eHVP 생산을 위한 효소 반응의 최적 조건

	Enzyme	opt. pH	opt. Temp.	50°C relative activity	Type	Activity
Novozyme	Flavourzyme	6	50°C	100%	endo/exo	500LAPU/g
Amano	Protease A	7	50°C	100%	endo/exo	20000units/g
	Peptidase R	7	36°C	98%	endo/exo	420u/g
	Prote AX	*	45°C	*	*	*
	Glutaminase	6	65°C	68%	Gln→Glu	100GTU/g

* Amano Inc.: Company information, details are unknown

30분 동안 85℃에서 효소를 불활성화 시켜 실온으로 방랭한 후 4℃, 8000rpm, 30분 동안 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 celite bed filtration (0.1%(W/V))을 이용하여 분해되지 않은 고형성분을 제거한 후, HPLC 분석용 sample은 vial에 덜어서 4℃에서 보관하고 나머지는 이화학적 분석을 위하여 -20℃에 냉동 보관 하였다.

(2) Glutamic acid 함량 증가를 위한 Glutaminase Enzyme Screening

쌀 단백질을 이용하여 천연조미료 소재를 개발하기 위해서는 단백질 효소 및 미생물을 이용하여 쌀 단백질을 분해하여 glutamic acid를 포함한 amino acid를 생산하여야 한다. 쌀 단백질의 glutamic acid의 함량은 MSG 대체를 위한 umami 특성을 가지고 있는 천연 eHVP 생산에 부족하여 eHVP 내의 총 glutamic acid의 함량을 높이기 위하여 쌀 단백질의 glutamic acid와 eHVP 생산과정 중 유리된 glutamine을 deamination 반응을 통하여 glutamic acid를 생성할 수 있는 glutaminase가 필요하다. 유리된 glutamine이 강한 산성에 의해 deamination되는 쌀 단백질의 acid hydrolysis와 달리, 천연 도폐 생산에는 enzymatic deamination 반응을 필요하다. 현재 상업적으로 판매되어 천연 eHVP생산에 사용될 수 있는 glutaminase는 *Bacillus* sp.에서 분리된 효소로 세종대학교 식물성 천연 eHVP 생산에 사용되는 효소를 사용하였다. Deamination glutaminase activity는 Biochemical Analyzer를 이용하여 분석하였다. Deamination reaction은 proteinase의 반응과 함께 첨가되어 50℃에서 반응시켰다.

2. 상업적 쌀 단백질 eHVP 생산 공정의 개발 - 3.5 liter Bioreactor

상업적 쌀 단백질 분해 공정 개발을 위하여 Small scale로 반응해서 얻은 HVP를 분석하여 최적의 효소를 선별하여 eHVP를 생산하였다. HVP내 Glutamic acid 함량을 증가시키기 위해 Glutaminase를 첨가하여 HVP를 생산하였다. 쌀 단백질 분해능이 높은 Proteinase는 Novozyme의 Flavourzyme과 Amano의 Protease A, Peptidase R, Prote AX를 선택하였으며, glutaminase를 첨가하여 반응을 진행시켰다. 효소 반응기 (그림 12)로 각 효소에 알맞은 최적 온도와 산도를 유지하였으며, 반응의 종결은 효소의 불활성화를 위하여 85℃에서 5분간 가열하였다. 쌀 단백질은 세종대학교에서 직접 분리한 쌀 단백질과 C사의 쌀 단백질을 사용하였다. Proteinase는 Small scale 실험을 통해서 선택한 Flavourzyme, Protease A와 Glutamine을 Glutamic acid로 전환시켜주는 Glutaminase를 넣어 주는 조건과, 기존에 N사에서 상업용 eHVP 생산에 사용하고 있는 Peptidase R, Prote AX, Glutaminase를 반응시켜 넣어 주는 것 두 가지 조건으로 진행하였다. 상업적 쌀 단백질 eHVP 생산을 위한 proteinase 및 반응 조건은 표 16에 정리하였다. 상업적으로 적용이 가능한 쌀 단백질 분해 반응은 쌀 단백질에 포함된 미생물과 반응 중 외부의 미생물의 오염을 방지할 수 없다. 쌀 단백질 분해 공정 중, 미생물의 오염을 방지



그림 12. 쌀 단백질을 이용한 천연 eHVP 생산을 위한 3 liter 효소반응기

하기 위하여 쌀 단백질 및 효소 반응기를 살균할 경우, 쌀 단백질 및 쌀 단백질 eHVP의 색상이 검어져 색상을 제거하기 위한 공정이 추가 되어야 한다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 쌀 단백질의 미생물 오염을 방지할 뿐만 아니라 쌀 단백질의 충분한 용해도를 확보하기 위하여 5%의 NaCl을 첨가하였다. 3-liter 효소 반응기를 이용한 상업적 쌀 단백질 eHVP 생산 공정은 **그림 13**에 도식화 하였다.

가. Flavourzyme, Protease A, Glutaminase로 생산한 쌀 단백질 eHVP

쌀 단백질을 분해하기 위하여 3L 발효기(Biotron, Model: Bio G-Microm, Korea, working volume 3L)에 증류수 2 L을 넣고 200rpm, 50°C로 예열하였다. 쌀 단백질 300g와 오염을 방지하기 위해 NaCl 150g를 넣고 효소 Flavourzyme 6g(Protein의 2%), Protease A 6g, Glutaminase 3g(Protein의 1%)를 넣고 50°C, 500rpm으로 72시간동안 분해하면서 0, 24, 48, 72시간별로 sample을 채취하였다. 분해가 끝나면 탈취를 위해 활성탄 24.5g(total volume의 1%)를 넣고 30분 동안 85°C에서 효소를 불활성화 시켜 실온으로 방랭하였다. Celite bed filtration을 이용하여 효소 분해가되지 않은 고형성분과 탈취제로 첨가된 활성탄을 제거하였다. 필터한 후 여과액의 volume을 줄이기 위하여 75°C에서 여과액을 감압 농축하고 동결 건조하였다. 총 450.0g의 고형분 (쌀 단백질; 300g + NaCl; 150.0g)을 반응 시켜 총 280.1g의 eHVP를 얻었다. Proteinase 효소 반응은 24시간 까지 빠르게 진행되어 48시간에 완료되지만, 쌀 단백질 eHVP의 생산 수율을 높이기 위하여 72시간 반응하였다 (**표 18**, **그림 14**). 쌀 단백질의 분해는 Biochemical analyzer를 이용하여 생성되는 glutamic acid 함량의 측정과 HPLC를 이용한 amino acid 분석을 통하여 측정하였다. 72시간 반응 후 쌀 단백질 eHVP의 glutamic acid의 함량은 2.32%로 측정되었다.

나. Peptidase, R Prote AX, Glutaminase로 생산된 쌀 단백질 eHVP

상업적으로 밀 단백질을 분해하여 천연 조미소재를 생산하기 위하여 다양한 proteinase가 사용되고 있으나, 밀 단백질 eHVP의 최상의 umami특성을 줄 수 있는 Peptidase, R Prote AX, Glutaminase를 이용하여 쌀 단백질 eHVP를 생산하였다. 쌀 단백질을 분해하기 위하여 3L 발효기(Biotron, Model: Bio G-Microm, Korea, working volume 3L)에 증류수 2 L을 넣고 200rpm, 50°C로 예열하였다. 쌀 단백질 300g와 오염을 방지하기 위해 NaCl 150g를 넣고 효소 Peptidase R 2.25 g(Protein의 0.75%), Prote AX 2.25 g, Glutaminase 2.25 g를 넣고 45°C, 500rpm으로 72시간동안 분해하면서 0, 24, 48, 72시간별로 sample을 채취하였다. Prote AX의 활성도는 50°C에서 급격하게 줄어들어 45°C에서 쌀 단백질 분해 반응을 시켰다. 분해가 끝나면 탈취를 위해 활성탄 24.5g(total volume의 1%)를 넣고 30분 동안 85°C에서 효소를 불활성화 시켜 실온으로 방랭하였다. Celite bed filtration을 이용하여 효소

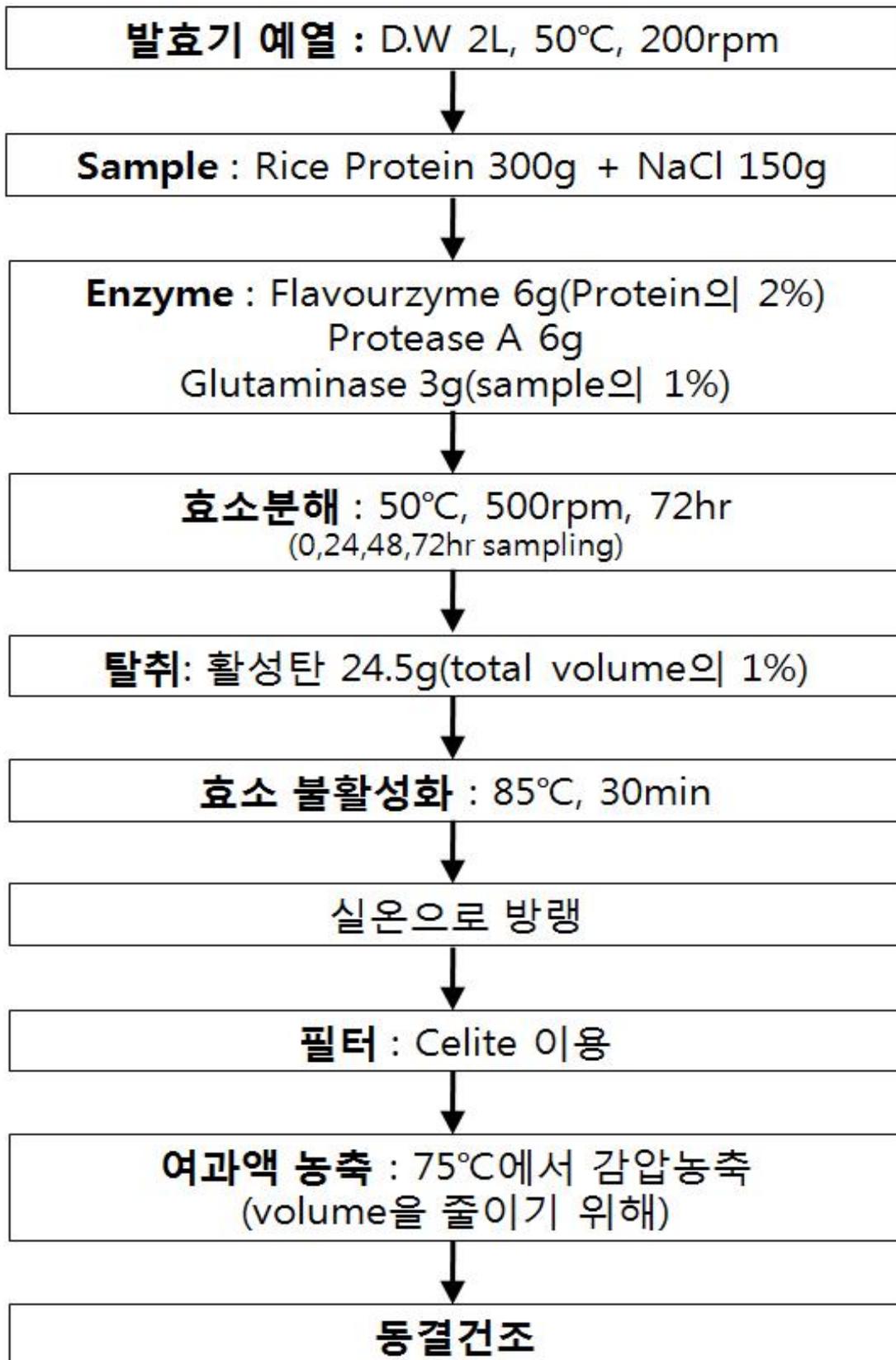
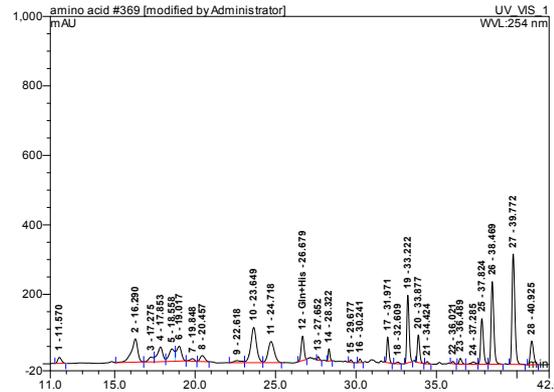
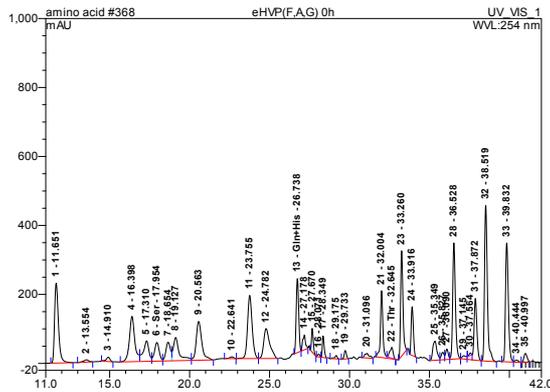


그림 13. 쌀 단백질을 이용한 천연 eHVP 생산 과정 도식도-Large Scale

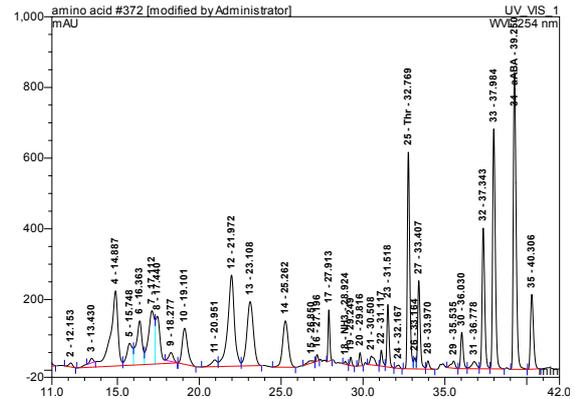
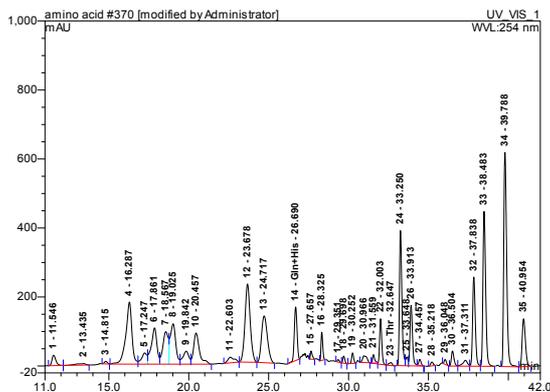
표 18. 쌀 단백질을 이용해 생산된 eHVP(F, A, G)의 총 아미노산 조성

Peak Name	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight / total a.a weight	pg/ul	a.a weight / total a.a weight	pg/ul	a.a weight / total a.a weight	pg/ul	a.a weight / total a.a weight
AMQ								
n.a.								
Asp	11,143.3	0.48%	—	—	7,107.0	0.18%	12,629.4	0.25%
Asn+Ser	169,233.1	7.33%	384,929.3	7.66%	370,534.9	9.34%	499,218.1	9.81%
Glu	87,757.7	3.80%	71,434.3	1.42%	65,617.8	1.65%	118,069.1	2.32%
n.a.								
Gly	33,588.5	1.46%	103,123.3	2.05%	97,815.3	2.47%	155,628.9	3.06%
Gln+His	104,151.3	4.51%	214,755.8	4.27%	238,105.8	6.00%	216,922.7	4.26%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	267,007.6	11.57%	697,804.5	13.88%	524,144.5	13.22%	671,251.4	13.20%
Thr	114,049.7	4.94%	307,729.5	6.12%	241,473.9	6.09%	315,805.1	6.21%
Ala	85,812.0	3.72%	121,773.1	2.42%	95,633.7	2.41%	148,040.7	2.91%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	33,039.6	1.43%	65,668.5	1.31%	54,867.6	1.38%	85,951.1	1.69%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
Cys	—	—	—	—	15,673.5	0.40%	26,159.7	0.51%
Tyr	161,600.3	7.00%	198,278.6	3.94%	136,717.3	3.45%	154,870.6	3.04%
n.a.								
Val	151,962.0	6.59%	367,728.9	7.31%	284,839.5	7.18%	384,825.6	7.57%
n.a.								
Met	84,237.7	3.65%	188,917.4	3.76%	168,522.5	4.25%	207,523.6	4.08%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	242,929.3	10.53%	43,441.2	0.86%	42,312.7	1.07%	84,808.7	1.67%
n.a.								
n.a.								
Ile	130,730.0	5.67%	325,262.7	6.47%	231,613.6	5.84%	308,479.9	6.06%
Leu	306,310.0	13.27%	591,956.1	11.77%	406,180.1	10.24%	534,354.1	10.50%
Phe	293,602.7	12.72%	1,032,442.7	20.53%	751,622.2	18.95%	873,267.4	17.17%
n.a.								
Trp	30,488.6	1.32%	312,928.0	6.22%	233,241.5	5.88%	288,943.4	5.68%



a. eHVP(F, A, G) 0 시간

b. eHVP(F, A, G) 24 시간



c. eHVP(F, A, G) 48 시간

d. eHVP(F, A, G) 72 시간

그림 14. 쌀 단백질을 이용해 생산된 eHVP(F, A, G)의 총 아미노산 조성을 분석한 HPLC 크로마토그램

분해가되지 않은 고형성분과 탈취제로 첨가된 활성탄을 제거하였다. 필터한 후 여과액의 volume을 줄이기 위하여 75℃에서 여과액을 감압 농축하고 동결 건조하였다. 총 450.0g의 고형분 (쌀 단백질; 300g + NaCl; 150.0g)을 반응 시켜 총 275.5g의 eHVP를 얻었다. Proteinase 효소 반응은 24시간 까지 빠르게 진행되어 48시간에 완료되지만, 쌀 단백질 eHVP의 생산 수율을 높이기 위하여 72시간 반응하였다 (표 19, 그림 15). 쌀 단백질의 분해는 Biochemical analyzer를 이용하여 생성되는 glutamic acid 함량의 측정과 HPLC를 이용한 amino acid 분석을 통하여 측정하였다. 72시간 반응 후 쌀 단백질 eHVP의 glutamic acid의 함량은 1.89%로 측정되었다.

나. 상업적 쌀 단백질 eHVP 분리/회수 정제 및 보관

쌀 단백질의 효소 분해 반응 후, Celite bed filtration을 이용하여 효소 분해가되지 않은 고형성분과 탈취제로 첨가된 활성탄을 제거하였다. 필터한 후 여과액은 투명한 수용액 상태로 회수되었다. 여과액의 volume을 줄이기 위하여 75℃에서 여과액을 감압 농축하고 동결 건조하였다. 동결 건조된 쌀 단백질 eHVP는 진한 카키색을 가지고 있으나, Micro-grinder로 미세 분말로 분쇄할 경우 옅은 카키색을 가지고 있다. Powdery 쌀 단백질 eHVP는 상온에 보존하고, 필요에 따라 이화학적 분석 및 관능평가를 위하여 적정량을 취한 후 증류수에 녹여 사용하였다. 천연 조미료 formulation을 위하여 개별 식품에서 요구되는 flavor/taste profile에 따라 다른 천연 첨가물과 조합하였다.

3. 천연 eHVP의 이화학적 특성 평가

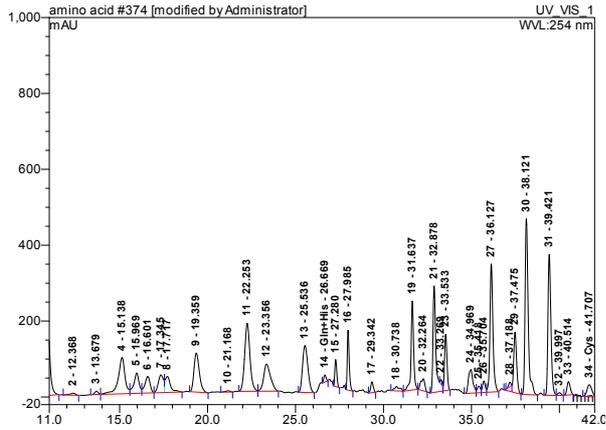
산 또는 Proteinase 효소를 이용하여 가수 분해된 쌀 단백질은 Spray dryer/동결건조기를 이용하여 수분을 제거하고 분말화 하였다. 분말화된 쌀 단백질 및 eHVP를 이용하여 (그림 16) 이화학적 평가를 하였다.

가. 천연 eHVP의 TN Value 및 총 조단백질 함량

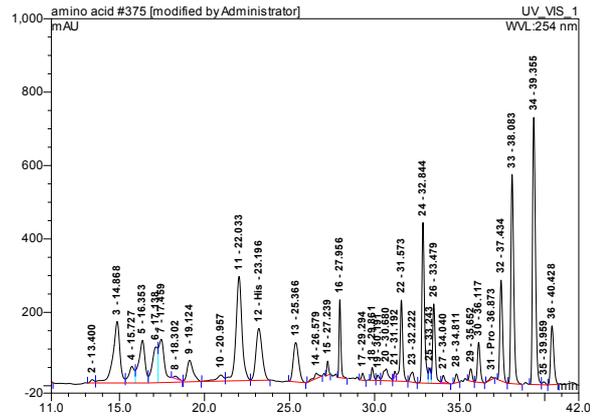
천연 eHVP의 아미노산 함량과 품질을 비교하기 위하여 kjeldahl 질소 분석법을 이용하여 TN Value 및 총 조단백질 함량을 측정하였다. 상업적 eHVP와 N사의 방법으로 생산한 eHVP 0.15g를 분해 촉진제(K₂SO₄ : CuSO₄ = 9:1) 2g, 황산 30ml, 끓임쪽과 함께 분해관에 넣고 색깔이 맑은 색으로 변할 때 까지 가열한 후 맑은 색으로 바뀐 후 1시간 가량 더 가열하였다. 분해액을 상온으로 방랭시킨 후 250ml 메스플라스크에 정용하여 증류 시료를 만들었고, 증류 플라스크에 증류 시료 10ml과 중화용 NaOH 30ml을 넣어 증류하였다. 냉각관을 통해서 나오는 암모니아를 4% boric acid 50ml과 혼합지시약(Bromocresol green 0.5g+

표 19. 쌀 단백질을 이용해 생산된 eHVP(R, AX, G)의 총 아미노산 조성

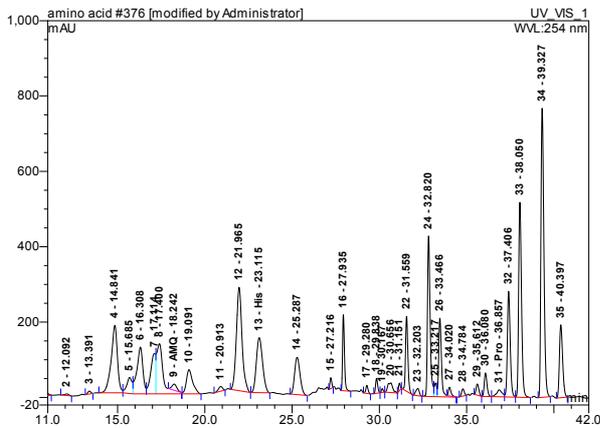
Peak Name	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight / total a.a weight	pg/ul	a.a weight / total a.a weight	pg/ul	a.a weight / total a.a weight	pg/ul	a.a weight / total a.a weight
AMQ								
n.a.								
Asp	5,536.8	0.29%	10,581.8	0.23%	6,813.8	0.16%	8,520.9	0.19%
Asn+Ser	116,410.5	6.17%	357,292.3	7.74%	316,478.7	7.51%	375,404.5	8.32%
Glu	56,230.7	2.98%	85,694.2	1.86%	70,866.7	1.68%	85,291.6	1.89%
n.a.								
Gly	24,660.0	1.31%	92,117.0	1.99%	84,891.3	2.01%	109,344.5	2.42%
Gln+His	45,504.5	2.41%	256,280.4	5.55%	278,568.1	6.61%	308,038.0	6.83%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	225,841.5	11.96%	683,196.6	14.79%	577,831.9	13.71%	581,603.9	12.89%
Thr	79,382.4	4.20%	240,847.2	5.21%	231,094.2	5.48%	262,739.7	5.82%
Ala	79,459.2	4.21%	118,157.9	2.56%	102,022.0	2.42%	126,417.8	2.80%
n.a.								
n.a.								
Pro	64,133.5	3.40%	139,488.5	3.02%	125,726.2	2.98%	162,373.2	3.60%
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	—	—	6,826.3	0.15%	8,542.7	0.20%	27,706.9	0.61%
Tyr	150,681.5	7.98%	257,712.6	5.58%	180,604.8	4.29%	101,523.3	2.25%
n.a.								
Val	133,167.5	7.05%	308,494.3	6.68%	283,051.8	6.72%	300,344.1	6.65%
n.a.								
Met	74,297.4	3.94%	201,178.5	4.36%	184,381.8	4.37%	159,586.2	3.54%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	200,645.2	10.63%	99,440.0	2.15%	53,419.9	1.27%	89,563.9	1.98%
n.a.								
Ile	93,799.2	4.97%	227,449.9	4.92%	226,170.5	5.37%	261,247.0	5.79%
Leu	257,960.3	13.66%	486,251.4	10.53%	415,766.0	9.86%	460,681.7	10.21%
Phe	248,066.4	13.14%	809,630.6	17.53%	799,016.5	18.96%	810,220.6	17.95%
n.a.								
Trp	32,144.4	1.70%	238,011.9	5.15%	269,535.3	6.40%	282,671.1	6.26%
n.a.								



