

11-1543

000-001

427-01

발간등록번호

11-1543000-001427-01

알레르기-프리 천연조미소재 생산기술 개발 최종보고서

호소분해공법을 이용하여 미강을 원료로 하는

# 고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

2016

농림축산식품부

## 호소분해 공법을 이용하여 미강을 원료로 하는 알레르기-프리 천연조미소재 생산기술 개발 최종보고서

주관연구기관 / 매일식품(주)

협동연구기관 / (주)아이엔비

(재)전남생물산업진흥원

식품산업연구센터

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “효소분해 공법을 이용하여 미강을 원료로 하는 알레르기-프리 천연조미  
소재 생산기술 개발”(개발기간 : 2014. 08. 01 ~ 2016. 07. 31)과제의 최종보고서로  
제출합니다.

2016. 09. .

주관연구기관명 : 매일식품주식회사 (대표자) 오상호 (인)  
협동연구기관명 : 주식회사아이엔비 (대표자) 정광호 (인)  
(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터 (대표자) 신현경 (인)

주관연구책임자 : 구 후 모  
협동연구책임자 : 정 광 호  
협동연구책임자 : 양 은 주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.



## 보고서 요약서

과제고유번호	114031	해 당 단 계 연구 기 간	2014.08.01~ 2016.07.31	단 계 구 분	2/2
연구 사업 명	중 사업 명	농식품기술개발사업			
	세부 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과 제 명	대 과 제 명				
	세부 과제명	효소분해 공법을 이용하여 미강을 원료로 하는 알레르기-프리 천연조미소재 생산기술 개발			
연구 책임 자	구후모	해당단계 참 여 연구원 수	총: 12명 내부: 5명 외부: 7명	해당단계 연구 개발 비	정부:170,000천원 민간: 56,667천원 계:226,667천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 25명 내부: 16명 외부: 41명	총 연구개발비	정부:340,000천원 민간:113,334천원 계:453,334천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	매일식품(주) 연구소			참여기업명 (주)아이엔비 (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	
<p>안정화 미강을 얻기 위한 방법으로, 양산화 가능성이 높은 로스팅, 연속식 열풍처리 등의 열처리 방법, Extruding방법에 대하여 검토하였으며, 이를 통하여 4주간의 산가변화는 로스팅 처리방법 1.94, Extruding을 이용한 방법은 4.65, 연속식열풍 처리방법은 6.80 및 8.95로 4주간 산가변화 10이하의 목표를 달성하는 안정화 기술 확보하였음.</p> <p>미강의 유리 단백질비율 개선하기 위해 물리적 파쇄처리 방법을 적용하여 기존의 효소처리를 이용한 방법대비 최소 28.8%에서 최대 35.9%만큼 단백질 추출비율이 향상되어 목표치인 10%향상을 상회하는 양호한 결과를 얻음.</p>					보고서 면수 : 200페이지

---

단백질 수율향상을 위한 미강 원료처리기술 개발을 목표로, 추출과정중에 불순물 제거 공정을 적용하여 Lab. scale에서의 단백질 함량 75.0%, Pilot scale에서의 단백질 함량 37.05%의 단백질 추출물을 얻어서 목표치인 35%이상을 달성하였음.

조미소재로서의 관능품질을 확보하기 위하여, 증곡효소와 정제효소의 조합에 따른 가수분해 진행 결과 아미노산화율 FN/TN 57.25%, 관능검사 평점 4.4로 평가되어 목표인 FN/TN 55%이상, 관능평가 평점 3.5이상을 달성함.

미강 효소가수분해물의 Salt enhancer로서의 효능평가결과, 미강 효소분해물의 나트륨 저감율은 12.3%~15.3%수준으로 평가되었음.

천연조미소재로서의 고부가가치화를 위하여, 효소분해물의 농축가공, SD분말화, VD 분말화 공정을 확립하였으며, Maillard reaction에 기초하여 Cysteine, Methionine 등 함유아미노산류 및 Pentose, Onion를 이용하여 meaty flavor, burnt potato flavor 생산조건을 확립함.

Ferulic acid, Coumaric acid, Polyphenol, Flavonoid 등 효소분해물 및 고부가가치화 개발품의 기능성성분 분석 및 아미노산 패턴분석을 수행하였으며, 항산화능 (DPPH Radical소거능, ABTS소거능), 항암활성, 항염증활성, ACE저해활성 등의 기능성평가를 수행하였음.

---

#### 4. 국문 요약문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식품 원료로의 이용을 목적으로 하는 지방산화 등 미강의 품질변화 억제기술 연구</li> <li>○ 미강의 최적 효소분해 조건 개발 및 이를 통한 알러지프리 천연 조미소재화 기술개발</li> <li>○ 미강 효소분해 조미 소재의 Reaction Flavor화 등 고부가가치화 기술 개발</li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미강의 유효이용을 목적으로, 효소분해 공법을 이용하여 미강을 원료로 하는 알레르기-프리 천연조미소재 생산기술 개발의 과제수행에 있어서, 미강의 유효이용이 저조한 원인인 산화억제를 목표로 안전화미강을 얻고, 이를 효소분해의 원료로 하고자 하였음.</li> <li>○ 안정화 미강을 얻기 위한 방법으로, 양산화 가능성이 높은 로스팅, 연속식 열풍처리 등의 열처리 방법, Extruding방법에 대하여 검토하였으며, 이를 통하여 4주간의 산가변화는 로스팅 처리방법 1.94, Extruding을 이용한 방법은 4.65, 연속식열풍 처리방법은 6.80 및 8.95로 4주간 산가변화 10이하의 목표를 달성하는 안정화 기술 확보하였음.</li> <li>○ 미강의 유리 단백질비율 개선하기 위해 물리적 파쇄처리 방법을 적용하여 기존의 효소처리를 이용한 방법대비 최소 28.8%에서 최대 35.9%만큼 단백 추출비율이 향상되어 목표치인 10%향상을 상회하는 양호한 결과를 얻음.</li> <li>○ 단백질 수율향상을 위한 미강 원료처리기술 개발을 목표로, 추출과정 중에 불순물제거 공정을 적용하여 Lab. scale에서의 단백질 함량 75.0%, Piolt scale에서의 단백질 함량 37.05%의 단백질 추출물을 얻어서 목표치인 35%이상을 달성하였음.</li> <li>○ 조미소재로서의 관능품질을 확보하기 위하여, 중국효소와 정제효소의 조합에 따른 가수분해 진행 결과 아미노산화율 FN/TN 57.25%, 관능검사 평점 4.4로 평가되어 목표인 FN/TN 55%이상, 관능평가 평점 3.5이상을 달성함.</li> <li>○ 미강 효소가수분해물의 Salt enhancer로서의 효능평가결과, 미강 효소분해물의 나트륨 저감율은 12.3%~15.3%수준으로 평가되었음.</li> <li>○ 천연조미소재로서의 고부가가치화를 위하여, 효소분해물의 농축가공, SD분말화, VD분말화 공정을 확립하였으며, Maillard reaction에 기초하여 Cysteine, Methionine 등 함황아미노산류 및 Pentose, Onion를 이용하여 meaty flavor, burnt potato flavor생산조건을 확립함.</li> <li>○ Ferulic acid, Coumaric acid, Polyphenol, Flavonoid 등 효소분해물 및 고부가가치화 개발품의 기능성성분 분석 및 아미노산 패턴분석을 수행하였으며, 항산화능(DPPH Radical소거능, ABTS소거능), 항암활성, 합염증활성, ACE저해활성 등의 기능성평가를 수행하였음.</li> </ul>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 과제를 통해 개발된 효소분해공법을 이용한 미강유래 천연조미소재는 저알러지성의 천연 조미소재로서 그간 풍부한 영양성분, 기능성 성분 등 우수한 특성에도 불구하고 조미소재로서 이용하지 않았던 미강을 본격적으로 이용한다는 점에서 의의가 큼.</li> <li>○ 본 과제의 효소분해공법을 이용한 미강을 원료로 하는 알레르기-프리 천연조미소재는 일반적인 조미소재의 원료인 대두, 소맥를 원료로 하는 조미소재에 비해 저알러지성이므로, 아토피 등 알러지 관련 질환을 가지고 있는 어린이나 청소년, 노약자 계층을 위한 식품으로서의</li> </ul>

사용이 기대되고 있으며, 특히 이와 관련된 시장이 이미 형성되어 있는 일본 등의 선진국 시장에 효과적으로 진출할 수 있을 것이 기대되어 수출증대에도 이바지 하고자 함.

- 미강유래 단백질소재로 만드는 효소분해 조미소재는 미강단백이 가지고 있는 아미노산 함량이 기존에 많이 사용하는 대두나 밀과는 다르기 때문에 다른 맛을 나타내어, 그동안 이용해왔던 기존의 맛과는 다른 차별화된 맛을 내줄 수 있는 가능성이 있다는 점에서 마케팅전략의 차별화와 기존 소재와의 블렌딩을 통해 새로운 조미소재 시장을 창출할수 있다는 점에서 매우 유망한 소재로 발전시켜 나갈 계획임.
- 국내에서 연간 36만톤이 생산되지만, 거의 대부분 사료로 이용되고 식품으로 이용되지 못하는 농업부산물인 미강으로부터 고부가가치 소재를 생산한다는 점에서, 녹색 산업의 발전과 농가소득의 증가 및 경제 활성화를 유도해 낼수 있어 국가적으로 크게 장려 할 수 있는 신규 산업을 만들어 나갈 계획임.
- 본 과제를 통한 산업화의 기대효과는 다음과 같음.

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준					
	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	200	400	800	1,600	3,100
경제적 파급효과	200	400	600	800	1,000	3,000
부가가치 창출액	100	500	700	1,000	2,000	4,300
합 계	400	1,100	1,700	2,600	4,600	10,400

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득 효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

중심어 (5개 이내)	미강	효소분해	알레르기-프리	리액션플래버	조미소재
----------------	----	------	---------	--------	------

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

<p>Purpose&amp; Contents</p>	<p>○ For the purpose of use as a food raw material, suppression technology research of rice bran of quality degradation. ○ Technology development of allergy-free natural seasoning material of the optimal enzymatic hydrolysis conditions of rice bran. ○ The development of high value-added technologies, such as Reaction Flavor of rice bran of enzymatic degradation seasoning material.</p>				
<p>Results</p>	<p>As a method for mass production potential stabilizing rice bran, results of studies on the method of Roasting and Continuous hot-air treatment and Extruding, 4 weeks acid value of degradation became stable below 10. In the application of the physical disruption treatment method for the purpose of improving the yield of rice protein, in the result of the extraction yield of the protein of up to 35.9 percent from 28.8 percent as compared to the existing enzyme treatment, higher than the 10 percent improvement goal FN / TN% of amino acid rate for the sensory quality of the enzymatic hydrolysis of rice bran is 57.25%, scores of sensory evaluation was 4.4. The results of efficacy evaluation as Salt enhancer of enzymatic hydrolysis of rice bran, the reduction rate of the sodium was 12.3% ~ 15.3%. Concentrated processing of enzymatic hydrolysis of rice bran, SD powdered, development and of VD powdered process, became established the production conditions of the Reaction Flavor as a principle in the Maillard Reaction. Analyzed amino acid pattern and functional components(Ferulic acid, Coumaric acid, Polyphenol and Flavonoid) of the enzyme hydrolyzate of rice bran.</p>				
<p>Expected Contribution</p>	<p>The raw material is rice bran allergy-free natural seasoning material as compared to the general seasoning material of the raw materials of soybean and wheat, because it is hypoallergenic, proceed exports to developed countries the relevant market is already forming as it can be expected.</p>				
<p>Keywords</p>	<p>Rice Bran</p>	<p>Enzymolysis</p>	<p>Allergy-Free</p>	<p>R e a c t i o n Flavor</p>	<p>S e a s o n i n g matter</p>

## 6. 영문목차

### CONTENTS

1. Overview of Research and Development Challenges .....	10
2. State of the domestic and international technology development .....	16
3. Content and results of the study .....	30
4. Achievement and contribution to the related fields of the goal .....	186
5. Utilization plan of the research results .....	187
6. Collected foreign scientific technology information for studying .....	187
7. Security grade of R & D results .....	188
8. Equipped with the National Science and Technology information research facility that has been registered in the system .....	188
9. Performance track record of safety measures of the laboratory by the research and development challenges .....	188
10. Typical research performance of R & D challenges .....	189
11. Other matters .....	189
12. Reference .....	189

# 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요 .....	10
2. 국내외 기술개발 현황 .....	16
1절 국내 기술개발 현황 .....	16
1. 단백질 관련 국내산 소재 개발의 필요성 .....	16
2. 쌀과 미강관련 단백질 소재의 국내 개발현황 .....	17
3. 국내 제품생산 및 시장 현황 .....	18
2절 국외 기술개발 현황 .....	19
1. 국제적으로 단백질 신소재 개발은 식품바이오업계의 Hot Issue ...	19
2. 조미용 단백질 원료 개발시 핵심 목표 .....	21
3. 조미용 단백질 신규 소재 동향 .....	21
4. 기타 조미용 단백질 신규 소재 동향 .....	23
5. 전 세계 시장에서의 단백질 수요량은 지속적으로 증가하는 추세 ..	24
6. 미강단백 소재 최신 기술 개발 동향 .....	25
7. 국외 제품생산 및 시장 현황 .....	27
3절 미활용 바이오매스를 발굴, 활용한 단백질 신소재 사업개발 필요 ..	28
1. 국내 실정에는 농업 부산물을 활용한 식물성 단백질 개발이 적합 ...	28
2. 국내 시장환경 변화 및 기술 개발 시사점 .....	29
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	30
1절 미강의 식품원료로써의 품질유지 안정성 연구 개발 .....	36
1. 미강의 전처리기술별 품질변화 비교 분석 .....	36
2. 미강의 안정화 처리방법별 품질변화 억제효능 비교 분석 .....	36
3. 안정화 미강의 식품원료로써의 특성 분석 .....	42
2절 미강의 분해 최적화를 위한 처리기술 연구 .....	54
1. 단백질추출 수율 향상을 위한 미강의 최적화 분해조건 .....	54
3절 미강의 효소분해 특성연구 .....	66
1. 미강의 효소분해 최적 조건 평가 .....	66
4절 미강효소분해물의 scale up 생산조건 연구 .....	106
1. 종국효소와 정제효소균 조합 가수분해 연구 .....	106
2. 미강효소분해물을 이용한 조미소재의 고부가가치화 연구 .....	128
5절 미강효소 분해물 및 조미소재의 기능성 평가 .....	136
1. 미강효소분해물과 액상 형태의 조미소재 시료의 품질특성 분석 ...	136
2. 미강효소분해물 분말 시료의 품질특성 분석 .....	152

6절 미강효소분해물을 이용 reaction flavor 조건 연구를 통한 초고부가가치화 연구 .....	166
1. Maillard reaction에 기초한 reaction flavor 조건연구 .....	166
2. Maillard reaction에 기초한 reaction flavor 품질확인 .....	171
3. 다양한 종류의 reaction flavor 생산 조건 연구 .....	181
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	186
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	187
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	187
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	188
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	188
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	188
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	189
11. 기타사항 .....	189
12. 참고문헌 .....	189



# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 식품 원료로의 이용을 목적으로 하는 지방산화 등 미강의 품질변화 억제기술 연구
- 미강의 최적 효소분해 조건 개발 및 이를 통한 알러지프리 천연 조미 소재화 기술개발
- 미강 효소분해 조미 소재의 Reaction Flavor화 등 고부가가치화 기술 개발

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 쌀은 세계에서 생산되는 곡물의 30%를 차지하는 거대한 식량자원으로 지구의 약 70% 인구가 쌀을 먹고 있음. 쌀의 부산물 중 미강(米糠)은 현미를 백미로 도정하는 과정에서 발생하는 껍질부분에 해당되며, 도정 전 현미에 대한 미강의 중량비율은 불과 10%에 지나지 않지만, 쌀 전체의 약 75%에 상당하는 풍부한 미네랄 성분과 영양소, 기능성 성분이 미강에 함유되어 있음.
- 벼 생산에 따른 부산물로서 벼짚, 미강 및 왕겨 등이 다량 발생하고 있으나 이들의 활용은 퇴비화, 소각, 사료화 등의 소극적 활용에 머무르고 있는 실정임.
- ※ 연간 벼 부산물 발생량(2012) : 벼짚(565만톤), 왕겨(80만톤), 미강(36만톤)

표. 벼 부산물 이용 형태

(단위: %)

구 분	퇴비로 활용	가축사료/갈래	식용활용	정미소에 두고 음	계
왕 겨	82.9	9.8	-	7.3	100
미 강	41.0	48.7	-	10.3	100
쇄 미	-	80.0	10.0	10.0	100
청 미	-	76.9	19.2	3.9	100

자료 : 한국농촌경제연구원 수도작 조사결과, 2006

- 벼 부산물은 고도이용을 위한 융복합 기술을 적용함으로써 그 부가가치를 획기적으로 높일 수 있으며, 농기업의 수익성을 극대화할 수 있는 유용한 소재임.
  - 왕겨 : 단순이용 50원/kg → 에너지화 400원/kg, 실리카(Si) 30,000원/kg
  - 미강 : 단순이용 200원/kg → 식품소재화 1,000원~100,000원/kg  
→ 생분해 제품·화장품소재 2,000원~50,000원/kg
- 특히 쌀 부산물인 미강은 친환경적인 자연소재이며 트랜스지방이 없으며 항산화활성이 있는 기능성 물질과 몸에 유익한 불포화지방산으로 구성되어 있고 발연점이 높아 고급 식용유로 사용할 수 있는 쌀눈유의 급원이며, 생체조절 기능과 항산화활성을 갖는 파이톨케미칼 및 알레르기 유발 가능성이 거의 없는 단백질과 입자크기가 작은 전분의 급원임.

표. 미강의 주성분과 효능 효과

	주성분	효능 효과
비타민	티아민, 토코페놀, 비타민 B, 피틴	항산화작용, 혈액축진, 미백효과(피부의 미백효과)
아미노산/단백질	알부민, 글로블린, 글루테닌	탄력 증진, 세포활성, 비알레르기 유발
식이섬유	셀룰로오스, 펙틴	노폐물 제거, 저 열량, 항암효과, 변비억제
다당류	오리자브란	보습효과, 촉촉한 피부
전분		지방대체제로 활용이 가능, 에너지원, 부형제
유지	감마 오리자놀	자외선 흡수, 미백효과, 장의 염증을 억제

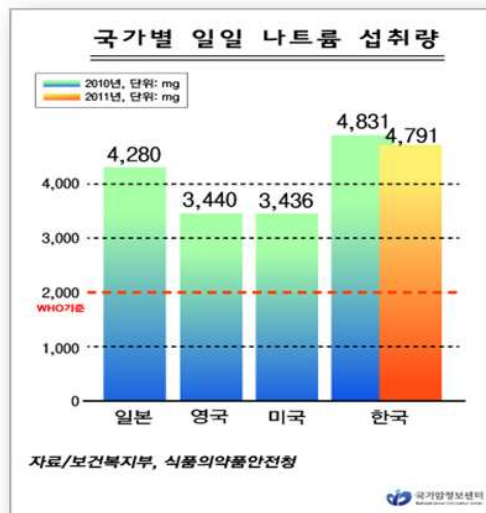
- 즉, 미강은 쌀의 종류나 품종에 따라 달라질 수 있으나 현미유 원료나 식이섬유 같은 기능성 물질을 추출하여 사용할 수 있는 우수한 식품소재이지만 바로 생산된 생 미강은 도정과정에서 리파제나 리폭시나아제 등의 효소 작용으로 산패가 되고 지방 산화물에 의해 이취와 색이 누렇게 변하는 등 품질저하로 인해 활용성이 낮은 실정임.
- 미강에 포함된 영양성분 중 단백질은 12~16%, 지방은 18~23%, 탄수화물 45~55%, 식이섬유 25~41%를 함유하고 있으나, 미강을 식품으로 이용하는 예는 매우 드물고 대부분 가축의 사료로서 이용되거나 폐기되는 실정임.
- 안정화 미강
  - 안정화된 미강(Stabilized rice bran)은 리파제나 리폭시나아제 효소의 활성을 억제하여 산패되지 않으면서 성분 변화를 최소화함.
  - 89% 백미 쌀가루에 11%의 안정화된 미강을 혼합하면 본래의 난알 형태의 현미로부터 얻은 것과 같은 성질을 가짐.
  - 안정화된 미강은 자연의 건강유지, 매일 영양, 건강, 체중관리 건강한 생애를 위한 즉석 에너지에 필요한 필수 비타민과 미네랄(K, Ca, Mg, Fe, P, Zn,  $\gamma$ -oryzanol,  $\omega$ -3와  $\omega$ -6 지방산 등) 및 100여개의 항산화제와 보조인자를 포함함.
  - 안정화된 미강에는 새롭게 발견된 비타민 E와 토코트리에놀(tocotrienols)의 복합체로 일반적으로 비타민 E로 불리며 다른 항산화제보다 40~60배의 활성을 가짐.
- 미강의 안정화 방법
  - 미강은 생산직후 즉시 안정화해야 리파아제에 의한 지방질의 가수분해를 방지할 수 있음.
  - 압출성형(extrusion)이나 전자파(microwave) 가열과 같은 열처리, ohmic 가열, 염산을 사용한 화학적 방법, 저온 저장, 상대습도의 조절, irradiation 조사와 같은 물리 화학적 방법으로 lipase를 불활성화함.
  - 미강의 안정화방법으로 미강에 함유된 폴리페놀에 의해서 가능하다는 일부 연구가 보고됨.
  - 또한, 안정화된 쌀겨에 probiotics로의 역할을 하며 장 관련 질병의 예방이나 치료에 사용되는 식이보충제인 효모(Saccaromyces boulardiif)로 발효된 쌀겨의

bioactivity를 갖는 대사산물(쌀겨 파이토케미칼)을 확인함(Ryan et al. 2011).