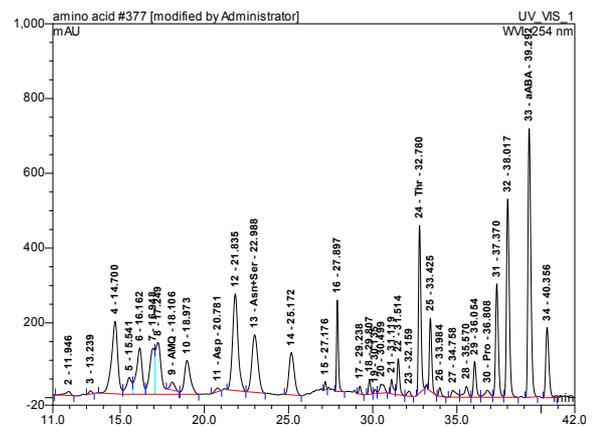
a. eHVP(R, AX, G) 0 시간



b. eHVP(R, AX, G) 24 시간



c. eHVP(R, AX, G) 48 시간



d. eHVP(R, AX, G) 72 시간

그림 15. 쌀 단백질을 이용해 생산된 eHVP(R, AX, G)의 총 아미노산 조성을 분석한 HPLC 크로마토그램

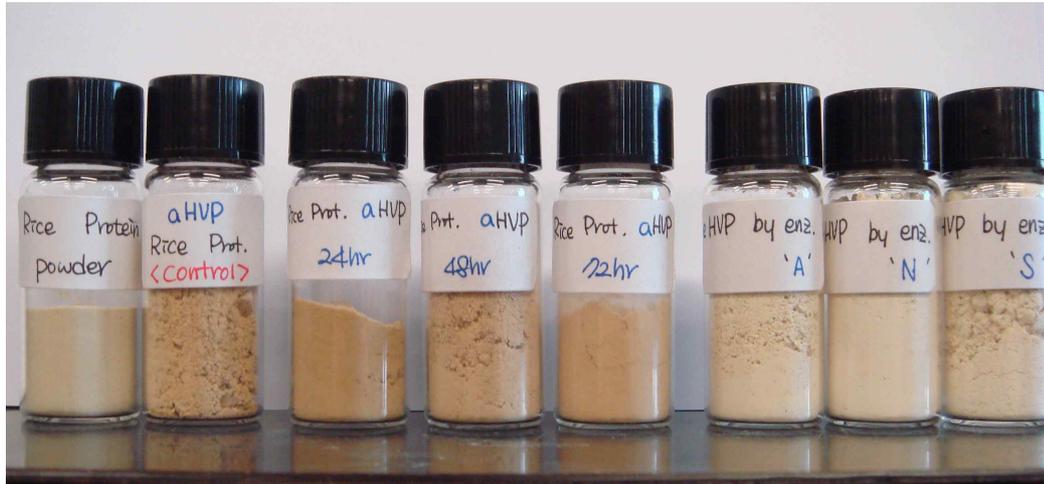


그림 16. 이화학적 평가 및 관능평가에 사용된 쌀 단백질과 생산된 aHVP와 eHVP

Methyl red 0.1g + 95% Ethyl alcohol 30ml) 4-5방울이 들어있는 삼각플라스크에 포집하였다. 포집된 용액이 150ml이 되면 증류를 끝내고 0.1N-HCl로 적정하였다. TN value는 다음과 같이 계산 하였으며 총 조단백질 함량은 쌀의 질소계수(5.95)를 곱하여 구하였다.

$$TN-value = \frac{0.001401 \times (\text{시료를 적정 } HCl(ml) - \text{Blank 적정 } HCl(ml)) \times 1.002 \times 25}{\text{시료 무게}(g)} \times 100$$

*1.002 - 역가, 25 - 회석배수

N사의 방법으로 생산한 eHVP의 TN value는 8.78, 총 조단백질 함량은 52.23이고 상업용 eHVP의 TN value는 7.61, 총 조단백질 함량은 46.27로 N사의 방법으로 생산한 eHVP가 상업용 eHVP보다 쌀 단백질이 더 많이 분해된 것을 알 수 있었다 (표 20).

나. HPLC를 이용한 쌀 단백질 aHVP와 eHVP의 Amino acid 조성 분석

쌀 단백질의 효소 가수분해물의 amino acid 조성을 분석할 수 있는 HPLC분석법 “AccQ • Tag Method”를 이용하여 HPLC running 조건을 확립하였다 (표 21). HPLC running 조건은 단백질의 함량과 아미노산의 함량에 따라 크게 영향을 받으며, 전개 용매의 gradient설정이 충분하지 못할 경우, amino acid의 분리가 잘 이뤄지지 않았다. HPLC분석을 하기 전에 쌀 단백질의 산 및 효소 분해물을 유도체화 하기 위한 전처리 과정을 거쳤다. Amino acid 유도체를 만들기 위하여 sample tube에 분석하고자 하는 HVP 시료를 10ul 넣고 AccQ-Fluor Borate Buffer를 60ul 첨가하여 잘 섞어준 후, 여기에 0.1mM의 내부표준물질(α -aminobutyric acid를 20mM HCl에 0.1 mM로 녹여 만듦) 10ul 과 AccQ-Fluor reagent 20ul을 첨가하여 몇 초간 섞어 실온에서 1분간 반응시킨다. 유도체화 반응 1분 후에 과량의 reagent가 AMD로 가수분해 되고 유도체화 반응이 종결시켰다. Heating block을 이용하여 유도체화된 amino acid solution을 10분 동안 가열하였다. 유도체화가 끝난 sample은 microfiltering을 한 후, 20ul을 Dionex HPLC에 injection하여 정량분석을 실시하였다. 이때 컬럼의 온도는 37°C를 유지하였으며 UV 254nm의 파장에서 분석하였다. 쌀 단백질의 총 Amino acid 조성은 쌀 단백질 0.1g를 6N HCl 5ml로 112°C에서 22hr동안 Acid Hydrolysis하여 100ml volumetric 플라스크에 정용하여 HPLC 분석하기 전 0.45uM acid compatible filter로 여과하여 유도체화 과정을 거쳐 HPLC로 분석하였고, 유리 Amino acid는 쌀 단백질 0.5g와 증류수 10ml을 60분 동안 Sonication하여 0.45M Syringe filter로 여과한 후 유도체화 과정을 거쳐 HPLC를 이용하여 분석하였다.(그림 17) 분석결과 aHVP의 Glutamic acid 분해율이 9.54%로 eHVP보다 높았으며, Amano의 Protease A로 생산한 eHVP와 Novozyme의 Flavourzyme으로 생산한 eHVP가 총 아미노산 함량과 Glutamic acid

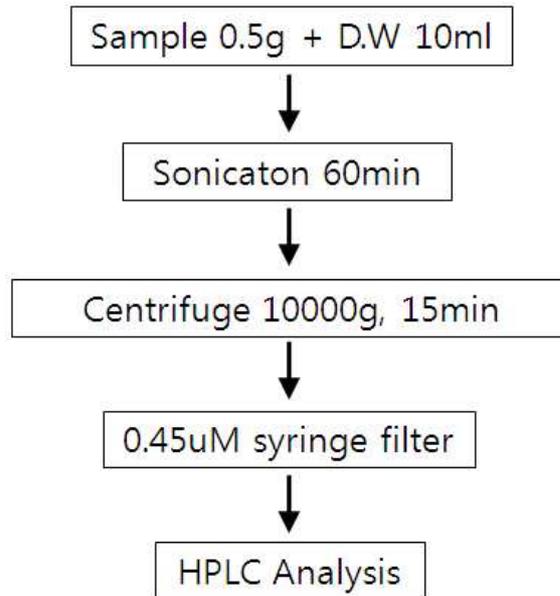
표 20. 쌀 단백질과 쌀 단백질을 이용해 생산한 eHVP의 조단백질 함량 측정

시료	적정에 사용된 HCl양(ml)	TN값(%)	총 조단백질량
blank	0.1		
Rice protein (SJ)	0.65	12.8681	76.5651
Rice protein (C사)	0.65	12.8681	76.5651

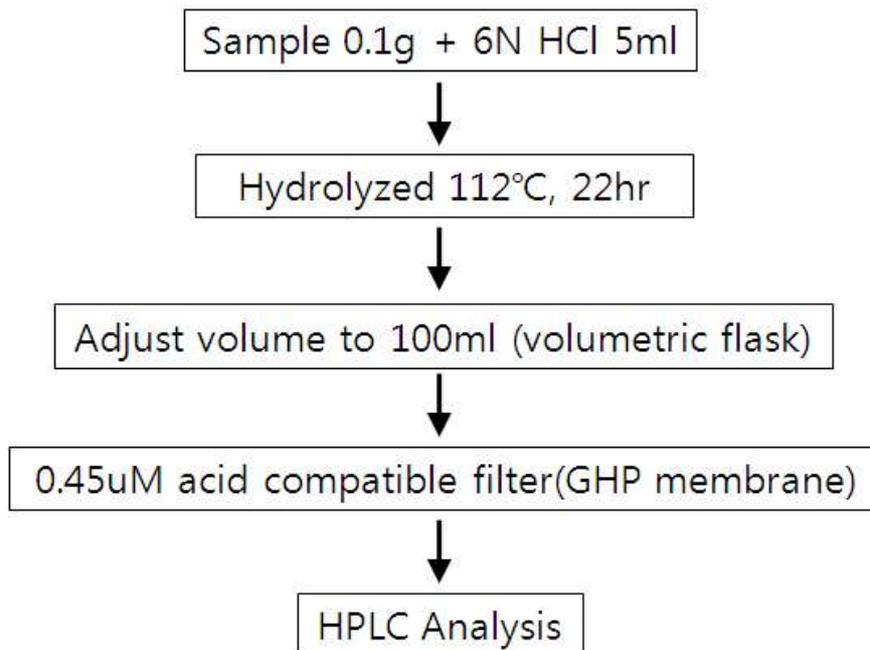
시료	적정에 사용된 HCl양(ml)	TN값(%)	총 조단백질량
blank	0.15		
R.P(C사)의 eHVP (Flavourzyme, Protease A, Glutaminase)	0.475	7.6082695	45.26920353
R.P(C사)의 eHVP (Peptidase R, ProtaAX, Glutaminase)	0.525	8.7787725	52.23369638

표 21. Total amino acid 및 free amino acid 조성 분석을 위한 HPLC Running 조건

Instrument	Dionex co. USA HPLC summit				
Column	AccQ-Tag™ 3.9 x 150 mm Column				
Detection	Dionex UVD detector (170 - 340 nm)				
Temperature	37°C				
Mobile phase	A : WaterAccQ-TagEluentA (acetate-phosphate buffer)				
	B : HPLC-grade acetonitrile				
	C : HPLC-grade water				
Injection volume	20 μ l				
Gradient	Time (min)	Flow (ml/min)	%A	%B	%C
	Initial	1.0	100	0	0
	0.49	1.0	100	0	0
	0.5	1.0	99	0.5	0
	24	1.0	95	5	0
	25	1.0	91	9	0
	37.5	1.0	83	17	0
	41.99	1.0	83	17	0
	12	1.0	0	60	40
	45.99	1.0	0	60	40
	46	1.0	100	0	0
	60	1.0	100	0	0



a) Free amino acid 분석 방법 도식도



b) Total amino acid 분석 방법

그림 17. 쌀 단백질 Amino Acid 분석 공정도

함량이 다른 효소에 비해 높게 나타나 이 두 효소를 이용하여 상업적 eHVP를 생산하였다. 상업적 eHVP의 Glutamic acid 분해율은 2.32%로 N사의 방법으로 생산한 eHVP의 Glutamic acid 분해율 1.89%보다 높았다. HPLC의 분석 결과는 보고서 마지막에 별도로 첨부 하였다.

다. 쌀 단백질의 Enzyme 가수분해율: Free amino acid 및 Total amino acid 함량 분석

쌀 단백질 aHVP와 eHVP의 가수분해율: 쌀 단백질의 산 혹은 효소 가수분해는 수용성 및 불용성 단백질의 함량에 많은 영향을 받아 쌀 단백질 가수분해가 완전히 이루어지지 않아 효소를 조합 혹은 반응 조건의 최적화를 통한 쌀 단백질 분해 효율을 증가 시킬 수 있는 기술 개발 연구를 진행하였다. 쌀 단백질 가수분해율은 쌀 단백질의 Acid Hydrolysis에서 얻어지는 총 Amino acid를 기준으로 개별 혹은 조합의 proteinase enzyme에 의해 쌀 단백질이 분해되어 생성시킨 유리 Amino acid의 함량을 기준으로 계산하였다 (그림 18). 총 Free amino acid 및 쌀 단백질의 Total amino acid의 함량은 amino acid의 유도체 과정을 거쳐 HPLC로 분석하였다 .

$$DH \text{ (Degree of Hydrolysis)} = \frac{\text{Number of free amino acid}}{\text{Total number of amino acid residues}} \times 100$$

(Adler-Nissen, 1979, Hajós et al., 1988)

가수분해율 결과를 실험실에서 분리한 쌀 단백질과 C사의 쌀 단백질 모두 Protease A와 Flavourzyme으로 생산한 eHVP의 가수분해율이 높아 HPLC를 이용한 Amino acid 조성 분석과 같은 결과를 얻은 것을 알 수 있다. 효소를 하나만 처리한 것뿐 만 아니라 두 가지 효소를 처리한 것 또한 Protease A와 Flavourzyme이 포함된 것이 가수분해율이 높다. 상업적 eHVP의 가수분해율은 4.17로 N사의 방법으로 생산한 eHVP의 가수분해율은 4.67보다 조금 떨어지는 것을 알 수 있다 (표 22).

라. Glutamic Acid Contents 결정

HPLC로 분석한 쌀 단백질 eHVP의 유리 Amino acid 함량에 대한 Glutamic acid 함량을 계산하였다 (그림 18, 표 23). 실험실에서 분리한 쌀 단백질에 Protease A를 처리하여 생산한 eHVP의 Glutamic acid 함량은 19658.56pg/uL, Flavourzyme을 처리하여 생산한 eHVP의 Glutamic acid 함량은 48226.0pg/uL이고 C사의 쌀 단백질에 Protease A를 처리하여 생산한 eHVP의 Glutamic acid 함량은 189807.24pg/uL, Flavourzyme을 처리하여 생산한 eHVP의 Glutamic acid 함량은 80785.88로 다른 eHVP의 Glutamic acid 함량보다 높아 Protease A와 Flavourzyme이 eHVP를 생산하기 적합한 효소인 것을 알 수 있다. Protease A와

표 22. 쌀 단백질과 생산된 eHVP의 아미노산의 양과 가수분해정도

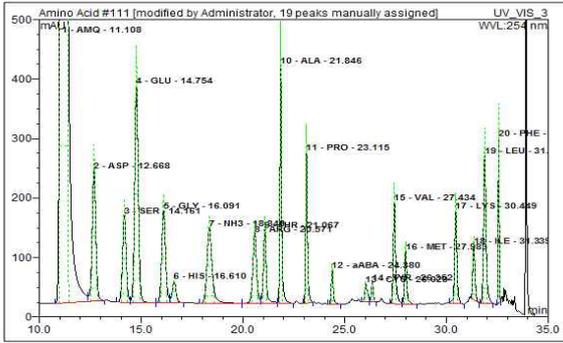
Sample	Amount by sum of all amino acid(mg/g)		% DH
	Free amino acid(mg/g)	Total amino acid(mg/g)	
SJ Rice Protein	4.40	720	0.61
SJ A-A	34.02	720	4.72
SJ A-M	13.72	720	1.91
SJ A-P	22.54	720	3.13
SJ A-S	14.28	720	1.98
SJ N-F	39.27	720	5.45
SJ N-N	4.69	720	0.65
SJ A-N/A-A	31.22	720	4.34
SJ A-N/A-P	23.80	720	3.31
SJ A-N/N-F	33.88	720	4.71
SJ N-N/A-A	30.66	720	4.26
SJ N-N/A-P	23.59	720	3.28
SJ N-N/N-F	38.64	720	5.37
SJ N-P/A-A	27.86	720	3.87
SJ N-P/A-P	22.26	720	3.09
SJ N-P/N-F	43.68	720	6.07
CJ Rice Protein	1.40	860	0.16
CJ A-A	53.97	860	6.28
CJ A-M	19.60	860	2.28
CJ A-N	2.80	860	0.33
CJ A-P	31.29	860	3.64
CJ A-S	11.20	860	1.30
CJ N-F	55.16	860	6.41
CJ N-N	3.36	860	0.39
CJ A-N/A-A	50.47	860	5.87
CJ A-N/A-P	25.41	860	2.95
CJ A-N/N-F	24.29	860	2.82
CJ N-N/A-A	45.50	860	5.29

CJ N-N/A-P	32.76	860	3.81
CJ N-N/N-F	44.73	860	5.20
CJ N-P/A-A	43.82	860	5.10
CJ N-P/A-P	27.09	860	3.15
CJ N-P/N-F	31.85	860	3.70
CJ F/A/G	35.87	860	4.17
CJ R/AX/G	40.20	860	4.67

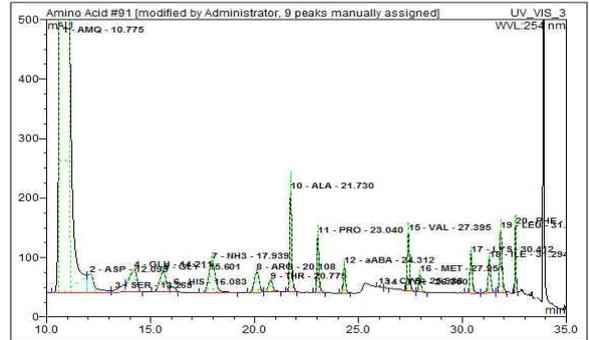
*A-A, A : Protease A로 처리한 eHVP *N-F, F : Flavourzyme으로 처리한 eHVP
 *A-M : Protease M로 처리한 eHVP *N-N : Neutrase으로 처리한 eHVP
 *A-N : Protease N로 처리한 eHVP *N-P : Protamex로 처리한 eHVP
 *A-P : Protease P로 처리한 eHVP *G : Glutaminase로 처리한 eHVP
 *A-S : Protease S로 처리한 eHVP *R : Peptidase R로 처리한 eHVP
 *AX : Prote AX로 처리한 eHVP

표 23. 쌀 단백질 eHVP의 Glutamic acid equivalent index

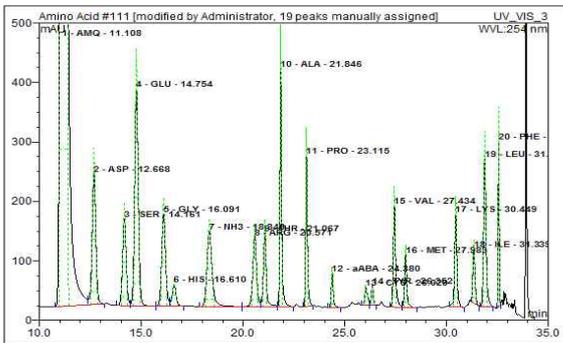
Sample	Glutamic acid 함량(pg/uL)	비율(%)
SJ A-A	19658.56	0.4
SJ A-M	6738.11	0.34
SJ A-P	22477.53	0.7
SJ A-S	29836.48	1.46
SJ N-F	48226.08	0.86
SJ N-N	28571.44	4.24
SJ A-N/A-A	90329.92	2.02
SJ A-N/A-P	88590.63	2.6
SJ A-N/N-F	97077.84	2
SJ N-N/A-A	81425.32	1.86
SJ N-N/A-P	56492.82	1.68
SJ N-N/N-F	107177.46	1.94
SJ N-P/A-A	67780.14	1.7
SJ N-P/A-P	46786.62	1.47
SJ N-P/N-F	107509.73	1.72
CJ A-A	189807.24	2.46
CJ A-M	25885.30	0.92
CJ A-N	15867.64	3.99
CJ A-P	28376.30	0.63
CJ A-S	35484.64	2.22
CJ N-F	80785.88	1.03
CJ N-N	11983.77	2.52
CJ A-N/A-A	31328.90	0.43
CJ A-N/A-P	24052.73	0.66
CJ A-N/N-F	71319.05	2.05
CJ N-N/A-A	27826.70	0.43
CJ N-N/A-P	24403.69	0.52
CJ N-N/N-F	43531.67	0.68
CJ N-P/A-A	21552.06	0.34
CJ N-P/A-P	24278.86	0.63
CJ N-P/N-F	44933.57	0.99
CJ F/A/G	118069.09	2.32
CJ R/AX/G	111997.88	1.86



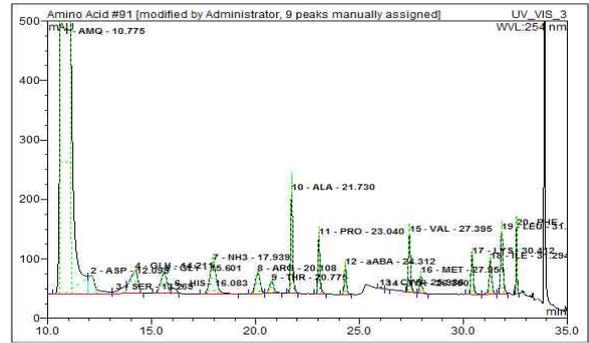
a. 쌀 단백질의 총 아미노산



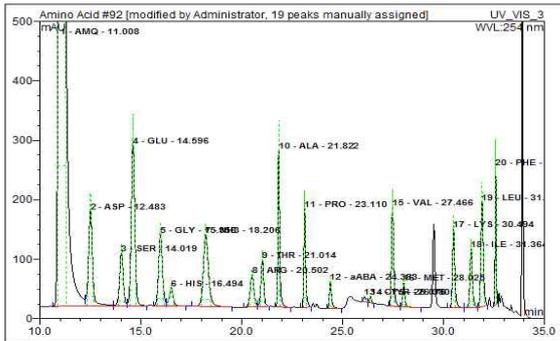
b. 쌀 단백질의 유리 아미노산



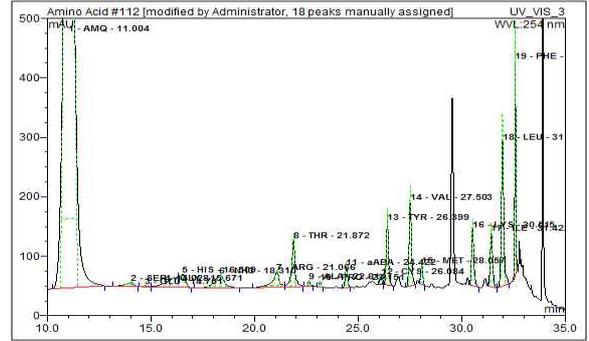
c. aHVP 총 아미노산



d. 7 aHVP 유리 아미노산



e. Proteinase "A"로 반응한 eHVP 총 아미노산



f. Proteinase "A"로 반응한 eHVP 유리 아미노산

그림 18. 쌀 단백질, 생산된 aHVP와 eHVP의 총 아미노산과 유리 아미노산 조성을 분석한 HPLC 크로마토그램

Flavourzyme과 Glutaminase를 같이 처리하여 생산한 산업용 eHVP의 함량은 118069.09로 기존의 N사에서 사용하고 있는 방법으로 생산한 eHVP의 Glutamic acid 함량 111997.88과 비슷한 정도로 나타났다.

4. 된장 샘플에서 고효성 Proteinase 미생물 분리

가. 된장의 구입 및 수집

천연 조미료: 전 세계의 향료 및 향장 원료 물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 국내를 비롯하여 전 세계적으로 소득의 증가와 소비자의 고급화 추세로 인하여 천연 식품 및 향장 소재의 요구가 증가하고 있다. 이에 따라 합성된 mono-sodium glutamate(MSG) 또는 식물 단백질의 산 가수분해를 통해 생산된 아미노산 제품을 거부하는 소비자가 또한 증가하고 있다.

콩 발효 식품: 된장은 간장, 청국장 등과 함께 콩을 주원료로 하여 발효, 숙성시킨 우리나라의 대표적인 발효식품으로 특유한 맛과 향을 지니고 있어 예로부터 널리 애용되어왔다. 된장의 품질을 결정하는 데는 좋은 원료와 제조방법 등 여러 가지 요인이 있으나, 특히 맛과 향은 숙성 과정 중 미생물의 작용에 따라 결정된다. 숙성에 관여하는 하는 미생물로는 *Apergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis* 등이 있으며, 이런 곰팡이와 각종 세균이 분비하는 proteinase, amylase, lipase 등에 의하여 원료의 단백질과 탄수화물 그리고 지방 등이 가용성 성분으로 분해되어 된장의 맛과 향이 결정 된다. 특히, 된장 고유의 구수한 맛과 향은 단백질의 가수분해 산물인 아미노산으로부터 생성된다. 현재 국내에서는 된장에서 분리한 미생물에 의하여 세포외로 분비되는 효소의 분리 정제와 생화학적 특성 규명 등의 연구가 주를 이루고 있으며, 이를 이용한 산업적 효소 생산 연구는 결음마 수준이다. 따라서 모든 효소를 일본, 미국을 비롯한 국외에서 전량 수입하고 있어 분리 정제된 효소의 이용에는 제한이 있다. 따라서 우리나라 전통 장류인 된장으로부터 proteinase activity가 우수한 균주를 선별하여 저 알러지성 쌀 단백질을 가수분해 함으로서 MSG를 대체할 수 있는 고부가 천연 향신료의 대량 생산 기술 개발이 가능하다. Proteinase activity 뿐만 아니라 glutaminase 또는 glutamyltransferase activity를 함께 갖는 균주를 확보한다면, 단백 분해를 통한 glutamic acid 확보와 동시에 umami 특성 향상에도 기여할 수 있는 장점이 있다.

고활성 Proteinase 미생물 본 연구에서는 시중에서 판매되고 있는 재래식 된장 22종을 수집하여 proteinase activity가 우수한 균주를 선별하였으며, 또한 한국식

품연구원에서 보유하고 있는 된장 분리 균주 12종의 proteinase activity와 glutaminase 혹은 glutamyltransferase activity가 동시에 우수한 균주를 각각 1종씩 확보하여 쌀 단백질 가수분해에 이용하였다. 된장으로부터 proteinase activity가 우수한 균주를 분리하는 과정은 **그림 19**에 도식화 하였다.

나. 된장 시료의 확보

쌀 단백질을 이용한 천연 HVP를 생산하기 위해 시중에서 판매되고 있는 재래식 된장 및 된장 시료 22종을 구입하여 4℃에 보관하여 실험에 사용하였다. **표 24**은 확보된 된장 시료 22종의 목록이다.

다. 된장 내 균주배양 (Microorganism Isolation)

Proteinase activity를 갖는 균주를 분리하기 위해 된장 1 g를 멸균한 3 % NaCl 용액 9 mL에 60 초간 혼합한 후, 멸균한 3 % NaCl 용액을 이용해 희석하여 100 μ l씩 plate에 분주하여 spreading하였다. 세균의 경우 plate Count Agar에 3 % NaCl과 2 % substrate, 효모의 경우 Malt extract agar에 3 % NaCl과 2 % substrate, 곰팡이의 경우 Rose Bengal Choloramphencol agar에 3 % NaCl과 2 % substrate를 이용하여 선별하였다. 기질 단백질로는 wheat gluten을 이용하였으며, plate를 20℃에서 미생물은 24-48시간 배양하고, 효모 및 곰팡이는 72-120 시간 배양한 후 1차적으로 clear zone을 형성하는 균주를 분리하였다 (**그림 20**). 단일 균주를 선별하기 위해 분리된 균주를 위상차현미경으로 관찰하여 28종의 균주를 순수 분리하였다 (**그림 21**).

라. 고효성 Proteinase 균주선발 (Microorganism Isolation)

1차로 분리된 28종의 clear zone을 형성하는 균주를 toothpick으로 따서 기질을 넣은 새 배지에 접종하여 proteinase activity를 비교하여 고효성 proteinase 균주를 선별하였다. 2차 균주 선별에 사용된 배지는 세균의 경우 Nutrient Agar에 2 % substrate, 효모의 경우 Malt extract agar에 2 % substrate, 곰팡이의 경우 Rose Bengal Choloramphencol agar에 2 % substrate를 이용하여 선별하였다. 기질 단백질로는 skim milk를 이용하였으며, plate를 28℃에서 미생물은 24-48시간 배양하고, 효모 및 곰팡이는 72-120 시간 배양한 clear zone의 지름을 측정하여 지름이 큰 2 종을 선정하여 순수 분리 한 후, -80 ℃ deep-freezer에 동결 보관하여 쌀 단백질 가수분해에 이용하였다 (**그림 23, 표 25**).

1st step.



2nd step.



그림 19. Scheme of screening high proteinase activity microorganism

표 24. Proteinase 활성 균주를 선별하기 위한 이용한 된장 목록

순위	제조원	제품명	유통기한	생산년월
1	장본가	조선된장	2010. 08. 02	2009. 02
2	김용순전통식품	재래식된장	2010. 10. 14	2009. 04
3	순창전통별미	한식된장	2010. 10. 20	2009. 04
4	순창 허씨 전통	재래식된장	2010. 03. 31	2008. 10
5	오순이대덕식품	된장	-	2009. 03
6	내고향전통식품	된장	-	2008. 10
7	순창고향전통식품	재래식된장	-	2009. 03
8	순창해목전통식품	된장	-	2009. 04
9	순창 오복전통	된장	-	2009. 04
10	순창 민들레 전통	조선된장	-	2008. 10
11	감조전통식품	된장	-	2009. 04
12	명성전통식품	된장	-	2008. 10
13	순창이조전통식품	재래식된장	-	2008. 11
14	가남전통식품	전통된장	-	2009. 04
15	하늘마음 김성숙	재래식된장	-	2008. 10
16	순창명진전통식품	된장	2010. 07. 30	2009. 02
17	문옥레가	된장	2010. 09. 25	2009. 03
18	순창영농조합법인	수 순창된장	2010. 09. 22	2009. 03
19	성가정식품	전통된장	2010. 10. 23	2009. 04
20	향적원전통식품	된장	-	2009. 04
21	순창 장수원 전통	순창전통된장	-	2008. 10
22	순창문옥레식품	된장	2010. 08. 03	2009. 02



그림 20. Clear zone by microbial proteinase of the strains isolated from soybean pastes

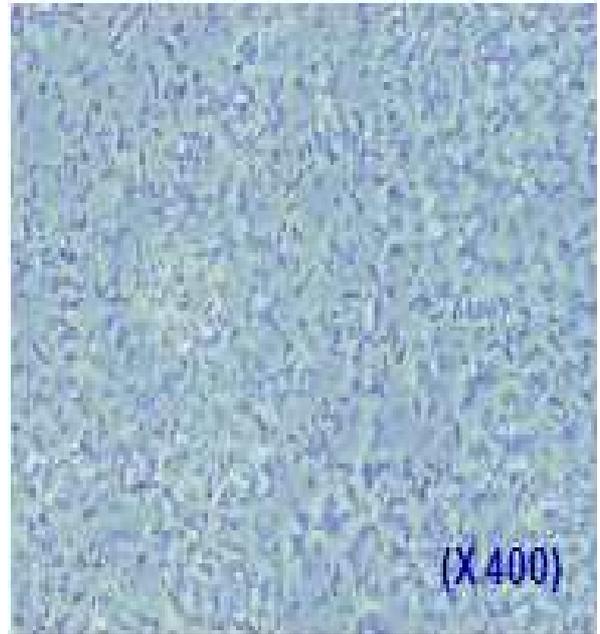
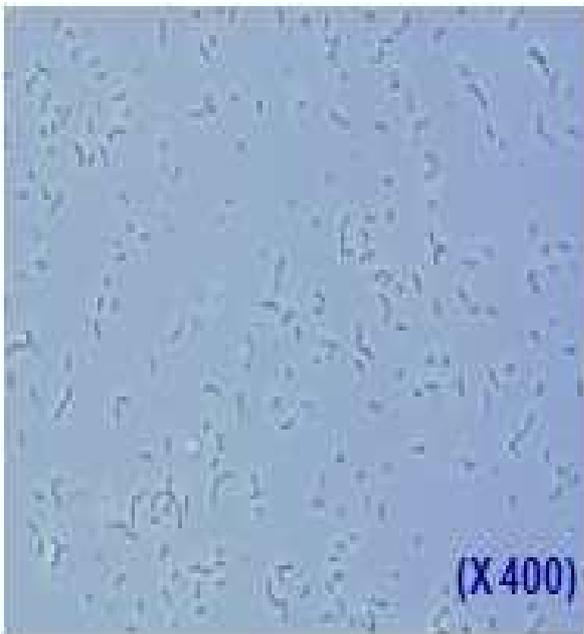
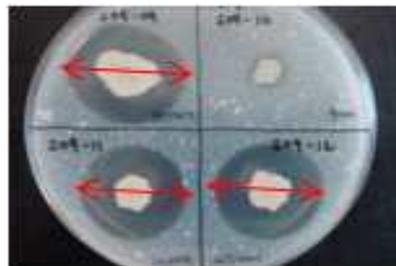
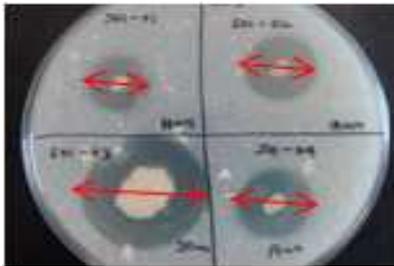
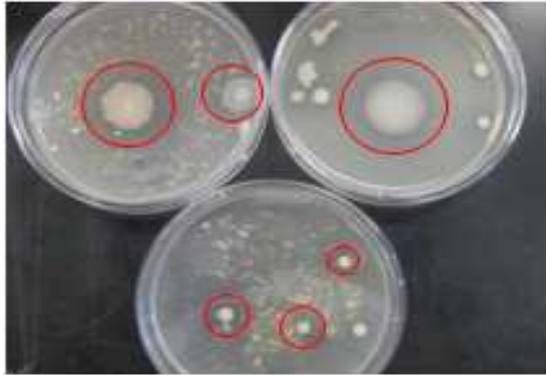


그림 21. Phase-contrast microscope of the strains isolated from soybean pastes at magnification of $\times 400$



S01-03



S09-04



그림 22. 선별된 균주 중에서 Clear zone 크기로 Proteinase 활성 비교

표 25. Clear zone size 측정을 통한 Protease activity 비교측정

미생물	직경 (mm)	미생물	직경 (mm)	미생물	직경 (mm)
S01-01	14	S06-01	-	S08-03	28
S01-02	18	S06-02	19	S08-04	27
S01-03	30	S06-03	28	S08-05	26
S01-04	19	S06-04	24	S08-06	28
S01-05	18	S06-05	27	S08-07	26
S01-06	17	S06-06	28	S08-08	9
S01-07	15	S06-07	27	S09-01	30
S01-08	15	S06-08	27	S09-02	26
S01-09	15	S06-09	27	S09-03	13
S01-10	17	S06-10	27	S09-04	31
S01-11	13	S06-11	25	S09-05	26
S02-01	25	S07-01	21	S09-06	24
S02-02	23	S07-02	21.5	S09-07	27
S02-03	26	S07-03	27	S09-08	27
S02-04	27	S07-04	26	S09-09	30
S02-05	23	S07-05	27	S09-10	9
S03-01	-	S07-06	10	S09-11	26
S03-02	25	S07-07	24	S09-12	27
S03-03	26	S07-08	24	S09-13	26
S03-04	-	S07-09	27	S09-14	27
S03-05	24	S07-10	23	S09-15	24
S05-01	18	S07-11	24	S09-16	26
S05-02	24	S07-12	18	S09-17	27
S05-03	13	S07-13	20	S09-18	27
S05-04	-	S07-14	23	S09-19	24
S05-05	17	S07-15	28	S09-20	27
S05-06	28	S07-16	26	S09-21	25
S05-07	25	S07-17	10	S10-01	21
S05-08	24	S08-01	26	S10-02	17
S05-09	26	S08-02	28	S10-03	20

5. 미생물을 이용한 쌀 단백질 HVP 생산 공정

Proteinase를 가진 미생물을 이용하여 Rice Protein을 분해하여 Glutamic acid를 생산하였다. 미생물을 이용하여 HVP를 생산하는 것은 효소를 이용하여 HVP를 생산하는 것 보다 비용을 절감 할 수 있을 뿐만 아니라, 하나의 미생물이 가진 여러 가지 효소의 작용을 한 번에 적용할 수 있기 때문에 상업용 eHVP를 생산하는데 효소를 이용하는 것 보다 더 좋을 것으로 예상된다.

가. 고효율성 Proteinase 미생물 배양

Rice protein은 C사 것을 사용하고 된장에서 분리한 미생물 중 clear zone이 넓은 미생물 2종류(S01-03, S09-04)와 한식연에서 분양받은 균주 중 proteinase activity가 높은 미생물 2종류(F3204, F3205)를 사용하였다. 배지로는 Basic medium(5 g/L NaNO₃, 1 g/L K₂HPO₄, 2 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄, 1 g/L Yeast extract)을 Rice Protein을 넣어준 배지와 넣지 않은 배지 모두 pH 6.5로 맞춰 121 °C 15 min 동안 멸균하여 사용하였다. 배지에 미생물을 접종하기 전에 멸균된 glucose를 20 g/L로 넣어주었다.

나. Proteinase activity 방법

미생물 배양액을 원심분리하여 상등액을 효소액으로 이용하였다. Azo-casein (Megazyme ACS 2/99)을 이용하여 기질 용액을 준비하였다(2 g powder, 4 ml Methanol, 96 ml 100 mM Sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 넣고 완전히 녹을 때까지 10 분간 녹인다.) 효소액 1 ml과 기질 1 ml을 넣고 vortex하여 40 °C에서 10 분간 반응시켰다. 반응 후, 분해되지 않은 단백질을 제거하고 효소반응도 중지시키기 위해 5 % trichloroacetic acid(TCA, 6 ml)를 넣고 5 초간 vortex시켰다. 상온에서 5분간 방치한 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리한다. 분리된 상등액을 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. Proteinase assay 계산

Proteinase activity의 계산은 다음과 같이 하였다.

-Bacterial protease (from *Bacillus subtilis*)

$$\text{Protease (milli-Units/mL)} = 250 \times \text{Abs.}(440\text{nm}) \cdot 8$$

$$R = 0.99 \quad (\text{Linear absorbance range} = 0.1 \text{ to } 1.0)$$

-Fungal protease (from *Apergillus niger*)

$$\text{Protease (milli-Units/mL)} = 146 \times \text{Abs.}(440\text{nm}) - 4$$

$$R = 0.99 \quad (\text{Linear absorbance range} = 0.1 \text{ to } 1.0)$$

라. 고효성 Proteinase 미생물을 이용한 쌀 단백질 HVP 생산 공정

계대배양 하기 위하여 4종류의 미생물(S01-03, S09-04, F3204, F3205)을 각각 50 % glucose를 4 ml 넣어준 Basic medium 100 ml에 접종하여 하루 동안 배양하였다. Rice Protein 3 g를 넣은 Basic medium 100 ml과 Rice Protein을 넣지 않은 Basic medium 100 ml에 50 % glucose를 4 ml 넣고 S01-03, S09-04, F3204, F3205를 각각 계대배양 하여 26 °C, 200 rpm에서 72시간 까지 배양하였다 (표 26, 그림 23). 배양하는 도중 glucose 양을 측정하여 glucose가 5 g/L이하로 떨어지게 되면 glucose를 최대 20 g/L로 첨가 하여 미생물이 지속적으로 자랄 수 있게 하였다. cell의 growth를 확인하기 위하여 Rice protein을 넣지 않고 배양한 미생물을 각각 6, 10, 24, 30, 46, 48, 54, 72시간에 sample을 채취하여 spectrophotometer를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하고 pH와 남아있는 glucose의 양을 확인하였다. Rice Protein을 넣어서 배양한 것과 넣지 않고 배양한 것 모두 0, 24, 48, 72시간에 sample을 채취하여 pH, glutamic acid 함량, 남아있는 glucose의 양을 측정하고 AZO-CASEIN(Megazyme)을 이용하여 Proteinase activity를 측정하였다 (표 27). 미생물 균주 F3204를 제외하고 24시간 배양을 통하여 높은 proteinase의 활성을 보였다. 분리된 미생물균주는 배지의 조성에 영향을 받으나, 단백질의 함유 여부와 관계없이 proteinase의 활성을 보였다. 이러한 활성은 된장에서 분리된 미생물은 지속적으로 proteinase를 생산함으로 된장의 숙성에 깊이 관여하는 것으로 사료된다. 하지만 된장에서 분리된 미생물 균주는 질소원으로 아미노산을 사용하는 것으로 나타나, 무기 질소원이 첨가된 배지를 사용할 경우보다도 탄소원인 glucose를 많이 사용하여 미생물의 성장을 촉진하였다 (표 28). 미생물 균주가 첨가된 쌀 단백질을 이용하여 성장하게 되어 높은 proteinase 활성을 보이지만, 쌀 단백질 eHVP생산에 필수적인 amino acid를 축적하지 않아, 된장에서 분리된 미생물을 이용한 HVP 생산기술은 배지 조성 및 미생물 성장과 proteinase를 이용한 쌀 단백질 분해를 위한 생물공정의 개발이 필요할 것으로 사료된다 (예, 2-step Bio-reaction Process 등)

표 26. 미생물의 Growth rate

	6시간			10시간		
	O.D (590nm)	pH	Glucose(g/L)	O.D	pH	Glucose
S01-03	0.151	6.61	22.6	0.98	6.32	22.9
S09-04	0.081	6.65	24.7	0.36	6.41	24.3
F3204	0.281	6.3	21.6	1.16	6.34	21.5
F3205	0.631	6.85	22.4	1.76	6.42	19.3
	24시간			30시간		
	O.D	pH	Glucose	O.D	pH	Glucose
S01-03	2.37	6.81	20.1	2.69	6.82	19.5
S09-04	1.05	6.59	19.6	1.61	6.58	20.7
F3204	3.37	6.82	19.4	4.2	6.68	16.5
F3205	4	7.16	19.5	4.54	7.04	16.6
	46시간			48시간		
	O.D	pH	Glucose	O.D	pH	Glucose
S01-03	2.74	6.66	16	2.74	6.64	17
S09-04	1.86	6.49	23	1.95	6.5	19.8
F3204	4.76	5.98	14	4.98	5.83	12.9
F3205	5.75	7.12	20.6	5.97	7.09	15.6
	54시간			72시간		
	O.D	pH	Glucose	O.D	pH	Glucose
S01-03	2.94	6.53	16.6	3	5.97	11.1
S09-04	1.89	6.55	20.9	2.11	6.57	17.6
F3204	4.98	5.25	12.1	4.86	4.49	9.85
F3205	6.45	7.09	13.8	7.47	7.15	12.5

※O.D:590nm,1/10 희석하여 측정, 접종하기 전 배지를blank 로잡음

※ glucose : 1/10 희석하여 측정.

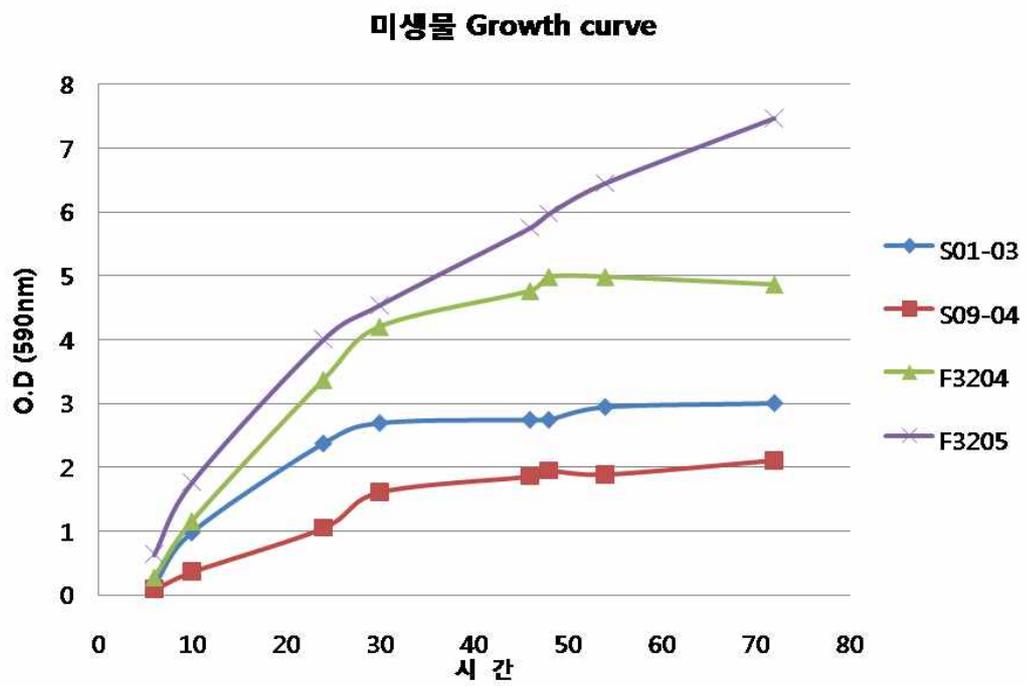


그림 23. S01-03, S09-04, F3204, F3205의 Growth curve

표 27. 시간대별 Protease activity 변화

		0시간		24시간	
		Abs. (440nm)	Activity (milli-Units/mL)	Abs. (440nm)	Activity (milli-Units/mL)
	M/O				
Basic	S01-03	0.261	57.25	1.057	256.25
	S09-04			1.099	266.75
	F3204			0.371	84.75
	F3205			1.169	284.25

		48시간		72시간	
		Abs. (440nm)	Activity (milli-Units/mL)	Abs. (440nm)	Activity (milli-Units/mL)
	M/O				
Basic	S01-03	1.339	326.75	1.346	328.5
	S09-04	1.327	323.75	1.342	327.5
	F3204	0.795	190.75	0.168	34
	F3205	1.358	331.5	1.359	331.75

		0시간		24시간	
		Abs. (440nm)	Activity (milli-Units/mL)	Abs. (440nm)	Activity (milli-Units/mL)
	M/O				
Basic +	S01-03	0.219	46.75	0.582	137.5
	S09-04			0.796	191
Rice protein	F3204			0.266	58.5
	F3205			0.98	237

		48시간		72시간	
		Abs. (440nm)	Activity (milli-Units/mL)	Abs. (440nm)	Activity (milli-Units/mL)
	M/O				
Basic +	S01-03	1.334	325.5	1.362	332.5
	S09-04	1.348	329	1.359	331.75
Rice protein	F3204	0.811	194.75	1.355	330.75
	F3205	1.346	328.5	1.35	329.5

* 쌀 단백질과 같이 배양한 F3205는 24시간 배양하면 색이 붉게 변함.

표 28. 시간별 Glutamic acid 함량 및 pH 변화

	M/O	0시간			24시간		
		Glucose (g/L)	Glutamic acid (g/L)	pH	Glucose (g/L)	Glutamic acid (g/L)	pH
Basic	S01-03	25.3	0	6.63	20.1	0	6.81
	S09-04				19.6	0	6.59
	F3204				19.4	0	6.82
	F3205				19.5	0	7.16

	M/O	48시간			72시간		
		Glucose (g/L)	Glutamic acid (g/L)	pH	Glucose (g/L)	Glutamic acid (g/L)	pH
Basic	S01-03	17	0	6.64	11.1	0	5.97
	S09-04	19.8	0	6.5	17.6	0	6.57
	F3204	12.9	0	5.83	9.85	0	4.49
	F3205	15.6	0	7.09	12.5	0.03	7.15

* Basic은 1/10 희석하여 측정

	M/O	0시간			24시간		
		Glucose (g/L)	Glutamic acid (g/L)	pH	Glucose (g/L)	Glutamic acid (g/L)	pH
Basic+	S01-03	23	0	6.53	12.2	0.015	5.77
	S09-04				0.007	0.064	7.34
Rice Protein	F3204				1.3	0.013	5.97
	F3205				0.028	0.121	7.44

	M/O	48시간			72시간		
		Glucose (g/L)	Glutamic acid (g/L)	pH	Glucose (g/L)	Glutamic acid (g/L)	pH
Basic+	S01-03	6.18	0.009	6.39	0	0.319	6.77
	S09-04	6.87	0.026	7.27	0.029	0.231	7.4
Rice Protein	F3204	6.69	0.01	6.7	0.019	0.524	7.03
	F3205	7.59	0.014	7.42	0.197	0.217	6.93

- * Basic+Protein의 S09-04, F3205는 24h에 2g/100ml의 glucose를 더 넣어줌
- * Basic+Protein의 S01-03, F3204는 30h에 1g/100ml의 glucose를 더 넣어줌
- * Basic+Protein의 S01-03, S09-04, F3204, F3205는 46h에 1g/100ml의 glucose를 더 넣어줌
- * Basic+Protein의 S01-03, S09-04, F3204, F3205는 54h에 2g/100ml의 glucose를 더 넣어줌
- * 72h 배양한 Basic+Protein의 S09-04는 약간의 점성이 생김

6. 쌀 단백질 Glutamic Acid Index 향상을 위한 Glutaminase 활성 균주 선별

콩 발효식품: 된장은 간장, 청국장 등과 함께 콩을 주원료로 하여 발효, 숙성시킨 우리나라의 대표적인 발효식품으로 특유한 맛과 향을 지니고 있어 예로부터 널리 애용되어왔다. 된장의 품질을 결정하기 좋은 원료와 제조방법 등 여러 가지 요인이 있으나, 특히 맛과 향은 숙성 과정에서 미생물의 작용에 따라 결정된다. 숙성에 관여하는 미생물로는 *Apergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis* 등이 있으며, 이러한 곰팡이와 각종 세균이 분비하는 proteinase, amylase, lipase 등에 의해서 원료의 단백질과 탄수화물 그리고 지방 등이 가용성 성분으로 분해되어 된장의 맛과 향이 결정된다. 특히 된장 고유의 구수한 맛과 향은 단백질의 가수분해 산물인 아미노산으로부터 생성된다.

Glutaminase: 우리나라 전통 정류인 된장으로부터 Glutaminase 활성이 우수한 균주를 선별하여 저 알리지성 쌀 단백질을 가수분해 함으로서 MSG를 대체할 수 있는 고부가 천연 향료의 대량 생산 기술 개발이 가능하다. Glutaminase 활성뿐만 아니라 Proteinase 활성도 함께 갖는 균주를 확보한다면, 단백질 분해를 통한 Glutamic acid 함량의 증가 및 Umami 특성 향상에도 기여할 수 있는 장점이 있다. 쌀 단백질을 이용하여 천연조미료 소재를 개발하기 위해서는 단백질 효소를 이용하여 쌀 단백질을 분해하여 glutamic acid를 포함한 amino acid를 생산하여야 한다. 효소를 이용한 단백질의 분해는 사용되는 단백질의 분해 효소의 활성에 따라 amino acid의 생산성이 결정되며, 일부 단백질은 완전 분해되지 않고 amino acid의 생산과 더불어 small peptide를 만들게 된다. 대두 단백질의 효소 가수분해물의 small peptide는 Bitter peptide로 불리며 천연 조미료 품질에 나쁜 영향을 미치게 된다. 본 연구에서는 한국식품연구원에서 분양받은 된장 분리 균주 12 종의 Glutaminase 활성 및 Proteinase 활성 균주를 선별하였다 (표 29).

가. Glutaminase 활성 균주 선별

균주를 선별을 위해 한국식품연구원에서 된장에서 분리된 균주 20종을 분양받아 Glutaminase 활성을 측정하였다. 균주를 PCA(Plate Counter Agar)에 배양 후, single colony를 PC medium (Tryptone 5.0g, Yeast Extract 2.5g, Dextrose 1.0g)에 접종하여 200 rpm, 25°C에서 20시간 배양하였다. Glutamine 0.1g/1을 첨가하여 24시간 반응 후, 상등액을 분리하여 Glutamic acid 함량을 측정하였다. Glutaminase의 활성 측정은 L-Glutamic acid assay kit (Megazyme Ltd..)을 이용하였다. 실험결과 F3203, F3204 균주가 가장 높은 활성을 보였다. 따라서 가장 높은 활성을 보인 F3204 균주를 이용하여 Glutamic acid 함량을 증가시키는 실험을 진행하였다.

나. Glutaminase 활성 균주를 이용한 쌀 단백질의 Glutamic Acid 함량 증가

쌀 단백질을 이용하여 Glutamic acid의 함량을 증가시키기 위해, 한식연에서 된장에서 분

표 29. 된장에서 분리된 미생물 균주의 Glutaminase 활성도

균주	A1 흡광도	A2 흡광도	ΔA	Glutamic acid 농도 (mg/l)
1460	0.018	0.156	0.138	1.8
1461	-0.072	0.056	0.128	1.7
F1260	-0.072	0.752	0.824	10.95
F1261	-0.076	0.840	0.916	12.18
F1263	-0.064	0.772	0.836	11.11
F1264	-0.077	0.653	0.730	9.70
F3200	-0.065	0.799	0.864	11.49
F3201	-0.020	0.628	0.648	8.61
F3202	0.004	0.776	0.772	10.26
F3203	0.016	1.126	1.110	14.76
F3204	0.007	1.132	1.125	14.96
F3205	-0.009	0.578	0.587	7.80
F3199	0.004	0.975	0.971	12.91

표 30. Glutaminase 활성에 따른 GA 함량변화

	A1 흡광도	A2 흡광도	ΔA	Glutamic acid 농도 (mg/l)
산분해물	-0.029	0.731	0.757	10.068
효소반응물	-0.020	0.841	0.861	11.451

리된 균주를 분양받아 Glutaminase 활성을 갖는 균주를 선별하였다. 가장 높은 Glutaminase 활성을 갖는 균주의 배양액을 효소액으로 하여 aHVP를 기질로 이용하였을 때, GA 함량을 변화를 측정하였다.

(1) 쌀 단백질 aHVP를 이용한 Glutaminase 반응

추출한 쌀 단백질 0.1g을 6N HCl을 이용하여 24시간 동안 산분해하였다. 산분해 후 NaOH을 이용하여 pH 6.5로 조정하여 효소반응에 기질로 사용하였다. Glutaminase activity가 가장 높은 F3204를 24시간 배양하여 원심분리하여 얻은 상등액을 효소반응에 이용하였다. 배양 상등액 2ml에 쌀 단백질을 산분해하여 만든 기질 1 ml을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 glutamic acid 함량을 측정하였다.