- 미강을 최종 식품소재나 원료로 활용할 때 가공적성을 고려하여 안정화처리 최적조건을 확립해야 하며 안정화 처리 후 쌀겨는 수용성과 불용성으로 구분하여 단백질, 식이섬유 및 용해성 파이토케미칼과 불용성 단백질, 식이섬유와 전분으로 분리하여 각각을 더 유용한 식품소재로 사용할 수 있도록 용도별로 처리하여 식품소재로 고부가가치화할 수 있음.
- 조미소재를 구성하는 성분은 여러 가지가 있으나, 그중 단백질이 가장 중요한 성분으로서, 미강은 약 14%의 단백질을 함유하고 있음.
- 미강단백은 맛을 내기 위한 글루탐산, 아스파라긴산, 글리신, 알라닌 등이 골고루 풍부하게 분포되어 있어 분해를 통한 조미소재 제조 시 글루탐산 비율이 높은 다른 식물성단백과는 다른 맛 풍미를 낼 것으로 예상됨.
- 그동안 몇몇 선행연구자들에 의해 미강단백을 분리해내려는 시도가 있었으나, 일단 효율적인 추출 분리가 어려워져 실용화되기 힘들었음. 그 이유는 미강단백은 대두단백과는 달리 섬유질 내외곽 모두에 골고루 존재하며, 섬유질 외곽에 있는 단백질은 알칼리 추출로서 쉽게 분리해낼 수 있으나 섬유질 내부의 단백질은 용매 추출 시 섬유질이 용매와 닿는 면적을 줄여 분리를 방해함으로써 추출을 어렵게 함.
- 따라서 섬유질을 효과적으로 제거하는 방법을 개발하면 미강단백을 유용한 단백질 소재로 개발할 수 있을 것으로 사료됨.
- 현재 국내외를 막론하고 천연조미소재 원료로서 주로 이용되는 곡물류는 대두, 소맥을 원료로 하는 가수분해 계통의 조미소재가 주류를 이루고 있는 것이 현실임. 이러한 대두와 소맥을 주원료로 하는 천연 조미소재는 원료에서 유래하는 알레르겐에 의해 알레르기를 유발하게 하는 점이 있어서, 서구를 중심으로 알레르기-프리 식품을 찾는 소비자의 니즈를 충족시키지 못하고 있으므로 알레르기-프리 식품을 위한 천연조미소재의 개발이 절실함.
- 대두나 소맥은 알레르겐을 함유한 대표적인 곡물로서, 알레르기를 유발시키는 원인 곡물의 2~3위를 차지할 정도로 알레르기 질환을 가진 사람들에게는 기피해야 할 대표적인 곡물로 알려져 있음. 현대와 같은 건강지향성향이 강한 소비자의 욕구를 충족하기 위해서는 천연조미소재의 원료로 알레르겐이 없는 원료를 선택하여 조미소재화 하는 기술을 개발하고 상품화할 필요성이 강하게 대두되고 있음.
- 미강에 함유된 성분에 아토피성 피부염 등의 알레르기를 일으키는 IgE 항체에 작용하여 염증작용 등을 억제하는 작용이 있다는 것을 도쿄대의 尾崎교수, 도쿄해양대의 潮秀교수 등이 규명하였음. 천연 성분에서 유래하는 새로운 항알레르기 약품으로 이어질 수 있을 것으로 기대됨. 연구팀은 미강 성분 중에 자외선흡수, 항산화 작용 등이 보고되어 있던 감마오리자놀에 주목하고 이 성분이 장(腸) 등의 염증을 억제하는 것을 확인함. 알레르기에도 효과가 있는지를 동물실험을 통하여 확인하였으며, 그 결과 미강성분은 IgE 항체에 작용하여 항알레르기 작용도 있다는 것을 발견하였음. 미강성분이 IgE 항체에 작용함으로써 가려움증을 유발하는 물질의 방출이 70~80% 억제되었으며, 이는 지금까지의 항알레르기약의 억제효과를 상회한다고 함.
- 식품 알레르기는 면역시스템 질환군으로, 아토피성 피부염등 소아의 35%가 식품알

레르기를 갖고 있다고 알려짐. 이들 식품 알레르기는 가벼운 피부반응에서 정도가 중해서 생명을 위협하는 반응에 이르기까지 범위가 넓다고 할 수 있음. 주요 식품 알레르기 유발물질은 6가지로서(우유, 계란, 땅콩, 밀, 대두, 호두) 아동 식품알레르기 반응을 일으키는 원인의 90%를 점유함.

- 식품의약품안전처 고시 제2014-19호(2014.2.12)에 의하면 한국인에게 알레르기를 유발하는 식품원료로 난류(가금류에 한함.), 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토, 아황산류로 규정하고 있으며, 일본의 경우는 알레르기 유발원료 의무표시 7품목으로 계란, 우유, 밀, 땅콩, 새우, 메밀, 게로 규정하고, 권장표시 18품목의 식품 및 식품원료를 정하고 있지만, 어디에도 쌀을 알레르기 유발 식품원료로 정하지 않고 있음을 알 수 있다.
- 한편 한국인들은 짜게 먹는 습관으로 인해 나트륨 과다 섭취에 대한 경고가 지속되고 있으나 나트륨 섭취를 줄일만한 뚜렷한 대책은 아직 없는 상태임.



- 나트륨 섭취를 줄이기 위한 방법으로는 크게 3가지가 있음.
  - 1) 나트륨 대신 칼륨이나 마그네슘 같은 대체 미네랄을 사용하는 방법
  - 2) 나트륨을 일부 MSG로 대체하여 전체 나트륨의 섭취를 줄이는 방법
  - 3) 2)에서 MSG대신 식물성 단백 가수분해물(HVP)를 사용하여 나트륨과 MSG를 줄이는 방법
- 미강단백은 알라닌과 글리신 등 단맛과 농후미를 줄 수 있는 아미노산이 다른 식물성 단백보다 풍부하여 나트륨 저감화 용도로 사용 시 좋은 효과를 낼 수 있을 것으로 생각됨.
- 식염은 각종 식품의 전체적인 풍미를 끌어올리는 Taste Booster의 역할을 갖고 있으므로, 저염화나 감염을 시도할 경우에 식품의 전체적인 풍미가 저하되는 역효과가 나게 됨으로 인해 효과적인 Salt Reduction의 효과를 거두기가 어려움. 본 연구과제에서 개발되는 조미소재는 다양한 아미노산으로부터 발현되는 지미(Umami) 및 농후미(Kokumi)의 발현에 의해 식품의 전체적인 풍미를 증강시키는 원리로 인해 식품에서의 식염함량을 낮추고도 풍미를 유지시키는 작용을 갖게 됨. 식품의 풍미를 향상시킬 수 있는 조미소재는 거의 어느수준 이상의 Salt Enhancer 역할을 갖

는다고 볼 수 있으나, 본 연구과제에 의해 개발되는 조미소재는 풍미증강으로 인한 Salt Enhancer 역할등 조미소재 본연의 역할 이외에 알레르기-프리 조미식품소재 라는 특화된 장점을 갖고 있음.

- Reaction Flavor는 Maillard Reaction에 기초하여 식품의 제조 가공공정에서 특유의 향기성분을 생성시키는 것으로, 이 향기성분의 생성은 반응의 기본물질이 되는 아미노산의 종류나 당(糖)의 종류, 온도, 압력과 같은 반응조건에 따라 각각 다른 향기성분이 생성됨. 배합물의 종류에 따라서 Beef Flavor, Chicken Flavor 등 다양한 Reaction Flavor 생산이 가능하며, 각종 Snack, Seasoning, Soup 원료 등의 생산기법에서 고부가가치화를 꾀하는데 있어서 불가결한 제조기법의 하나임.
- 전 세계적인 식품 시장의 규모는 27,319억불 규모로, 그중 제일 큰 식품시장을 형성하고 있는 국가는 미국으로 세계 식품시장 비중 14.8%인 4,050억불의 식품시장을 형성하고 있으며, 다음으로 중국의 식품시장이 세계 식품시장 비중 10.7%인 2,929억불, 일본의 식품시장이 세계 식품시장 비중 9.4%로 2,558억불의 식품시장을 형성하고 있음. 우리나라는 식품 시장규모 세계 15위 규모로 세계 식품시장 비중 1.1%인 308억불 규모의 식품시장을 형성하고 있음. 본 사업의 목표인 천연 조미소재 효소 가수분해물의 잠재적인 시장은 조미식품 관련시장이 될 것으로 판단되므로, 전 세계 식품시장의 식품 제품군별 시장규모를 근거로 조미소재의 시장규모를 추정했을 때, Sauce, dressing & condiments시장규모의 10%, Savory snacks시장규모의 1%를 점유할 것으로 감안하면, 전 세계적인 잠재시장의 규모는 12조원의 규모일 것으로 추정되며, 전 세계적으로도 기능성 식품에 대한 관심과 수요가 증가되는 경향에 있음에 따라, 시장에서의 확대·정착은 안정적인 것으로 판단됨.
- 미강유래 단백질로 만드는 효소분해 조미소재는 미강단백이 가지고 있는 아미노산 함량이 기존에 많이 사용하는 대두나 밀과는 다르기 때문에 다른 맛을 나타낼 것으로 예상하며, 그동안 이용해왔던 기존의 맛과는 다른 차별화된 맛을 내줄 수 있는 가능성이 있다는 점에서 마케팅전략의 차별화와 기존 소재와의 블렌딩을 통해 새로운 조미소재 시장을 창출할 수 있다는 점에서 매우 유망한 소재로 생각됨. 본 연구과제의 완성품 형태로는 Liquid type, Paste type, Powder type등 수요처의 용도에 맞는 다양한 형태의 완성품 생산이 가능하며, 다양한 형태의 완성품 상품화는 시장에서의 안정적인 정착, 신장에 효과적으로 대응하는 수단이 될 것임.
- 본 기술개발사업은 미강에 함유된 단백질, 지방 등 영양성분으로부터 발현되는 조미소재로서의 특성이외에 감마오리자놀, 감마아미노낙산(GABA)등 미강에 함유된 기능성성분을 함유하는 조미소재의 생산기술을 개발하는데 목적이 있다고 할 수 있음.

표. 미강의 기능성 물질 및 보고된 효능

미강	화합물 이름	보고된 대표적 효능
	감마 오리자놀	항암, 항산화, 항염증 작용
	옥타코사놀	항동맥경화
	베타 시토스테롤	콜레스테롤 저하, 항암효과
	가바	중추신경세포 전달물질
	토코트리에놀	항산화, 항암, tyrosinase 저해효과, LDL 저해

1-3. 연구개발 범위

- 미강(米糠)의 식품원료로서의 품질유지 안정성 연구 개발
- 미강의 식품원료로서의 특성분석
  - 일반성분 및 미량성분, 아미노산, 기능성성분 등
- 최적 정미특성 발현을 목적으로 하는 펩타이드, 아미노산화를 위한 미강의 효소분해 특성 및 최적 조건 연구
- 미강 효소분해물의 성능평가
  - 펩타이드, 아미노산 패턴 등 특성 분석
  - 기능성 성분 분석
  - 관능평가를 통한 조미소재로서의 특성분석
  - Salt enhancer로서의 효능 평가
- 미강 효소분해물의 Scale up생산조건 연구
- 미강효소분해물을 이용한 조미소재의 고부가가치화 연구
  - Concentration, Vacuum Drying등 공정을 통한 고부가가치화
  - 고부가가치화 미강효소분해물의 성능평가 및 관능 평가
  - *in vitro* 기능성 평가(항산화 활성, 항고혈압 활성, 항암 활성)
- 미강효소분해물을 이용한 Reaction Flavor 조건 연구를 통한 초고부가가치화 연구
  - 최적 Reaction Flavor 조미소재 생산조건 연구
  - Reaction Flavor의 성분 분석, 관능평가 등 성능평가
  - Liquid, Paste, Powder등 수요편이성을 고려한 상품의 제형화 연구

## 2. 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내 기술개발 현황

#### 1. 단백질 관련 국내산 소재 개발의 필요성

- 국내시장에서 단백질 소재는 주로 유청 또는 대두단백 등 수입품목에 의지하는 관계로 아직 단백질 소재의 사업화가 본격 추진되고 있지 않으며, 일부 연구목적으로 학교에서 연구되고 있음. 그나마도 주로 대두와 같은 식물성 단백질 공급원에서 단백질을 추출하여 건강기능성 소재로의 이용이 주목적일 뿐 일반적인 식품원료로서 단백질 공급은 연구 되고 있지 않음.

- 국내에서 유통 중인 대표적인 단백질 소재로서는 유청단백질, 카제인나트륨, 분리대두 단백질, 농축대두단백, 농축완두단백 등이 있으며, 이들 소재 대부분은 소시지 또는 햄 등의 육가공제품에 단백질보충용 또는 물성개량용으로 사용되고 있으며, 조미용 소재로는 탈지대두박, 밀 글루텐 등이 거의 시장 전반을 차지하고 있으며 이외 옥수수글루텐, 우유 등의 동물성단백질 등이 소량의 시장을 형성하고 있음.

- 그러나, 이들 소재의 대부분은 미국, 유럽, 중국 등지에서 수입되고 있으며, 국내산 원료로부터 개발, 사용되고 있는 사례는 극히 일부에 지나지 않음. 이러한 현상의 원인은 국내 농산물의 가격 및 품질 경쟁력이 외국산에 비해 떨어지기 때문으로서, 일례로 국내산 우유는 대부분 시유형태로서 대형마트, 슈퍼 등 일반 유통채널을 통해 직접 마시는 형태로 주로 소비되고, 연유, 버터, 치즈, 분유 등 육가공제품으로 소비되는 물량은 전체의 20%에 지나지 않음.

유제품별 소비 비율

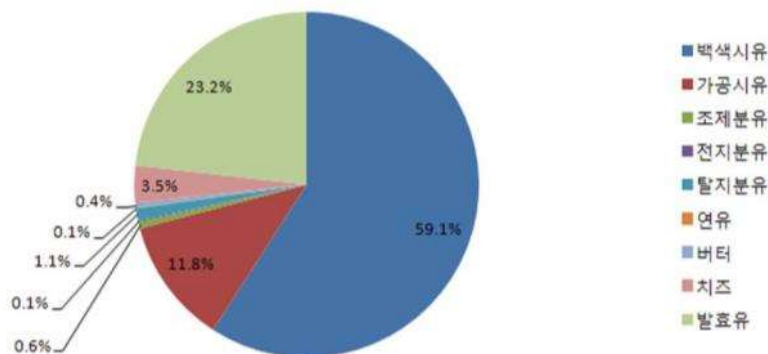


그림 1. 2012년 국내 유제품별 소비비율<sup>1)</sup>

- 그러나, 국내에서 직접 생산하는 단백질 공급원은 찾기 힘들어지는 상황인데, 그 이유는 수입산 대두유 가격이 하락하면서 국내에서 직접 대두유를 착유하기보다는 저렴한 수입산 대두유를 판매하는 업체가 늘어나면서, 대두유의 부산물인 탈지대두박의 공급이 줄어들게 되고, 결국은 탈지대두박을 이용하는 산업이 위축되는 결과를 가져옴. 이에 따라, 탈지대

1) 출처 : 축산유통정보센터 홈페이지

두박에서 추출해야하는 대두단백질 역시 국내산 소재 개발보다는 해외 소재를 수입하려는 경향으로 바뀌고 있는 형편임.

- 요약하면, 국내에서는 산업계 구조적 문제로 인해 원료 공급 및 시장 수요가 없어 국내산 단백질 소재의 개발 필요성이 상대적으로 낮게 평가되어 왔으며, 최근까지도 이러한 경향은 꾸준히 유지되어왔음.

- 그러나, 2000년대 들어 국제 유가상승 및 원자재 가격의 동반상승으로 인해 각종 바이오 소재의 가격이 지속적으로 상승하는 경향이 나타나고 있으며, 특히 바이오에탄올 생산 증가 및 이에 따른 사료용 가용 작물량의 감소 등으로 인해 탄수화물, 단백질, 지방 등 각종 바이오매스 자원의 수급이 까다로워지고 있음. 이중에서도 단백질은 가축의 성장을 늘리는데 필수적인 영양성분으로서 사료용 자원에서 매우 중요하게 평가받고 있는데, 최근 가축 사육 두수의 증가로 인해 사료공급 부족사태가 계속 이어지는 가운데 양질의 단백질 공급원을 확보하기 위한 경쟁이 나날이 가속되고 있는 형편임.

## 2. 쌀과 미강관련 단백질 소재의 국내 개발현황

- 쌀은 심부에서 외피로 나갈수록 탄수화물 함량은 감소하는 반면, 단백질이 증가하는 특징을 가짐. 부위별로 단백질 함량을 조사하면, 백미는 약 5%, 현미는 약 6%, 미강은 약 13% 정도의 단백질 함량을 가지며, 1990년대 쌀 가공식품의 필요성이 대두되고, 미강유 공장이 전국에 20여개 가량 될 정도로 활성화되면서, 미강유를 추출하고 난 탈지미강을 이용하는 목적으로 미강단백 추출 연구가 진행된 바 있음.

- 한편, 백미 부위의 단백 추출연구는 거의 진행되지 않다가, 최근 막걸리 생산 후 남은 찌꺼기에서 단백질을 추출하는 기술이 연구된 바 있음. 2010년 농림수산식품부 고부가가치 식품기술개발사업 중 “쌀가공부산물을 활용한 쌀단백질 및 천연보존제 제조기술 개발 및 산업화”과제의 연구보고서에 따르면 쌀단백질은 저알러지성이라는 특징으로 인해 기존의 다른 단백질과는 다른 장점이 있으며, 이에 따라 막걸리 부산물인 주박, 쌀엿 부산물인 시럽박, 현미유 부산물인 탈지미강으로부터 각각 단백질 추출 시험을 실시한 결과 원료의 단백질 함량이 가장 높은 시럽박을 최적의 원료로 선정, 이를 추출하는 기술 및 효소로 가수분해하여 최적의 수용성 쌀 단백질 제조기술을 개발 보고한 바 있음. 이 연구과제의 결과를 활용하여 2011년 국내산 쌀엿시럽박을 이용한 수용성 쌀단백질이 출시된 바 있음.

- 미강단백질은 그동안 높은 영양적 가치로 인해 주목받고 있었음에도 불구하고, 원료 수급의 어려움과 추출공정의 난이도로 인해 오랜 시간동안 개발되지 못하다가, 2009년 CJ제일제당에서 세계 최초로 미강단백질을 개발, 상품으로서 출시한 바 있음. CJ제일제당의 미강단백질은 탈지미강으로부터 단백질을 추출, 정제, 농축한 제품으로서, 분리대두단백 제조공정을 응용하여 개발하였으며, 단백질함량 80%이상의 식품용 단백질로서 현미유를 착유한지 24시간 내에 단백추출을 함으로써 신선도를 높여, 변성이 되지 않았다는 것을 특장점으로 하였음. 용해도는 분리대두단백과 같은 수준이었던 반면, 유효력 및 pH안정성 등에서는 분리대두단백보다 우수한 특징을 가져, 카제이나트륨 및 유청단백 대체를 목표로 하였음. 그러나 탈지미강 대량수급의 문제로 인해 중국에서 생산되었다는 단점과 추출 중 색과 맛의 변화로 인해 식품용으로서 단백질질이 경쟁제품에 비해 열위에 있었던 관계로 판매량은 극히 적음.



- 현재까지 국내에서 개발된 쌀 또는 미강유래의 단백질의 경우 용해도가 50%를 넘지 못해 용해도를 높이기 위해 반드시 효소 등의 처리를 통한 가수분해공정을 거쳐야한다는 단점을 가지고 있어, 그 사용용도가 단백질보충용 등으로서 극히 제한적임.