(2) Glutaminase 활성 균주를 이용한 쌀 단백질 천연 eHVP 생산

실험결과 Glutaminase 활성을 갖는 균주의 배양액을 효소 반응액으로 반응한 결과, Glutamic acid 함량이 증가됨을 확인하였다 (표 30). Microorganism Screening 사용된 총 13 균주 중 11 균주의 미생물이 glutaminase의 활성을 지니고 있는 것으로 확인되었다. 그 중 가장 높은 glutaminase 및 proteinase의 활성을 보인 F3204 균주를 분리하여 미생물을 이용한 천연 eHVP를 생산하기 위하여 F3204 균주가 Glutaminase 활성과 Protease 활성을 동시에 보이는지를 확인해보았다. 실험결과 F3204 균주는 두 활성이 동시에 발현되지 않음을 확인하였다. 따라서 두 효소 활성을 동시에 발현시킬 수 있는 medium formulation과 균주의 growth condition 변화에 대한 추가적인 연구가 더 필요하다.

7. 쌀 단백질 Umami 특성 향상을 위한 Transglutaminase 활성 균주 선별

쌀 단백질의 Umami 특성 향상을 위해 된장에서 분리된 균주를 한국 식품 연구원에서 분양받아 γ -Glutamyltranspeptidase(GGT; EC 2.3.2.2) 활성을 갖는 균주를 선별하였다. GGT는 hetero-dimeric enzyme으로 세균을 비롯하여 포유동물에서 발견되며, glutathion 대사에 관여하는 효소이다. GGT는 γ -Glutamyl compound와 반응하여 중간체를 형성하게 되는데, 이 중간체는 pH에 따라서 Reaction Selectivity를 갖게 된다 (그림 24, 25). 중간체가 물과 반응하면 Hydrolysis가 일어나 Glutamic acid가 생성되고, 다른 아미노산이나 Peptide와 반응하게 되면 Transpeptidation이 일어나 새로운 γ -Glutamyl compound가 만들어진다. γ -Glutamyl compound를 일반적으로 Solubility가 높고, Peptidase에 저항성을 갖으며, 맛을 좋게 한다고 알려져 있다. Umami 특성을 증가시키는 것으로 알려진 γ -glutamyl compound의 예로 theanine (γ -L-glutamylethylamide)의 경우 Japanese green-tea의 grade를 결정하는 umami

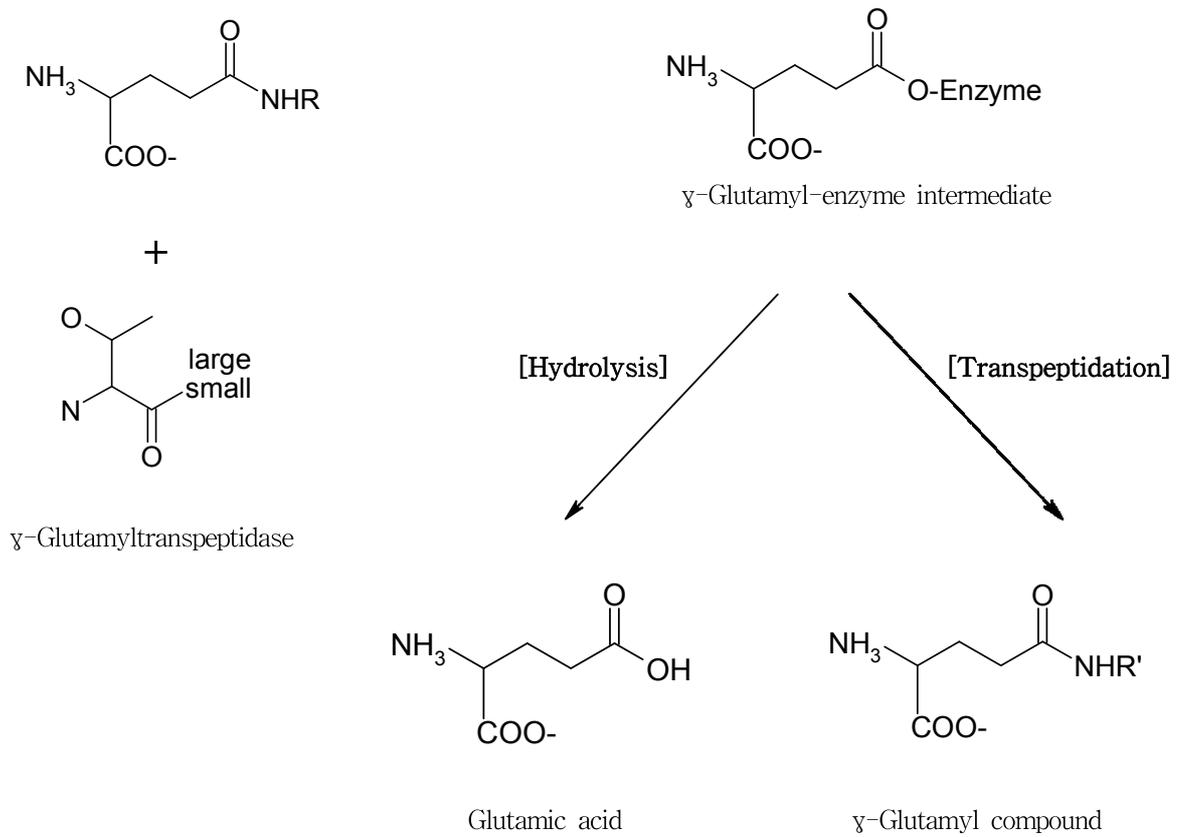


그림 24. Reaction mechanism of γ -Glutamyltranspeptidase

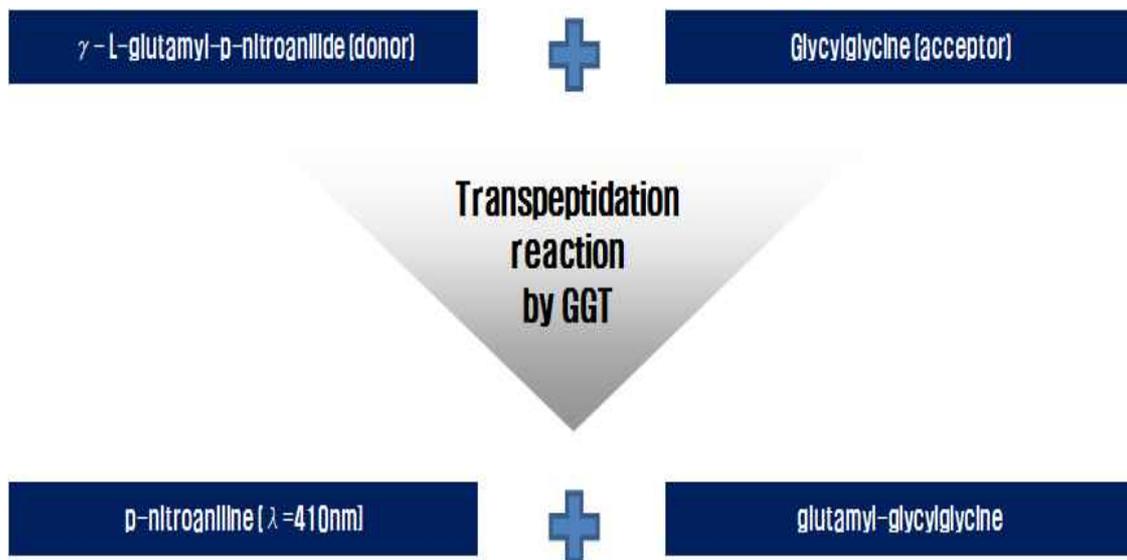


그림 25. Measurement of γ -Glutamyltranspeptidase activity

key-compound로 잘 알려져 있다. 뿐만 아니라 bitter amino acid의 γ -glutamylation은 bitter taste를 효과적으로 감소시키고 또한 상쾌함을 주는 lemons-like sour taste를 부여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 쌀 단백질의 GGT의 처리를 통해 새로운 γ -glutamyl compound를 형성함으로써 umami 특성을 향상시키고 동시에 쌀 단백질 가수분해 시 발생할 수 있는 bitter taste를 줄여 최종 제품의 품질을 향상시킬 수 있어 γ -Glutamyltranspeptidase 활성을 갖는 균주를 선별하게 되었다. γ -Glutamyltranspeptidase 활성을 갖는 균주를 선별하기 위해서 된장에서 분리된 균주를 한국식품연구원에서 분양받아 이용하였다. γ -Glutamyltranspeptidase는 γ -Glutamyl compound와 반응하여 중간체를 형성하게 되는데, 이 중간체는 주변 환경 pH에 따라서 Reaction Selectivity를 갖게 된다. 중간체가 물과 반응하면 Hydrolysis가 일어나 Glutamic acid가 생성되게 되거나, 다른 아미노산이나 Peptide와 반응하게 되면 Transpeptidation이 일어나서 새로운 γ -Glutamyl compound가 만들어진다. γ -Glutamyl compound를 일반적으로 Solubility가 높고, Peptidase에 저항성을 갖으며, 맛을 좋게 한다고 알려져 있다. 따라서 γ -Glutamyltranspeptidase를 갖는 균주를 이용하여 HVP를 생산하여 식품 소재로 응용 시 도움이 될 수 있는 특성을 갖게 되므로 γ -Glutamyltranspeptidase 활성을 갖는 균주를 선별하게 되었다.

가. Transglutaminase 활성 균주 선별

한식연에서 분양받은 14종의 균주를 배양액(Tryptone 5 g/L, Yeast extract 2.5 g/L, Dextrose 1 g/L)에서 30 °C, 200 rpm에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 배양액을 10,000 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 상등액을 분리하여 효소액으로 이용하였다.

나. γ -Glutamyltranspeptidase activity 측정 방법

50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 5 mmol/L γ -Glutamyl-p-nitroanilide, 20 mmol/L glycylglycine, enzyme solution(미생물 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액)을 혼합하여 37 °C에서 30 분간 반응시켰다. 0.1 mol/L HCl을 첨가하여 반응을 종결시키고, 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질 용액은 L- γ -Glutamyl-p-nitroanilide 0.00285 g, 2 N HCl 20 μ l, 1 M acetate-sodium acetate buffer (pH 6.0) 1 mL, 2 N NaOH 20 μ l를 섞어 증류수로 10 mL을 맞추어 준비하였다.

다. Glutamyltransferase standard curve 및 역가 계산

Glutamyltransferase의 standard curve (그림 26)를 그려서 아래의 식을 이용하여 역가를 계산하는데 사용하였다.

umol/ml	OD ₄₁₀
0	0
0.025	0.088
0.05	0.155
0.075	0.229
0.1	0.322
0.15	0.455

glutamytransferase standard curve

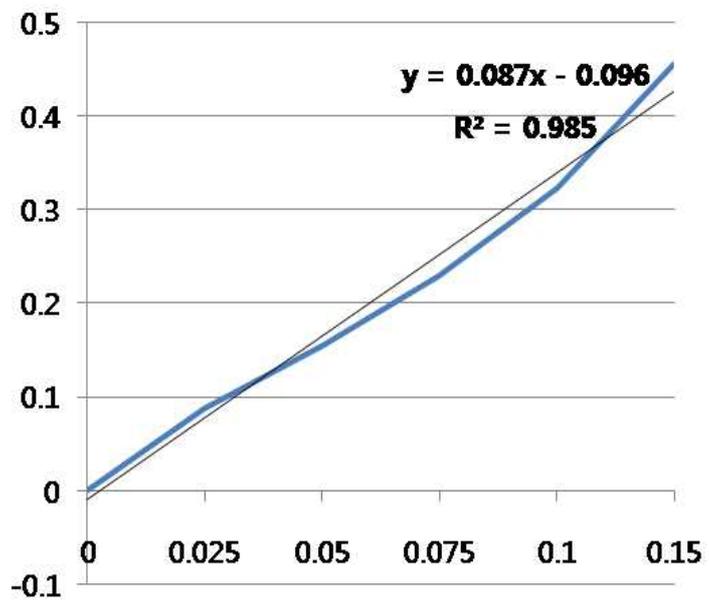


그림 26. Glutamytransferase standard curve

$$F = 12.579 \text{ umol/ml}$$

$$\text{글루타미나아제 역가 (GSU/g)} = (A_s - A_b) \times F \times D$$

1 glutaminase unit(GSU) : 1분간 1umol의 p-nitroaniline을 유리시키는 효소의 양

As: 효소 시험 용액의 흡광도

Ab: Blank의 흡광도

F: 표준곡선에서 얻어진 흡광도 차가 1.000일 때의 p-nitroaniline 농도

D: 검체의 희석 배수

라. Glutamyltransferase 활성균주의 Transglutaminase Activity

총 14종의 균주 (12종 Bacteria, 2종의 Fungi)에서 약 0.3-2.6 GFU/mL의 역가를 가지고 있음을 확인하였다 (표 31). 곰팡이의 경우는 상등액을 분리하여 역가를 측정 시 수치가 매우 낮아서 결과에 포함시키지 않았으며, 실험결과 F3201과 F3205에서 가장 큰 역가를 보였다. Transglutaminase activity가 우수한 F3205와 Glutaminase activity가 우수한 F3204의 proteinase activity를 조사하여 쌀 단백질 가수분해에 사용하였으며, 그 결과는 그림 정리하였다. F3205와 F3204의 proteinase activity는 24시간에는 F3205가 약 4배정도 높게 나타나는 큰 차이를 보였으나 72시간 후 유사한 activity를 보였다. 두 종의 균주를 이용하여 쌀 단백질을 가수분해한 시료 각각의 glutamic acid 함량을 분석하였을 때, 초기 24시간에는 F3205의 glutamic acid 함량이 F3204를 이용하여 쌀 단백질을 가수분해한 시료보다 높게 나타났으나, 가수분해가 완료된 72시간 후에는 F3205를 이용하여 가수분해한 시료의 glutamic acid 함량이 F3204를 이용하여 가수분해 한 시료에 비해 낮게 나타남을 알 수 있었다. 이는 glutamic acid만을 분석한 것으로 초기 24시간까지는 F3205의 proteinase activity가 F3204보다 높기 때문에 쌀 단백질이 가수분해되어 생성된 glutamic acid함량의 증가와 인과관계가 성립한다. 그러나 24시간이후 glutamic acid 함량은 F3205의 경우 크게 증가하지 않았으나 F3204를 이용한 경우 급격한 증가를 보였다. 최종 생성되는 proteinase activity는 두 균주 모두 유사하였으나, F3204는 glutamine을 glutamic acid로 전환시키는 glutaminase activity가 F3205에 비해 상대적으로 우수하므로 최종 쌀 단백질 가수분해 시료에서의 glutamic acid 함량이 증가한 것으로 보인다. 그러나 F3205의 경우 glutamyltransferase activity가 F3204에 비해 상대적으로 우수한 균주로 새로운 glutamyl compound가 생겼기 때문에 분석이 되지 않은 것으로 사료된다.

표 31. Glutamytransferase 활성균주의 Transglutaminase Activity

	Substrate (ml)	Crude Enz. Extract (ml)	buffer (ml)	OD410	GSU
F1260	0.5 + 0.5	0	1	0.267	1.679
F1261	0.5 + 0.5	2	1	0.261	1.641
F1262	0.5 + 0.5	2	1	0.086	0.036
F1263	0.5 + 0.5	2	1	0.194	1.220
F1264	0.5 + 0.5	2	1	0.240	1.509
F3199	0.5 + 0.5	2	1	0.285	1.791
F3200	0.5 + 0.5	2	1	0.044	0.277
F3201	0.5 + 0.5	2	1	0.381	2.396
F3202	0.5 + 0.5	2	1	0.244	1.535
F3203	0.5 + 0.5	2	1	0.128	0.805
F3204	0.5 + 0.5	2	1	0.193	1.214
F3205	0.5 + 0.5	2	1	0.409	2.572

제 3 절 천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor의 개발

- ◆ 쌀 단백질을 이용한 식품의 개발: 쌀 단백질은 생산 공정에 따라 크게 비수용성 쌀 단백질 (Crude Rice Protein)과 상대적으로 수용성이 높은 쌀 단백질 분해물 (Protein Hydrolysate)로 구별된다.
- ◆ 천연 HVP의 물리적/화학적 특성에 따른 다른 식품의 응용 및 천연 Hydrolyzed Product의 관능평가에 따른 시제품의 개발하였다.
- ◆ 천연 조미료 Formulation Process: 용도에 따른 다양한 천연 소재의 조합을 통한 천연 Savory Flavor 조미료 생산하였다.

1. 쌀 단백질을 이용한 HVP의 관능검사 기준 설정 및 제품 생산 기준 설정

가. 관능평가 기준 설정을 위한 실험실 수준의 관능검사 실시

(1) Commercial HVP의 관능평가

쌀 단백질을 가수분해한 시료와 비교하기 위하여 밀 글루텐을 가수분해하여 제품화된 시료를 수집하여 색, Umami, 쓴맛의 정도를 중심으로 세종대학교 식품공학과 대학원생 8명에게 관능검사를 실시하였다. 각 시료는 관능검사용 흰색 컵에 담아 제시하였으며, 하나의 시료를 맛보고 물로 입을 씻어낸 후 약 5분간의 시간간격을 두고 다음 시료를 맛보게 하였다. 5가지의 시료를 1에서 5까지의 순위를 정하도록 하였고, 그 결과는 Basker의 최소유의성검정표를 사용하여 분석하였으며, 5% 수준에서 유의성이 인정되었다. 표 와 같이 이미 제품화된 밀 글루텐 가수분해 시료의 umami는 J사의 제품이 가장 우수하였으며 관능적 특성에 나쁜 영향을 주는 bitterness 또한 J사의 제품이 가장 낮은 점수를 받았다. 이에 비교하여 N사의 제품은 Umami의 강도는 가장 낮고 bitterness는 가장 높았으며 색도 역시 가장 진하였다. 결과적으로 J사의 제품은 umami는 강한 반면 bitterness는 약하며, 색도는 5가지 제품 중 강하지도 약하지도 않아 첨가물로 사용에도 적합하여 시판되는 제품 중 가장 우수한 제품으로 선정되었으며, 이를 쌀 단백질 가수분해물과 비교분석하는데 이용하였다. 관능적 특성 평가와 함께 YSI chemistry analyzer를 이용하여 시료를 glutamic acid의 함량을 분석하였다. Glutamic acid 함량의 기기분석 결과는 표 32, 표 33과 표 34에 정리 하였다.

표 32. 대두 단백질/ 탈지대두/ 밀 gluten eHVP의 관능적 특성 평가

대두단백/ 탈지대두/ 밀 gluten eHVP	관능적 특성
천연조미료 formulation	Limited Umami Character : Lower Glutamic acid index Required Masking "Bitter" Flavor
Soy off-flavor	Residual " Beany Flavor" Fatty acid Oxidation : off-flavor development
Wheat Gluten	Microbial Contamination due to limited microbial control of wheat gluten(High agglomeration)
Enzyme Digestion	Lower Digestibility by Commercial Proteases ✓Lower Glutamic acid liberation ✓Bitter polypeptide formation

표 33. 시판 밀 글루텐 가수분해물의 관능검사 결과(p<0.05)

Sample	Color	Umami	Bitterness
J사의 eHVP	3 ^{abc}	1 ^d	5 ^g
C사의 eHVP	1 ^a	3 ^{def}	3 ^h
M사의 eHVP	2 ^{ab}	2 ^{de}	4 ^g
A사의 eHVP	4 ^{bc}	4 ^{ef}	2 ^h
N사의 eHVP	5 ^c	5 ^f	1 ^h

표 34. 시판 밀 글루텐 가수분해물의 기기분석 결과(dry based)

	GA conc. (g/L)	Glucose conc. (g/L)
J사의 eHVP	13	0
C사의 eHVP	4.5	0.2
A사의 eHVP	7.8	1.3
N사의 eHVP	2.7	0

(2) 쌀 단백 aHVP 및 eHVP의 관능평가

쌀 단백질로 생산된 aHVP와 eHVP의 관능평가 기준을 설정하기 위하여, Rice protein powder와 aHVP, aHVP-24hr, aHVP-48hr, aHVP-72hr, eHVP-A eHVP-N, eHVP-S를 시료로 하여 실험실 수준의 관능평가를 실시하였다. 또한 기존 대두 단백/탈지 대두/ 밀 글루텐을 이용한 eHVP의 관능검사를 실시하여 비교분석하였다. 관능평가를 위한 패널로는 식품공학을 전공한 남녀 7명이 참여하였으며, 조미소재 개발을 위한 독특한 관능적 특성을 찾아내기 위해 (주)유니크 및 (주)농심의 전문가 패널에 의해도 관능평가를 진행하였다. 각 시료는 일반 먹는 물에 0.1% 희석하여 제공하였다. 각 평가의 결과는 표 10에 정리하였다.

(3) 쌀 단백질 제품 생산의 기준 설정

관능평가를 바탕으로 하여 쌀 단백질을 이용한 HVP 제품 생산의 기준을 설정하였다. 기존 탈지대두 및 Wheat gluten을 이용한 HVP가 가지는 문제점은 효소 가수분해물인 small peptide가 Bitter peptide로 불리며 천연 조미료 품질에 나쁜 영향을 미치는 것이다. 따라서 관능검사 실시를 통해 bitter taste의 유무를 파악하고 최소화하는 쌀 단백질을 이용한 HVP 생산 기준을 설정하여 기기분석 및 관능평가를 하였다.

2. 상업적 eHVP의 관능평가 및 기기분석

가. 상업적 eHVP의 관능평가 실시

Large scale로 생산한 eHVP의 기호도를 평가하기 위하여 J사에서 생산하고 있는 eHVP와 상업용 eHVP, N사에서 생산하는 방식대로 Peptidase R, Prote AX, Glutaminase를 이용하여 생산한 eHVP의 관능평가를 실시하였다. 식품 공학을 전공한 5명을 선정하여 실험 목적을 설명하고 각 eHVP의 단맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛, 전체적인 맛에 대하여 9등급의 채점법을 이용하여 평가하게 하였고 관능평가 시료로는 eHVP를 1g/100ml로 녹여 Salt meter(대윤계기산업(주), model:HDS 1024, Korea)로 염도를 측정하여 그 중 가장 높은 염도에 맞게 NaCl을 첨가하여 염도를 맞춘 후, 염도가 0.2%가 되도록 희석하여 사용하였다. 평가 결과는 전체적인 맛에 대하여는 0-매우 좋지 않다, 3-좋지 않다, 5-보통이다, 7-좋다, 9-매우 좋다고 표시하게 하였고, 나머지 항목에 대해서는 0-없다, 3-약하게 감지할 수 있다, 5-보통 감지할 수 있다, 7-강하게 감지할 수 있다, 9-매우 강하게 감지할 수 있다고 표시하게 하였다. 이렇게 얻어진 자료를 분산분석(ANOVA) 및 Durcan의 다범위 검정을 통해 유의성을 검정하고 시료들 간에 다중비교분석을 하였다.

각 eHVP에 대한 관능검사 결과는 (표 35)과 같다. 단맛, 신맛, 쓴맛은 유의적인 차이가 없었고 감칠맛과 전체적인 맛은 1%의 유의적인 차이로 J사에서 생산하는 eHVP가 다른 것에 비하여 높은 것으로 나타났다. 감칠맛은 J사의 eHVP가 가장 높게 나타났고, N사의 방법으로 생산한 eHVP와 상업용 eHVP는 비슷한 정도의 감칠맛을 가진 것으로 나타났고 전체적인 맛은 J사의 eHVP, N사의 방법으로 생산한 eHVP, 상업용 eHVP 순으로 높게 평가 되었다 (그림 27).

나. 상업용 eHVP의 이화학적 평가

상업용 eHVP를 유도체화 하여 HPLC로 분석하여 얻은 유리 Amino acid양과 총 Amino acid양, 유리 Amino acid와 총 Amino acid양을 비교한 가수분해율, Glutamic acid의 조성비율과 kjeldahl 질소 분석법을 이용하여 얻은 상업용 eHVP의 TN-value등은 다음과 같다(표 36). 상업용 eHVP와 N사의 방법으로 생산한 eHVP는 유리 Amino acid양과 총 Amino acid양, 가수분해율, TN-value에서 작은 차이를 보여 N사에서 생산한 eHVP보다 조금 떨어졌지만, Glutamic acid 조성 비율에서는 상업용 eHVP가 N사의 방법으로 생산한 eHVP 보다 좋은 것으로 나타났다.

다. 관능평가 결과

쌀은 전 세계 인구의 50%가 주식으로 사용하고 있는 만큼 다른 곡류에 비해 알러지를 적게 일으킨다. 이런 쌀에서 분리해낸 쌀 단백질을 이용하여 생산한 eHVP 또한 알러지를 적게 일으키는 Hypoallergenicity이다. 또한 쌀 단백질 HVP는 단백질이 분해되면서 Glutamic acid가 유리되어 감칠맛을 낸다. 그러나 이 과정에서 쓴맛을 내는 Amino acid 또한 유리되는데 우리는 Glutamic acid의 함량을 높여 감칠맛을 주고, 쓴맛은 적게 느낄 수 있도록 하는 효소로 Protease A와 Flavourzyme을 선택하였고 이 효소들을 이용하여 상업적 eHVP를 생산하였다. 상업적 eHVP의 관능평가 결과 현재 시판되고 있는 J사의 eHVP보다는 감칠맛과 전체적인 맛이 조금 떨어지지만, N사에서 사용하는 방법으로 생산한 eHVP와는 비슷한 정도의 감칠맛과 전체적인 맛을 가지고 있다는 것을 알게 되었다. 이 결과로 보아 우리가 생산해낸 상업적 eHVP는 감칠맛을 상승시켜주는 GMP나 IMP같은 핵산물질과 섞어 음식의 감칠맛을 더해주는 조미료나 스낵의 seasoning 등으로 활용 할 수 있을 것으로 예상된다. 이에 관해서는 Unique와 N사에서 eHVP의 활용에 관해 평가하고 있는 중이다.