### 3. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 식품산업의 시장규모는 2012 KHIDI보건산업통계집의 자료를 참고했을 때, 연간 43.2조원 규모의 시장규모를 갖추고 있으며, 그 중 본 사업의 개발목표인 콩·밀을 원료로 하는 효소 가수분해물과 연관된 장류의 시장규모는 생산액 기준 7,440억원의 시장 규모로, 2011년 기준 전년대비 증가율은 5.9%로 점진적으로 증가추세를 보이고 있는 것으로 확인됨<sup>2)</sup>.

- 국내 장류 생산규모는 2012년도 식품 및 식품첨가물 생산실적 기준으로 연간 613,933톤 규모이며, 그 중 국내 출하량 497,725톤, 수출 24,161톤의 생산·출하 규모를 보이고 있음. 장류의 출하액기준 식품산업 시장에서의 점유율은 2.38%이며, 출하액기준 증가율은 2011년 대비 5.44%의 증가세를 보이고 있음<sup>3)</sup>. 본 사업의 효소 가수분해물은 기본적으로 먼저 장류시장의 잠식을 통해 시장 확대를 도모할 것으로 판단되며, 국내장류의 생산규모나 시장규모로 판단할 때, 우수한 생리기능성과 향미 등 관능품질을 겸비한 조미식품으로서 안정적인 시장 확대 정착을 이룰 것으로 판단됨.

- 국내 효소분해간장 시장의 규모는 2012년 출하액 기준 301,600천원으로 집계되고 있으며, 2008년 대비 85.6%의 신장을 나타냈다. 공식 집계되는 효소분해간장의 출하액은 스낵이나 씨즈닝등 식품산업체에서의 2차가공에 대한 부분이 누락된 것으로 판단되어 보다 더 큰 규모의 시장을 형성하고 있을 것으로 판단됨.<sup>4)</sup>

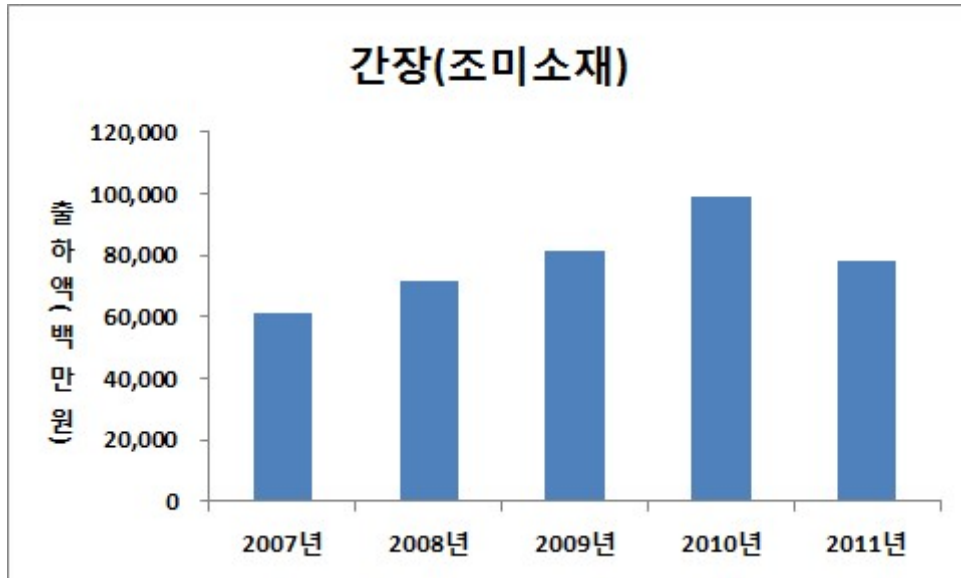
- 국내 가정용 조미료 시장은 연간 1,350억원 수준으로 추정되며, 이중 간장으로 대표되는 조미소재의 국내 업체들의 생산 출하액은 2011년 기준으로 783억원 가량이고 연간 출하액 변동 추이는 아래 그림과 같음.<sup>5)</sup>

2) 2012 KHIDI 보건산업통계집, 한국보건산업진흥원

3) 2012년도 식품 및 식품첨가물 생산실적 통계, 식품의약품안전처

4) 2012년도 식품 및 식품첨가물 생산실적 통계, 식품의약품안전처

5) 2012년 식품유통연감



- 국내 천연 조미료 시장은 170억원 정도로 추산되며, 2006년 산들애(CJ제일제당), 맛선생(대상) 등의 천연 조미료가 출시되면서 비약적으로 증가하여 2009년엔 시장점유율 12.4%를 기록할 만큼 급격히 성장중인 시장임.

- 현재 출하되고 있는 조미소재(간장)의 원료는 대부분 대두, 밀 등과 같은 알러지 유발원들이며, 분해하면 알러지 유발 활성이 낮아진다는 이유로 아토피 및 알러지성 비염, 천식 등 알러지 환자들을 위한 저알러지성 조미소재는 거의 개발되어 있지 않음.

- 매일식품에서 국내 최초로 현미를 발효시켜 만든 현미간장을 2011년 출시한 사례 있음.

## 2절 국외 기술개발 현황

### 1. 국제적으로 단백질 신소재 개발은 식품바이오업계의 Hot Issue

- 2002년 설립된 국제 식품 및 식품기술 네트워크사인 Bridge2Food사에서는 식품단백질에 관한 innovation network를 형성하고, 관련된 식품회사 간 창조적인 연결을 통한 식품신기술발전을 위해 매년 Protein Course를 개최하는데, Unilever, Danon, Roquette, Cargill, Dupont, Puratos, Masterfoods, Vion, DSM 등 단백질에 관심있는 Global 대기업들이 참석하여 단백질 신소재에 관한 정보 교류 및 네트워크를 형성하여 단백질신기술 발전을 위해 노력하고 있음.



그림 2. Protein Course 컨퍼런스에 참가하는 Protein 관련 Global 회사들

- 전 세계적으로 동물성 단백질 공급원으로는 Milk Protein, Egg Protein, Meat Protein 이, 식물성 단백질 공급원으로는 soy protein과 wheat gluten이 예전부터 많이 사용되어 왔으나, 21세기에 접어들면서, 국제 유가의 상승에 따른 원재료가격의 폭등, 광우병 이슈, 웰빙 트렌드의 가속화 등으로 인해 좀 더 저렴하고 안전한 새로운 단백질 원료의 공급이 이슈화 되고 있음.

- 대표적인 것이 최근의 완두단백 열풍으로 2006년 프랑스의 글로벌 식품바이오소재기업인 Roquette사에서는 세계 최초로 식품용 완두단백질을 출시하여 세계적으로 시장을 확대해가고 있으며, 최근 2년 여간 미국지역에서의 수요 폭등으로 인해 완두단백질은 공급부족 현상을 나타낼 정도로 폭발적인 인기를 누리고 있음. 완두단백질의 성공 배경에는 당초 사료용 단백질 공급원 정도로만 개발되었던 완두단백을 과감히 식품용으로 전환시켜 개발한 Roquette사의 결정도 있었지만, 세계적으로 새로운 단백질 공급원을 찾는 트렌드 속에 적절한 제품을 시장에 런칭한 결과이기도 함.

- 최근 미국에서는 완두단백 외에도 야생 대마에서 추출한 Hemp protein, 호박씨에서 추출한 pumpkin seed protein 등이 신규 단백질 공급원으로서 시장에 출시되었으며, 완두단백의 인기와 함께 시장이 급속히 성장해나가고 있는 추세임.



그림 3. 미국 내 출시판매중인 Hemp Protein 제품

## 2. 조미용 단백질 원료 개발 시 핵심 목표 : 아미노산 조성

- 단백질은 식품 내에서 주요 영양소로서 다른 영양소와는 다르게 훨씬 다양한 역할을 수행하고 있음. 일단, 단백질은 3대 주요 영양소중 유일하게 질소를 포함하고 있으며, 20여 가지의 아미노산 조합 및 연결을 통해 생물체 내의 단백질 고유 구조를 형성하며, 이러한 단백질은 지방의 저장수단으로서, 그리고 골격근과 내부장기를 구성하는 주요 영양소로서 성장에 매우 중요한 역할을 수행하고 있음.

- 단백질은 이러한 생리적 특성 외에도 식품의 물성과 맛에도 매우 중요한 영향을 줌. 식품 단백질은 식품 내에서 식품의 고유한 물성을 나타낼 수 있도록 작용하며, 대표적으로 소시지나 햄 등 육가공 제품에서의 수분 보유능력, 아이스크림에 있어 얼음결정 성장 방해 및 어는점 강화효과, 단백질 내 소수성 부위와 지방이 결합함으로써 크림을 형성하고 지방구 형성에 영향을 미치게 되는 유화능력, 젤라틴 등의 겔형성능력, 빵을 구울 때 환원당과 반응하여 구수한 맛을 내주는 풍미강화력 등 다양한 식품 내 품질개선 작용을 담당하고 있음. 그중 단백질을 가수분해할 때 생성되는 글루탐산, 글리신, 세린, 프롤린 등의 아미노산은 식품의 맛과 풍미를 향상시키는데 절대적인 역할을 함.

표 1. 단백질의 식품 내 작용

기능	작용	식품종류
수분보유 및 결합	수분과 수소결합을 통해 수분 포집	육가공, 소시지, 빵, 케익등
점도	증점제, 수분결합	스프, 소스
겔형성	고화 및 접착	육가공, 소시지, 베이커리, 파스타 등
가소성/탄성	글루텐내 소수성결합 : disulfide 결합	육가공, 베이커리
유화	지방 유화 및 안정화	소시지, 아이스크림, 스프 등
지방흡수	유리지방 결합	육가공, 소시지, 도넛 등
향결합	흡수, 포집, 방출	가공육, 베이커리 등
거품형성	가스포집 및 필름형성	휘핑크림, 쉬폰, 디저트, 케익

## 3. 조미용 단백질 신규 소재 동향 : 쌀단백질, 미강단백질

- 쌀단백질은 저알러지성과 식물성 단백질 중엔 높은 소화흡수율(약 65%)을 가지고 있어 영양적으로 가치가 높다고 오래전부터 보고되었으며, 본격적인 단백소재로서의 대량생산 기술이 개발보급된 것은 1993년 일본의 Hokkaido 대학의 Tatsuya Morita와 Shuhachi

Kiryama 교수의 논문을 통해서 현미를 분쇄하여 쌀가루를 만든 후 뜨거운 물에서 Termamyl 효소와 함께 배양하여 연속적으로 침전물을 받아냄으로써 제조하는 방법이 보고되었음. 침전된 단백질을 영양적으로 평가한 결과 카제인 대비 소화율 10% 가량, 생물가 (Biological Value) 26% 낮았으나, 쥐 사료에 혼합하여 공급하였을 때 콜레스테롤 함량 및 중성지방 등의 함량이 카제인보다 낮았다고 보고되었음. 이 연구 이래로 1997년부터 미국 농무성 USDA ARS에서 쌀단백질에 대한 지속적인 연구 결과가 보고되고 있으며, 특히 Arkansas 주립대학의 N.S. Hettiarachchy 교수는 쌀단백질의 지속적인 연구결과 보고를 통해 백미부위에 존재하는 쌀단백질의 추출 및 변성, 소수성 성질을 알려왔으며, 연구결과 쌀단백질은 다소 소수성의 불용성 단백질임을 밝혀냈음. 쌀단백질에 대한 학문적 연구 결과는 많이 있지 않으나, 쌀단백질이 콜레스테롤 억제 및 중성지방 증가 억제 등의 유익한 생리적 기능을 가지고 있다는 공통적인 연구 결과가 보고되어 있음.

- 백미 부위의 쌀단백질은 현재 미국 Axiom Foods사에서 중국산 쌀단백질을 정제가공하여 판매중이며, 시장규모는 2012년기준 연간 약 600톤 정도로 단백질함량 80%인 기본 제품 외에도 400 mesh로 곱게 분쇄하여 용해도를 높인 silk 제품도 동시에 판매중임. Axiom사에서 판매중인 쌀단백질은 쌀가루에서 쌀엿을 만들 때 부산물로 생성되는 쌀글루텐을 농축 정제하여 생산하고 있으며, 저알러지성이라는 장점 외에도 모유에 가장 가까운 아미노산 조성(91% 이상 일치)이라는 컨셉으로 이유식과 단백질보충제 용도로 판매중임. 한편, Global 식품소재그룹인 Beneo 그룹 산하 Beneo Remy사는 100년 전부터 쌀전분과 사료용 쌀단백질을 제조판매해왔으며, 2002년 식품용 쌀단백질을 개발하고 런칭한 이래 영양보충용 드링크 제품으로 꾸준히 전세계에 수출 판매 중에 있음. 그 외에도, 일본 오리자유화공업에서 단백질함량 70%인 쌀단백질을 출시판매 중에 있으며, 추가로 쌀단백질을 가수분해한 쌀펩타이드를 식품 및 화장품 용도로 판매중인데, 주요 용도는 항고혈압용 건강식품 및 보습, 미백용 화장품용 소재로서 판매중임. 그 외에 중국 운남성 소재 쌀전분당 전문생산회사인 Puer Yongji사에서 쌀전분당 부산물인 쌀글루텐으로부터 단백질을 정제 수출중이며, 그 외 파키스탄 소재 쌀단백질 제조사인 Havib사는 최근 미국 곡물메이저인 ADM에 인수되어 글로벌 소재기업으로서 쌀단백질을 판매하고 있음.



그림 4. 미국시장에서 판매중인 Rice Protein 제품

- 미강단백질과 관련하여, 1990년 USDA 연구관인 R.M. Saunders가 Cereal Foods World 지에 기고한 논문을 통해 그 영양적 가치 및 동물성 단백질의 대체 가능성이 처음으로 보고되었으며, 이 논문에 따르면 미강 내 단백질 함량은 13%로서 다른 단백질 공급원에 비해

높지는 않으나 영양적 가치가 매우 높아 단백질이용효율(Protein Efficiency Ratio, PER)이 식물성 단백질로서는 높은 1.6~1.9, 약알칼리 추출 시엔 2.0~2.5로서 카제인의 2.5와 견주어도 전혀 손색이 없는 수준이고, 소화율에 있어서도 미강 자체는 약 70%에 지나지 않으나 농축단백질 형태일 때는 90% 이상의 높은 수준을 나타낸다고 보고되었음. 그 외에도 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 저하효과가 있다고 보고되었으며, 이후 미국 내 연구그룹을 통해 미강 단백질 중 수용성 단백질 함량은 약 65~70%로서 분리대두단백의 20% 수준인 것에 비해 월등히 높은 것으로 알려졌으며, 1989년 Journal of Food Science지에 발표된 M.B. Bera 등의 논문에 따르면 용해도 및 유화력, 거품형성력 등이 우수하여 좋은 단백질 대체원으로써 사용가능성이 제기 되었고, 이후 1995년 미국의 Arkansas 주립대학의 N.S. Hettiarachchy 교수 연구팀에서는 탈지미강에서 알칼리추출을 통한 미강단백질 추출방법을, 1997년 USDA의 Hamada 연구팀에서는 수용성, 불용성 분획별 단백질 특징을 분석 보고 하였으며, 2002년 및 2003년 Tang 등은 Freeze thaw, sonication, high pressure, 물리적 파쇄, 효소분해 등의 다양한 미강단백질 추출방법을 실험한 후 보고하였는데, 결과적으로 물리적 파쇄와 amylase, protease를 한꺼번에 사용하였을 때 추출 수율이 가장 좋았다고 보고하였음. 이후 초임계수추출을 통한 미강단백추출방법 등도 보고된 사례가 있으나 비용 등의 문제로 상품화하기는 힘든 방법이라고 판단되며, 최근에도 미강단백질 추출방법은 대만, 중국, 일본, 파키스탄, 인도, 호주 연구팀에 의해 지속적으로 연구보고 되고 있는 상황임.

- 미강단백질은 USDA 연구원인 Kahlon 및 W. Yokohama 등에 의해 꾸준히 건강기능성 효과에 대해 연구 발표되고 있으며, 2009년 Arkansas 주립대학의 N.S. Hettiarachchy 교수 팀에서는 미강단백질의 가수분해물을 대장암 세포에 처리한 결과 저해효과가 우수했다는 연구 보고가 발표된바 있음. 미강단백질은 현재 미국 서부 샌프란시스코 소재 USDA-ARS 와 루이지애나주 소재 USDA-ARS팀을 중심으로 Arkansas 주립대에서 생산방법 및 그 우수한 가능성이 지속적으로 연구보고되고 있으며, 대만, 중국, 인도, 파키스탄, 태국 등 다수의 아시아 국가들에서 영양적 우수성, 물성적 우수성이 보고되고 있음.

#### 4. 기타 조미용 단백질 신규 소재 동향 : 완두단백질

- 식물성 단백질공급원으로서 완두단백은 1980년대부터 개발이 추진되어왔으며, 20여년간의 사업검토과정을 거쳐 2006년 프랑스 Roquette사를 필두로 식품용 완두단백이 출시되었음. 완두단백은 저알러지성으로서 비교적 가격이 저렴하고, 대두와 비슷한 물성을 갖기 때문에 식품에 다양하게 활용가능하다는 장점을 가지고 있어, 출시 이후 다양한 용도로 식품 및 건강기능식품에 사용되고 있음. 그러나 완두단백은 메치오닌(Methionine)과 시스틴(Cystein)과 같은 황 함유 필수 아미노산 함량이 적다는 단점을 가지고 있으며, 이를 극복하기 위해 단독사용보다는 다른 단백질과 사용이 권장되며, 특히 유청단백과 혼합사용 시 영양적인 단점을 보완가능하다는 점에서 사용이 장려되고 있음. 완두단백의 제조메이커는 Roquette 외에도 벨기에의 Coscura, 캐나다의 Norben Company, Burcon NutraScience 등이 있으며, Global 식품정보 사이트인 FoodNavigator.com에 따르면 최근 3년간 연평균 시장성장률이 5%를 웃돌고 있다고 함.

## 5. 전 세계 시장에서의 단백질 수요량은 지속적으로 증가하는 추세

- 2013년 “Global Food Forum”에서 시장조사전문기관인 Frost & Sullivan에서 발표한 자료에 따르면 전세계 단백질 시장은 크게 동물성 단백질과 식물성 단백질로 나뉘며 이중 동물성 단백질 시장은 2012년 기준 230만톤 정도의 Global Market Volume을 가지고 있음. 이중 계란단백이 40%를 차지하며, 우유단백 10%, 카제인 13%, 이후 유청단백, 젤라틴 등의 순으로 시장을 형성하고 있다고 함. 지역별 수요량은 유럽시장에서 38%로서 최대 수요를 차지하고 있으며, 북미에서 30%, 아시아에서 23%의 수요율을 나타내고 있으며, 2012년부터 2018년까지의 연평균 예상성장률이 5.5~6%에 달할 정도로 지속적으로 확대되고 있는 시장이라고 말할 수 있음. 성장요인을 3가지로 압축하여 말하자면, 식물성 단백질과의 경쟁이 가속화되면서 동물성 단백질은 품질면에서 좀 더 개선된 단백질시장으로 이동하고 있으며, 물성보다는 영양적인 특징이 강조되면서 성장하고 있고, 마지막으로 유가공품 가격이 올라가고 신제품 출시를 통해 점유율을 지속적으로 늘리면서 전반적인 시장성장을 이끌어가고 있다는 것을 들 수 있음. 무엇보다도 다이어트 또는 영양강화 추세로 인해 식음료 시장에서의 단백질 강화 컨셉이 갈수록 강력해지고 있다는 점이 단백질 시장을 성장하게끔 하는 요인이 되고 있음.

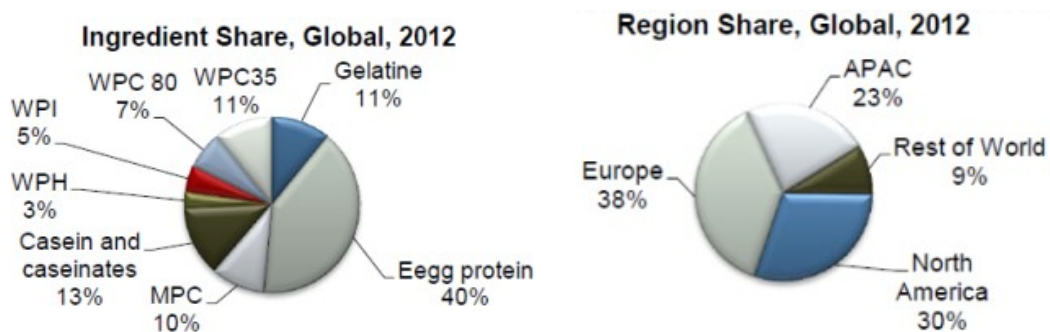


그림 5. 2012년 동물성 단백질 종류별 점유율 및 지역별 수요비율, 2012년

- 한편, 식물성 단백질 역시 2012년 기준으로 전세계 시장규모가 170만톤에 달하며, 2012년부터 2018년까지의 연평균 예상성장률이 5.0~5.5%에 달할 정도로 안정적 성장이 기대되는 시장임. 식물성 단백질 중 가장 많이 판매되는 단백질은 대두단백질로서 전체 식물성 단백질 시장의 절반이 넘는 시장점유율을 가지고 있으나, 농축대두단백(SPC), 분리대두단백(ISP), 조립대두단백(TSP) 등의 다양한 소재형태로 팔리고 있어, 단일 식물성 단백질 소재로서는 밀 단백질이 전체 식물성 단백질 중 약 43%에 달하는 가장 큰 시장점유율을 가지고 있는 상황이며, 그 외 완두단백이나 기타 식물성 단백질들은 전체 시장이 1%에 지나지 않을 정도로 굉장히 미미한 부분을 차지하고 있음. 그러나 대두가공산업이 지속가능한 식품/단백질 공급원으로서 성공적으로 정착했기에 마케팅 컨셉이 점차 강력해지고 있으며, 동물성 단백질 대비 가격경쟁력을 가지고 있기에 향후 성장이 기대되고 있음. 무엇보다도 non-soy protein 소재 시장이 아직 열리지 않았고, 지금까지는 동물성 단백질대비 관능품질면에서 열위에 있었던 식물성 단백질 소재가 점점 관능품질을 맞춰가고 있기에 새로운 application 개발을 통해 지금



보다도 성장속도가 높아질 여지가 많이 있음.