표 35. 세 종류의 eHVP의 9등급 채점법의 결과

	시료		
	A	B	C
단 맛	2.6	1.8	1.6
신 맛	1.4	0.8	1.4
쓴 맛	2	2	0.8
감 칠 맛	7.2 ^a	4.2 ^b	4.2 ^b
전체적인 맛	6.6 ^a	3.4 ^b	4 ^b

* sample A = J사의 eHVP

* sample B = 상업용 eHVP

* sample C = N사에서 사용하는 방법으로 생산한 eHVP

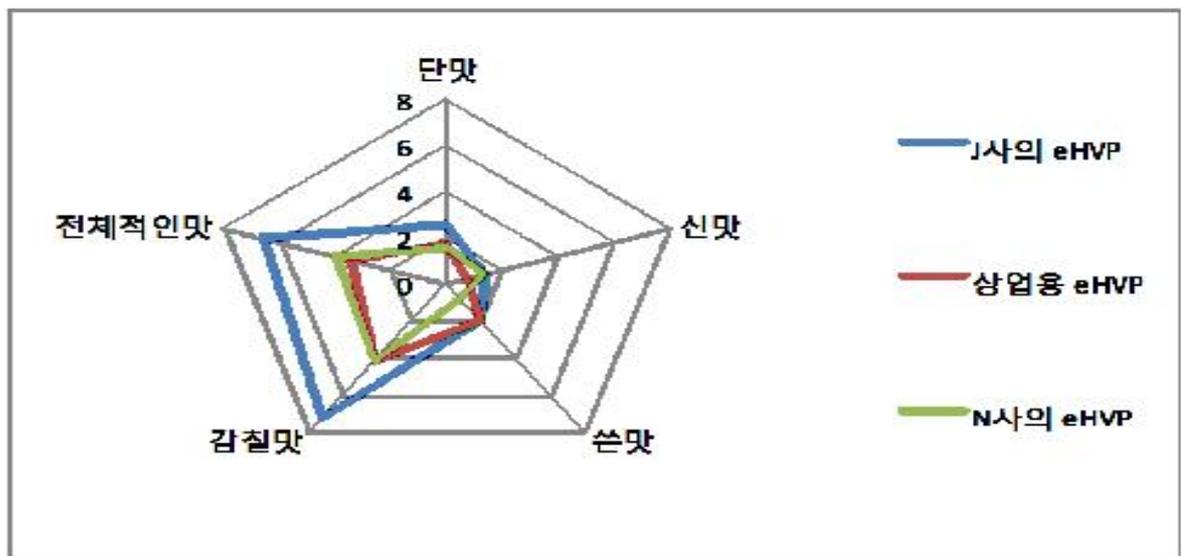
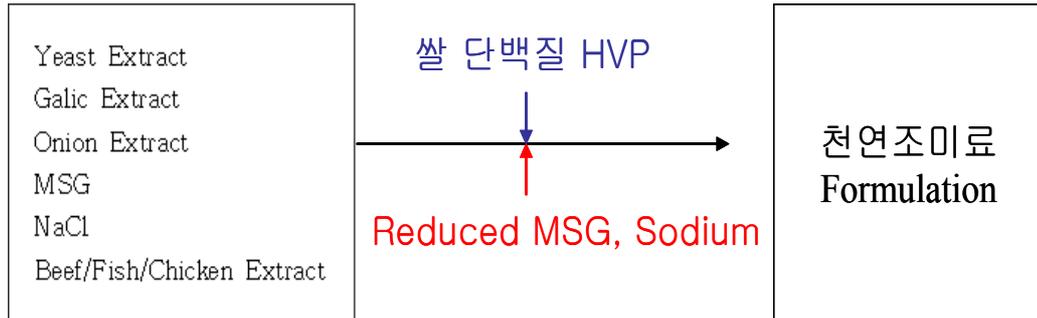


그림 27. 세 종류의 eHVP의 관능평가 결과 비교

표 36. 상업용 eHVP와 N사의 방법으로 생산한 eHVP의 이화학적 평가 비교

	유리 Amino acid(mg/g)	총 Amino acid(mg/g)	가수 분해율(%)	Glutamic acid 조성비율(%)	TN-value(%)
상업용 eHVP	35.87	860	4.17	2.32	7.61
N사의 방법으로 생산한 eHVP	40.20	860	4.67	1.86	8.78

3. 천연 조미료 Formulation Process



천연 쌀 단백질 eHVP를 식품에 적용하기 위해서는 개별 식품의 Umami특성에 따라 다양한 천연 향미소재와 함께 개별적으로 조합되어야 함으로, 현재 (주)유니크와 세종대학교, 그리고 천연 조미료 생산에 관심을 가지고 기술개발 이전에 관심을 가지고 있는 회사를 중심으로 관능평가를 기준으로 천연 조미료 Formulation Process에 따라 천연 조미료를 개발하고 있다. 쌀은 전 세계 인구의 50%가 주식으로 사용하고 있는 만큼 다른 곡류에 비해 알러지를 적게 일으킨다. 이런 쌀에서 분리해낸 쌀 단백질을 이용하여 생산한 eHVP 또한 알러지를 적게 일으키는 Hypoallergenicity이다. 또한 쌀 단백질 HVP는 단백질이 분해되면서 Glutamic acid가 유리되어 감칠맛을 낸다. 그러나 이 과정에서 쓴맛을 내는 Amino acid 또한 유리되는데 우리는 Glutamic acid의 함량을 높여 감칠맛을 주고, 쓴맛은 적게 느낄 수 있도록 하는 효소로 Protease A와 Flavourzyme을 선택하였고 이 효소들을 이용하여 상업적 eHVP를 생산하였다. 상업적 eHVP의 관능평가 결과 현재 시판되고 있는 J사의 eHVP보다는 감칠맛과 전체적인 맛이 조금 떨어지지만, N사에서 사용하는 방법으로 생산한 eHVP와는 비슷한 정도의 감칠맛과 전체적인 맛을 가지고 있다는 것을 알게 되었다. 이 결과로 보아 우리가 생산해 낸 상업적 eHVP는 감칠맛을 상승시켜주는 GMP나 IMP같은 핵산물질과 섞어 음식의 감칠맛을 더해주는 조미료나 스낵의 seasoning 등으로 활용 할 수 있을 것으로 예상된다. 이에 관해서는 Unique와 N사에서 eHVP의 활용에 관해 평가하고 있는 중이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 연구목표의 달성

가. 쌀 단백질 분리 정제 공정의 개발

- * **쌀 단백질 분리 정제 공정:** 국내 해남산 쌀을 사용하여 쌀 단백질 분리 정제 기술을 개발하였다. 쌀 분리 공정은 물리적 (Drum Milling)과 생물학적 방법 (Glycolytic Enzyme Pretreatment)를 통하여 수율이 향상 되었다. 쌀 단백질 분리과정 중 쌀 단백질의 품질에 가장 큰 영향을 주는 쌀 지방은 **Supercritical Carbon Dioxide**을 통하여 효과적으로 제거될 수 있어 쌀 단백질의 품질 향상에 크게 기여할 수 있다 (예, 색상 및 냄새).

나.. MSG 대체를 위해 쌀을 이용한 쌀 단백질 eHVP 생산 기술의 개발

- * **천연 쌀 단백질 eHVP 생산:** 천연 쌀 단백질 eHVP의 생산을 식품에 사용하기 위해서는 상업적으로 구입이 가능한 식품첨가물 grade의 Proteinase와 Glutaminase를 사용해야 하므로, 쌀 단백질 분해를 위하여 수집/구매 가능한 효소를 이용하여 천연 쌀 단백질 eHVP를 생산하였다. 천연 쌀 단백질 eHVP의 이화적 및 관능적 평가를 거쳐 기존의 상업 eHVP와 비교될 수 있는 우수한 천연 조미 소재를 개발하였다.

다. 천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor의 개발

- * **천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 저 알러지성 Savory Flavor:** 쌀 단백질을 이용한 천연 쌀 단백질 eHVP는 저 알러지성 천연 조미소재로, 천연 쌀 단백질 eHVP의 관능 평가 기준을 설정하였으며, 다양한 식품에 응용되기 위한 개별 평가 작업이 진행되고 있다.

2. 연차별 연구내용(계획) 대비 달성도

구분 (연도)	세부 계획목표	실제 수행성과	달성도 (%)
1차 연도 (2009)	천연 쌀 단백질 HVP의 관능평가의 기준설정	<ul style="list-style-type: none"> ● 조미소재개발을 위한 관능적 특성을 찾아내기 위해 식품공학을 전공한 유니크 소속 연구원과 (주)농심의 관능검사 전문가 그리고 세종대학교 대학원생을 패넬로 하여 관능평가 실시하여 이를 바탕으로 쌀 단백질을 이용한 HVP의 생산 기준을 설정함 	100
	쌀 단백질 HVP 제품 생산 기준의 설정	<ul style="list-style-type: none"> ● HPLC분석을 통한 이화학적 특성 분석 및 관능평가를 통해서 HVP 제품 생산의 기준을 설정함 	100
	실험실 수준의 쌀 단백 질 분리를 위한 전처리 공정	<ul style="list-style-type: none"> ● 정미기를 통해 쌀을 4, 8, 12분도로 도정하여 쌀겨와 쌀 껍질을 얻어 쌀 단백질을 추출한 결과 8분도가 최적으로 나타남 ● 쌀겨에서 지방을 제거하기 위한 초임계유체의 최적조건을 설정함 ● 쌀겨를 Solvent를 이용하여 지방을 제거한 후 쌀 단백질을 추출을 추출하였음 ● Supercritical gas extraction을 통한 전처리 조건 확립 	100
	쌀 단백질의 분리, 정제 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 쌀겨에서 쌀 단백질을 분리, 정제함 ● 분도별 쌀겨의 조단백질, 조지방, 탄수화물 함량을 확인하였음 ● 효소처리 및 물리적 처리를 통하여 쌀 단백질 회수율을 향상시킴 	100
	쌀 단백질을 이용한 천 연 HVP 생산 공정 기 술의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 쌀 단백질을 이용하여 aHVP, eHVP 생산 공정의 최적 조건을 확립하였음. ● 미생물을 이용한 eHVP 생산 공정을 개발함 ● Proteinase 및 Glutaminase, Transglutaminase활성을 갖은 균주의 선별 	100
	HVP의 이화학적 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> ● HPLC 분석을 통해 가수분해 후 얻어진 HVP와 eHVP에 다량의 Poly peptide가 함유되어 있음을 확인하였음 	100

구분 (연도)	세부 계획목표	실제 수행성과	달성 도 (%)
2차 연도 (2010)	쌀 단백질 분리 정제 공정의 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ● 쌀 단백질의 회수율의 향상을 위해 물리적 처리의 조건을 확립하여 쌀 도정 기술의 최적화시킴 ● Large-scale 쌀 단백질 분리 정제 공정 개발하고 Supercritical Extraction을 이용한 Defating processing 공정 개발 	100
	쌀 단백질 분리 공정의 Scale-up	<ul style="list-style-type: none"> ● 쌀 단백질 회수 공정을 최적화하기 위해 Spray-Drying, Freeze-Drying을 이용하였음 	100
	천연 쌀 HVP의 이화적 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> ● 이화학적 특성 연구를 위해 HPLC를 이용한 amino acid profiles를 확립하였고, TN/AN ratio을 통한 HVP의 특성 연구 	100
	천연 HVP 생산 공정의 Scale-up	<ul style="list-style-type: none"> ● 원가절감을 위해 상업적 쌀 단백질을 이용한 Scale-up 공정 개발하였고, 효소 반응의 최적화를 위해 Endo/Exo proteinase 조화시켜 pH ratio 에 따른 반응 최적화 및 GA함량을 측정하였음 	100
	천연 HVP의 관능검사 기준 설정 및 제품 생산 기준 설정	<ul style="list-style-type: none"> ● Large scale로 생산된 천연 eHVP의 관능검사 실시하였음 - 조미소재개발을 위한 전문가패널의 관능검사 - Umami Indirect TN/AN - NaCl effect - eHVP 제품생산 기준 설정 	100
	천연 HVP의 물리적, 화학적 특성에 따른 식품의 응용 및 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> ● 천연 조미료 Formulation - eHVP를 이용한 천연 조미료 Formulation - 식품 분야별 적용이 가능한 시제품 개발함 	90

3. 1차년도 지적사항에 대한 조치

지적사항	보완내용
<ul style="list-style-type: none"> ● 쌀 단백질에 대한 알리지 측정내용이 없고, 1, 2년차 연구내용이 대체로 연계성과 참신성이 부족하므로 이에 대해 보완할 것 	<ul style="list-style-type: none"> ● 쌀 단백질에 대한 저 알리지성 특징은 참고문헌에 따라 이미 증명된 사실이기에 별도의 측정실험은 포함하지 않았으며 1차년도에 시행한 연구결과를 바탕으로 2차년도에는 시제품제작 및 생산규모를 확장하였음.
<ul style="list-style-type: none"> ● 목표달성이 미흡으로 기존 쌀 단백질의 분리 정제 방법 등과 차별성이 없으므로 이에 대해 보완할 것 	<ul style="list-style-type: none"> ● 기존의 쌀 단백질의 처리공정과 차별화된 고수율 및 양질의 쌀 단백질 생산 공정의 개발을 위한 생물학적 및 물리적 전처리 공정을 개선하여 쌀 단백질 분리 정제 수율을 향상시켰음.
<ul style="list-style-type: none"> ● 학생인 비전문 패널 7명을 써서 시행한 관능검사 결과는 신뢰도가 떨어지며 2차년도에는 전문패널을 사용할 것을 고려할 것 	<ul style="list-style-type: none"> ● 1차년도 관능평가는 학생패널 뿐만 아니라 (주)유니크와 (주)농심의 조미료소재개발팀의 전문 평가단을 중심으로 Description Analysis를 실시하였음 ● 2차년에는 조미료시제품을 이용한 관능검사를 (주)유니크의 관능검사 전문가 패널을 중심으로 실시하였음
<ul style="list-style-type: none"> ● 관능검사의 구체적인 방법, 설문지 및 통계처리에 의한 데이터 등을 보완할 것 	<ul style="list-style-type: none"> ● 1차년도 실시한 조미료소재개발에 관여하는 적은 수의 전문가 패널을 중심으로 한 묘사분석 검사의 향미프로필 특성을 알아내는 방법으로 관능검사를 실시하였기 때문에 이에 대한 설문지나 통계처리에 의한 데이터는 작성하지 않았음
<ul style="list-style-type: none"> ● 2차년도는 연구 성과물을 산업화할 수 있도록 노력해 주시기 바랍니다. 	<ul style="list-style-type: none"> ● 2차년도에는 (주)유니크를 중심으로 시제품 제작을 통해 산업화에 적용하였음.
<ul style="list-style-type: none"> ● 쌀 단백질 제조 공정의 scale-up과정에서 원가 절감 요인을 찾아 내야 산업화시 가격경쟁력을 갖출 것 	<ul style="list-style-type: none"> ● 쌀 단백질의 원료인 쌀겨(Rice bran)는 버려지는 부산물로서 원가에 대한 상대적 경쟁력을 갖고 있으며, 사업적으로 저렴하게 판매되고 있는 쌀 단백질을 이용한 천연 HVP의 생산은 시장 경쟁력을 가질 수 있음. ● 공정상의 비용절감을 2차년도 Scale-up 공정상에 반영하였음.
<ul style="list-style-type: none"> ● 연구성과목표의 계획대비 부족한 실적을 차년도에 보완할 것 	<ul style="list-style-type: none"> ● 지속적인 공정개발이 진행하여 연구 목표 실적을 달성하였음.

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 식물성 단백질 분리

최근 환경변화에 따라 인류의 단백질 공급원으로 동물성 단백질을 대체할 수 있는 식물성 단백질에 대한 관심이 집중되고 있어, 본 연구결과로 개발된 쌀 단백질 분리 정제 공정이 응용될 수 있다.

2. 저 알러지성 식품 개발

쌀 단백질 분리 공정 개발 과정 중, 벼는 쌀 단백질, 쌀 전분, 쌀 지방으로 분리된다. 이에 따라 쌀 단백질은 본 연구에서 목표로 하는 저 알러지성 천연 식품소재의 개발뿐만 아니라, 쌀 단백질을 이용하여 알러지 유발성 콩, 밀과 유단백질을 대체하여 저알러지성 식품 개발에 응용될 수 있다. 또한 쌀 단백질 분해과정에서 추출된 쌀 지방 (미강유: Orygenol)은 항산화 효과가 커 천연 항산화제로 다양한 식품에 적용될 수 있어 소비자의 천연 식품에 대한 선호도에 따른 다양한 천연 식품 개발에 응용될 수 있다.

3. 천연 향료 개발

전세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있다. 쌀 단백질을 이용한 천연 eHVP의 생산은 세계적으로나 국내의 국민소득의 증가와 천연 식품 및 향장 소재의 요구, 소비자의 고급화 추세로 인한 천연 향료가 안정성과 기호도에서 선호되는 경향으로 고부가의 천연 향료의 생산은 수입대체 효과와 더불어 국내 향장 업계의 국제화에 중요한 기여를 할 수 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 저 알러지성 쌀 단백질의 생산 공정 개발

쌀 단백질의 대량생산 기술이 개발되어, 분리 정제된 천연 쌀 단백질의 다양한 물성을 이용하여 다양한 식품군에 적용하여 고부가의 저 알러지성 식품의 개발이 가능하기 때문에 면역 체계가 확립의 미비한 유아용 식품개발에 적용한다면 국제 경쟁력의 확보가 가능하다.

2. 저 알러지성 쌀 단백질 HVP를 이용한 MSG 대체용 천연 향료/조미료의 개발

저 알러지성 쌀 단백질을 이용한 고부가의 HVP를 생산함으로써 쌀 단백질 가수 분해물은 아미노산 중 glutamic acid의 함량이 높아, 최근 식품에 사용이 제한되고 있는 MSG (Mono Sodium Glutamate)의 대체 **고부가의 천연향료**에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 면역성 질환의 일종인 아토피 예방을 위한 식품에 첨가할 수 있어 쌀 소비량의 감소에 따른 농가 소득을 보전할 수 있는 가능성을 제공한다.

3. 저 알러지성 천연 쌀 단백질 HVP를 이용한 Savory Flavor의 개발

최근 시판되고 있는 MSG 대체 천연 HVP는 대부분 콩 단백질과 밀 단백질을 이용하여 제작되나, 미국 등 선진국에서는 콩 단백질 및 밀 단백질에서 유래하는 알러지로 인하여 사용이 제한되어, 쌀겨를 이용한 저 알러지성 천연 단백질원을 이용한 천연향료 및 조미료 개발은 국내외 경쟁력을 가질 수 있다.

제 2 절 성과활용 계획

1. 국제 경쟁력을 가질 수 있는 천연향료 및 조미료 생산기술에 활용

전세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 세계적으로나 국내의 국민소득의 증가와 천연 식품 및 향장 소재의 요구, 소비자의 고급화 추세로 인한 천연 향료가 안정성과 기호도에서 선호되는 경향으로 고부가의 천연 향료의 생산은 수입대체 효과와 더불어 국내 향장 업계의 국제화에 활용될 수 있다.

2. 천연 식품 신소재 개발을 통한 국내산 쌀의 소비 증가

국내의 식품 소비 패턴의 변화에 따른 쌀의 소비량의 감소와 FTA를 중심으로 한 국제 자유 무역의 확대에 따른 값싼 쌀을 비롯한 외국 농산물의 수입이 급증하여 쌀 가격의 하락 추세를 지속할 예정이지만, 국민의 식량 자급률 확보를 위한 국내 쌀 농가의 지속적인 유지 및 생산 기반의 확립은 절대적으로 필요하여, 새로운 고부가의 쌀 생산 및 쌀 가격의 하락에 따른 농가의 소득을 보전 방법으로 개발될 수 있다. 저 알러지성 식품개발을 위한 쌀 단백질 및 쌀겨 oil 및 쌀 전분의 생산은 다양한 의 식품 소재 생산을 위하여 사용이 가능하여 미국을 비롯한 선진국 에서 개발되고 있는 고부가의 식품 개발 (예, 유아용 식품개발)에 사용될 수 있다. 국내산 쌀의 부가 가치를 추가하여 수익성이 큰 식품소재의 개발로 전환되어 농가의 수익 안정성을 이룩할 계기를 줄 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 쌀

곡물: 곡물류는 세계적으로 가장 중요한 농산물로, 전체 칼로리의 60% 이상을 차지하고 있으며, 특히 아시아 지역에서는 중요한 단백질원으로 이용되고 있음.

1. 쌀

쌀: 쌀은 밀, 옥수수 등과 함께 가장 많이 생산되는 농산물로서,

- 곡물 중 쌀은 밀과 옥수수와 함께 가장 중요한 곡물로서 전세계 곡물 소비량의 75% 이상을 차지하고 있음.
- 전 세계적으로 쌀은 연간 560,000,000 metric ton 이상 (2003년도 기준) 생산되고 있으며, 한국에서도 연간 5,000,000 metric ton 이상을 생산하고 있음.
- 소비자의 영양 및 고기능성 식품의 선호도에 따라 쌀의 생산량은 최근 20여년 동안 전세계적으로 10배 이상 늘어나, 동결 식품으로 개발된 쌀 제품 자체만으로도 시장 규모가 \$2.2B로 증가됨 (2000).
- 쌀은 전통적으로 주식으로 사용되고 있었으나, 미국을 비롯한 선진국을 중심으로 알러지 유발성의 콩, 밀과 유제품을 대체할 수 있는 소재로 인식되어, 알러지 대체 물질로 많은 분야의 식품에 사용되고 있으며, 물성을 조절할 수 있는 식품공학의 기술 개발에 따라 그 적용분야가 급속도로 빠르게 확산되고 있음.
- 밀과 옥수수등과 비교하여, 쌀은 대부분 식용으로 사용되어, 잠재적으로 경제적 가치를 제공할 수 있는 양질의 쌀 단백질에 대한 연구 및 식품 개발에 대한 노력이 미진하였음.
- 최근 까지는 영양학적으로 쌀 소비에 있어 가장 중요한 문제는 “단백질 부족 (Protein Deficiency)”이었으며 특히 유아 및 여성의 영양 공급의 한계를 지니고 있어 지속적으로 쌀 소비량의 향상시키기에는 한계를 지님.

2. 쌀을 이용한 새로운 고부가 식품소재 개발

최근 식량 공급에 대한 국제교역의 확대가 활발하여, 전통적인 쌀 생산국인 동남아시아 국가를 비롯하여 미국 등의 선진국도 영양성분 및 기능성 식품소재의 관심이 많아 쌀을 이용한 새로운 고부가 식품소재의 개발이 활발하게 진행되고 있음. 쌀과 관련된 고부가의 식품소재 개발은 크게 벼를 원료로 하여, 쌀 전분, 쌀 단백질, 쌀 지방과 기능성 물질로 크게 구분되어 주식을 위한 쌀 제품과 구별되고 있다. 쌀과 관련하여 미 농무성 연구소를 중심으로, 1) 우수한 영양 및 기능성 성분을 극대화하기 위한 종자 계량 연구와 2) 소비자의 고품질 제품의 선호도에 따른 고부가

쌀 소재 개발 연구 (Value-added rice products) 가 빠르게 진행되고 있음.

- 쌀 전분 및 쌀 단백질 분리 기술
(Physical process for rice starch and protein separation)
- 현미 조리 기술
(Physical process for quick-cooking brown rice)
- 쌀 단백질을 이용한 제빵제조 기술
(Gluten-free rice bread)
- 쌀 전분을 이용한 저 지방 제품
(Low-oil uptake rice batter and donuts)
- 쌀겨 및 벼 부산물 제품
(Fungi-free rice straw)

제 2 절 천연 식물성 단백질 eHVP

쌀 단백질 (Rice Protein): 전세계의 쌀 생산량의 증가에 따른 양질의 단백질원으로 쌀 단백질에 대한 양적 및 질적 관심이 다시 집중되고 있어 새로운 식품소재로 시장에 새롭게 접근하고 있음.

1. **저 알러지성 쌀 단백질:** 콩 및 밀 단백질, 우유 단백질은 Allergy 유발물질로 알려져 있으며, 가수분해 될 경우에도 Allergy를 유발하는 물질을 포함하고 있다고 보고되어 있다. 이에 따라 미국 식약청 FDA 및 EU EFSA의 규정에는, 이러한 단백질을 식품에 사용할 경우 식품의 포장지에 표기하도록 규정하고 있다. 이에 반해 쌀은 아시아 지역을 중심으로 가장 많이 소비되는 곡물로, 상대적으로 저 알러지성 단백질 (Hypoallergenic Protein) 을 함유하고 있어, 천연 향료의 원료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 면역체계가 완전하게 구축되지 않은 유아 및 어린이들을 위한 식품의 개발에 이용되어 아토피 (Atopic Dermatitis)를 비롯한 면역성 질환을 예방할 수 있는 식품에 이용될 수 있음.
2. **단백질 가수 분해물 (Hydrolyzed Vegetable Protein (HVP)):** 단백질 가수 분해물은 천연 향료 생산에 중요한 한 부분으로 다양한 식품의 Processed Savory Food Product로 사용되고 있으며,
 - 가. **천연 향료:** 단백질 가수 분해물은 아미노산 중 glutamic acid의 함량에 따라, 최근 식품에 사용이 제한되고 있는 MSG (Mono Sodium Glutamate)의 대체 **고부가의 천연향신료**로 그 사용량이 급격하게 증가하고 있음.
 - 나. **MSG 대체 천연 HVP:** 최근 시판되고 있는 MSG 대체 천연 HVP는 대부분

콩 단백질과 밀 단백질을 이용하여 제작되나, 미국 등 선진국에서는 콩 단백질 및 밀 단백질에서 유래하는 알러지로 인하여 사용이 제한되어 대체 농작물을 이용한 저 알러지성 천연 단백질원의 개발에 많은 연구를 집중하고 있음.

제 3 절 천연 향료

천연 향료의 생산의 경제적 가치: 전세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 세계적으로나 국내의 국민소득의 증가와 천연 식품 및 향장 소재의 요구, 소비자의 고급화 추세로 인한 천연 향료가 안정성과 기호도에서 선호되는 경향으로 고부가의 천연 향료의 생산은 수입대체 효과와 더불어 국내 향장 업계의 국제화를 기대할 수 있음.

1. 향료산업

향료산업은 반과학 반예술 산업 (Half science, half art industry)이라고 불리는 독특한 분야의 산업으로서, 고부가가치가 창출되며 과 동시에 물류비용이 비교적 적게 들고 환경 친화적 분야이며, 크게 음료수, 빙과, 담배 등 식품에 들어가는 식향 (flavor) 과 향수, 화장품, 세제, 비누 등에 들어가는 향장(fragrance)으로 나뉨.

가. 향료산업의 특성

향료산업은 다양한 분야의 학문 (농학, 생물학, 생리학, 유기화학, 분석화학, 유전학 등)과 다양한 분야 (농업, 원예, 유기화학, 정밀화학, 식품가공학, 위생 등) 산업의 경계점에 존재하는 특수한 산업임. 특히 향료산업의 특성상 유능하고 재능이 있는 개인적인 조향 능력에 크게 좌우된다는 점, 그리고 상대적으로 부가가치가 높아, 원료에 대한 의존도가 낮으므로, 자원이 부족하면서도 우수한 인재를 갖고 있는 우리나라에 아주 적합한 산업으로 판단됨.

- 고부가가치 창출 산업임
- 인종에 따른 피부특성, 생활문화 의존성이 강한 산업임
- 원/부재료의 수입의존도가 높음
- 다품종소량 생산체제임
- 다양한 유통구조를 가지고 있음
- 물류비용이 비교적 적음

- 미래지향적이며 영속 발전적인 산업

나. 향료산업의 시장 현황

1) 세계 향료업체의 시장규모

전 세계의 향 시장규모는 US\$ 180억 규모이며, 1999-2010년 사이에 연평균 5% 이상의 성장을 이루었다. 아시아 향료 시장의 경우 생활수준의 향상으로 인해 연평균 10%이상의 높은 성장률을 나타남.

2) 천연향료의 원료 동향

대부분의 주요 향료업체들은 Formulation을 중심으로 한 조합향을 생산 판매하거나 제한된 향 원료 제조하고 있다. 향 원료 중에서 4,000여 향 원료는 인도나 중국의 소규모의 업체를 중심으로 생산되고 있음. 하지만 전통적으로 이용되어온 향식물의 천연 추출물은 다음과 같은 한계로 인하여 세계적인 시장의 요구에 부응하기에는 어려움이 있음.

- 천연 추출물의 질과 공급은 자연 재해, 생산국의 정치적 불안정 및 사회 및 경제적 불안 요소로 인하여 매년 일정하지 않다.
- 천연 추출물은 제품의 속성상 그 안정성이 떨어져 보관 및 운반에 한계를 가지고 있다.
- 천연 추출물은 상대적으로 향료로서의 활성이 낮아 가격이 비싸 사용이 제한된다.

2. 천연향료에 대한 소비자의 기호도

향 원료 중 70%는 유기합성을 통한 합성원료로 대체되고 있으나 합성원료는 천연 원료에 비해 품질이 떨어지고, 석유화학 제품에서 유래될 수 있는 잠재적인 발암물질 등을 포함하는 단점이 있다. 이러한 합성원료의 단점과 경제발전에 의한 생활수준의 향상으로 소비자의 천연식품에 대한 요구는 증가하는 추세이다. 그에 따른 F+F 업체의 천연향료의 공급은 새로운 Marketing Strategy로서 세계적인 Trend에 능동적으로 대처하고 있음. 전 세계의 Flavor and Fragrance의 Market규모는 2009년 기준 \$20 Billion으로, 이중 잠재적으로 10%의 전체 Market product가 미생물/효소를 이용한 천연 소재를 이용한 천연제품으로 교체될 것으로 예측된다.

제 7 장 참고문헌

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenesulfonic acid. *J.Agric.FoodChem.*27:1256-1262.
- Ames, J.M. 1992. The Maillard reaction, pp. 150-154. In B.J.F. Hudson, ed. *Biochemistry of food proteins*. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Ansharullah, Hourigan, James A., Chesterman and Colin F. 1997. Application of Carbohydrases in Extracting Protein from Rice Bran. *Journal of the science of food and agriculture* 74:141-146.
- Association of official analytical chemist. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Washington, D. C.
- Beak, H.H and K.R. Cadwallader. 1995. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *J.FoodSci.*60:929-935.
- Cruz Lourdes J., Cagampang Gloria B. and Juliano Bienvenido O. 1970. Biochemical Factors Affecting Protein Accumulation in the Rice Grain. *Plant physiology* 46:743-747.
- FitzGerald R.J. and Cuinn G.O. 2006. Ezymatic debittering of food protein hdyrolysates. 24: 234-237.
- Fujimaki, M., T. Tsugita and T. Kurata. 1977. Fraction and identification of volatile acids and phenols in the steam distillate of rice bran. *Agric.Biol.Chem.*41:1721-1725.
- Gnanasambandam, R. and Hettiarachchy, N. S. 1995. Protein Concentrates from Unstabilized and Stabilized Rice Bran: Preparation and Properties. *Journal of food science : an official publication of the Institute of Food Technologists* 60:1066.
- Hamada, J.S., A.M. Spaniera., J.M. Bland and M. Diackb. 1998. Preparative separation of value-added peptides from rice bran proteins by HPLC. *J.Chromatogr.*4827:319-327.
- Helm RM, Burks AW (1996) Hypoallergenicity of rice protein *Cereal Foods World* 41: 839-43.

- Hoyle, N.T and J.H. Merritt. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupeaharengus*). *J.FoodSci*:59:76-79.
- Hideyuki S., Kenji K., Hidehiko K. 2004. Enzymatic synthesis of γ -Glutamylvaline to improve the bitter taste of valine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 577-580.
- Hideaki T., Masumi K. Yasuo N. 2001. Allergens in major crops. *Nutrition Research* 21: 925-934.
- Kyung Sook Choi and Hei Soo Rhee. 1994. Characteristic of Doenjang made from Different Material and Ratio of Koji. *Korean J. Soc. Food Sci.* 10:39-44.
- Lee J.Y., Lee H.D., Lee C.H. 2001. Characterization of hydrolysates produced by mild-acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. 34: 217-222.
- Lin, Chung-Liang, Lin, Hui-Chiao, Wang, Ai-Yu and Sung, Hsien-Yi 1999. Purification and Characterization of an Alkaline Invertase from Shoots of Etiolated Rice Seedlings. *The New phytologist* 142:427-434.
- Mandac B.E. and Juliano B.O. 1978. Properties of prolamin in mature and developing rice grain. *Phytochemistry*. 17:611-614.
- Mark O., Paul B., Hong X., Guy S. 2004. Receptors for bitter, sweet and umami taste couple to inhibitory G protein signaling pathways. *European Journal of Pharmacology* 489: 139-149.
- Prakash, J. and Ramanatham, G. 1994. Effect of stabilization of rice bran on the extractability and recovery of proteins. *Die Nahrung* 38:87.
- Ruth L.H., and Flavia M.N. 1998. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. *Food Research International* 46: 3009-3015.
- Sangita P.S, Ghugre S.A. 2005. Satiety from rice-based, wheat-based and rice-pulse combination preparations. *Appetite* 44: 263-271.

- Shanhu T., Navam S.H., Thomas H.S. 2002. Protein extraction from heat stabilized defatted rice bran 1. physical processing and enzyme treatments. 50: 7444-7448.
- Shih, F. F., Champagne, E. T., Daigle, K. and Zarins, Z. 1999. Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour. *Die Nahrung* 43: 14-18.
- Sugunya W., Tinakorn S., Suppachai C. 2003. Identification and quantitation of the rice aroma compound 2-acetyl-1-pyrroline, in bread flowers (*Vallaris glabra* Ktze). 51: 457-462.
- Silvestre M.P.C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry* 2: 263-271.
- Van Bergen, C.A., Collier, P.D., Cromie, D.D.O., Lucas, R.A., Preston, H.D and D.J. Sissons. 1992. Determination of chloropropanols in protein hydrolysates. *J.Chromatogr.* 589:109-119.
- Van Hooser, B. and Crawford, L. V. 1989. Allergy diets for infants and children. *Comprehensive therapy* 15:38-47.
- Weir, G.S.D. 1992. Proteins as a source of flavor, pp. 363-408. In B.J.F. Hudson, ed. *Biochemistry of food proteins*. Elsevier Applied Science, London and NewYork.
- Wojtek P.M. and Brian J.S. 1999. Strategies for analysis of electrophoretically separated protein and peptides. *Analytica Chimica Acta* 383: 27-46.
- Yim M.H. and Lee J.H. Functional properties of fractionated soy protein isolates by protease from Meju. *Food Science and Biotechnology* 4: 253-257.

첨부> 쌀 단백질의 Enzyme Digestion Profiles

C사 A-A	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
Asp	29625.46	0.94%	46783.73	0.95%	52525.11	0.85%	77878.16	1.01%
Asn+Ser	263062.45	8.31%	570635.05	11.61%	733617.07	11.90%	799194.41	10.36%
n.a.								
Glu	16081.37	0.51%	17958.93	0.37%	23735.52	0.38%	189807.24	2.46%
n.a.								
Gly	42971.01	1.36%	154268.24	3.14%	215695.01	3.50%	280202.09	3.63%
Gln+His	242920.12	7.68%	376718.62	7.67%	389154.22	6.31%	468906.73	6.08%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	467817.93	14.78%	621954.86	12.66%	782991.56	12.70%	999896.69	12.96%
Thr	217796.55	6.88%	287307.02	5.85%	372577.30	6.04%	465847.21	6.04%
n.a.								
Ala	100219.15	3.17%	126327.42	2.57%	172660.52	2.80%	218584.76	2.83%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	35795.63	1.13%	116385.21	2.37%	176453.71	2.86%	209872.89	2.72%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	5958.38	0.19%	19043.15	0.39%	27372.28	0.44%	30637.12	0.40%
Tyr	324458.11	10.25%	620809.41	12.63%	789156.20	12.80%	1006144.91	13.05%
n.a.								
Val	181817.03	5.75%	233150.32	4.74%	310523.69	5.04%	375917.92	4.87%
n.a.								
Met	112351.51	3.55%	94544.46	1.92%	118586.88	1.92%	141974.58	1.84%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	61415.46	1.94%	38910.02	0.79%	49977.70	0.81%	51279.85	0.66%
n.a.								
Ile	148401.38	4.69%	208034.16	4.23%	273939.06	4.44%	327405.57	4.25%
Leu	344887.09	10.90%	366869.62	7.47%	469147.99	7.61%	560566.40	7.27%
Phe	474931.13	15.01%	706561.40	14.38%	851744.76	13.81%	1072360.00	13.90%
Trp	94144.37	2.97%	307980.84	6.27%	356056.18	5.77%	435926.89	5.65%

C사 A-N	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
Asp	—	—	1215.48	0.38%			2558.90	0.64%
Asn+Ser	21421.71	4.11%	15525.97	4.87%			22653.78	5.70%
Glu	14443.33	2.77%	11036.27	3.46%			15867.64	3.99%
n.a.								
Gly	10684.24	2.05%	11861.49	3.72%			25462.34	6.41%
Gln+His	17311.76	3.32%	26798.52	8.40%			5051.93	1.27%
NH3								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Arg	12118.57	2.33%	21867.56	6.85%			23795.50	5.99%
Thr	4746.59	0.91%	—	—			918.60	0.23%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Ala	23075.93	4.43%	12358.86	3.87%			17816.49	4.48%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	4772.06	0.92%	3584.00	1.12%			2960.14	0.74%
n.a.								
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	2650.57	0.51%	13527.30	4.24%			14386.51	3.62%
n.a.								
Tyr	18964.61	3.64%	—	—			—	—
n.a.								
Val	44809.38	8.60%	28451.92	8.92%			39633.14	9.97%
n.a.								
Met	11641.62	2.23%	12585.73	3.94%			17137.48	4.31%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	38045.49	7.30%	12662.65	3.97%			14418.80	3.63%
n.a.								
Ile	50695.89	9.73%	16254.66	5.09%			27875.72	7.02%
n.a.								
Leu	122181.64	23.45%	90785.37	28.45%			116288.81	29.26%
Phe	60755.65	11.66%	31700.78	9.93%			39831.68	10.02%
n.a.								
Trp	62704.02	12.03%	8905.59	2.79%			10709.32	2.70%

C사 A-M Peak Name	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight /total a.a weight						
AMQ								
n.a.								
Asp	4810.70	0.35%	9816.81	0.61%	8741.03	0.45%	31451.78	1.12%
n.a.								
Asn+Ser	78146.88	5.67%	212676.62	13.27%	299270.96	15.47%	338401.26	12.07%
Glu	8932.96	0.65%	11062.51	0.69%	30600.52	1.58%	25885.30	0.92%
n.a.								
Gly	27452.79	1.99%	60182.83	3.76%	90862.40	4.70%	122145.51	4.36%
Gln+His	97353.20	7.07%	127127.12	7.93%	145858.68	7.54%	175929.24	6.28%
n.a.								
n.a.								
NH3					5932.04	0.31%		
n.a.								
n.a.								
Arg	14548.03	1.06%	192001.27	11.98%			328163.15	11.71%
Thr	120765.96	8.77%	120426.94	7.52%	167275.82	8.65%	229898.01	8.20%
n.a.								
Ala	33494.96	2.43%	38839.31	2.42%	57428.63	2.97%	81196.71	2.90%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	24456.56	1.78%	69927.68	4.36%	84904.33	4.39%	132379.40	4.72%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	13522.32	0.98%	4883.32	0.30%	6873.64	0.36%	8272.61	0.30%
Tyr	235123.09	17.07%	86843.00	5.42%	178536.88	9.23%	220101.29	7.85%
n.a.								
n.a.								
Val	84009.01	6.10%	80393.98	5.02%	111642.52	5.77%	134867.44	4.81%
n.a.								
Met	31110.51	2.26%	42754.63	2.67%	42418.26	2.19%	45086.35	1.61%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	19232.91	1.40%	4619.44	0.29%	5587.46	0.29%	6710.26	0.24%
n.a.								
Ile	67895.13	4.93%	63265.34	3.95%	90695.56	4.69%	113807.56	4.06%
Leu	138832.73	10.08%	108026.87	6.74%	147008.84	7.60%	188323.22	6.72%
Phe	295771.82	21.47%	256285.42	15.99%	295697.21	15.28%	433912.04	15.48%
Trp	82102.67	5.96%	113291.13	7.07%	171334.34	8.86%	186460.57	6.65%

C사 A-N,A-A		0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight		
	pg/ul	/total a.a weight							
AMQ									
Asp	5428.34	0.23%	11604.96	0.28%	15805.96	0.33%	21153.42	0.29%	
Asn+Ser	207528.64	8.67%	462194.22	11.21%	603985.75	12.65%	814486.91	11.30%	
Glu	9764.67	0.41%	19101.13	0.46%	28850.61	0.60%	31328.90	0.43%	
n.a.									
Gly	38250.94	1.60%	127289.32	3.09%	171899.20	3.60%	255366.53	3.54%	
Gln+His	198507.00	8.30%	285102.43	6.92%	320725.68	6.71%	344524.73	4.78%	
n.a.									
NH3									
n.a.									
Arg	312504.14	13.06%	531035.06	12.88%	664217.28	13.91%	847452.49	11.76%	
Thr	151436.53	6.33%	271169.53	6.58%	345232.55	7.23%	495157.74	6.87%	
Ala	37730.49	1.58%	115509.80	2.80%	147150.04	3.08%	225014.68	3.12%	
n.a.									
n.a.									
Pro	13783.04	0.58%	92157.78	2.24%	131784.32	2.76%	243527.33	3.38%	
aABA									
n.a.									
n.a.									
n.a.									
Cys	15403.15	0.64%	15933.58	0.39%	19016.14	0.40%			
Tyr	262633.58	10.98%	534272.04	12.96%	404649.42	8.47%	929415.87	12.90%	
n.a.									
Val	168143.23	7.03%	235772.16	5.72%	280511.96	5.87%	441826.98	6.13%	
Met	55062.21	2.30%	102930.35	2.50%	118501.10	2.48%	170144.77	2.36%	
n.a.									
n.a.									
n.a.									
n.a.									
Lys	33116.56	1.38%	23938.51	0.58%	25804.71	0.54%	37833.28	0.53%	
Ile	144326.76	6.03%	184609.90	4.48%	219413.52	4.59%	352107.53	4.89%	
Leu	248802.40	10.40%	300052.71	7.28%	348006.53	7.29%	558041.62	7.74%	
Phe	360372.74	15.06%	547046.49	13.27%	634922.62	13.29%	1042096.96	14.46%	
Trp	129571.57	5.42%	262065.33	6.36%	295935.92	6.20%	396501.18	5.50%	

C사 A-N,A-P	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight	
	pg/ul	/total a.a weight						
AMQ								
Asp	6636.92	0.19%	6015.72	0.18%	10642.48	0.27%	7762.38	0.21%
Asn+Ser	227889.14	6.36%	303788.84	9.21%	384328.94	9.91%	380340.71	10.49%
Glu	10632.76	0.30%	19823.93	0.60%	24703.79	0.64%	24052.73	0.66%
n.a.								
Gly	25024.03	0.70%	91345.24	2.77%	116755.10	3.01%	120707.07	3.33%
Gln+His	197566.84	5.52%	299289.70	9.07%	326661.05	8.42%	238476.47	6.58%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	539731.54	15.07%	448929.43	13.60%	540857.48	13.95%	506074.13	13.96%
Thr	239373.44	6.68%	174926.48	5.30%	222233.84	5.73%	213318.46	5.88%
n.a.		0.00%						
Ala	101357.18	2.83%	60172.21	1.82%	79435.73	2.05%	86426.45	2.38%
n.a.								
n.a.								
Pro	38241.75	1.07%	56115.54	1.70%	73636.24	1.90%	76623.44	2.11%
aABA								
n.a.								
Cys	14525.41	0.41%	13762.89	0.42%	16757.61	0.43%	16265.67	0.45%
Tyr	333977.54	9.32%	393537.24	11.93%	473561.25	12.21%	447889.64	12.35%
n.a.								
Val	303448.96	8.47%	216189.76	6.55%	248814.84	6.42%	239384.97	6.60%
Met	120771.81	3.37%	91679.76	2.78%	101559.10	2.62%	95234.77	2.63%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	83844.99	2.34%	44549.68	1.35%	36830.22	0.95%	36460.70	1.01%
Ile	232027.45	6.48%	164740.99	4.99%	187700.48	4.84%	177562.67	4.90%
Leu	429056.57	11.98%	270986.80	8.21%	303693.19	7.83%	283990.09	7.83%
Phe	524622.61	14.65%	438647.04	13.29%	498776.96	12.86%	463925.84	12.80%
Trp	152996.86	4.27%	205447.39	6.23%	231455.31	5.97%	210804.25	5.81%

C사 A-N,N-F	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight	
	pg/ul	/total a.a weight						
AMQ								
Asp	6041.43	0.22%	12796.55	0.36%	15800.63	0.42%	39024.40	1.12%
Asn+Ser	166144.06	6.07%	369062.50	10.28%	298137.10	8.01%	341471.90	9.83%
Glu	39216.06	1.43%	29085.36	0.81%	16151.24	0.43%	71319.05	2.05%
n.a.								
Gly	11380.16	0.42%	85167.68	2.37%	121133.00	3.26%	95349.24	2.75%
Gln+His	223867.92	8.18%	306776.57	8.54%	214469.80	5.76%	233169.52	6.71%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	424037.43	15.50%	550232.69	15.32%	675179.16	18.14%	586908.90	16.90%
Thr	149286.00	5.46%	116607.55	3.25%	205221.84	5.51%	192724.45	5.55%
n.a.								
n.a.								
Ala	84901.75	3.10%	86047.04	2.40%	111960.71	3.01%	79533.47	2.29%
n.a.								
n.a.								
Pro	24612.22	0.90%	73602.52	2.05%	84762.16	2.28%	79913.37	2.30%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	13728.55	0.50%	18002.49	0.50%	19421.14	0.52%	18919.32	0.54%
Tyr	248054.17	9.07%	437834.45	12.19%	463877.19	12.47%	430513.27	12.40%
n.a.								
Val	271216.71	9.91%	233621.93	6.51%	92263.43	2.48%	64310.26	1.85%
Met	6088.69	0.22%	—	—				
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys			61366.01	1.71%	77206.37	2.07%	62517.66	1.80%
n.a.								
Ile	207883.42	7.60%	189867.44	5.29%	219583.95	5.90%	182080.25	5.24%
Leu	408625.91	14.93%	339976.31	9.47%	375134.04	10.08%	308050.06	8.87%
Phe	451224.06	16.49%	500955.75	13.95%	529089.18	14.22%	507685.34	14.62%
Trp	—	—	179717.49	5.01%	201841.72	5.42%	179330.39	5.16%

C사 A-P	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight						
AMQ								
ASP	14174.86	0.48%	13065.20	0.36%	29105.08	0.73%	20929.81	0.47%
Asn+Ser	180052.23	6.12%	326130.13	9.09%	361186.60	9.05%	428177.61	9.58%
Glu	14646.69	0.50%	21626.56	0.60%	30041.44	0.75%	28376.30	0.63%
n.a.								
Gly	11151.84	0.38%	89708.72	2.50%	109004.35	2.73%	130678.20	2.92%
Gln+His	228932.51	7.78%	354751.70	9.89%	345303.05	8.66%	354867.11	7.94%
n.a.								
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	463222.94	15.75%	535209.18	14.92%	597725.76	14.98%	645073.52	14.43%
Thr	139839.47	4.75%	189901.57	5.29%	210969.53	5.29%	240289.23	5.38%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Ala	59126.66	2.01%	61984.06	1.73%	79669.86	2.00%	101412.06	2.27%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	28348.10	0.96%	60433.16	1.68%	84099.97	2.11%	121523.75	2.72%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	15785.60	0.54%	16812.38	0.47%	18524.96	0.46%	23314.44	0.52%
Tyr	218518.45	7.43%	418153.68	11.65%	443680.64	11.12%	531574.79	11.89%
n.a.								
Val	199310.45	6.78%	216797.18	6.04%	250067.69	6.27%	279581.19	6.25%
n.a.								
Met	115425.93	3.92%	94486.96	2.63%	107936.82	2.71%	116595.82	2.61%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	149500.69	5.08%	42772.46	1.19%	58338.70	1.46%	55523.38	1.24%
n.a.								
Ile	131016.95	4.45%	162232.48	4.52%	186921.81	4.69%	208894.68	4.67%
Leu	422287.71	14.36%	293722.18	8.19%	339134.37	8.50%	357418.89	8.00%
Phe	492432.92	16.74%	505418.04	14.09%	551549.22	13.83%	604273.17	13.52%
Trp	57927.00	1.97%	184670.39	5.15%	186064.92	4.66%	221391.15	4.95%

C사 A-S	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
n.a.								
Asn+Ser	10800.19	1.68%			82866.34	4.72%	82109.75	5.14%
Glu	18088.81	2.81%			33763.48	1.92%	35484.64	2.22%
n.a.								
Gly	4962.03	0.77%			21622.17	1.23%	25698.77	1.61%
Gln+His	29437.77	4.58%			90373.51	5.15%	96100.92	6.02%
n.a.								
n.a.								
NH3								
n.a.								
n.a.								
Arg	14315.26	2.23%			199208.71	11.36%	260156.79	16.30%
n.a.								
Thr	9744.24	1.52%			36051.40	2.06%	92268.14	5.78%
n.a.								
n.a.								
Ala	16903.93	2.63%			24473.37	1.40%	38151.51	2.39%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	3413.76	0.53%			31017.17	1.77%	59300.38	3.72%
n.a.								
n.a.								
aABA								
n.a.								
Cys	6436.70	1.00%			1832.04	0.10%	1869.46	0.12%
n.a.								
Tyr	51807.29	8.06%			65095.68	3.71%	28934.29	1.81%
n.a.								
n.a.								
Val	48487.39	7.54%			69096.23	3.94%	52984.01	3.32%
Met	43378.23	6.75%			104775.09	5.97%	90911.36	5.70%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	28182.61	4.38%			69689.78	3.97%	61400.75	3.85%
n.a.								
Ile	11505.45	1.79%			51348.38	2.93%	31200.79	1.95%
n.a.								
Leu	132464.39	20.60%			331966.53	18.92%	243907.22	15.28%
n.a.								
Phe	163400.53	25.41%			513650.05	29.28%	379686.95	23.79%
n.a.								
Trp	49682.85	7.73%			27344.74	1.56%	15932.07	1.00%

C사 N-F		0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight		
	pg/ul	/total a.a weight							
AMQ									
Asp	26593.99	1.06%	92976.30	1.31%	71354.36	1.00%	292358.22	0.93%	
Asn+Ser	164646.49	6.56%	633341.39	8.90%	624434.24	8.72%	2722506.22	8.64%	
Glu	51176.74	2.04%	90672.09	1.27%	122738.99	1.71%	323143.51	1.03%	
n.a.									
Gly	—	—	173007.97	2.43%	190500.65	2.66%	876641.54	2.78%	
Gln+His	215613.61	8.59%	637447.35	8.96%	575886.71	8.04%	2354380.67	7.47%	
n.a.									
NH3	14477.98						62921.27		
n.a.									
Arg	384565.90	15.32%	1170770.86	16.46%	1158537.71	16.17%	4934381.22	15.66%	
Thr	110645.56	4.41%	312654.07	4.40%	327325.10	4.57%	855756.70	2.72%	
n.a.									
n.a.									
Ala	120555.94	4.80%	169872.22	2.39%	183557.41	2.56%	848621.58	2.69%	
n.a.									
n.a.									
Pro	—	—	150153.49	2.11%	171149.67	2.39%	839402.10	2.66%	
n.a.									
n.a.									
aABA							41236.41		
n.a.									
n.a.									
n.a.									
Cys	7537.08	0.30%	38464.45	0.54%	35749.28	0.50%	107905.28	0.34%	
Tyr	154087.37	6.14%	689063.53	9.69%	717634.74	10.02%	3358601.03	10.66%	
n.a.									
Val	153932.76	6.13%	360151.57	5.06%	376211.25	5.25%	1933972.96	6.14%	
n.a.									
Met	74586.26	2.97%	133077.12	1.87%	136640.26	1.91%	800443.32	2.54%	
n.a.									
n.a.									
n.a.									
n.a.									
Lys	169547.80	6.76%	168503.87	2.37%	159390.81	2.22%	489545.67	1.55%	
n.a.									
Ile	120162.09	4.79%	303539.42	4.27%	317368.83	4.43%	1443277.90	4.58%	
Leu	362311.21	14.44%	667654.70	9.39%	663045.61	9.26%	3021025.47	9.58%	
Phe	357263.67	14.24%	960280.93	13.50%	971921.93	13.57%	4639117.08	14.72%	
Trp	36195.21	1.44%	361449.29	5.08%	360560.50	5.03%	1677433.50	5.32%	

C사 N-N Peak Name	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
Asp	36925.44	1.12%	—	—	—	—	—	—
Asn+Ser	120632.39	3.66%	9194.72	2.52%	12041.34	2.67%	12182.98	2.56%
Glu	93628.53	2.84%	11649.48	3.19%	10258.34	2.28%	11983.77	2.52%
n.a.								
Gly	79858.54	2.42%	7279.06	1.99%	8137.99	1.81%	8409.89	1.77%
Gln+His	—	—	9182.44	2.51%	11215.91	2.49%	11900.53	2.50%
NH3								
n.a.								
Arg	119483.23	3.62%	8155.74	2.23%	9675.54	2.15%	9694.08	2.04%
Thr	23740.91	0.72%	—	—	—	—	—	—
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Ala	175642.14	5.32%	23254.61	6.37%	24356.91	5.41%	27174.76	5.70%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	15268.59	0.46%	3398.87	0.93%	3141.98	0.70%	2972.23	0.62%
Tyr	64408.12	1.95%	11734.14	3.21%	13437.04	2.98%	15045.49	3.16%
n.a.								
Val	160659.50	4.87%	24316.19	6.66%	24610.23	5.46%	24716.02	5.19%
Met	28152.81	0.85%	9588.68	2.63%	12242.20	2.72%	13941.77	2.93%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	360406.59	10.92%	16892.02	4.62%	21467.12	4.77%	24089.96	5.06%
Ile	30856.33	0.93%	19300.29	5.28%	26768.28	5.94%	25520.43	5.36%
n.a.								
n.a.								
Leu	490794.15	14.87%	127481.45	34.90%	114489.47	25.42%	109023.34	22.89%
n.a.								
Phe	327135.36	9.91%	43657.11	11.95%	46249.20	10.27%	48506.89	10.18%
Trp	1172806.58	35.54%	40175.36	11.00%	112290.40	24.93%	131170.29	27.54%