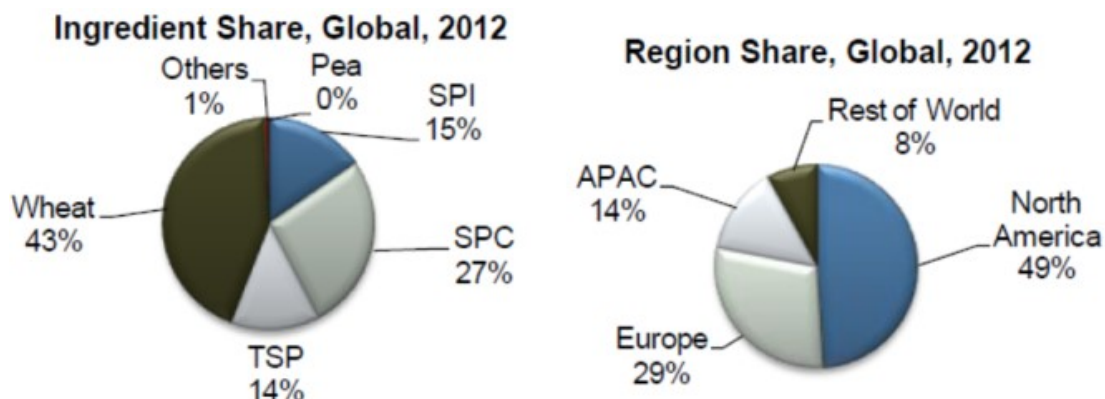


그림 6. 식물성 단백 종류별 점유율 및 지역별 수요비율, 2012년

- 결국 동물성 단백질이건 식물성 단백질이건 단백질 시장 성장은 향후 5년간은 5~6% 내외로 꾸준히 성장할 것이고, 이후에도 지속적으로 성장할 것으로 예상되며, 이들 단백질 소재의 최대 수요처가 미국과 EU등 선진국이라는 점, 단백질 소재가 이제는 단순 가공생산이 아닌 새로운 application과 품질개선을 통해 성장하고 있는 기술기반 소재 산업이라는 점에서 국내 기업이 Global 단백질 소재 시장에 뛰어드는 것은 국내 산업 발전과 중국 등 후발 개발도상국의 도전을 따돌리고 미국, EU등 선진국과 기술수준을 나란히 하여 수출 증대 등 꺾을 수 있는 유망한 바이오 소재라고 할 수 있음.

## 6. 미강단백 소재 최신 기술 개발 동향

- 미국 아리조나주 피닉스 주 소재 미강 소재 전문 기업인 Rice Bran Technology사는 2012년 파산위기에 몰린 NutraCea사를 인수하여 사업을 시작했으며, 미강에 관련된 여러 가지 소재들을 주요 아이템으로 삼아 회사를 운영하고 있음. 이 회사의 주요 제품은 안정화 미강(Stablized Rice Bran)이며, 여기에 미강추출물(RiBalance), 미강식이섬유(RiFiber), 미강 수용성추출물(RiSoluble)도 함께 판매중이며, 최근에는 미강단백추출물인 Proryza™ P-35를 출시 판매 중에 있음. Proryza는 천연, 저알러지, Gluten-free 등을 컨셉으로하여 물성면에서도 분산성이 뛰어난 것을 장점으로 하며, 단백질함량은 35% 이상, 탄수화물 45% 지방 8%, 회분 7%의 조성을 갖는 제품임. 주요 용도는 음료, 스포츠 뉴트리션 제품, 시리얼, 뉴트리션바, 에너지바, 단백질강화식품, 건강기능식품 등이며, 타 단백질대비 장점으로써 근육합성에 필수적인 아미노산인 BCAA(Branched Chain Amino Acid)을 풍부하게 가지고 있으며, 아르기닌 함량이 높아 단백질합성과 여러 가지 생리활성물질들의 합성을 촉진시키는 기능을 가지고 있다는 점을 부각시키면서 최근 판매확대에 나서고 있음.

표 2. Proryza™ P-35의 제품 스펙6)

6) 출처 : Rice Bran Technology 홈페이지



제품 조성	
단백질(질소 계수 6.25)	35%
탄수화물	45%
식이섬유	3%
당류	11%
지방	8%
회분	7%
수분	8%
칼로리(100g 당)	390

표 3. Proryza™ P-35의 아미노산 조성<sup>7)</sup>

Amino Acid	Contents (g/100g protein)
Alanine	7.4
Arginine	9.1
Aspartic Acid	10.0
Cystine	1.6
Glutamic Acid	15.6
Glycine	5.7
Histidine	2.6
Isoleucine	3.8
Leucine	7.6
Lysine	4.5
Phenylalanine	4.8
Proline	5.3
Methionine	1.9
Serine	5.4
Threonine	3.9
Tryptophan	1.0
Tyrosine	3.4
Valine	6.3

- 이외에도 Rice Bran Technology 사에서는 단백질함량은 20%로 약간 낮지만, 식이섬유가 50% 함유되어 있는 Proryza PF20/50 제품도 동시에 판매중임.

7) 출처 : Rice Bran Technology 홈페이지

## 7. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 식품산업 중 가공식품의 세계시장 규모는 2012년 2조 4,411억달러로 2011년 2조3,599억 달러에서 3.4% 가량 성장한 것으로 추정됨. 식품산업은 최근 5년간 연평균 3.4%의 꾸준한 성장세를 이어가고 있음. 국가별 가공식품의 시장규모를 보면 미국이 4,578억달러로 전 세계 시장의 18.8%를 차지해 시장규모로 1위를 차지했고, 그다음으로 중국3,366억달러(13.8%), 일본 2,212(9.1%), 브라질 1,541억달러(6.3%), 독일 1,435(5.9%) 순으로 시장규모 상위 5위국가로 나타남.<sup>8)</sup>

- 본 사업을 목표인 효소 가수분해물의 잠재적인 시장은 장류와 같은 조미식품 시장이 될 것으로 판단되므로, 전 세계 식품시장의 식품 제품군별 시장규모<sup>9)</sup>를 근거로 조미소재의 시장규모를 추정했을 때, Sauce, dressing & condiments시장규모의 10%, Savory snacks시장규모의 1%를 점유할 것으로 감안하면, 전 세계적인 잠재시장의 규모는 11.4조원의 규모일 것으로 추정됨.

- 글로벌 조미소재 시장에서 조미소재의 원료로 많이 쓰이는 단백질원들은 대두, 밀, 옥수수 등이 있으며, 우유등 일부 동물성 단백질도 사용하고 있는 추세임. 특히, 일본은 조미소재로 특화된 기업이 다양하게 존재하며, 아지노모토, 교와 핫코 같은 대기업 외에 반슈조미료와 같은 지역 특화 조미소재 생산 기업이 자리를 잡고 독자적으로 수출도 하는 등 국내와는 달리 상당히 많이 활성화된 상황임.

- 일본의 경우, 식품알레르기의 원인물질에 대한 추이에 있어서 소맥으로 인한 식품알레르기는 증가추세로, 2002년 8.0%를 점유하던 결과에서 2008년 12.1%로 늘어나고 있는 추세에 있다고 할 수 있음.<sup>10)</sup> 이는 Allergy-Free식품에 대한 시장환경이 안정적으로 신장해 갈 것이라는 확신이 있게 한다고 할 수 있음.

- 저알러지성 조미소재의 경우, 일본에서의 시장 니즈가 강한데, 2010년 일본 IWAKI사는 쌀엿을 정제하고 남은 부산물에서 얻은 쌀글루텐으로부터 발효를 통해 저알러지성의 쌀단백분해 조미소재를 개발 출시한 적이 있으며, IWAKI사의 쌀단백 유래 조미소재는 기존의 대두, 밀유래 조미소재와는 달리 우마미는 약간 적은 대신 단맛과 농후미가 강하여 또다른 제3의 조미소재로서 충분히 가능성을 보였다라는 시장의 평가를 받음.

8) 2013년 식품산업 분석보고서. 한국보건산업진흥원

9) 2013년 식품산업 분석보고서. 한국보건산업진흥원

10) 厚生労働科学研究費補助金「食物アレルギーの発症・重症化予防に関する研究」

### 3절 미활용 바이오매스를 발굴, 활용한 단백질 신소재 사업 개발 필요

- 국내외적으로 미활용 바이오매스는 다량 발생하고 있는데, 특히 국내에서는 수거 등의 불편, 효과적인 전처리기술 개발 부족 등으로 인해 바이오매스 활용도가 극히 떨어지고 있으며, 미활용된 바이오매스는 그대로 쓰레기 형태로 폐기 또는 매립되고 있는 형편임. 그런데, 육상폐기물의 해양투기에 관한 국제협약인 “런던 협약 및 런던의정서”에 따라 최근 2013년부터 전통적인 쓰레기 폐기방법중 하나인 해양투기가 점차 금지되어 2016년부터는 전면 금지될 예정이어서 관련 업계에서는 이와 관련한 대책 마련이 시급한 상황임. 이에 정부와 업계에서는 육상 매립 재개 및 폐자원 재활용 활성화 등으로 이 문제를 극복하려고 하나, 효과적인 처리 기술이 충분히 개발되지 못한 관계로 그 성과는 아직 미미한 수준임. 국내 바이오매스 폐기물중 상당부분을 차지하는 농업부산물의 경우에 있어서도 해양투기 금지 및 자원 재활용 대책 마련이 시급한데, 특히 농업부산물은 BOD가 높고 양이 많다는 문제가 있어 일반적인 매립이나 미생물을 활용한 처리방법은 효과적이지 못하기 때문에 현재까지 가축 사료 등으로의 활용 외에는 뚜렷한 해결방법은 없는 상태임. 이에, 농업 부산물 안에는 다량의 단백질, 식이섬유들이 함유되어 있으므로 이를 활용하여 새로운 신소재를 발굴하고 사업화할 수만 있다면, 국내 폐자원 활용도와 녹색 환경 유지를 위해 대단히 기여할 수 있게 될 것임.

#### 1. 국내 실정에는 농업 부산물을 활용한 식물성 단백질 개발이 적합

- 단백질 중 동물성 단백질과 식물성 단백질을 비교해보면, 동물성 단백질은 필수 아미노산이 풍부하고 아미노산 밸런스가 좋아 소화이용률이 우수하여, 근육합성과 성장 등의 단백질 고유의 기능이 우수하고, 물성적으로도 수용성으로서 유화력과 점도 안정화 능력 등이 뛰어날뿐더러 관능적으로도 우수하다는 장점을 가지고 있으나, 동맥경화 및 혈중 콜레스테롤 증가 등 심혈관계 질환에 좋지 않다는 건강관련 단점과 광우병, 조류독감, 식품 알레르기가 있다는 문제 때문에 사용을 꺼리는 소비자들이 늘어나고 있음.

- 한편, 식물성 단백질은 곡류, 두류, 서류, 씨앗류 등에서 주로 유래하는데 원료에 따라 약간씩 품질과 물성이 달라짐. 동물성 단백질에 비해 필수아미노산이 부족하고 아미노산 밸런스가 떨어져서 섭취한 단백질 전량을 다 이용하지 못한다는 단점이 있고, 용해도와 유화력과 같은 단백질의 고유 물성과 관능적인 측면에서도 식물성 단백질은 동물성 단백질에 비해 품질이 떨어진다는 단점이 있음. 그러나 식물성 단백질에는 단백질 외 유용한 항산화물질과 비타민, 미네랄 등이 함께 포함되어 있어, 동물성 단백질의 단점이라고 지적되는 동맥경화, 콜레스테롤 증가 등의 부작용이 없으며, 광우병, 조류독감과 같은 위해질병에서도 안전하기 때문에 웰빙 추세에 따라 사람들로부터 널리 이용되고 있는 상황임. 특히, 동물성 단백질 중 우유 유래 단백질은 최근 10년간 국제 시세가 폭등하는 추세라서 원가 절감을 위해 품질에 민감하지 않은 application분야를 중심으로 가격이 저렴한 식물성 단백질로 대체하려는 추세가 지배적으로 나타나고 있음.

## 2. 국내 시장환경 변화 및 기술개발 시사점

- 최근 CJ제일제당에서 아토피 증세 개선효과가 있는 식물성 김치유산균을 출시하면서 아토피 관련 기능성 소재들이 재조명받고 있으며, 밀이나 콩같이 기존에 알려졌던 알레르기 유발원 외에도 2015년 호두, 닭고기, 쇠고기, 오징어, 굴·전복·홍합 등을 포함하는 조개류 등 지속적인 알레르기 유발식품 표시대상 확대가 진행되면서 알레르기에 대한 사회적, 시장적 관심이 지속적으로 증가하는 추세임. 따라서 알레르기가 없는 식품 신제품들에 대한 개발 소비자 니즈가 지속적으로 확대되고, 관련 시장도 비례하여 커질 것으로 예상되고 있음.

- 2015년 국내 쌀시장이 개방되면서 국내산 쌀의 수입산 대비 경쟁력 확대 방안이 절실히 필요한 상황이 되어가고 있으며, 도정부산물인 미강에 대한 관심역시 지속적으로 늘고 있음. 특히 최근에는 미강과 쌀눈제품이 건강식품으로서 홈쇼핑을 통해 판매량이 지속적으로 늘고 있어 미강관련 시장이 좀 더 확대될 것으로 예상 됨.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

#### 1절 미강의 식품원료로서의 품질유지 안정성 연구 개발

##### 1. 미강의 전처리기술별 품질변화 비교 분석

- 미강의 산패를 막기 위한 전처리기술, 즉 안정화기술은 도정 시 활성화되는 lipase에 열 또는 압력, 그리고 열과 압력을 동시에 가해 실효시키는 기술로서 해외, 특히 미국에서는 extruder설비에 미강을 투입하여 대량으로 생산하고 있음. 그러나 이 기술은 미국과 같이 처리용량이 시간당 5톤이 넘는 대용량 처리시설에서는 설비투자 대비 경제성이 좋아 사용될 수 있지만, 국내에서는 대형정미소에서 시간당 처리용량이 미국의 10~20% 수준으로 작은 편이라 이 설비를 이용하기는 실제로 어려운 상황이므로 경제성을 감안하여 소규모 안정화 처리가 가능한 방법을 탐색하였음. 한편, 기존의 extruder 사용 시 생산되는 미강펠렛은 식품용으로 판매하기 위해서는 추가적인 분쇄공정이 동반되어야 하나 이를 분쇄를 생략한 단일공정으로 변경함으로써 처리량의 소형화에 따른 생산성 저하를 극복하고자 하였음.

- 미강안정화 기술은 크게 나누어 열처리 방법과 비열처리 방법으로 나뉘볼 수 있음. 열처리는 열에 의해 lipase를 실효시키는 것인데, 로스팅, extruding, 연속식열처리, 과열증기처리 등 다양한 방식이 사용될 수 있으며, 비열처리방법으로는 향산화물질 첨가, 방사선 조사, 고압처리 등을 생각해 볼 수 있음. 그러나 비열처리방법을 통한 미강의 안정화는 문헌에 보고된 사례가 없으며, 만약 기술이 가능하더라도 양산화 가능여부 관점에서 비용과 효능을 감안하면 현실적으로는 비열처리 방법은 효과적인 방법이 될 수 없다고 판단함. 따라서 열처리 방법 중에서 양산화 가능성이 높은 기술을 골라 이러한 기준에 입각하여 3가지 방법을 최종 선정하였고, 이 방법에 따라 다음과 같이 분석을 실시 함.

- 미강은 국내에서 주로 사료나 비료, 퇴비용도로 많이 사용되며 식품용도로는 거의 사용되고 있지 않은데, 미강 수거과정 중 변질이 가장 큰 원인이긴 하지만 그 외에도 미강이 식품용으로 특별히 관리되고 있지 않기에 식품원료로서 사용되기엔 각종 위생관련 품질 수준이 열악하다는 것에도 원인이 있음. 특히 별도의 세척 등의 공정을 거치지 않기에 미생물 관련 품질이 낮을 수밖에 없으며, 토양과 직접 맞는 농산물이기 때문에 많이 관리하고 있는 토양유래 포자균인 바실러스 세레우스 균 관리가 필요함. 미강 안정화 기술은 본질적으로 열처리 기술이고, 이 기술은 살균등에도 효과적으로 사용될 수 있는바 각각의 안정화 처리에 따른 미생물 관련 품질 변화도 함께 분석하여 기술의 적용 효과를 확인 함.

##### 가. 재료 및 방법

- 미강은 2014년 12월 (주)쌀눈조아에프앤비로부터 구입하였으며, 구입한 미강은 경상북도 달성군 화원읍 소재 화원도정공장에서 동진 품종의 쌀로부터 생산된 것임.

- 사용한 미강은 (주)쌀눈조아에프앤비에서 고유의 정선과정을 거쳐 정제된 미강으로서, 정미소에서 수거된 미강을 밀도차에 의해 쌀눈, 미강, 불순물, 왕겨의 4가지 부분으로 분리한 후 이중 미강만을 회수한 것으로서, 단백질함량 14% 내외의 일정한 품질을 유지함을 확인

함.

- 안정화방법은 열처리 방법 중 1) 연속식열처리 2)과열증기(overheat)처리 3)볶음(Roasting)처리 등 총 3가지를 사용하였으며, 이들 방법 중에서도 온도와 처리시간을 달리 하여 조건별로 2가지씩 샘플을 제작하여 1kg씩 PE비닐백에 담아 40℃에서 8주간 저장하면서 분석에 사용하였음. 자세한 샘플 제작처리방법은 다음 표와 같음.

(1) 로스팅 처리

- 로스팅 안정화 방식은 통형태의 용기를 직접 불로 가열 또는 전기 가열하여 내벽과 접촉하는 미강을 100℃이상의 고열로 가열하여 미강내 lipase를 순간적으로 실활시킴. 미강이 용기 내벽에 들러붙지 않고 고르게 가열되도록 하기 위해 용기를 계속 회전시키며 가열하며, 설비가 저렴하여 국내 식품산업계에서 널리 사용된다는 점에서 실제 양산 가능성이 매우 높은 방식임.

- 본 시료는 충청남도 논산시 소재 농업회사법인 (주)두리두리에서 제작 함.

표 4. 로스팅을 통한 안정화 처리방법 및 샘플제작 조건

처리방법	로스팅
샘플명	RT
사용기기	THDR-20
제조사	태환자동화기기(한국)
로스팅온도(℃)	180
로스팅시간(분)	20
1회 처리량(kg)	20



그림 7. 사용한 Roasting 설비

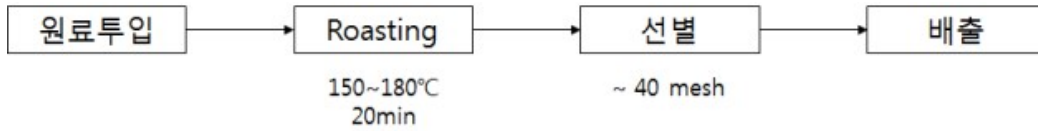


그림 8. 제조공정도

(2) 연속식열처리(Continuous Heat Treatment; CHT)

연속식열처리는 속이 비어있는 통 내부에 열풍을 통과시키면서, 미강을 연속적으로 투입하여 열풍 및 통벽면, 내부 blade에 닿게 하면서 미강을 고르게 열처리하는 방식으로서, 연속식이기 때문에 실제 양산화시 인건비 절감과 처리용량 상승 등 생산성을 증가시킬 수 있다는 장점이 있음. 본 시료는 경상북도 구미시 소재 (주)팜토스에서 자체제작한 설비로 제작하였음.