C사 N-N,A-A	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight						
AMQ								
Asp	9797.77	0.33%	14680.46	0.35%	18150.57	0.36%	25016.12	0.39%
Asn+Ser	273787.84	9.19%	490402.33	11.64%	633542.65	12.52%	673909.66	10.37%
Glu	13641.56	0.46%	24716.71	0.59%	31060.47	0.61%	27826.70	0.43%
n.a.								
Gly	17112.98	0.57%	127759.96	3.03%	184313.97	3.64%	244418.70	3.76%
Gln+His	291346.74	9.78%	295444.98	7.02%	354059.28	7.00%	383654.78	5.91%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	432615.55	14.52%	606925.74	14.41%	713994.58	14.11%	878842.59	13.53%
Thr	190140.38	6.38%	296761.21	7.05%	361515.53	7.14%	474549.02	7.30%
Ala	58225.97	1.95%	117628.29	2.79%	150052.83	2.96%	223205.39	3.44%
n.a.								
n.a.								
Pro	19121.31	0.64%	97863.40	2.32%	151563.89	2.99%	322465.66	4.96%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
Cys	21400.47	0.72%	19589.94	0.47%	23861.66	0.47%		
Tyr	348110.21	11.68%	575317.36	13.66%	545344.86	10.78%	843639.66	12.98%
n.a.								
Val	191519.40	6.43%	219183.83	5.20%	266835.10	5.27%	404475.43	6.23%
n.a.								
Met	88250.70	2.96%	92105.79	2.19%	106958.67	2.11%	164849.34	2.54%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys			20973.73	0.50%	21897.71	0.43%	42676.86	0.66%
n.a.								
Ile	143233.17	4.81%	167134.76	3.97%	217923.21	4.31%	279257.51	4.30%
Leu	263788.25	8.85%	259995.73	6.17%	336928.67	6.66%	441563.36	6.80%
Phe	430881.80	14.46%	507434.82	12.05%	614796.76	12.15%	733772.29	11.29%
Trp	187188.50	6.28%	277390.83	6.59%	328111.65	6.48%	332924.58	5.12%

C사 N-N,A-P	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight	
	pg/ul	/total a.a weight						
AMQ								
Asp	8150.85	0.12%	8739.95	0.18%	14046.83	0.33%	9853.84	0.21%
Asn+Ser	451345.44	6.88%	404192.83	8.53%	405132.43	9.53%	471513.69	10.08%
Glu	24063.01	0.37%	24880.06	0.52%	20410.65	0.48%	24403.69	0.52%
n.a.								
Gly	26970.97	0.41%	117385.91	2.48%	117702.04	2.77%	136145.42	2.91%
Gln+His	565193.08	8.61%	414903.97	8.75%	384596.24	9.05%	419332.30	8.97%
n.a.								
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	1117392.16	17.03%	677819.77	14.30%	650879.15	15.31%	722163.74	15.44%
Thr	428657.72	6.53%	251743.78	5.31%	269148.10	6.33%	286953.42	6.14%
n.a.								
Ala	215519.94	3.28%	77670.87	1.64%	96504.69	2.27%	105301.43	2.25%
n.a.								
n.a.								
Pro	71170.52	1.08%	80391.65	1.70%	82498.55	1.94%		
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	17971.59	0.27%	24369.71	0.51%	19970.88	0.47%	25539.65	0.55%
Tyr	533660.78	8.13%	599399.52	12.64%	508845.95	11.97%	595937.46	12.74%
n.a.								
Val	521460.39	7.95%	319702.96	6.74%	262930.16	6.19%	304251.58	6.51%
Met	152313.46	2.32%	142968.13	3.02%	110420.97	2.60%	127623.83	2.73%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	237364.15	3.62%	46645.63	0.98%	36009.61	0.85%	31443.94	0.67%
Ile	334631.03	5.10%	204487.67	4.31%	167702.33	3.95%	186104.02	3.98%
Leu	742015.90	11.31%	379988.53	8.01%	304650.31	7.17%	339839.89	7.27%
Phe	1114742.10	16.99%	641852.72	13.54%	528984.15	12.44%	597605.35	12.78%
Trp	—	—	323834.21	6.83%	270405.76	6.36%	293093.24	6.27%

C사 N-N,N-F	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
Asp	10119.20	0.32%	17865.74	0.23%	20855.60	0.34%	17389.98	0.27%
Asn+Ser	183820.09	5.86%	682723.68	8.93%	585805.08	9.68%	656070.86	10.27%
Glu	50658.41	1.61%	47507.00	0.62%	45160.94	0.75%	43531.67	0.68%
n.a.		0.00%						
Gly	—	—	169207.59	2.21%	158294.26	2.62%	176647.59	2.77%
Gln+His	287207.26	9.16%	636014.95	8.31%	526807.47	8.70%	534690.88	8.37%
n.a.								
NH3								
n.a.								
n.a.								
Arg	597680.07	19.05%	1232001.93	16.11%	1131857.51	18.70%	1099878.58	17.22%
Thr	167195.31	5.33%	418660.89	5.47%	—	—	—	—
n.a.								
Ala	128943.24	4.11%	195768.27	2.56%	162698.05	2.69%	181862.29	2.85%
n.a.				0.00%		0.00%		
n.a.				0.00%		0.00%		
Pro	34706.28	1.11%	155619.76	2.03%	138504.30	2.29%	158720.94	2.49%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
Cys	6834.05	0.22%	25001.50	0.33%	19031.44	0.31%	23702.74	0.37%
Tyr	177794.57	5.67%	797096.02	10.42%	720329.97	11.90%	702346.76	11.00%
n.a.								
Val	263898.60	8.41%	482379.45	6.31%	406706.77	6.72%	433072.07	6.78%
Met	78220.04	2.49%	210747.14	2.76%	178584.58	2.95%	173257.95	2.71%
n.a.								
n.a.								
Lys	4353.07	0.14%	22704.03	0.30%	17489.19	0.29%	23082.62	0.36%
Ile	84759.06	2.70%	120381.58	1.57%	55226.24	0.91%	116285.75	1.82%
Leu	100401.21	3.20%	234809.34	3.07%	142444.80	2.35%	214029.97	3.35%
Phe	446141.19	14.22%	731006.75	9.56%	515761.20	8.52%	622938.30	9.75%
Trp	514396.53	16.40%	1469784.60	19.21%	1226510.14	20.27%	1209036.53	18.93%

C사 N-P,A-A	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
Asp	9677.06	0.32%	12926.94	0.32%	16469.18	0.35%	20516.22	0.33%
Asn+Ser	265307.94	8.66%	450239.17	11.23%	563041.83	12.09%	748959.48	11.97%
Glu	15121.63	0.49%	28858.43	0.72%	32438.69	0.70%	21552.06	0.34%
n.a.								
Gly	46149.89	1.51%	128253.86	3.20%	162337.88	3.48%	216885.29	3.47%
Gln+His	268498.54	8.77%	291894.83	7.28%	310069.98	6.66%	447053.84	7.15%
n.a.								
NH3							3316.50	0.05%
n.a.								
Arg	442332.76	14.44%	528923.10	13.19%	645439.01	13.86%	954270.50	15.25%
Thr	189698.08	6.19%	243939.02	6.08%	296570.42	6.37%	394030.11	6.30%
Ala	53268.54	1.74%	101376.39	2.53%	133328.12	2.86%	171677.11	2.74%
n.a.								
n.a.								
Pro	19674.33	0.64%	96348.84	2.40%	124412.01	2.67%	219860.76	3.51%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	23088.51	0.75%	17767.29	0.44%	24556.32	0.53%	29273.99	0.47%
Tyr	334913.42	10.93%	526269.63	13.13%	614250.63	13.19%	761912.72	12.18%
n.a.								
Val	203928.28	6.66%	224186.61	5.59%	248687.34	5.34%	351013.09	5.61%
n.a.								
Met	103951.07	3.39%	116578.23	2.91%	96596.95	2.07%	160172.69	2.56%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	46639.47	1.52%	22242.13	0.55%	28927.09	0.62%	9955.09	0.16%
n.a.								
Ile	153141.86	5.00%	178603.86	4.45%	205970.64	4.42%	34282.76	0.55%
Leu	289356.17	9.45%	279794.05	6.98%	320795.57	6.89%	152173.93	2.43%
Phe	434002.62	14.17%	512361.57	12.78%	575233.92	12.35%	448063.87	7.16%
Trp	164391.70	5.37%	249055.57	6.21%	259343.79	5.57%	1114570.66	17.82%

C사 N-P,A-P	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight						
AMQ								
Asp	6001.43	0.24%	9272.78	0.25%	15520.12	0.41%	12205.55	0.32%
Asn+Ser	144702.04	5.88%	336081.12	9.10%	364990.66	9.54%	377189.92	9.76%
Glu	11978.38	0.49%	20869.50	0.57%	28510.90	0.75%	24278.86	0.63%
n.a.								
Gly	28730.39	1.17%	92299.63	2.50%	103211.44	2.70%	110113.50	2.85%
Gln+His	178133.55	7.24%	350759.38	9.50%	293533.53	7.67%	336577.05	8.71%
n.a.								
NH3							10443.71	0.27%
n.a.								
Arg	408179.68	16.60%	530758.00	14.37%	581863.60	15.20%	583078.57	15.08%
Thr	151654.96	6.17%	126573.02	3.43%	205482.03	5.37%	202188.00	5.23%
n.a.								
Ala	77107.90	3.14%	66791.15	1.81%	79738.76	2.08%	82157.59	2.13%
n.a.								
n.a.								
Pro	24195.38	0.98%	82428.78	2.23%	79884.81	2.09%	86745.50	2.24%
n.a.								
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
Cys	13516.09	0.55%	18622.56	0.50%	16595.30	0.43%	19666.88	0.51%
Tyr	200747.91	8.16%	441742.95	11.96%	479708.57	12.54%	463530.13	11.99%
n.a.								
Val	183047.13	7.44%	254965.39	6.90%	244671.13	6.39%	248337.86	6.42%
n.a.								
Met	83270.78	3.39%	108801.89	2.95%	102600.35	2.68%	102893.91	2.66%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	94036.23	3.82%	48595.49	1.32%	31243.97	0.82%	39130.61	1.01%
n.a.								
Ile	129723.10	5.27%	192422.21	5.21%	181916.45	4.75%	184128.40	4.76%
Leu	301774.39	12.27%	324109.84	8.78%	294178.86	7.69%	298880.34	7.73%
Phe	348215.19	14.16%	472802.93	12.80%	495969.41	12.96%	483006.51	12.49%
Trp	74315.34	3.02%	214642.95	5.81%	227283.20	5.94%	211894.63	5.48%

C사 N-P,N-F	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
Asp	19409.35	0.44%			17099.77	0.35%	17048.68	0.37%
Asn+Ser	295244.92	6.70%			424849.33	8.69%	366430.80	8.05%
Glu	93267.42	2.12%			48165.93	0.98%	44933.57	0.99%
n.a.								
Gly	51639.81	1.17%			117931.32	2.41%	118081.09	2.59%
Gln+His	271307.41	6.15%			399443.12	8.17%	372087.08	8.17%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	673428.39	15.28%			805650.36	16.47%	784268.53	17.23%
Thr	242633.54	5.50%			256586.19	5.25%	226488.83	4.98%
n.a.								
Ala	135312.92	3.07%			117540.94	2.40%	108313.88	2.38%
n.a.								
n.a.								
Pro	73821.92	1.67%			103629.37	2.12%	106004.06	2.33%
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	20696.62	0.47%			22894.11	0.47%	26683.75	0.59%
Tyr	315583.92	7.16%			573899.56	11.73%	519049.86	11.40%
n.a.								
Val	349586.60	7.93%			298309.36	6.10%	287311.21	6.31%
n.a.								
Met	144105.82	3.27%			115242.36	2.36%	105307.92	2.31%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	262721.46	5.96%			66681.91	1.36%	93967.64	2.06%
n.a.								
Ile	246737.65	5.60%			235714.53	4.82%	224881.66	4.94%
Leu	660938.32	14.99%			424324.73	8.68%	394403.11	8.67%
Phe	505287.87	11.46%			644769.67	13.18%	555893.05	12.21%
Trp	46879.65	1.06%			218272.66	4.46%	200405.31	4.40%

쌀 단백질을 이용한 eHVP (F, A, G를 처리)의 아미노산 함량- 3.5 liter 반응기

C사 Rice Protein eHVP(F,A,G)										
Peak Name	0시간		24시간		48시간		72시간		72시간-inactivation	
	pg/ul	a.a weight	pg/ul	a.a weight	pg/ul	a.a weight	pg/ul	a.a weight	pg/ul	a.a weight
AMQ										
n.a.										
Asp	11,143.3	0.48%	—	—	7,107.0	0.18%	12,629.4	0.25%	25756.533	0.48%
Asn+Ser	169,233.1	7.33%	384,929.3	7.66%	370,534.9	9.34%	499,218.1	9.81%	496630.846	9.23%
Glu	87,757.7	3.80%	71,434.3	1.42%	65,617.8	1.65%	118,069.1	2.32%	100852.094	1.87%
n.a.										
Gly	33,588.5	1.46%	103,123.3	2.05%	97,815.3	2.47%	155,628.9	3.06%	156525.457	2.91%
Gln+His	104,151.3	4.51%	214,755.8	4.27%	238,105.8	6.00%	216,922.7	4.26%	340434.011	6.33%
n.a.										
NH3										
n.a.										
Arg	267,007.6	11.57%	697,804.5	13.88%	524,144.5	13.22%	671,251.4	13.20%	674293.688	12.53%
Thr	114,049.7	4.94%	307,729.5	6.12%	241,473.9	6.09%	315,805.1	6.21%	339896.624	6.32%
Ala	85,812.0	3.72%	121,773.1	2.42%	95,633.7	2.41%	148,040.7	2.91%	167440.511	3.11%
n.a.										
n.a.										
n.a.										
n.a.										
Pro	33,039.6	1.43%	65,668.5	1.31%	54,867.6	1.38%	85,951.1	1.69%	100379.742	1.87%
n.a.										
aABA										
n.a.										
n.a.										
Cys	—	—	—	—	15,673.5	0.40%	26,159.7	0.51%	23421.112	0.44%
Tyr	161,600.3	7.00%	198,278.6	3.94%	136,717.3	3.45%	154,870.6	3.04%	209938.207	3.90%
n.a.										
Val	151,962.0	6.59%	367,728.9	7.31%	284,839.5	7.18%	384,825.6	7.57%	407834.278	7.58%
n.a.										
Met	84,237.7	3.65%	188,917.4	3.76%	168,522.5	4.25%	207,523.6	4.08%	188246.922	3.50%
n.a.										
n.a.										
n.a.										
n.a.										
Lys	242,929.3	10.53%	43,441.2	0.86%	42,312.7	1.07%	84,808.7	1.67%	111870.556	2.08%
n.a.										
n.a.										
Ile	130,730.0	5.67%	325,262.7	6.47%	231,613.6	5.84%	308,479.9	6.06%	332874.263	6.18%
Leu	306,310.0	13.27%	591,956.1	11.77%	406,180.1	10.24%	534,354.1	10.50%	583517.830	10.84%
Phe	293,602.7	12.72%	1,032,442.7	20.53%	751,622.2	18.95%	873,267.4	17.17%	879831.663	16.35%
n.a.										
Trp	30,488.6	1.32%	312,928.0	6.22%	233,241.5	5.88%	288,943.4	5.68%	242457.250	4.50%

쌀 단백질을 이용한 eHVP (R, AX, G를 처리)의 아미노산 함량- 3.5 liter 반응기

C사 Rice Protein eHVP(R,AX,G)											
		0시간		24시간		48시간		72시간		72시간-inactivation	
Peak Name	a.a weight										
	pg/ul	/total a.a weight									
AMQ											
n.a.											
Asp	5,536.8	0.29%	10,581.8	0.23%	6,813.8	0.16%	8,520.9	0.19%	14081.256	0.23%	
Asn+Ser	116,410.5	6.17%	357,292.3	7.74%	316,478.7	7.51%	375,404.5	8.32%	495181.598	8.21%	
Glu	56,230.7	2.98%	85,694.2	1.86%	70,866.7	1.68%	85,291.6	1.89%	111997.880	1.86%	
n.a.											
Gly	24,660.0	1.31%	92,117.0	1.99%	84,891.3	2.01%	109,344.5	2.42%	142443.517	2.36%	
Gln+His	45,504.5	2.41%	256,280.4	5.55%	278,568.1	6.61%	308,038.0	6.83%	373045.002	6.18%	
n.a.											
NH3											
n.a.											
Arg	225,841.5	11.96%	683,196.6	14.79%	577,831.9	13.71%	581,603.9	12.89%	775001.654	12.85%	
Thr	79,382.4	4.20%	240,847.2	5.21%	231,094.2	5.48%	262,739.7	5.82%	368953.758	6.12%	
Ala	79,459.2	4.21%	118,157.9	2.56%	102,022.0	2.42%	126,417.8	2.80%	205808.122	3.41%	
n.a.											
n.a.											
Pro	64,133.5	3.40%	139,488.5	3.02%	125,726.2	2.98%	162,373.2	3.60%	248803.911	4.12%	
aABA											
n.a.											
n.a.											
n.a.											
Cys	—	—	6,826.3	0.15%	8,542.7	0.20%	27,706.9	0.61%	30940.310	0.51%	
Tyr	150,681.5	7.98%	257,712.6	5.58%	180,604.8	4.29%	101,523.3	2.25%	112811.993	1.87%	
n.a.											
Val	133,167.5	7.05%	308,494.3	6.68%	283,051.8	6.72%	300,344.1	6.65%	448702.397	7.44%	
n.a.											
Met	74,297.4	3.94%	201,178.5	4.36%	184,381.8	4.37%	159,586.2	3.54%	216312.172	3.59%	
n.a.											
n.a.											
n.a.											
n.a.											
Lys	200,645.2	10.63%	99,440.0	2.15%	53,419.9	1.27%	89,563.9	1.98%	183175.009	3.04%	
n.a.											
Ile	93,799.2	4.97%	227,449.9	4.92%	226,170.5	5.37%	261,247.0	5.79%	380901.500	6.31%	
Leu	257,960.3	13.66%	486,251.4	10.53%	415,766.0	9.86%	460,681.7	10.21%	676243.759	11.21%	
Phe	248,066.4	13.14%	809,630.6	17.53%	799,016.5	18.96%	810,220.6	17.95%	962215.939	15.95%	
n.a.											
Trp	32,144.4	1.70%	238,011.9	5.15%	269,535.3	6.40%	282,671.1	6.26%	286813.281	4.75%	
n.a.											

C사 Pice Protein total a.a (R.P 1g/L)							
No.	Ret.Time min	Peak Name	M.W g/mol	Area	pmol/ul	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
1	12.60	AMQ		1044.583	1124.17		
2	14.37	Asp	133.10	38.076	40.98	54540.98	6.36%
3	16.27	Asn+Ser	132.12	38.519	41.45	54768.25	6.39%
4	16.99	Glu	147.10	51.636	55.57	81744.58	9.54%
5	18.71	Gly	75.01	61.276	65.94	49464.90	5.77%
6	19.33	Gln+His	146.15	21.896	23.56	34438.96	4.02%
7	21.62	NH3	17.00	25.868	27.84		
8	24.38	Arg	174.20	53.081	57.13	99512.79	11.61%
9	24.85	Thr	119.10	33.467	36.02	42896.21	5.01%
10	26.64	Ala	89.09	49.861	53.66	47805.96	5.58%
11	28.19	Pro	155.10	30.596	32.93	51069.39	5.96%
12	29.65	aABA	103.10	9.292	10.00		
13	31.62	Cys	121.50	7.990	8.60	10447.28	1.22%
14	31.88	Tyr	181.20	19.337	20.81	37708.48	4.40%
15	32.98	Val	117.20	35.770	38.50	45117.01	5.27%
16	33.60	Met	149.20	13.132	14.13	21085.87	2.46%
17	36.35	Lys	146.20	39.777	42.81	62585.43	7.30%
18	37.09	Ile	131.20	23.294	25.07	32891.00	3.84%
19	37.49	Leu	131.20	51.709	55.65	73011.49	8.52%
20	37.84	Phe	165.20	31.049	33.41	55201.51	6.44%
21	38.02	Trp	204.23	1.194	1.28	2623.70	0.31%
				total a.a weight (pg/ul)		856913.80	100%
				total a.a weight (g/L)		0.86	

C사 Pice Protein free a.a (R.P 50g/L)							
No.	Ret.Time min	Peak Name	M.W g/mol	Area	pmol/ul	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
1	14.00	AMQ		848.12	1037.84		
2		Asp	133.10	—	—	—	—
3	18.29	Asn+Ser	132.12	0.62	0.76	997.70	1.53%
4	19.13	Glu	147.10	1.76	2.15	3162.24	4.86%
5	20.74	Gly	75.01	1.52	1.86	1394.50	2.14%
6		Gln+His	146.15	—	—	—	—
7	23.50	NH3	17.00	19.72	24.13		
8		Arg	174.20	—	—	—	—
9	26.47	Thr	119.10	1.93	2.37	2817.03	4.33%
10	27.25	Ala	89.09	9.05	11.08	9868.17	15.17%
11	28.68	Pro	155.10	0.34	0.41	637.79	0.98%
12	30.13	aABA	103.10	8.17	10.00		
13		Cys	121.50	—	—	—	—
14	32.33	Tyr	181.20	0.69	0.84	1522.54	2.34%
15	33.41	Val	117.20	5.28	6.46	7570.36	11.64%
16	34.04	Met	149.20	1.27	1.56	2321.48	3.57%
17	36.80	Lys	146.20	2.86	3.49	5108.83	7.86%
18	37.45	Ile	131.20	1.90	2.33	3055.29	4.70%
19	37.70	Leu	131.20	10.99	13.45	17648.39	27.14%
20	37.93	Phe	165.20	3.88	4.74	7834.71	12.05%
21	38.06	Trp	204.23	0.44	0.54	1093.60	1.68%
				total a.a weight (pg/ul)		65032.62	100%
				total a.a weight (g/L)		0.07	

SJ A-A	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight	
	pg/ul	/total a.a weight						
AMQ								
Asp	—	—	300213.091	8.76%	1896.370	0.06%	—	—
n.a.								
n.a.								
Asn+Ser	3221.777	0.12%	—	—	3117.918	0.10%	6269.222	0.13%
Glu	266701.376	10.21%	230652.199	6.73%	354912.421	11.61%	638106.211	13.13%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Gly	41702.375	1.60%	127181.290	3.71%	102068.503	3.34%	162359.827	3.34%
Gln+His	195667.612	7.49%	220299.706	6.43%	209503.813	6.86%	292286.806	6.01%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	392200.760	15.01%	11467.634	0.33%	418397.637	13.69%	611438.822	12.58%
Thr	168503.216	6.45%	268995.023	7.85%	177685.811	5.81%	272494.328	5.61%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Ala	86413.660	3.31%	112224.376	3.27%	82180.612	2.69%	136416.594	2.81%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	30568.311	1.17%	99797.525	2.91%	98807.313	3.23%	171750.508	3.53%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	20773.797	0.79%	23983.899	0.70%	18279.802	0.60%	24330.180	0.50%
Tyr	235571.841	9.01%	429907.578	12.54%	334136.451	10.93%	550785.638	11.33%
n.a.								
Val	158816.307	6.08%	203593.261	5.94%	162503.823	5.32%	259597.007	5.34%
n.a.								
Met	66247.795	2.53%	118300.852	3.45%	83541.907	2.73%	126244.383	2.60%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	84433.160	3.23%	40559.587	1.18%	26727.275	0.87%	36264.203	0.75%
n.a.								
Ile	135579.896	5.19%	172568.534	5.03%	137092.543	4.49%	226085.332	4.65%
Leu	281084.105	10.76%	288226.408	8.41%	233372.389	7.64%	375667.161	7.73%
Phe	367258.983	14.05%	507631.394	14.81%	422913.270	13.84%	674929.662	13.88%
Trp	78607.988	3.01%	272061.500	7.94%	188881.331	6.18%	296055.068	6.09%

SJ A-M	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight	
	pg/ul	/total a.a weight						
AMQ								
n.a.								
Asp	3212.449	0.17%	3814.164	0.26%	14937.127	0.63%	10652.914	0.54%
n.a.								
n.a.								
Asn+Ser	128041.228	6.97%	164943.403	11.22%	345200.192	14.46%	289820.876	14.82%
Glu	5066.815	0.28%	11433.164	0.78%	8134.720	0.34%	6738.107	0.34%
n.a.								
n.a.								
Gly	6767.826	0.37%	80676.391	5.49%	98597.700	4.13%	79637.502	4.07%
Gln+His	199819.473	10.87%	70516.161	4.80%	156890.676	6.57%	127663.302	6.53%
n.a.								
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	201896.755	10.99%	173313.100	11.79%	257677.848	10.80%	223305.611	11.42%
Thr	126182.569	6.87%	110378.762	7.51%	184372.307	7.73%	148003.065	7.57%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Ala	28377.244	1.54%	36341.842	2.47%	59707.064	2.50%	50231.796	2.57%
n.a.								
n.a.								
Pro	29929.663	1.63%	69569.673	4.73%	99473.963	4.17%	84412.150	4.32%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	10077.779	0.55%	9575.734	0.65%	—	—	4739.848	0.24%
Tyr	251847.825	13.71%	66025.399	4.49%	124466.060	5.22%	143452.163	7.34%
n.a.								
n.a.								
Val	93319.575	5.08%	81628.897	5.55%	110819.263	4.64%	94736.305	4.85%
n.a.								
Met	37202.479	2.02%	34298.124	2.33%	59906.132	2.51%	43963.699	2.25%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	13554.645	0.74%	4630.741	0.32%	4495.990	0.19%	5457.116	0.28%
n.a.								
Ile	72468.268	3.94%	65037.953	4.43%	78080.961	3.27%	73621.428	3.77%
Leu	159275.030	8.67%	112876.887	7.68%	156389.337	6.55%	119606.712	6.12%
Phe	346034.522	18.83%	240976.710	16.40%	420907.536	17.64%	293464.194	15.01%
Trp	124422.433	6.77%	133519.474	9.09%	206456.113	8.65%	155811.205	7.97%

SJ A-N,A-A	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight	
	pg/ul	/total a.a weight						
AMQ								
Asp	5922.29	0.27%	31406.97	1.08%	35509.62	0.96%	23855.36	0.53%
Asn+Ser	102252.13	4.67%	317618.88	10.89%	412720.89	11.20%	553921.25	12.41%
Glu	39392.54	1.80%	57912.78	1.98%	69282.90	1.88%	90329.92	2.02%
n.a.								
Gly	55039.18	2.51%	107996.53	3.70%	145106.76	3.94%	183699.66	4.12%
Gln+His	132161.74	6.04%	190208.16	6.52%	201219.59	5.46%	249347.62	5.59%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	350157.16	16.00%	452782.60	15.52%	545570.30	14.80%	622796.20	13.95%
Thr	140596.76	6.42%	185566.93	6.36%	236014.79	6.40%	294259.14	6.59%
Ala	91925.18	4.20%	76186.43	2.61%	102791.34	2.79%	141521.90	3.17%
n.a.								
n.a.								
Pro	22459.94	1.03%	64645.55	2.22%	96858.63	2.63%	138029.69	3.09%
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	10418.30	0.48%	20787.22	0.71%	23252.97	0.63%	31476.66	0.71%
Tyr	288861.51	13.20%	219437.23	7.52%	319494.69	8.67%	245495.02	5.50%
n.a.								
Val	131089.84	5.99%	160417.85	5.50%	205687.50	5.58%	261760.18	5.86%
Met	56672.12	2.59%	58334.97	2.00%	73696.26	2.00%	114713.24	2.57%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	53206.29	2.43%	22448.09	0.77%	27654.66	0.75%	52227.10	1.17%
n.a.								
Ile	113700.85	5.19%	136127.46	4.67%	172073.57	4.67%	225174.47	5.04%
Leu	201922.83	9.22%	218522.02	7.49%	279909.30	7.59%	364089.51	8.16%
Phe	295242.58	13.49%	444814.95	15.24%	553318.75	15.01%	613794.85	13.75%
Trp	98015.98	4.48%	152724.63	5.23%	185342.16	5.03%	256917.97	5.76%

SJ A-N,A-P	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight /total a.a weight						
AMQ								
Asp	19688.62	0.57%	19312.04	0.71%	21785.47	0.77%	38967.27	1.15%
Asn+Ser	233893.70	6.80%	207131.87	7.65%	238942.68	8.43%	308949.42	9.08%
Glu	51080.94	1.49%	45215.61	1.67%	46614.07	1.64%	88590.63	2.60%
n.a.								
Gly	73952.32	2.15%	73085.35	2.70%	82346.77	2.90%	72489.82	2.13%
Gln+His	228934.28	6.66%	198225.83	7.32%	217931.17	7.69%	276387.27	8.12%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	572269.60	16.64%	430449.15	15.89%	450185.30	15.88%	540093.78	15.88%
Thr	169158.50	4.92%	135765.63	5.01%	143330.90	5.06%	186397.51	5.48%
Ala	72591.71	2.11%	45625.82	1.68%	50335.60	1.78%	86708.52	2.55%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	52529.25	1.53%	58820.10	2.17%	62673.40	2.21%	93337.89	2.74%
aABA								
n.a.								
n.a.								
Cys	5382.61	0.16%	15037.67	0.56%	17524.36	0.62%	29474.53	0.87%
Tyr	291094.08	8.47%	327056.09	12.07%	336400.20	11.87%	167936.16	4.94%
n.a.								
Val	279981.43	8.14%	166494.67	6.15%	166519.25	5.87%	235401.37	6.92%
Met	103215.14	3.00%	76203.75	2.81%	71572.96	2.52%	100420.99	2.95%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	160841.89	4.68%	43490.94	1.61%	43141.83	1.52%	80954.08	2.38%
n.a.								
Ile	201776.16	5.87%	125198.78	4.62%	128049.58	4.52%	179897.79	5.29%
Leu	397585.89	11.56%	228109.71	8.42%	227344.84	8.02%	314158.33	9.23%
Phe	441455.94	12.84%	393615.49	14.53%	401868.74	14.18%	442435.12	13.00%
Trp	83006.88	2.41%	120203.29	4.44%	128158.40	4.52%	159474.37	4.69%
n.a.								