표 5. 연속식열풍처리를 통한 안정화 처리방법 및 샘플제작 조건

처리방법		연속식열풍처리	
샘플명		CHT #1	CHT #2
열풍셋팅온도(°C)		320	360
내부 온도(°C)	도입부	150	170
	이송부	120	150
	출구부	100	120
품온(°C)		80	90
Capacity(kg/h)		80	200
머무름시간(분)		20	5



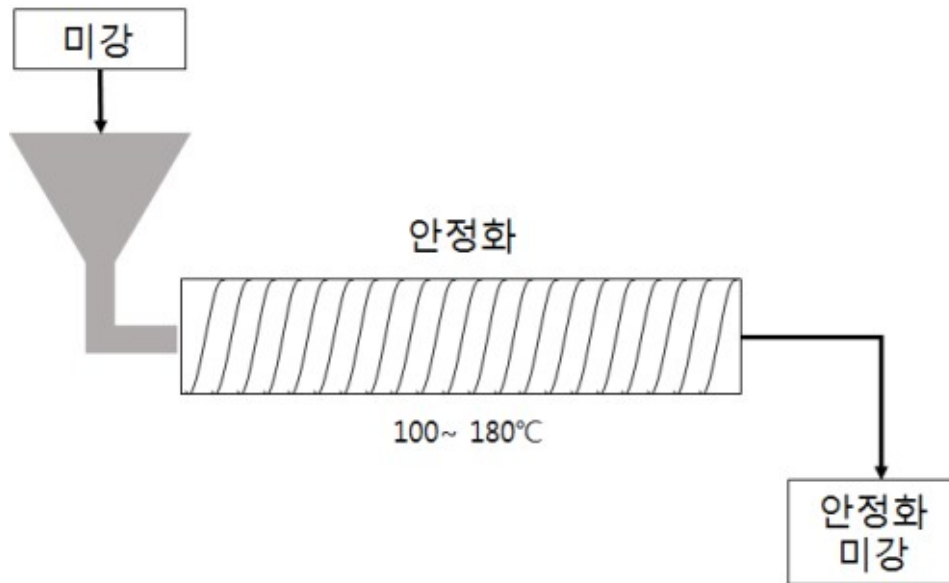


그림 9. 제조공정도

### (3) 과열증기처리(Overheat Steam Treatment ; OST)

과열증기처리는 150℃ 이상의 과열된 수증기를 미강에 최대 5초 이내의 단시간 동안 처리하여 순간적으로 미강 내 lipase를 실험시키는 방식임. 2012년 한국조리학회지에 과열수증기를 사용한 농산물처리방법에 관한 연구가 보고(1)된 바 있고, Lab. scale로 미강에 적용 테스트시 안정화효과 및 이취제거 효과가 우수하다고 하여 관련 특허도 출원등록(대한민국 특허출원번호 10-2011-0107457호, 도정부산물의 가공방법) 된바 있으나, 국내에서는 아직까지 양산화규모로 개발된 기술은 없는 상황임. 과열증기처리는 분말상 식품에 강력한 살균효과를 가지고 있어 일본에서는 녹차가루 등 각종 농산물 분말에 사용되는데, 열처리에 의한 살균은 안정화 처리와 그 원리가 같기 때문에 살균효과와 안정화효과는 비례관계가 성립할 것으로 예상되어 본 실험에 처리기술로 채택하게 되었음. 한편, 일본에서는 1980년대 Okawara MFG사(일본 시즈오카현 소재)에서 독자적 기술로 개발하여 산업화 적용사례가 있는바, Okawara 사의 도움을 받아 본 시료를 제작하게 됨.

#### (가) 과열증기처리법 예비테스트

국내에는 과열증기처리장치를 pilot설비로 도입한 기관이 없어, 최적의 안정화 조건 도출을 위한 예비실험은 일본 Okawara사 공장에 있는 pilot 장비를 사용하여 실시하였으며, 실제의 pilot 장비 및 공정흐름도는 다음과 같음.



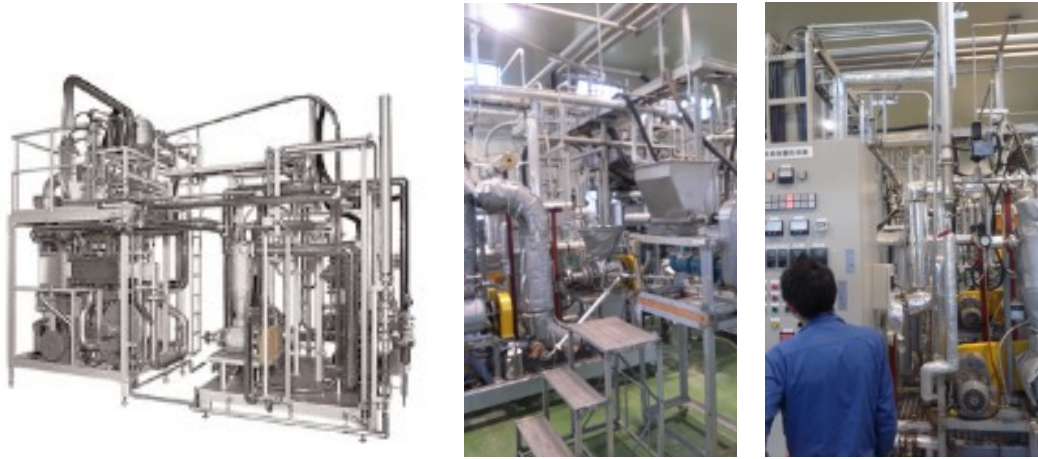


그림 10. Pilot 장비

< 공정흐름도 >

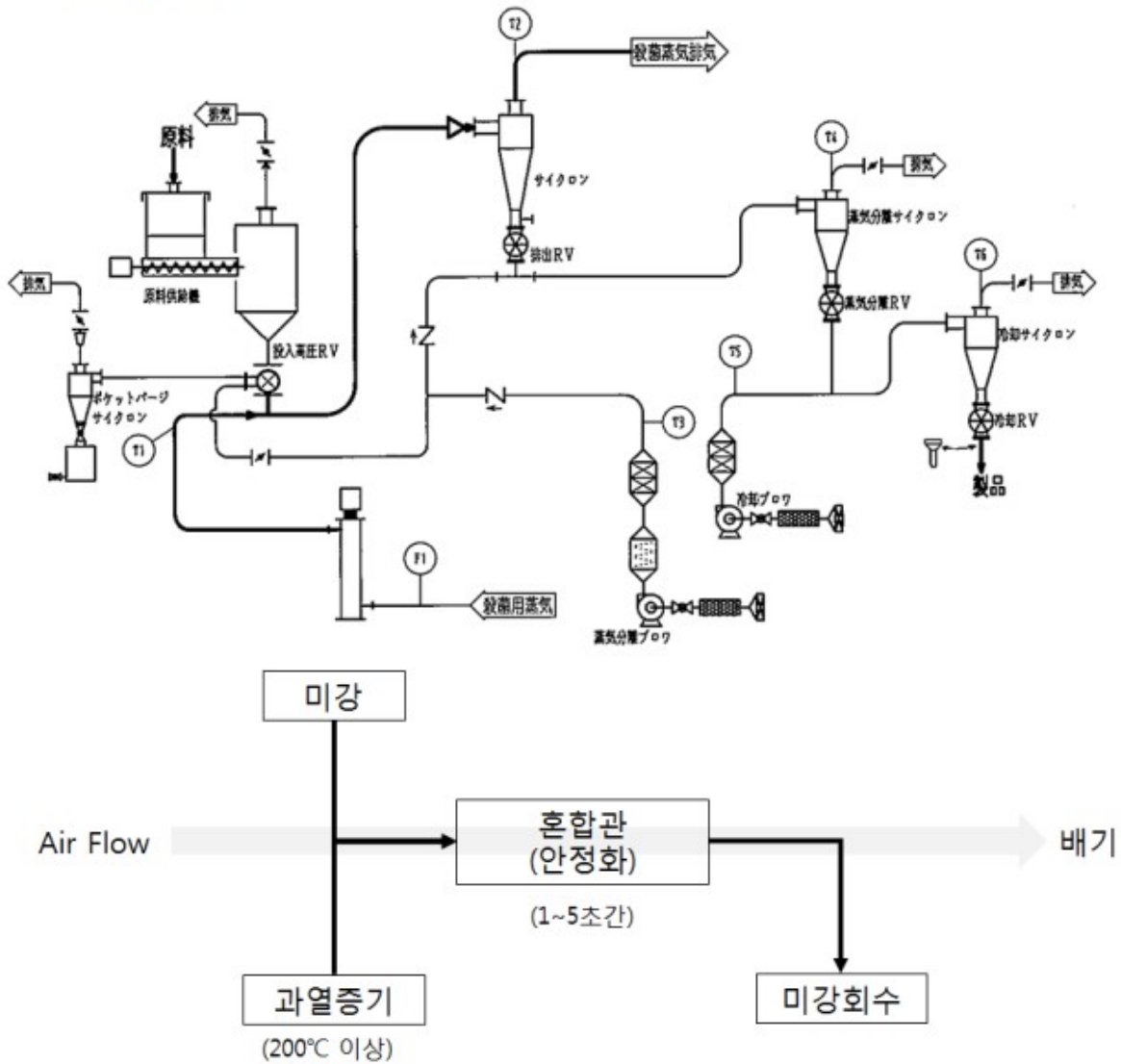




그림 11. 과열처리 후 미강

표 6. 과열증기처리를 통한 안정화 처리방법 및 샘플제작 조건

처리방법	과열증기처리		
	OST_R #1	OST_R #2	OST_R #3
샘플명			
처리전 수분(%)	11.97	11.58	10.72
처리량(kg)	50	25.68	24.14
과열증기초기온도(℃)	196	195	185
과열증기출구온도(℃)	156	146	147
증기분리입구온도(℃)	110	110	110
증기분리출구온도(℃)	83	83	84
살균증기압력(MPaG)	0.3	0.2	0.2
살균증기유량(kg/h)	236	175	236
처리후 수분(%)	11.35	9.52	9.59
회수량(kg)	49.34	25.13	23.47
수율(%)	99.41	100	98.45
품온(℃)	35	33	34

- 예비테스트는 총 3가지 조건으로 실시하였는데, 과열증기의 온도와 유량을 변경해 가며 3가지 조건으로 테스트를 실시하였음. 예비테스트 결과, 전체적인 수율은 거의 100%에 달하였으며, 국내에서 산업적으로 사용되고 있는 안정화방법인 로스팅처리시 93%보다는 우수하였음. 과열증기로 처리하는 만큼 수분증가가 있을 것으로 예상하였으나 오히려 수분이 감소하는 결과를 나타냈으며, 미강과 과열증기가 분리되는 지점의 온도는 조건에 상관없이 거의 일정하여 공정관리지표로 삼기는 무의미하였으며, 그보다는 과열증기가 생성되어 미강과 접촉하기 직전인 과열증기출구온도가 직접적인 미강안정화 처리 온도지표로 삼을 수 있음이 확인 됨.

- 각 시험 조건별로 제작된 시료는 일본의 시험분석기관인 (주)靜環検査センター(일본 시즈오카현 소재)에 의뢰하여 미생물 분석을 실시하였으며, 미생물 분석결과는 다음과 같음.

표 7. 과열증기처리 시료별 미생물 분석결과

시료명	일반세균수 (cfu/g)	대장균군	바실러스 세레우스 (cfu/g)
처리전	3,000,000 이상	양성	음성
OST_R #1	40	음성	음성
OST_R #2	0	음성	음성
OST_R #3	0	음성	음성

- 미생물 분석결과 처리군 모두 살균효과가 있었으며, 거의 멸균에 가까울 정도의 살균효과를 나타냈음.

(나) 시료제작

- 예비테스트 결과를 참고로 하여 살균증기압력과 유량을 극도로 제한한 시료(시료명 : OST #1)와 예비테스트 결과 및 Okawara 사 기술팀의 의견을 참고로 하여 최적화된 조건의 시료(시료명 : OST #2)를 제작하였음.

표 8. 과열증기처리를 통한 안정화 처리방법 및 샘플제작 조건

처리방법	과열증기처리	
	OST #1	OST #2
샘플명	OST #1	OST #2
과열증기초기온도(℃)	202	195
과열증기출구온도(℃)	126	146
살균증기압력(MPaG)	0.05	0.2
살균증기유량(kg/h)	86	175

- 제작된 시료는 40℃ convection oven에서 8주간 보관하면서, 2주 간격으로 샘플을 채취하여 품질변화지표로서 산가 및 과산화물가를 분석하였고, 추가로 미생물 분석항목 중 일반세균수, 대장균군, 바실러스 세레우스를 분석하였으나, 건조된 분말의 경우 수분함량이 낮아 저장 중 미생물 증식이 되지 않으므로 미생물 분석은 처리직후인 0주차 시료에 대해서만 분석하였음. 산가 및 과산화물가는 식품공전에 등재된 분석방법을 사용하였으며, 미생물 분석은 공인시험기관인 중앙생명과학원(경기도 남양주시 소재)에 분석의뢰하였음.

## 2. 미강의 안정화 처리방법별 품질변화 억제효능 비교 분석

- 미강의 안정화 처리방법별 품질변화는 산가와 과산화물가, 미생물 분석결과를 비교분석함으로써 도출하고자 했는데, 그 결과는 다음과 같음.

가. 산가 분석

- 대조구 대비하여 전 처리시료군에서 산가상승이 억제되는 결과를 나타냈으며, 목표값인 4주간 산가변화 10 이하를 만족시키는 시료는 로스팅, 연속식 열풍 처리 시료 2종 등 총 3종이 목표수준을 만족시킴.

표 9. 안정화 처리방법별 산가

처리방법	시료명	저장기간			
		0주	2주	4주	8주
대조구	Control	97.26	111.31	133.92	150.32
로스팅(RT)	RT	99.75	98.45	101.68	137.13
연속식열풍 (CHT)	CHT#1	97.69	95.20	106.64	110.76
	CHT#2	94.88	92.80	101.68	118.67
과열증기 (OST)	OST#1	98.34	106.10	111.60	145.04
	OST#2	96.18	110.52	114.08	142.41

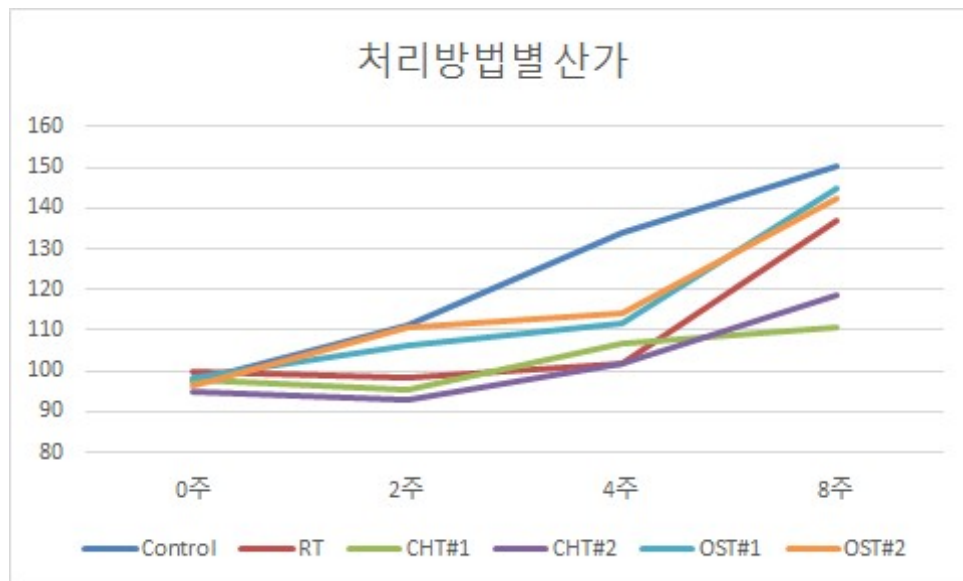
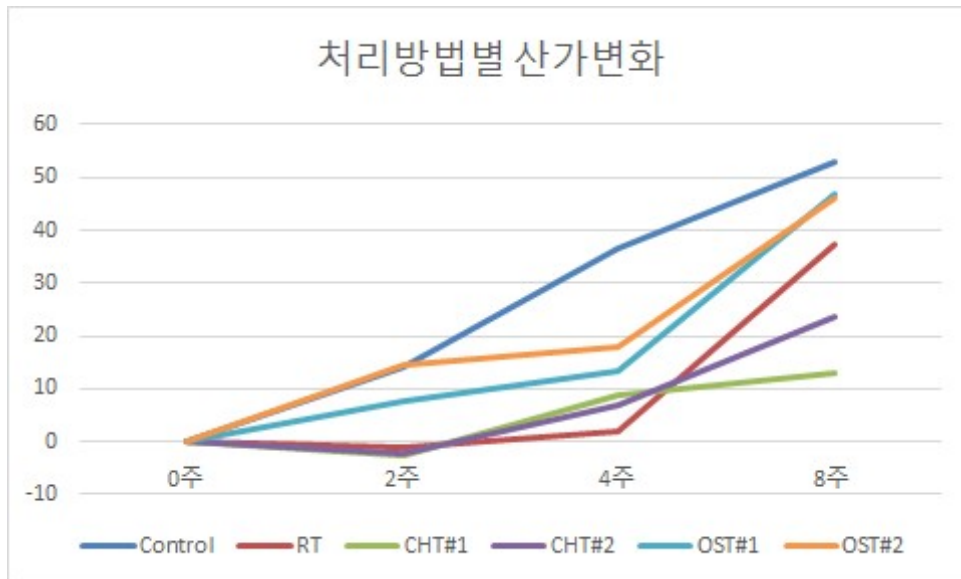


표 10. 안정화 처리방법별 산가상승변화

처리방법	시료명	저장기간			
		0주	2주	4주	8주
대조구	Control	0.00	14.05	36.66	53.06
로스팅(RT)	RT	0.00	-1.30	1.94	37.39
연속식 열풍 (CHT)	CHT#1	0.00	-2.49	8.95	13.07
	CHT#2	0.00	-2.09	6.80	23.79
과열증기 (OST)	OST#1	0.00	7.76	13.26	46.70
	OST#2	0.00	14.34	17.90	46.23



- 산가변화를 각각의 처리군별 처리방법 및 조건을 비교하여 고찰해보면, 열처리시간이 짧은 가열증기처리 방법은 산가상승의 폭이 큰 반면, 비교적 처리시간이 길었던 로스팅 및 연속식 열풍처리방식일 때는 산가상승의 폭이 작았다. 이로부터 안정화를 위해서는 미강에 열을 전달시킬 때 온도는 안정화효과에 영향을 미치는 인자가 아니며, 열처리 시간 및 열전달효율에 따라 안정화효과가 비례적으로 높아지는 것을 알 수 있음.

나. 과산화물가 분석

- 대조구 대비 과산화물가 변화는 전 시험군에서 두드러진 변화는 없음.

표 11. 안정화 처리방법별 과산화물가

처리방법	시료명	저장기간			
		0주	2주	4주	8주
대조구	Control	5.00	5.00	8.00	10.01
로스팅(RT)	RT	6.00	5.00	7.00	11.01
연속식열풍 (CHT)	CHT#1	4.00	4.00	7.00	10.01
	CHT#2	5.00	5.00	8.00	12.01
과열증기 (OST)	OST#1	5.00	7.00	11.51	13.01
	OST#2	6.00	7.00	11.01	15.01

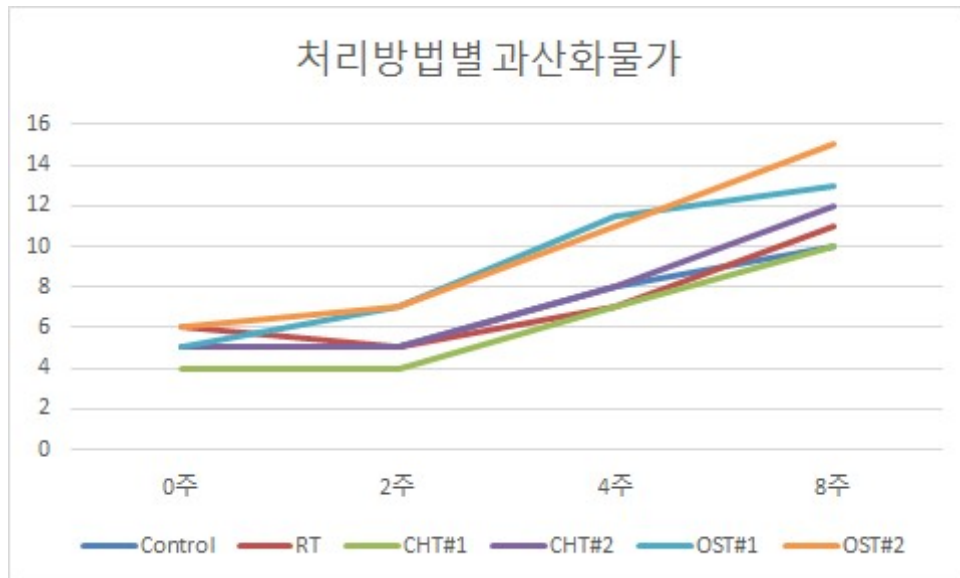
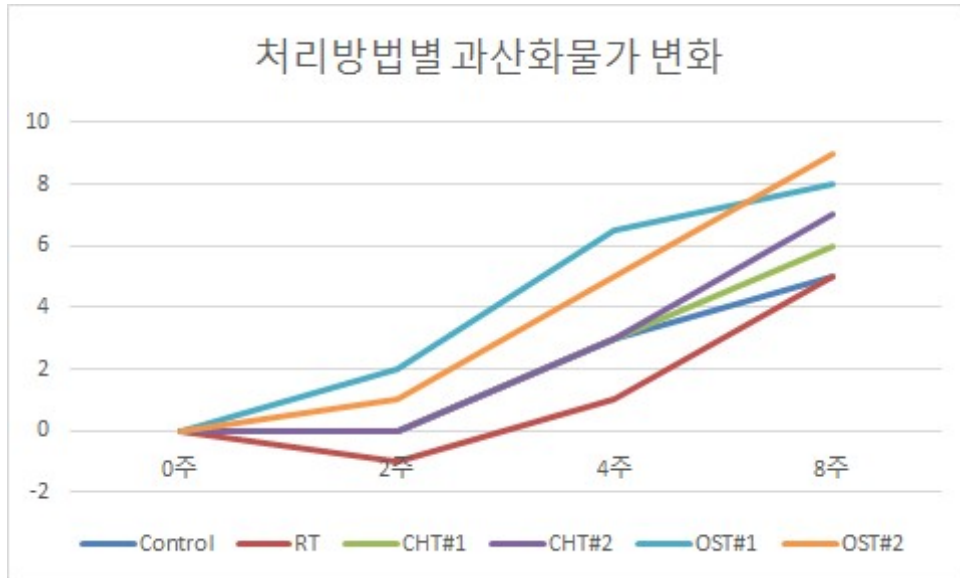


표 12. 안정화 처리방법별 과산화물가상승변화

처리방법	시료명	저장기간			
		0주	2주	4주	8주
대조구	Control	0.00	0.00	3.00	5.00
로스팅(RT)	RT	0.00	-1.00	1.00	5.00
연속식열풍 (CHT)	CHT#1	0.00	0.00	3.00	6.00
	CHT#2	0.00	0.00	3.00	7.00
과열증기 (OST)	OST#1	0.00	2.00	6.50	8.00
	OST#2	0.00	1.00	5.00	9.01



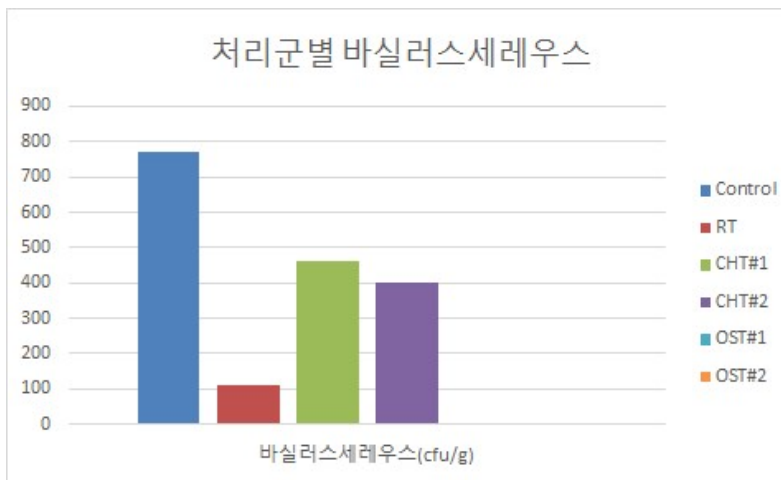
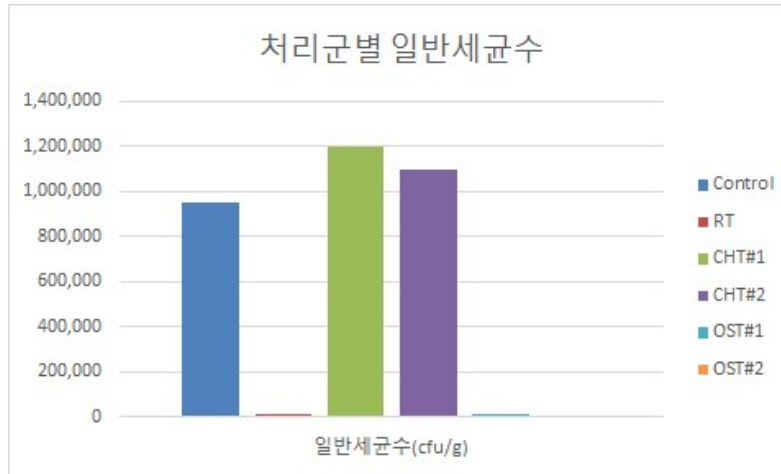
- 처리방법별 과산화물가 상승을 비교한 결과, 과열증기처리법이 상승시기와 그 폭이 가장 높고, 연속식 열풍, 로스팅 처리의 순으로 과산화물가의 상승폭이 높았는데 이로부터 처리온도가 높을수록 과산화물 생성량이 쉽게 증가하여 과산화물가의 상승이 발생하는 것으로 보이며, 로스팅처리 시에는 처리원리상 상대적으로 열전달이 미강외부에만 오래 작용하여 미강 내부까지 충분히 열전달이 되지 않아 과산화물생성이 상대적으로 적었다고 사료됨.

다. 미생물 분석

- 각각의 시료는 안정화 처리 직후 미생물 분석하여, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었음.

표 13. 안정화 처리별 미강의 미생물 분석 결과

처리방법	시료명	일반세균수 (cfu/g)	대장균군	바실러스 세레우스 (cfu/g)
대조구	Control	950,000	양성	770
로스팅(RT)	RT	5,000	음성	110
연속식열풍 (CHT)	CHT#1	1,200,000	양성	460
	CHT#2	1,100,000	양성	400
과열증기 (OST)	OST#1	60	음성	0
	OST#2	0	음성	0



- 각 안정화 처리 방법별 미생물 살균효과는 과열증기>로스팅>연속식열풍 순서였으며, 연속식 열풍의 경우 산가변화를 방지하는 안정화효과는 가장 높은 것으로 나타났으나 미생물 살균효과는 가장 떨어지는 것으로 나타났으며, 반대로 과열증기처리법은 안정화효과는 3가지 처리방법 중 가장 떨어지는 것으로 나타났지만, 살균효과는 가장 우수한 것으로 나타났다. 특히, 연속식 열풍처리의 경우 대장균군이 양성인 결과가 나와 생식 등 비가열식품에 사용되기에는 부적당할 것으로 판단되며 미강은 식이섬유가 풍부한 원료로서 체중조절용 조제식품 또는 영유아식, 생식 등에 사용이 유망하나 이러한 용도로 사용하려면 법적 규격인 1g 당 100 이하 기준을 만족시켜야하므로 미강의 안정화 처리 이후 별도의 살균처리를 거치거나 과열증기처리를 해야 할 것으로 생각됨.

- 미강은 도정 후 산가변화가 바로 일어난다는 점에서 도정즉시 안정화처리하는 것이 가장 좋은 안정화 방법이나 현실적으로 도정기와 직결된 안정화설비는 비용을 고려하면 현실적으로 어려운 관계로 산가변화를 최소화할 수 있는 안정화처리 기술을 선별하여 실제 산업에 적용하고자 함. 분석결과 연속식 열풍처리기에 의한 안정화효과는 가장 우수한 것으로 판단되며, 로스팅 처리의 경우 산업체 적용성 및 경제적으로 가장 무난한 방법이라는 점에서 유용한 처리방법이라고 생각됨. 통상적으로 식품의 유통기한 설정 시 40℃에서 보관 시 1개월 정도 품질유지가 되면, 상온에서는 6개월 정도의 유통기한을 갖는 것으로 인정되고



있음. 따라서 본 연구에 따른 방법으로 상온에서 보관 시 6개월까지는 산가변화에 안정적인 품질을 가질 것이라고 판단됨.

- 미강의 안정화 효과 및 살균효과를 분석한 결과를 종합적으로 판단하면, 앞서 언급한 것처럼 통상적으로 열처리에 의한 살균과 안정화처리기술은 그 원리가 유사하여 이들 처리의 효과가 비례관계가 될 것으로 예상하였음. 그러나 살균효과가 가장 우수했던 과열증기처리가 안정화효과는 오히려 가장 낮은 결과를 나타냈는데, 이는 여러 가지 실험 변수 중에서 열처리 시간이 안정화 효과에 미치는 영향이 가장 결정적인 것으로 결론지을 수 있음. 또한, 처리온도에 따른 안정화효과의 차이도 거의 없었음을 볼 때, 안정화 효과에 미치는 유일한 요인은 처리시간임을 알 수 있음. 결국 150℃ 이상으로 충분히 5분 이상 열처리할 경우 목표로 하는 산가변화폭을 달성할 수 있을 것으로 예상함.

### 3. 안정화 미강의 식품원료로서의 특성 분석

#### 가. 안정화 미강의 일반성분 분석

- 안정화 처리별 미강의 일반성분 함량을 확인하기 위하여 수분, 회분, 조단백, 조지방, 탄수화물, 열량을 분석함. 수분은 상압가열건조법으로, 조회분은 550℃에서 회화한 후 측정하였으며, 조단백은 Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법을 이용하여 측정함. 탄수화물은 시료 100 g 중에서 수분, 조회분, 조단백, 조지방 함량을 감하여 얻은 양으로 표시함. 안정화 처리를 하지 않은 미강을 대조구로 하여 함께 비교함.

표 14. 안정화 미강의 일반성분

처리방법	시료명	수분 (%)	조단백 (%)	조지방 (%)	회분 (%)	탄수화물 (%)	열량 (Kcal/100g)
대조구	Control	7.83	15.19	19.98	9.34	47.66	431.20
로스팅(RT)	RT	1.02	15.72	21.53	9.90	51.83	463.98
연속식열풍 (CHT)	CHT#1	7.65	15.46	19.47	9.17	48.26	430.08
	CHT#2	8.35	15.19	19.13	9.14	48.19	425.70
과열증기 (OST)	OST#1	3.78	16.00	20.90	9.82	49.51	450.12
	OST#2	3.73	15.84	20.44	9.66	50.34	448.65

- 미강의 수분함량은 1.0%~8.4% 수준으로 로스팅 처리한 두리두리의 수분함량이 1.02%로 가장 낮게 나타남. 과열증기 처리한 미강의 경우 대조구와 큰 차이 없었으며 연속식열풍 미강의 경우 대조구의 절반수준으로 감소함. 이는 안정화 처리 시 가열과정에 의한 감소로 생각되며 로스팅 처리가 수분손실에 가장 큰 영향이 있는 것으로 나타남.

조단백 함량은 15.1%~16.0%, 조지방 함량은 19.1%~21.5%, 회분 함량은 9.1%~9.9% 수준으로 나타났으며, 안정화 처리 방법에 따라 큰 차이는 없는 것으로 나타남.

- 탄수화물 함량은 47.6%~51.8% 수준으로 수분함량이 낮은 시료에서 약간 높게 나타남.

나. 안정화 미강의 유리 아미노산 분석

- 미강의 유리 아미노산을 분석하기 위하여 미강 1~2 g을 70% 에탄올과 혼합하여 1시간 초음파 추출 후 상온에서 24시간 동안 추출하고 0.2 µm syringe filter로 여과하여 HPLC로 분석함.

표 15. 안정화 미강의 유리 아미노산 분석조건

분석조건																													
System	Dionex Ultimate 3000																												
FL Detector	Emission 450nm , Excitation 340nm(OPA) Emission 305nm , Excitation 266nm(FMOC)																												
UV Detector	338 nm																												
Column	C18 column (4.6mm x 150mm, 5µm)																												
Injection vol.	0.5µL																												
Column Temperature	40°C																												
Sample Temperature	20°C																												
Mobile phase	A : 20mM Sodium phosphate monobasic, pH 7.8 B : water / Acetonitrile / Methanol(10:45:45 v/v%)																												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>Flow Rate</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>1.5</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>24.0</td> <td>1.5</td> <td>43</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td>24.5</td> <td>1.5</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>1.5</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>26.5</td> <td>1.5</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>1.5</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Time	Flow Rate	A	B	0	1.5	100	0	24.0	1.5	43	57	24.5	1.5	0	100	26	1.5	0	100	26.5	1.5	100	0	30	1.5	100	0
Time	Flow Rate	A	B																										
0	1.5	100	0																										
24.0	1.5	43	57																										
24.5	1.5	0	100																										
26	1.5	0	100																										
26.5	1.5	100	0																										
30	1.5	100	0																										

표 16. 안정화 미강의 유리 아미노산 함량

Free amino acid (mg%)	대조구	로스팅	과열증기		연속식열풍	
	쌀눈조아	두리두리	오가와라#1	오가와라#2	팜토스#1	팜토스#2
Aspartic acid	38.72	52.27	39.54	40.72	43.28	43.71
Glutamic acid	51.36	92.12	53.42	53.02	58.76	59.94
Asparagine	47.64	47.66	49.28	50.86	51.68	52.33
Serine	8.41	6.96	9.09	8.83	8.26	8.74
Glutamine	5.78	6.49	6.10	6.05	6.88	6.99
Histidine	5.42	3.02	5.15	5.07	5.45	5.46
Glycine	10.68	3.99	7.96	7.87	7.40	7.74
Threonine	3.51	2.65	3.97	4.59	5.32	5.87
Arginine	24.49	18.15	25.57	26.27	26.17	28.35
Alanine	42.10	19.58	41.52	42.24	43.17	44.27
Taurine	0.89	0.76	0.89	0.92	1.01	1.07
GABA	42.68	23.40	41.31	41.82	43.18	42.86
Tyrosine	5.55	3.99	5.57	5.70	6.03	6.29
Valine	4.65	5.90	5.63	5.35	5.99	6.12
Methionine	0.57	0.54	0.63	0.66	0.80	0.90
Phenylalanine	2.04	1.54	2.00	2.02	2.18	2.31
Isoleucine	2.07	1.49	2.02	1.97	2.17	2.36
Leucine	2.07	1.43	2.26	2.22	2.40	2.52
Lysine	4.69	3.41	5.67	6.39	5.13	6.88
proline	15.84	13.04	14.88	16.73	12.06	9.04
Total	319.16	308.38	322.47	329.29	337.32	343.74

- 미강에서의 유리 아미노산 함량은 안정화 처리 방법에 따라 308 mg%~344 mg% 수준으로 나타남. 총 아미노산 함량은 로스팅 처리한 두리두리를 제외하고 대조구보다 높게 나타났으며, 연속식열풍처리 미강에서의 함량이 높았음. 연속식열풍처리 미강 중에서는 팜토스#2의 함량이 더 높게 나타남.

- 전체적으로 glutamic acid의 함량이 가장 높은 비율로 나타났으며, aspartic acid, asparagine, alanine, GABA 등이 비교적 높은 수준으로 나타남.

- 미강의 기능성 성분인 GABA는 L-glutamic acid로부터 glutamate decarboxylase의 촉매작용에 의해 탈탄산되어 생합성 되며, 혈압강화작용, 통증과 불안증세 완화, 당뇨병 예방, 불면, 우울증 완화 등과 같은 기능성을 보유하고 있다고 보고됨. 안정화 미강의 GABA 함량은 23.4 mg%~43.18 mg% 수준이었으며, 연속식열풍처리 팜토스#1이 43.18 mg%로 가장 높은 함량을 나타냈으나 두리두리를 제외한 다른 시료들과 유사한 수준이었음.

- 감칠맛 성분 아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid의 함량은 로스팅 처리한 두리두

리에서 52.27 mg%와 92.12 mg%로 가장 높았으며, 특히 glutamic acid의 함량이 높게 나타남. 다른 안정화처리 미강의 경우도 대조구 보다는 모두 높게 나타남.

- 과열증기와 연속식열풍처리 각각에서 처리 조건이 다른 두 종류의 미강(#1과 #2)은 전반적으로 유사한 수준으로 나타남.

#### 다. 안정화 미강의 기능성 성분 분석

- 안정화 미강의 기능성 성분 중 하나로 설정한 GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid)는 상기의 유리아미노산 분석을 통하여 평가함.

- 미강 유래의 다른 기능성 성분으로 당초  $\gamma$ -oryzanol을 설정하였으나, 조미소재화 과정에서 원료의 탈지 가능성을 고려하여 지용성 성분인  $\gamma$ -oryzanol을 대신하여 미강의 주요 페놀산인 ferulic acid를 기능성 성분으로 설정하여 분석을 시행함.

- 미강의 페놀 화합물은 쌀의 기능성에 중요한 역할을 하며, 항산화성, 항콜레스테롤, 성장 촉진, 항균, 항암 활성이 있는 것으로 보고되고 있음.

- 특히 ferulic acid는 LDL 산화 억제, radicals에 의한 세포손상 보호 등 항산화 효과가 우수할 뿐만 아니라 항돌연변이 활성, UV 조사에 대한 피부 보호활성, 당뇨 유도쥐의 혈중 지질 개선효과 등 여러 생리활성이 보고되고 있음.

#### (1) 미강 폴리페놀 추출

- 미강의 폴리페놀 성분 추출은 미강 1 g에 1 M NaOH 20 mL 첨가하여 실온에서 15시간 동안 가수분해 시킨 후 1 M HCl로 pH 2로 적정하고 에틸아세테이트 20 mL 첨가하여 잘 혼합한 후 3,000 rpm에서 30분 원심분리 하여 에틸아세테이트 분획층만 수거함. 남은 잔사에는 에틸아세테이트를 다시 넣어 2회 반복하고 회수된 에틸아세테이트 추출물을 감압·농축한 후 80% 메탄올 10 mL로 정용하여 분석시료로 사용함.

#### (2) 미강의 ferulic acid 분석방법 설정

- 미강의 폴리페놀 기능 성분인 ferulic acid의 HPLC 분석방법을 설정하기 위하여 아래의 분석방법을 순차적으로 시행함.

- 표준시료와의 크로마토그램 및 PDA spectrum을 비교분석함.

표 17. HPLC 분석방법 1

HPLC Condition			
HPLC	Agilent 1100		
Column	shiseido capcellpack C <sub>18</sub> MGIII (5 μm, Φ4.6X250 mm)		
Injection volume	20 μL		
Detector	UV detector 280 nm		
Flow rate	1.0 mL/min		
Mobile phase	A: 1.5% phosphoric acid B: 70% methanol		
	min	A(%)	B(%)
	0	70	30
	30	70	30
	40	0	100

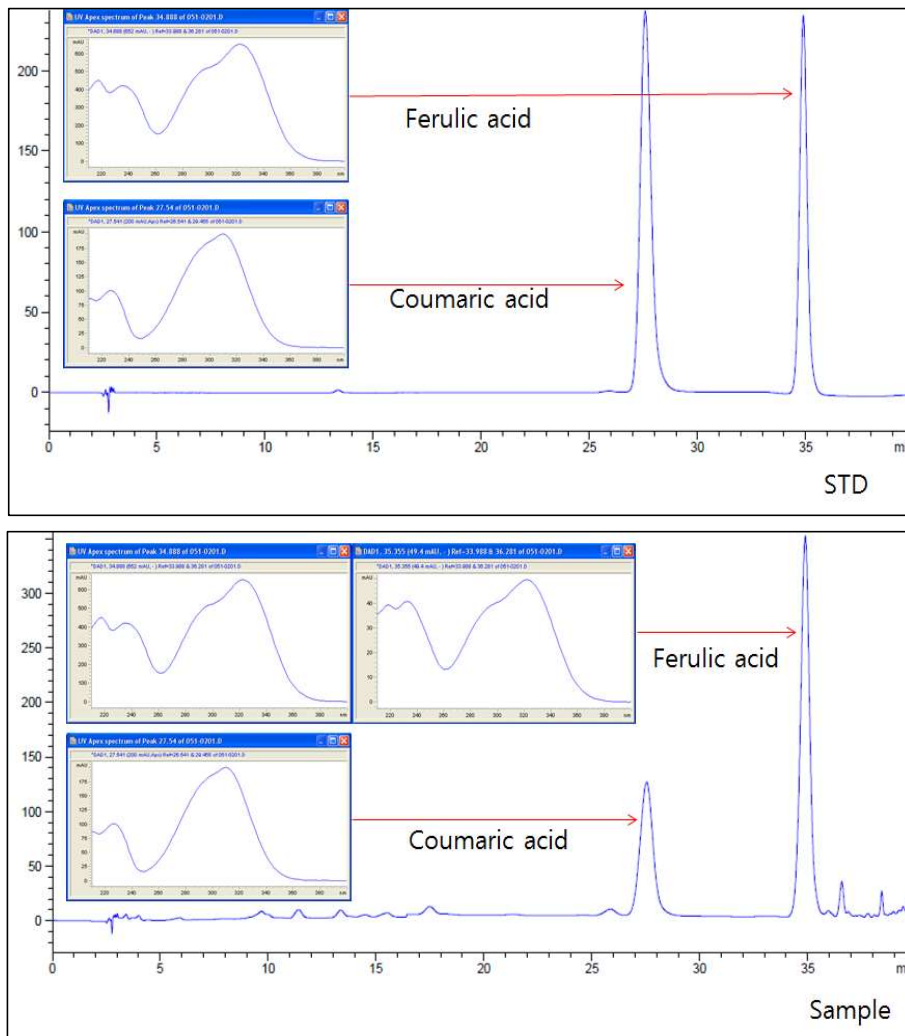


그림 12. 분석방법 1에 의한 미강 폴리페놀 분석

- 분석방법 1에 의한 미강 폴리페놀 추출물의 분석 결과 2개의 주요 피크가 검출되었으며, 표준 시료와의 비교분석을 통하여 첫 번째 피크는 coumaric acid이며, 두 번째 피크는 ferulic acid로 분석됨.