SJ A-N,N-F	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight	
	pg/ul	/total a.a weight						
AMQ								
Asp	25673.68	0.76%	16668.66	0.41%	18643.18	0.35%	13317.06	0.27%
Asn+Ser	207835.40	6.16%	351332.69	8.55%	445799.49	8.40%	422613.18	8.73%
Glu	83427.70	2.47%	90932.93	2.21%	109735.86	2.07%	97077.84	2.00%
n.a.								
Gly	50256.91	1.49%	114561.31	2.79%	159252.35	3.00%	160326.07	3.31%
Gln+His	176678.87	5.24%	283013.10	6.88%	352135.14	6.63%	298367.01	6.16%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	603227.64	17.88%	744345.08	18.11%	972068.41	18.31%	894593.43	18.47%
Thr	134174.74	3.98%	188090.33	4.58%	262444.52	4.94%	245425.42	5.07%
Ala	88662.95	2.63%	83680.06	2.04%	129008.49	2.43%	116178.02	2.40%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	71595.62	2.12%	99400.39	2.42%	148841.42	2.80%	143878.73	2.97%
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	—	—	18407.94	0.45%	27792.79	0.52%	26228.61	0.54%
Tyr	258127.36	7.65%	473562.64	11.52%	578911.82	10.91%	563412.55	11.63%
n.a.								
Val	233522.60	6.92%	215366.19	5.24%	278901.33	5.25%	244873.92	5.06%
n.a.								
Met	81376.83	2.41%	99943.70	2.43%	124413.71	2.34%	109879.85	2.27%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	244017.50	7.23%	98971.91	2.41%	146316.69	2.76%	91916.48	1.90%
n.a.								
n.a.								
Ile	216885.68	6.43%	174374.69	4.24%	221036.55	4.16%	189820.91	3.92%
Leu	457853.96	13.57%	371307.27	9.03%	483112.95	9.10%	406176.69	8.39%
n.a.								
Phe	395271.18	11.72%	551678.69	13.42%	675562.46	12.73%	649030.03	13.40%
n.a.								
Trp	44349.86	1.31%	135222.97	3.29%	174101.57	3.28%	169617.17	3.50%
n.a.								

SJ A-P Peak Name	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight /total a.a weight						
AMQ								
Asp	15395.313	0.74%	7485.043	0.27%	8260.177	0.27%	7576.531	0.24%
Asn+Ser	156663.448	7.50%	236704.510	8.48%	273342.617	8.87%	305261.479	9.48%
Glu	46130.183	2.21%	18425.550	0.66%	19989.119	0.65%	22477.527	0.70%
n.a.								
Gly	25745.308	1.23%	66080.614	2.37%	79371.150	2.57%	91441.661	2.84%
Gln+His	135984.635	6.51%	292497.177	10.48%	234810.883	7.62%	288725.374	8.97%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	386057.273	18.47%	480793.875	17.23%	537703.366	17.44%	551976.859	17.14%
Thr	115459.646	5.52%	136302.615	4.88%	162652.509	5.28%	165166.819	5.13%
n.a.								
n.a.								
Ala	57270.723	2.74%	57415.471	2.06%	64989.245	2.11%	70007.806	2.17%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	35759.063	1.71%	66329.151	2.38%	89795.714	2.91%	90884.824	2.82%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	—	—	17218.528	0.62%	22465.471	0.73%	21068.005	0.65%
Tyr	146085.669	6.99%	348263.998	12.48%	370457.967	12.02%	387943.390	12.05%
n.a.								
Val	138089.478	6.61%	151923.693	5.44%	188214.661	6.11%	189131.053	5.87%
n.a.								
Met	59941.315	2.87%	73055.048	2.62%	81855.150	2.66%	81382.991	2.53%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	157091.643	7.52%	32478.611	1.16%	58077.743	1.88%	56583.946	1.76%
n.a.								
Ile	72753.695	3.48%	119076.400	4.27%	147803.237	4.79%	147575.275	4.58%
Leu	264158.167	12.64%	223902.460	8.02%	264813.250	8.59%	260166.037	8.08%
Phe	249318.983	11.93%	327406.772	11.73%	345673.477	11.21%	344204.084	10.69%
Trp	28124.872	1.35%	135517.701	4.86%	132386.091	4.29%	138819.076	4.31%

SJ A-S	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight	
	pg/ul	/total a.a weight						
AMQ								
Asp	10733.779	1.10%	—	—	—	—	—	—
Asn+Ser	81091.226	8.31%	109088.652	5.07%	137847.029	6.12%	125433.431	6.13%
Glu	31801.702	3.26%	30235.756	1.41%	36258.310	1.61%	29836.483	1.46%
n.a.								
Gly	10684.158	1.09%	24387.293	1.13%	29363.411	1.30%	30878.135	1.51%
Gln+His	21663.203	2.22%	118147.067	5.49%	125800.830	5.59%	129762.080	6.35%
n.a.								
NH3								
n.a.								
n.a.								
Arg	286938.783	29.39%	503967.959	23.43%	512527.662	22.76%	483729.312	23.66%
Thr	4364.029	0.45%	—	—	—	—	—	—
n.a.								
n.a.								
Ala	25805.551	2.64%	31012.325	1.44%	32626.974	1.45%	32310.549	1.58%
n.a.								
n.a.								
Pro	18685.025	1.91%	9981.026	0.46%	7715.438	0.34%	6006.041	0.29%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	10635.162	1.09%	36086.110	1.68%	43644.417	1.94%	47295.989	2.31%
Tyr	66374.534	6.80%	145050.252	6.74%	173647.133	7.71%	171147.613	8.37%
n.a.								
Val	37863.315	3.88%	101344.253	4.71%	105313.928	4.68%	92073.667	4.50%
n.a.								
Met	25872.078	2.65%	42514.848	1.98%	49629.861	2.20%	50686.612	2.48%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	78959.922	8.09%	85572.641	3.98%	85044.077	3.78%	91927.436	4.50%
n.a.								
Ile	14699.497	1.51%	30630.931	1.42%	34628.766	1.54%	32551.327	1.59%
Leu	153787.505	15.75%	379574.078	17.65%	379761.573	16.87%	332264.543	16.25%
Phe	96219.871	9.86%	503537.900	23.41%	497613.966	22.10%	388937.956	19.02%

SJ N-F	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
n.a.								
Asp	74616.648	3.07%	34044.842	0.45%	23775.092	0.36%	73308.273	1.31%
Asn+Ser	220317.646	9.05%	619269.435	8.16%	572624.346	8.62%	550975.356	9.82%
Glu	89530.950	3.68%	165791.484	2.18%	100090.941	1.51%	48226.082	0.86%
n.a.								
n.a.								
Gly	35945.717	1.48%	185843.714	2.45%	285493.715	4.30%	165201.370	2.94%
n.a.								
Gln+His	127870.414	5.25%	608467.224	8.02%	275422.062	4.15%	424241.853	7.56%
n.a.								
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	382183.005	15.71%	1377900.997	18.16%	1262655.604	19.01%	1044744.459	18.61%
Thr	92274.424	3.79%	198239.098	2.61%	290794.176	4.38%	149549.621	2.66%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Ala	89492.043	3.68%	226533.293	2.99%	184098.871	2.77%	144570.939	2.58%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	59057.110	2.43%	232666.881	3.07%	221269.996	3.33%	183146.041	3.26%
n.a.								
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	8465.946	0.35%	29070.067	0.38%	23891.341	0.36%	17803.604	0.32%
Tyr	146999.887	6.04%	691845.931	9.12%	689194.112	10.38%	594335.971	10.59%
n.a.								
Val	122249.236	5.02%	392539.182	5.17%	310827.659	4.68%	265600.830	4.73%
n.a.								
Met	79219.834	3.26%	235785.153	3.11%	130560.896	1.97%	112122.205	2.00%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	166956.893	6.86%	396829.481	5.23%	279030.371	4.20%	171526.656	3.06%
n.a.								
Ile	67770.984	2.78%	292912.679	3.86%	260629.129	3.92%	219256.207	3.91%
Leu	331314.892	13.61%	757303.133	9.98%	665276.052	10.02%	520320.608	9.27%
Phe	245193.712	10.08%	800814.360	10.55%	748232.711	11.26%	651187.587	11.60%
Trp	94044.564	3.86%	342158.040	4.51%	318565.631	4.80%	277192.525	4.94%

SJ N-N	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
n.a.								
Asp	8505.859	0.91%	22405.794	3.76%	25077.475	3.57%	17983.436	2.67%
Asn+Ser	54306.655	5.83%	73171.469	12.28%	81641.447	11.61%	82818.748	12.30%
Glu	27156.736	2.91%	36775.851	6.17%	40051.428	5.69%	28571.438	4.24%
n.a.								
Gly	25145.675	2.70%	10254.377	1.72%	11872.593	1.69%	17578.335	2.61%
Gln+His	26534.183	2.85%	14577.162	2.45%	16199.121	2.30%	1619.178	0.24%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	8512.552	0.91%	85182.886	14.29%	100161.605	14.24%	105400.686	15.65%
Thr	66186.402	7.10%	14498.632	2.43%	15608.291	2.22%	14632.726	2.17%
n.a.								
n.a.								
Ala	76232.527	8.18%	30385.129	5.10%	29908.599	4.25%	31847.967	4.73%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	8089.706	0.87%	15122.558	2.54%	17221.956	2.45%	21002.432	3.12%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	—	—	3423.283	0.57%	3578.903	0.51%	4570.217	0.68%
Tyr	74631.316	8.01%	28284.062	4.75%	33977.777	4.83%	31057.084	4.61%
n.a.								
Val	77748.601	8.34%	21456.862	3.60%	18669.146	2.65%	23294.206	3.46%
n.a.								
Met	34615.010	3.71%	12839.186	2.15%	10277.725	1.46%	10539.692	1.56%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	95365.204	10.23%	74719.486	12.54%	88746.095	12.62%	77334.073	11.48%
n.a.								
Ile	46883.678	5.03%	9548.338	1.60%	10028.006	1.43%	1575.396	0.23%
n.a.								
Leu	141814.941	15.22%	68904.577	11.56%	80768.361	11.48%	90674.874	13.46%
Phe	98591.308	10.58%	44077.256	7.40%	62995.520	8.96%	61493.335	9.13%
Trp	61500.096	6.60%	30293.604	5.08%	56596.844	8.05%	51470.099	7.64%

SJ N-N,A-A	0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	pg/ul	a.a weight /total a.a weight						
AMQ								
Asp	18740.21	0.65%	31981.62	0.93%	9557.80	0.26%	46978.99	1.07%
Asn+Ser	242232.08	8.45%	345296.44	10.02%	390457.66	10.44%	507569.36	11.59%
Glu	46606.55	1.63%	58621.21	1.70%	50225.59	1.34%	81425.32	1.86%
n.a.								
Gly	82587.29	2.88%	117798.06	3.42%	148384.70	3.97%	188210.58	4.30%
Gln+His	217843.65	7.60%	218671.28	6.35%	182345.88	4.87%	210473.31	4.80%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	457504.86	15.96%	528609.51	15.34%	589188.28	15.75%	672406.98	15.35%
Thr	181498.63	6.33%	208646.59	6.06%	244641.17	6.54%	288914.91	6.60%
Ala	69093.82	2.41%	86169.24	2.50%	105117.99	2.81%	131347.15	3.00%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	32671.97	1.14%	75060.65	2.18%	100064.80	2.67%	123979.95	2.83%
n.a.								
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	16969.45	0.59%	26099.03	0.76%	29598.72	0.79%	33252.00	0.76%
Tyr	341347.87	11.91%	382814.66	11.11%	376910.61	10.07%	358179.45	8.18%
n.a.								
Val	168970.96	5.89%	183098.54	5.31%	207258.46	5.54%	244121.26	5.57%
Met	66374.14	2.32%	69016.72	2.00%	77471.42	2.07%	86809.79	1.98%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	68830.07	2.40%	33043.59	0.96%	34093.97	0.91%	56539.97	1.29%
n.a.								
Ile	137162.04	4.78%	151819.33	4.41%	168613.46	4.51%	198618.08	4.53%
Leu	243957.60	8.51%	253596.35	7.36%	280404.39	7.49%	325426.32	7.43%
Phe	355805.30	12.41%	503900.29	14.63%	560682.65	14.99%	622089.94	14.20%
Trp	118877.57	4.15%	170823.14	4.96%	186573.01	4.99%	204323.50	4.66%

SJ N-N,A-P		0시간		24시간		48시간		72시간	
Peak Name	a.a weight		a.a weight		a.a weight		a.a weight		
	pg/ul	/total a.a weight							
AMQ									
Asp	16331.33	0.55%	10912.38	0.34%	26708.95	0.79%	26978.77	0.80%	
Asn+Ser	212627.59	7.11%	226156.66	7.08%	262435.80	7.78%	269053.30	7.98%	
Glu	56363.21	1.89%	52474.10	1.64%	63186.08	1.87%	56492.82	1.68%	
n.a.									
Gly	61948.14	2.07%	87622.51	2.74%	98251.22	2.91%	101581.54	3.01%	
Gln+His	216928.75	7.26%	232494.64	7.28%	255662.60	7.58%	249754.60	7.41%	
n.a.									
NH3									
n.a.									
Arg	525403.61	17.58%	537024.17	16.82%	552924.07	16.40%	551616.10	16.37%	
Thr	134294.46	4.49%	153514.46	4.81%	166470.45	4.94%	170234.07	5.05%	
Ala	75982.91	2.54%	63429.51	1.99%	70664.02	2.10%	69490.09	2.06%	
n.a.									
n.a.									
n.a.									
Pro	50669.35	1.70%	79134.41	2.48%	83823.96	2.49%	81583.79	2.42%	
aABA									
n.a.									
n.a.									
n.a.									
n.a.									
Cys	—	—	18449.04	0.58%	21648.81	0.64%	22190.78	0.66%	
Tyr	226093.35	7.57%	340223.79	10.65%	376562.81	11.17%	393802.46	11.68%	
n.a.									
Val	189826.13	6.35%	202831.87	6.35%	200815.50	5.96%	197644.24	5.86%	
n.a.									
Met	89887.30	3.01%	87274.07	2.73%	88897.54	2.64%	95049.69	2.82%	
n.a.									
n.a.									
n.a.									
n.a.									
Lys	171158.10	5.73%	95383.50	2.99%	71750.22	2.13%	50768.26	1.51%	
n.a.									
n.a.									
Ile	134447.08	4.50%	149070.57	4.67%	150074.81	4.45%	146221.22	4.34%	
Leu	359387.43	12.03%	292303.43	9.15%	277235.80	8.22%	265119.71	7.87%	
Phe	411403.75	13.77%	436585.85	13.67%	463673.59	13.75%	474074.25	14.07%	
Trp	55897.21	1.87%	128543.39	4.03%	140708.08	4.17%	148646.51	4.41%	
n.a.									

SJ N-N,N-F	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
AMQ								
Asp	25568.76	0.97%	21571.35	0.39%	33590.00	0.51%	12899.49	0.23%
Asn+Ser	203801.44	7.72%	412808.18	7.51%	520728.91	7.92%	407739.14	7.38%
Glu	92935.60	3.52%	114877.74	2.09%	151447.44	2.30%	107177.46	1.94%
n.a.								
Gly	34646.74	1.31%	135970.41	2.47%	178886.47	2.72%	174852.47	3.17%
Gln+His	148449.53	5.62%	449068.15	8.16%	471819.09	7.18%	365242.60	6.61%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	436243.15	16.53%	1044096.90	18.98%	1240519.24	18.87%	1160223.33	21.01%
Thr	103537.14	3.92%	226555.92	4.12%	259973.76	3.95%	261656.14	4.74%
Ala	89465.36	3.39%	134143.87	2.44%	199158.47	3.03%	146856.88	2.66%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Pro	77675.01	2.94%	150694.02	2.74%	215828.07	3.28%	178081.97	3.22%
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	—	—	22330.16	0.41%	—	—	—	—
Tyr	151062.00	5.72%	545951.65	9.93%	634657.86	9.65%	601244.50	10.89%
n.a.								
Val	174089.66	6.59%	297751.17	5.41%	348959.95	5.31%	259941.00	4.71%
n.a.								
Met	63430.41	2.40%	160654.95	2.92%	143142.97	2.18%	121575.29	2.20%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	209314.53	7.93%	192743.23	3.50%	339443.78	5.16%	154879.82	2.80%
n.a.								
n.a.								
Ile	143362.23	5.43%	202473.40	3.68%	250887.54	3.82%	189330.99	3.43%
Leu	352940.05	13.37%	513056.85	9.33%	636113.36	9.68%	475848.09	8.62%
n.a.								
Phe	301626.68	11.43%	710078.62	12.91%	756621.38	11.51%	712688.26	12.90%
n.a.								
Trp	31735.15	1.20%	165281.23	3.01%	191810.90	2.92%	192739.84	3.49%
n.a.								

SJ Pice Protein total a.a (R.P 1g/L)							
No.	Ret.Time min	Peak Name	M.W g/mol	Area	pmol/ul	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
1	18.09	AMQ		1112.280	1113.39		
2	20.49	Asp	133.10	38.586	38.62	51408.91	7.16%
3	22.82	Asn+Ser	132.12	37.394	37.43	49454.46	6.88%
4	23.75	Glu	147.10	54.812	54.87	80709.14	11.23%
5	25.85	Gly	75.01	51.388	51.44	38584.95	5.37%
6	26.50	Gln+His	146.15	17.133	17.15	25064.96	3.49%
7	29.49	NH3	17.00	28.064	28.09		
8	32.39	Arg	174.20	47.713	47.76	83198.51	11.58%
9	33.10	Thr	119.10	26.307	26.33	31362.86	4.37%
10	34.62	Ala	89.09	42.666	42.71	38049.31	5.30%
11	37.00	Pro	155.10	27.936	27.96	43371.99	6.04%
12	39.13	aABA	103.10	9.990	10.00		
13	41.82	Cys	121.50	9.519	9.53	11576.60	1.61%
14	42.16	Tyr	181.20	16.842	16.86	30547.88	4.25%
15	43.78	Val	117.20	29.475	29.50	34579.14	4.81%
16	44.57	Met	149.20	9.474	9.48	14149.03	1.97%
17	48.14	Lys	146.20	39.098	39.14	57217.94	7.96%
18	49.27	Ile	131.20	19.891	19.91	26123.60	3.64%
19	49.78	Leu	131.20	45.124	45.17	59262.48	8.25%
20	50.43	Phe	165.20	24.951	24.98	41259.75	5.74%
21	50.84	Trp	204.23	1.214	1.21	2481.01	0.35%
				total a.a weight (pg/ul)		718402.54	100%
				total a.a weight (g/L)		0.72	
SJ Pice Protein free a.a (R.P 50g/L)							
No.	Ret.Time min	Peak Name	M.W g/mol	Area	pmol/ul	pg/ul	a.a weight /total a.a weight
1	13.66	AMQ		765.970	937.31		
2	16.17	Asp	133.10	2.778	3.40	4524.24	2.06%
3	18.17	Asn+Ser	132.12	13.715	16.78	22173.49	10.11%
4	19.01	Glu	147.10	6.910	8.46	12438.30	5.67%
5	20.74	Gly	75.01	5.321	6.51	4884.22	2.23%
6	21.46	Gln+His	146.15	5.608	6.86	10028.68	4.57%
7	23.51	NH3	17.00	15.194	18.59		
8		Arg	174.20	—	—	—	—
9	26.30	Thr	119.10	19.938	24.40	29058.41	13.25%
10	27.31	Ala	89.09	14.347	17.56	15640.83	7.13%
11	28.75	Pro	155.10	3.757	4.60	7130.95	3.25%
12	30.22	aABA	103.10	7.740	9.47		
13	32.40	Cys	121.50	5.295	6.48	7872.22	3.59%
14	32.82	Tyr	181.20	1.194	1.46	2647.09	1.21%
15	33.52	Val	117.20	6.503	7.96	9326.33	4.25%
16	34.13	Met	149.20	4.238	5.19	7737.75	3.53%
17	36.87	Lys	146.20	18.514	22.66	33121.84	15.11%
18	37.47	Ile	131.20	1.786	2.19	2867.12	1.31%
19	37.70	Leu	131.20	18.682	22.86	29994.29	13.68%
20	37.92	Phe	165.20	8.037	9.84	16247.97	7.41%
21	38.05	Trp	204.23	1.428	1.75	3567.53	1.63%
				total a.a weight (pg/ul)		219261.27	100%
				total a.a weight (g/L)		0.22	

Rice protein (C사) eHVP(R, AX, G 처리)의 아미노산 함량
 - 3.5 liter 반응기

C사 Rice Protein eHVP(R,AX,G)

Peak Name	0시간		24시간		48시간		72시간	
	pg/ul	a.a weight /total a.a weight						
AMQ								
n.a.								
Asp	5,536.8	0.29%	10,581.8	0.23%	6,813.8	0.16%	8,520.9	0.19%
Asn+Ser	116,410.5	6.17%	357,292.3	7.74%	316,478.7	7.51%	375,404.5	8.32%
Glu	56,230.7	2.98%	85,694.2	1.86%	70,866.7	1.68%	85,291.6	1.89%
n.a.								
Gly	24,660.0	1.31%	92,117.0	1.99%	84,891.3	2.01%	109,344.5	2.42%
Gln+His	45,504.5	2.41%	256,280.4	5.55%	278,568.1	6.61%	308,038.0	6.83%
n.a.								
NH3								
n.a.								
Arg	225,841.5	11.96%	683,196.6	14.79%	577,831.9	13.71%	581,603.9	12.89%
Thr	79,382.4	4.20%	240,847.2	5.21%	231,094.2	5.48%	262,739.7	5.82%
Ala	79,459.2	4.21%	118,157.9	2.56%	102,022.0	2.42%	126,417.8	2.80%
n.a.								
n.a.								
Pro	64,133.5	3.40%	139,488.5	3.02%	125,726.2	2.98%	162,373.2	3.60%
aABA								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Cys	—	—	6,826.3	0.15%	8,542.7	0.20%	27,706.9	0.61%
Tyr	150,681.5	7.98%	257,712.6	5.58%	180,604.8	4.29%	101,523.3	2.25%
n.a.								
Val	133,167.5	7.05%	308,494.3	6.68%	283,051.8	6.72%	300,344.1	6.65%
n.a.								
Met	74,297.4	3.94%	201,178.5	4.36%	184,381.8	4.37%	159,586.2	3.54%
n.a.								
n.a.								
n.a.								
n.a.								
Lys	200,645.2	10.63%	99,440.0	2.15%	53,419.9	1.27%	89,563.9	1.98%
n.a.								
Ile	93,799.2	4.97%	227,449.9	4.92%	226,170.5	5.37%	261,247.0	5.79%
Leu	257,960.3	13.66%	486,251.4	10.53%	415,766.0	9.86%	460,681.7	10.21%
Phe	248,066.4	13.14%	809,630.6	17.53%	799,016.5	18.96%	810,220.6	17.95%
n.a.								
Trp	32,144.4	1.70%	238,011.9	5.15%	269,535.3	6.40%	282,671.1	6.26%
n.a.								