- 미강의 폴리페놀 성분 중 하나인 coumaric acid는 항산화 활성과 항암활성을 보유하며, 미백활성이 있는 것으로 보고되고 있음.

- 분석방법 1에 의한 폴리페놀 성분 분석에서 ferulic acid 피크의 뒷부분이 다른 피크와 혼입된 것으로 나타남. 따라서 용매 조건을 변경하여 분석방법 2에 의한 분석을 시행함.

표 18. HPLC 분석방법 2

HPLC Condition													
HPLC	Agilent 1100												
Column	shiseido capcellpack C <sub>18</sub> MGIII (5 μm, Φ4.6X250 mm)												
Injection volume	20 μL												
Detector	UV detector 280 nm												
Flow rate	1.0 mL/min												
Mobile phase	A: 1.5% phosphoric acid B: 70% acetonitrile												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>min</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table>	min	A(%)	B(%)	0	100	0	10	70	30	40	60	40
min	A(%)	B(%)											
0	100	0											
10	70	30											
40	60	40											

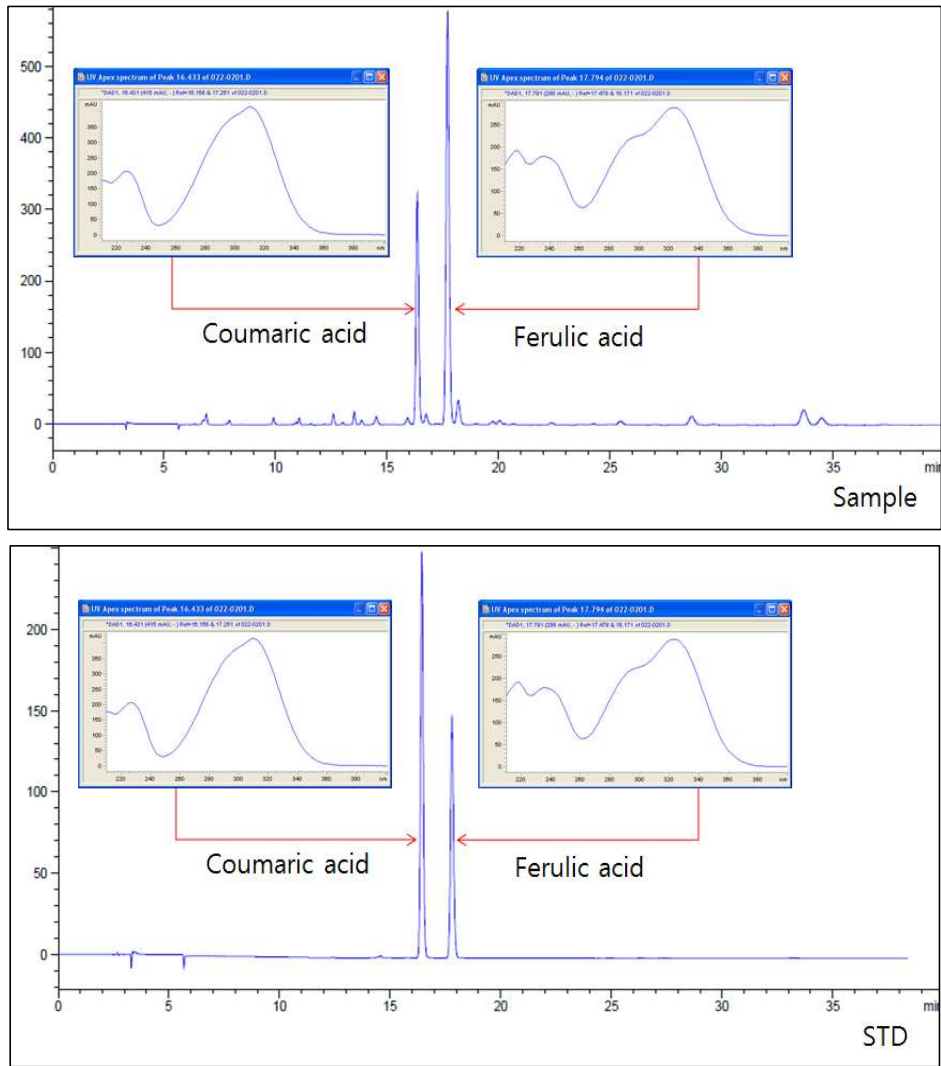


그림 13. 분석방법 2에 의한 미강 폴리페놀 분석

- 분석방법 2에 의한 미강 폴리페놀 성분 분석 결과 coumaric acid와 ferulic acid 피크가 단일성분으로 분리되어, 두 기능성분의 분석법은 분석방법 2로 설정함.

(3) 안정화 미강의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량

- 상기의 과정으로 설정된 분석방법으로 안정화 미강의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량을 분석함.

표 19. 안정화 미강의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량

처리방법	시료명	ferulic acid (mg%)	coumaric acid (mg%)
대조구	쌀눈조아	163.92	45.02
로스팅	두리두리	175.74	54.09
과열증기	오가와라#1	171.67	47.46
	오가와라#2	174.03	49.38
연속식 열풍	팜토스#1	164.64	45.24
	팜토스#2	167.27	46.99

- 미강의 ferulic acid 함량은 163 mg%~176 mg% 수준으로 두리두리 > 오가와라#2 > 오가와라#1 > 팜토스#2 > 팜토스#1 > 대조구 순으로 안정화 처리 미강이 대조구 보다 높게 나타났으나 시료에 따라 큰 차이는 없는 것으로 나타남.

- Coumaric acid 함량은 45 mg%~54 mg% 수준으로 ferulic acid의 1/3~1/4 수준이었으며 ferulic acid 함량과 유사한 경향성을 나타냄.

- 미강의 기능성분인 ferulic acid와 coumaric acid는 로스팅 방법으로 처리한 두리두리 시료에서 가장 높은 함량을 나타내었으나, 시료간의 함량 차이가 크지 않으므로 대조구와 처리군 모두 유사한 수준으로 평가됨.

라. 안정화 미강의 항산화 활성 측정

- 미강의 안정화 처리별 방법에 따른 항산화 활성을 비교하기 위하여 미강의 폴리페놀 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정하여 항산화 활성을 비교함.

(1) DPPH radical 소거능 측정

- 미강 폴리페놀 추출물 10 µL에 0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma chemical Co.) 190 µL를 혼합하여 빛이 차단된 상태로 상온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 계산함.

$$\text{Scavenging activity}(\%) = [(\text{대조군의 흡광도} - \text{시료의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100.$$



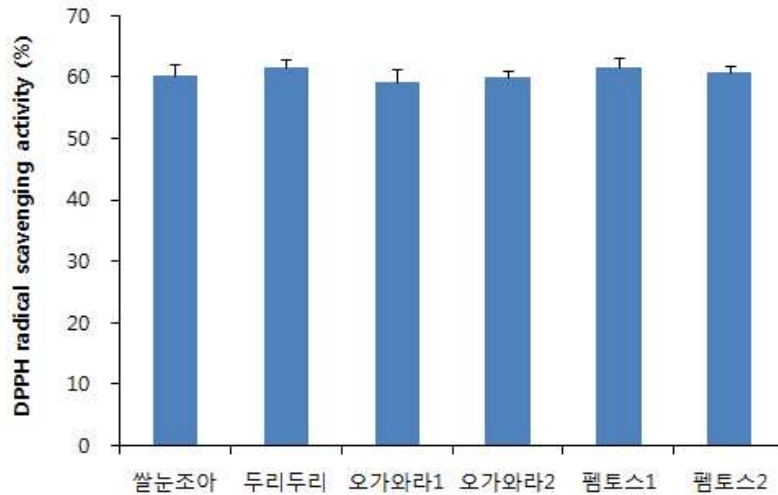


그림 14. 안정화 미강의 DPPH radical 소거능

- 미강의 DPPH radical 소거능 측정 결과 59.2~61.5% 수준으로 두리두리 > 펌토스#1 > 펌토스 #2 > 대조구 > 오가와라#2 > 오가와라#1 순으로 나타났으나 안정화처리에 따라 큰 차이는 없는 것으로 나타남.

(2) ABTS radical 소거능 측정

- ABTS 라디칼 용매는 사용 24시간 전에 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 2.45 mM potassium persulfate와 7 mM의 ABTS를 혼합하여 사용함. 준비된 ABTS working solution은 반응 전 734 nm에서 흡광도가 0.9~1.0 정도 되게 희석하여 사용함. 미강 폴리페놀 추출물 10 µL에 ABTS working solution 300 µL를 혼합하여 2분 반응 후 734 nm에서 흡광도를 측정하여 계산함.

Scavenging activity(%)=[(대조군의흡광도-시료의 흡광도)/대조군의 흡광도]×100.

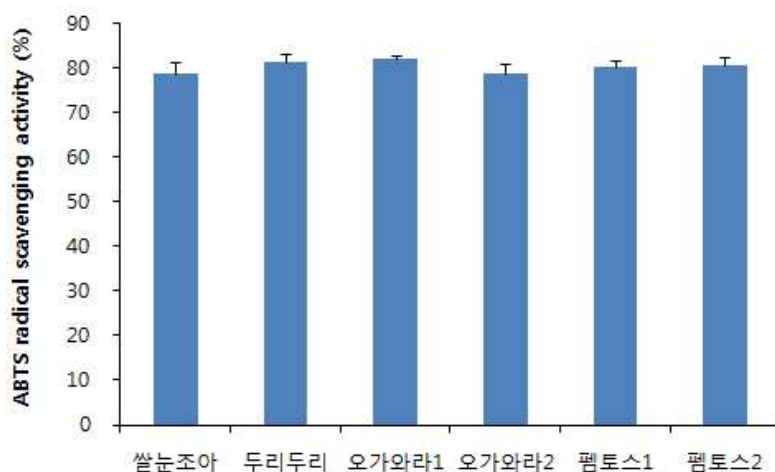


그림 15. 안정화 미강의 ABTS radical 소거능

- 미강의 ABTS radical 소거능 측정 결과 78.7~82.2% 수준으로 오가와라#1 > 두리두리 > 펌토스#2 > 펌토스 #1 > 오가와라#2 > 대조구 순으로 나타났으나 안정화처리에 따라 큰 차이는 없는 것으로 나타남.

(3) 안정화 미강의 무기질 및 비타민 분석

- 안정화 미강 처리시료들은 각 처리방법별로는 처리조건이 현격한 차이가 있으나, 같은 처리방법 내에서는 처리온도가 초기 7~20℃(편차율 3.5~11.7%), 최종 10~20℃(편차율 5~11.7%) 정도로만 달라질 뿐 다른 조건에는 차이가 없으므로 동일유형의 안정화 처리 샘플 중 영양소 파괴 또는 변질의 우려가 더 높은 시료인 처리온도가 높은 시료를 선정하여 무기질과 비타민 분석을 시행함.

(가) 무기질 분석

- 미강의 무기질은 시료를 강산과 혼합하여 Microwave digestion system을 이용하여 가열분해한 후 원자흡광광도계(AAnalyst 400, PerkinElmer)를 이용하여 분석함.

표 20. 안정화 미강의 무기질 함량

처리방법	시료명	무기질 mg%					
		Ca	K	Mg	P	Fe	Mn
대조구	쌀눈조아	43.83	1,759.04	957.88	1,243.78	10.32	19.10
로스팅	두리두리	45.53	1,931.76	969.21	1,274.45	9.39	20.24
과열증기	오가와라#1	39.69	1,738.21	933.42	1,315.22	9.96	15.44
연속식열 풍	팜토스#2	45.89	1,769.00	932.65	1,648.88	10.37	19.34

- 미강의 무기성분 분석결과 칼륨(K), 인(P), 마그네슘(Mg)의 함량이 높게 나타났으며, 칼슘(Ca), 철(Fe), 망간(Mn)은 비교적 낮은 수준으로 나타남.

- 칼슘(Ca)은 39.6 mg%~45.9 mg% 수준으로 팜토스#1 > 두리두리 > 대조구 > 오가와라#1 순으로 나타남.

- 칼륨(K)은 1,738 mg%~1,931 mg% 수준으로 두리두리 > 팜토스#1 > 대조구 > 오가와라#1 순으로 두리두리에서 약간 높으며 그 외 미강은 유사한 수준임.

- 마그네슘(Mg)은 932 mg%~969 mg% 수준으로 두리두리 > 대조구 > 오가와라#1 > 팜토스#1 순으로 나타남.

- 인(P)은 1,243 mg%~1,648 mg% 수준으로 팜토스#2 > 오가와라#1 > 두리두리 > 대조구 순으로 안정화 처리 미강에서 더 높으나 두리두리는 대조구와 유사한 수준임.

- 철(Fe)은 9.3 mg%~10.4 mg%의 비교적 낮은 수준으로 시료에 따라 큰 차이는 없는 것으로 나타남.

- 망간(Mn)은 15.4 mg%~20.3 mg% 수준으로 두리두리 > 팜토스#1 > 대조구 > 오가와라#1 순으로 나타났으며, 오가와라#1이 다른 시료에 비해 낮은 수준으로 나타남.

(나) 비타민 분석

- 미강에 주로 함유되어있는 비타민 B<sub>1</sub>, 비타민 B<sub>2</sub>, 나이아신, 비타민 B<sub>6</sub>, 비타민 B<sub>9</sub>, 비타민 E 함량을 분석하여 안정화 처리 방법에 따른 영향을 평가함.

- 비타민 B<sub>1</sub> 분석은 미강 4~5 g에 0.1 N HCl 25 mL을 넣고 초음파 추출 후 2 N sodium acetate로 pH 4~5로 적정하여 물 50 mL로 정용한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리 함. 원심분리 한 상등액 4 mL에 15% NaOH 3mL을 가하고 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 3 mL를 가하여 혼합한 후 3.75 N HCl 3 mL로 중화하여 Sep-Pak C18으로 정제한 후 HPLC로 분석함.

- 비타민 B<sub>2</sub> 분석은 미강 4~5 g에 물을 넣고 50 mL로 정용한 후. 30분 동안 초음파 추출하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후, 상등액을 여과하여 HPLC로 분석함.

- 나이아신 분석은 미강 1 g에 5 mM sodium hexanesulfonate를 넣고 100 mL로 정용한 후 30분 동안 초음파 추출하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액을 여과하여 HPLC로 분석함.

- 비타민 B<sub>6</sub> 분석은 미강 1 g에 물 50 mL을 넣고 30분 동안 초음파 추출 후 상등액을 회수하고 이와 같은 방법으로 1회 더 반복하여 50 mL로 정용한 후 여과하여 HPLC로 분석함.

- 비타민 B<sub>9</sub> 분석은 미강 1 g에 5 mM sodium hexanesulfonate/0.1% 초산 용액을 넣고 30분 동안 초음파 추출 후 50 mL로 정용함. 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 여과하여 HPLC로 분석함.

- 비타민 E 분석은 미강 0.5 g을 갈색플라스크에 넣고 에탄올 30 mL 및 10% 피로갈롤·에탄올 용액 1 mL를 가하고 이에 NaOH 5 mL를 가해 환류냉각관을 부착하여 비등수욕 중에서 30분간 비누화 함. 비누화 후 즉시 냉각하여 물 30 mL를 가해 갈색분액여두에 옮기고 플라스크는 물 10 mL, 석유에테르 30 mL로 씻어 넣고 잘 흔들어 혼합하여 방치한 후 석유 에테르 층을 분취함. 물 층은 석유에테르 30 mL로 2회 추출하고 석유에테르 액을 합하여 물 10 mL로 1회, 이어 물 50 mL로 페놀프탈레인시약이 분홍색이 되지 않을 때까지 씻음. 분액여두 중에서 물을 충분히 분리한 후 무수황산나트륨을 가해 탈수한 후 석유에테르 층을 갈색플라스크에 옮기고, 잔존하는 황산나트륨은 다시 석유에테르 10 mL로 2회 씻고 씻은 액을 플라스크에 모두 합한 다음 전 석유에테르 추출액을 40~45°C에서 감압건조한 후 잔류물은 헥산 1.0 mL를 가하여 녹여 이를 HPLC로 분석함.

표 21. 안정화 미강의 비타민 함량

처리방법	시료명	비타민 mg%					
		Vit B <sub>1</sub>	Vit B <sub>2</sub>	나이아신	Vit B <sub>6</sub>	Vit B <sub>9</sub>	Vit E
대조구	쌀눈조아	9.14	0.12	2.32	0.35	-	7.52
로스팅	두리두리	16.47	0.10	2.16	0.28	-	7.02
과열증기	오가와라#1	13.53	0.03	1.19	0.16	-	0.92
연속식열풍	팜토스#2	10.50	0.17	2.35	0.35	-	8.32

-; not detected.

- 미강의 비타민 B<sub>1</sub>은 9.14%~16.47% 수준으로 분석된 비타민 중 가장 높은 함량을 나타내었으며, 두리두리 > 오가와라#1 > 펠토스#2 > 대조구 순으로 안정화 처리 미강이 대조구보다 높은 함량을 나타냄.

- 비타민 B<sub>2</sub>는 0.03%~0.17% 수준으로 비교적 낮은 함량이었으며, 펠토스#2 > 대조구 > 두리두리 > 오가와라#1 순으로 나타났으며 특히 오가와라#1의 함량이 낮게 나타남.

- 나이아신은 1.19%~2.35% 수준으로 펠토스#2 > 대조구 > 두리두리 > 오가와라#1 순으로 나타났으며 오가와라#1의 경우 다른 시료의 1/2 수준으로 나타남.

비타민 B<sub>6</sub>는 0.16%~0.35% 수준으로 비교적 낮은 함량이었으며, 펠토스#2 = 대조구 > 두리두리 > 오가와라#1 순으로 나타났으며 오가와라#1의 경우 다른 시료의 1/2 수준으로 나타남.

- 비타민 B<sub>9</sub>은 모든 시료에서 검출되지 않았음.

- 비타민 E는 0.92%~8.32% 수준으로 오가와라#1을 제외하고 비교적 높은 비율로 나타남. 펠토스#2 > 대조구 > 두리두리 > 오가와라#1 순으로 나타났으며 특히 오가와라#1이 다른 시료의 1/8~1/9 수준으로 낮게 나타남.

안정화 처리별 미강의 비타민 분석 결과 과열증기처리한 미강의 비타민 손실이 가장 큰 것으로 나타났으며, 로스팅과 연속식열풍처리는 비타민 손실에 비교적 안정한 것으로 나타남.

- 미강의 안정화 처리조건에 따른 산가, 과산화가, 미생물 분석, 영양성분 분석 및 기능성분 분석 결과를 종합하여 안정화 방법 중 로스팅과 연속식열풍처리 방법이 우수한 것으로 사료됨.

## 2절 미강의 분해 최적화를 위한 처리기술 연구

### 1. 단백질 추출 수율 향상을 위한 미강의 최적화 분해조건

- 미강은 일반적인 추출방법으로 추출 시 효율이 그리 높지 않은 것으로 알려져 있으며, 특히 조미소재 생산을 위한 단백질 분획 추출 시 추출효율이 높지 않아, 그간 많은 연구자들에 의해 효과적으로 추출하는 방법이 연구되어 왔다. 예를 들어, amylase 또는 alkalase 등의 효소를 처리 후 추출하는 방법, 냉·해동을 반복하여 섬유질조직을 파괴하는 freeze-thaw 방법, 초음파 처리방법 등 다양한 시도가 있었는데, 최근엔 콜로이드 밀 등을 사용한 물리적 파쇄방법으로 전처리후 추출할 경우 추출 수율이 높아졌다는 보고가 있음. 본 연구에서는 미국에서 산업적으로 적용중인 효소처리법과 미강조직의 물리적 파쇄를 통한 size reduction 방법을 적용하여 각 방법별 단백질 추출 수율을 비교, 가장 우수한 방법을 도출해내고자 하였음.

표 22. 미강 영양소 조성

항목	함량
열량(kcal/100g)	355.46
탄수화물(g/100g)	49.36
식이섬유(g/100g)	23.93
당류(g/100g)	7.45
단백질(g/100g)	14.21
지방(g/100g)	16.56
포화지방(g/100g)	3.12
트랜스지방(g/100g)	0.01
콜레스테롤(mg/100g)	1.38
나트륨(mg/100g)	36.15

#### 가. 재료 및 방법

- 미강은 2014년 12월 (주)쌀눈조아에프엔비로부터 구입하였으며, 구입한 미강은 경상북도 달성군 화원읍 소재 화원도정공장에서 동진 품종의 쌀로부터 생산된 것임.

- 효소처리 방법은 S. Tang 등이 보고한 방법을 참고하여 다음과 같이 처리하였음.(2)

- 시험군별로 각각 10g씩 미강시료를 채취하여 100 mL의 증류수에 넣고 10분간 교반 후 각각의 효소를 아래 조건에 맞춰 처리하였음.

-  $\alpha$ -amylase(TermamyTM) : Sigma Chemical, 110,000 units/g 구입

- 효소농도별로 시료를 분주한 후 pH 6.25, 1.0 N HCl 용액에 분산시켜 45°C의 water bath에 넣고 200 rpm에서 3.5시간동안 교반.

○  $\beta$ -glucanase(endo-1,3(4)-)(ViscozymeTM) : Novozyme, 700ECU/g 구입

- 효소농도별로 시료를 분주한 후 pH 4.1, 1.0N HCl용액에 분산시켜 45°C의 water bath에 넣고 200 rpm에서 3.5시간동안 교반.

○ Cellulase(Celluclast™) : Novozyme, 100ECU/g 구입

- 효소농도별로 시료를 분주한 후 pH 5.5, 1.0N HCl용액에 분산시켜 55°C의 water bath에 넣고 200 rpm에서 3.5시간동안 교반.

- 물리적 파쇄처리 시료는 (주)제이분체(경기도 안산시 소재)에 로스팅 처리된 미강을 ACM pulverizer로 분쇄가공을 의뢰하여 준비하였음. 분쇄조건은 8,000rpm이었고, 입도는 미국표준체규격으로 200 mesh를 통과한 미강을 분리하여, 이중 10 g을 0.1 N NaOH로 조정된 pH 8.5의 증류수 100 mL에 분산시킨 후 45°C의 water bath에 넣고 200 rpm에서 3.5시간동안 교반한 각각의 시료를 1,100×g 원심분리기에서 30분간 돌려 상등액만을 취해 단백질 함량분석을 식품공전에 등재된 방법으로 실시하였음.

- 효소처리와 물리적 파쇄에 따른 단백질추출 결과는 다음과 같음.

표 23. 효소처리와 물리적 파쇄에 따른 단백질추출

처리 방법	처리군	상층액(추출액)		효소 단백질량 (g)	미강 단백질함량 (g)	단백질 추출수율 (%)
		단백질농도 (%)	총 단백질량 (g)			
효소 처리	ET #1	3.9	0.45708	0.0936	1.669	21.8%
	ET #2	3.9	0.45747	0.0749	1.669	22.9%
	ET #3	2.4	0.28368	0.0199	1.669	15.8%
물리적 파쇄	PT #1	6.0	0.7896	0	1.528	51.7%

\* ET #1 : α-amylase 처리시료

ET #2 : β-glucanase(endo-1,3(4)-) 처리시료

ET #3 : Cellulase 처리시료

PT #1 : 물리적 파쇄 처리시료

$$\text{단백질추출수율 \%} = (\text{추출된 총 단백질량g} - \text{효소단백질량g}) / \text{미강단백질함량g}$$

- 단백질 추출 시 효소처리와 물리적 파쇄처리간 수율 비교를 한 결과 효소처리보다 물리적 파쇄처리한 경우 단백질 추출 수율이 최소 28.8%에서 최대 35.9% 만큼 더 높은 결과를 얻었음. 이 결과는 목표로 했던 단백질 함량 차이인 10%를 뛰어넘었고, 물리적 파쇄에 의한 섬유질 파괴가 효소처리보다는 효과가 더 우수하다는 것을 알 수 있음. Tang 등이 발표한 기존 문헌(2)에 기재된 추출방법은 효소처리 또는 freeze-thaw, 초음파분쇄 처리 등이 있는데, 이들 방법을 사용할 경우 그냥 물로 추출했을때는 9.8%지만, 고속균질 및 amylase 와 protease 등의 효소를 복합적으로 처리할 경우에는 최대 65.9%까지 추출율이 상승했다고 보고되어 있는데, 여러 가지 공정을 거치지 않고 단순하게 ACM pulverizer를 활용한 물리적 분쇄 후 알칼리 용액으로 추출하는 방식이 고속균질과 효소첨가 등의 복합처리방식보다 높게 나왔다는 점에서 공정 단순화 및 양산화에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 생각

됨.

- 그러나, 미강 내 단백질 함량은 약 14%정도 되지만 본 실험결과로는 미분쇄를 통한 단백질추출액의 단백질함량은 6% 정도로서 이 결과를 그대로 활용하여 원료로 공급하기에는 아직 한계가 있음. 또한, 미강의 ACM pulverizer를 이용한 분쇄가공 비용이 높은 관계로 추출 수율 12%를 적용 시 경제성 측면에서 한번 더 신중하게 검토해 볼 필요가 있음.

#### 나. 수율 향상을 위한 미강 원료 처리 기술 개발

- 쌀은 단백질과 전분이 서로 뒤섞여 공존하고 있는 형태로 구성되어 있으며, 특히 단백질은 형태와 구조를 지탱하는 주요한 성분으로서 protein body 형태로 분포되어 있음. 백미 부분에는 단백질과 전분이, 미강부위에는 식이섬유와 단백질이 이와 같은 형태로 분포되어 있음. 이 부분에 착안하여 이전 실험에서는 cellulase, protase, amylase 효소처리를 통해 단백질 추출율을 높이거나 식이섬유의 물리적 파쇄를 통해 단백질을 둘러싸고 있는 식이섬유를 제거함으로써, 단백질 추출 수율을 올리려고 했고, 실험결과 물리적 파쇄를 통한 식이섬유 제거법이 가장 수율이 높았음을 알 수 있음.

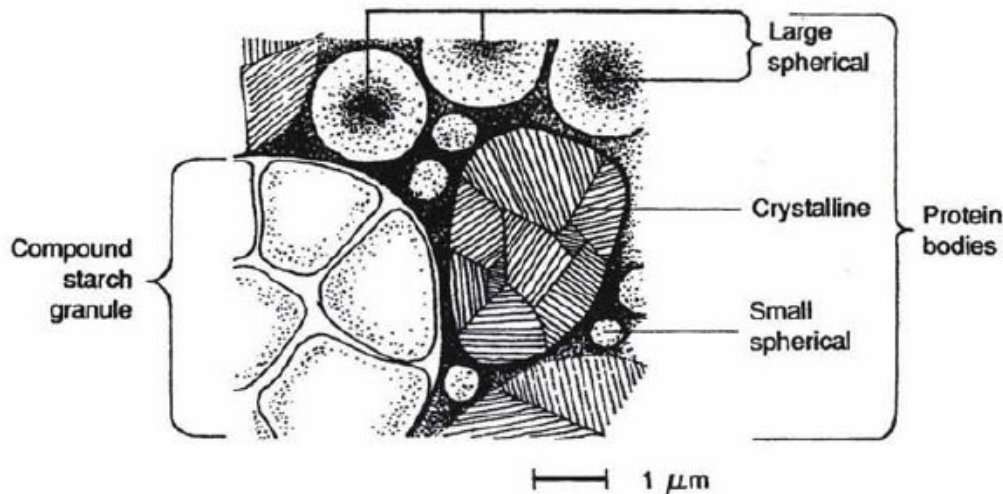


그림 16. 쌀조식 내에 전분과 단백질 분포 diagram(2)

#### (1) 약산 처리를 통한 단백질 추출 개선 테스트 및 시너지 효과 검토

- 추가적으로 효율이 개선된 미강단백질 추출 기술을 위하여, 약산 처리를 통한 단백질 추출 개선 실험 실시 및 시너지 효과를 연구하였음.

- 일반적으로 식이섬유를 추출할때는 황산처리를 통해 섬유질을 구성하고 있는 다당체를 제거하는 것이 보통임. 사탕수수 부산물일 bagasse에 0.1 N 약한 황산을 처리함으로써 lignocellulose를 분해하는 기술 등이 문헌 등에 기 보고된바 있어(3) 이 점을 참고로 하여 식품제조용으로 사용 가능한 수준의 약한 산을 미강에 처리함으로써 미강의 단백질을 둘러싸고 있는 식이섬유를 제거하여 미강단백질의 추출 수율을 높이려고 하였음.

#### (가) 재료 및 방법

- 실험에 사용된 황산은 순도 97%(제조사 : Showa)를 구입, 1%와 3%, 5%로 희석하여 사용하였으며, 구연산은 순도 99.5%(제조사 : Daejung)를 구입하여 각각 1%, 5%, 10%로 희

석하여 사용하였음. 수산화나트륨은 순도 33% 제품(제조사: 백광산업)을 구입하여 0.1 N 농도로 제조하여 사용하였음.

- 사용한 미강은 안정화효과가 가장 우수한 것으로 나타난 로스팅처리 미강(구입처 : 농업회사법인 (주)두리두리, 충남 논산시 소재)을 사용하였으며, 농도별, 산종류별로 1시간동안 실온에서 1: 10의 비율로 담가 침지한 후 산 종류별 분해율을 비교하였으며, 분해율은 다음 식에 의해 계산하였음.

$$\text{분해율(\%)} = \text{분해당 생성량/조섭유} \times 100$$

- 분해율이 우수한 시료를 골라 동일한 조건에서 산처리한 후 각각의 시료를 0.1 N NaOH 수용액을 사용하여 pH 7로 중화한 후, 1,100×g 원심분리기에 30분간 돌려 상등액만을 취해 단백질함량을 식품공전에 등재된 Kjeldal 방법으로 분석하였음.

(나)실험 결과

표 24. 산 처리종류별 식이섬유 분해율 및 추출물 단백질함량

산종류	처리농도	섭유질 분해율(%)	단백질함량(%)
구연산	1%	0	12.3
	5%	0.7	13.4
	10%	1.2	15.7
사과산	1%	0	11.1
	5%	0	11.8
	10%	0.5	13.3
황산	1%	4.5	20.1
	3%	15.2	29.2
	5%	18.8	35.5

- 일반적으로 미강은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌으로 분류되는 섬유질을 가지고 있으며, 이중 각 성분의 조성은 셀룰로오스 16%, 헤미셀룰로오스 42%, 리그닌 25%로 헤미셀룰로오스가 다소 많은 경향을 보임.(5) 헤미셀룰로오스는 xylan, glucan, xyloglucan, glucomanan 등의 복합다당체로 구성되어 있으며, 이를 산으로 분해하면 ribose, xylose 등 오탄당이 다량 생성되는 구조를 가지고 있음. 이를 활용하여 xylose, ribose, arabinose 등을 추출하기 위해 약산을 처리하는 기술이 발명공지된 바 있으며,(대한민국 특허 10-1108789) 본 실험에서는 이 기술을 활용하여 산종류별로 분해효과를 비교한 후 단백질 함량을 비교하였음.

- 기 보고된 문헌에 의하면 묽은 황산을 사용해서 섬유성 기질로부터 헤미셀룰로오스를 회수하기 위한 일반적인 반응 조건은 온도가 150℃ 내외, 산농도는 5%이내임. 이 조건에서는 10분에 바로 가수분해되는 것으로 알려져 있으나 본 실험은 실제 식품제조 시 안전을 고려하여 실온에서 수행되도록 함으로써 1시간 후에도 완전히 분해되지 못했으며, 미강 내 단백질과 지방 등이 함유되어 있어 다소 분해속도 및 분해율이 낮게 나온 것으로 판단됨. 이 결



과 중화 후 추출액 내 단백질 함량에도 차이를 보일 수밖에 없음.

(2) Extruding을 통한 미강의 안정화 및 시너지 효과 연구

- Extruder를 활용한 미강안정화 기술은 1986년 미국에서 최초로 개발 되었으며, 현재는 가장 경제성이 우수한 미강 안정화 방법으로서 상용화 생산되고 있음. 미국에서는 이러한 방식으로 처리한 안정화 미강이 다양한 시리얼 및 제과제빵, 소시지와 패티 등 육가공제품, 치킨 배터 등 다양한 제품에 사용되고 있음. 미국의 Rice Bran Technology 사에서는 1990년대부터 extruder로 생산하는 안정화 미강을 지속적으로 판매해오고 있을 정도로 상용화 가능성이 검증된 방식임.



그림 17. 해외 시장에서의 안정화 미강 상품

(가) 재료 및 방법

- Extruder를 통한 미강의 안정화 생산은 전남 고흥군 소재 (주)조은열매에서 실시했으며, 미강은 extruder에서 출구온도 105℃, 출구지름 5mm, 압출속도 30mm/sec 의 조건으로 안정화 생산되었음. 이때 미강은 경기도 안성시 소재 (주)쌀눈조아에프앤비에서 구입(원산지: 경북 김천)하여 사용하였음.

- 산가는 식품공전 1. 식품성분시험법 중 1.1.5.3.1 산가 분석방법에 의거하여 분석하였으

며, 총세균, 대장균군, 바실러스세레우스 분석 역시 식품공전 내 3. 미생물시험법 중 3.5 세균수 및 3.7 대장균군 시험법에 의거하여 분석하였음.

(나) 실험결과

표 25. Extruder 처리 시 산가 및 미생물 품질

처리방법	시료명	저장기간	산가	총세균 (CFU/g)	대장균군	바실러스 세레우스 (CFU/g)
대조구	Control	0주	85.2	1,600,000	양성	770
		4주	138.3	-	-	-
Extruding	Ext	0주	84.5	50	음성	20
		4주	89.15	-	-	-

- Extruder로 처리한 미강은 산가변화가 5미만으로서 매우 안정한 산가를 보였고 미생물에 있어서도 미생물 살균효과가 뚜렷하게 나타났다. Extruder 처리는 원료 전처리 방식으로 매우 유용한 것으로 판단됨.

표 26. Extruder 처리한 안정화 미강의 황산처리 후 단백질 추출 결과

산종류	처리농도	단백질함량(%)
황산	1%	25.4
	3%	38.8
	5%	42.2

- Extruder로 안정화한 미강을 상기의 황산처리 공정에 적용하여 단백질함량을 측정한 결과 15~20%정도의 함량증가 효과가 있음. Extruder시 미강은 약간 팽화하며 이때 섬유질 등의 조직구성물질들이 일부 파괴되는 효과가 있음. 비슷한 예로서 홍미삼을 extruder로 압출가공하였을 때 압출성형시 발생하는 고온, 고압, 고전단력에 의하여 세포벽 성분간 성분이 이완되면서 사포닌 등 기능성 성분의 추출을 개선시켰다는 보고가 있음.(6) 미강 역시 압출팽화에 의해 식이섬유가 전단되고, 조직이 벌어지면서 단백질 추출 수율이 개선된 것으로 생각됨. 황산은 단백질에 적용하면 단백질을 가수분해하여 조미료로 사용되는 식물성단백질가수분해물(HVP)를 만들 수 있다는 점에서 유리한 면이 있으나, 단백질 내 질소와 반응을 통해 황산암모늄을 생성하게 될 가능성이 있다는 단점이 있어 실제 조미료 원료를 생산 시 황산의 사용은 다른 요소들을 충분히 검토한 후 진행해야할 필요가 있음.

### (3) 여과를 통한 미강단백질 농축 최적화 연구

#### (가) Microfilter를 사용한 여과공정 실험

- 추출 후 건조과정에서 발생하는 단백질 함량 감소의 원인은 주로 무기질, 비타민, fiber debris 등의 불순물이 추출물에 다량 포함되어 나오기 때문임. 불순물을 제거하기 위하여 원심분리법, 단백질 등전점 침전 등의 방법을 생각해 볼 수 있음. 미강단백질 등의 small molecule만을 선택적으로 분리할 수 있는 microfilter를 사용하여 단백질을 농축 회수하고자 하였음.

#### ① 재료 및 방법

- 상용화 생산을 위한 조건을 설정하기 위하여 Lab. scale에서의 추출을 진행하였음. 상기 기재된 압출방식으로 각기 안정화한 미강 1 kg을 황산 1%로 1:10(w/w)에서의 1시간 처리를 통해 섬유질을 가수분해한 후 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH 9.2까지 상승시킨 다음 45°C에서 2시간 동안 교반하여 단백질을 추출하였음. 단백질 추출액 2 L를 150mesh 표준체에 통과 여과시켜 1차 여과액을 준비하고, 이 1차 여과액 1 L를 pore size 1  $\mu\text{m}$  인 microfilter로 걸러내어 그 여과액을 분무건조(모델명 : KL-8, 제조사 : 서강엔지니어링)하여 갈색의 분말을 얻을 수 있음.

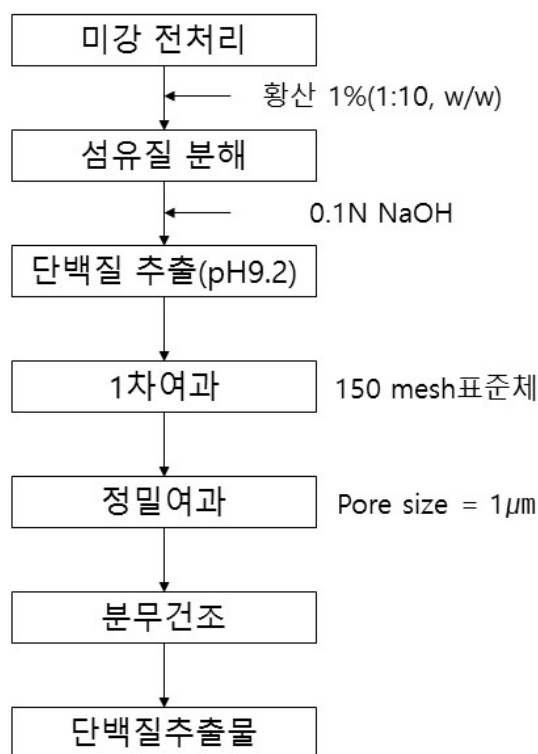


그림 18. 단백질추출물 제조공정도-Lab. scale

- 상기 단백질 추출물의 대량생산을 위하여 충북 진천군 소재 건우에프피(주)에서 양산화 실험을 진행하였음. 1차여과액 제조공정까지는 상기조건 같으나 microfilter 대신 필터프레스를 사용하여 여과를 진행한 후 여과액을 회수 후 진공건조 하였음.

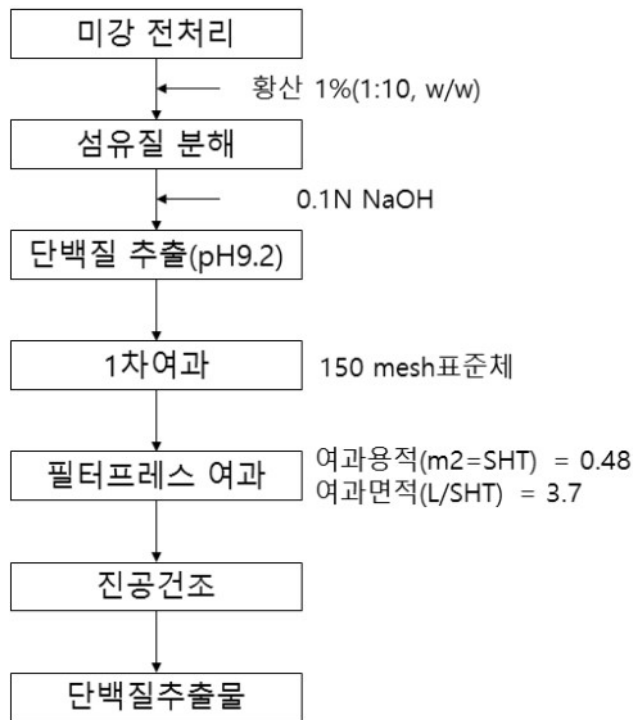


그림 19. 단백질추출물 제조공정도-pilot scale

② 실험 결과

- 2가지 방법으로 실험한 후 단백질 함량과 생산 수율을 계산하였음.

표 27. 단백질 함량과 수율

	단백질 함량(%)	단백질 수율(%)	수분(%)
Test #1*	75.0	13.8	5.36
Test #2	37.05	9.2	2.85

\*Test #1 : Lab. scale    Test #2 : Pilot scale

- Microfilter 방식은 단백질 함량과 수율 모두 우수한 결과를 얻을 수 있었으나, 이 공정을 scale up하여 실제 생산방식으로 적용할 경우 생산비용이 매우 높아져서 현실적으로 조미료용 단백질 원료로 사용하기가 어렵다. 이런 이유 때문에 비교적 경제성이 높은 것으로 알려진 필터프레스 방식을 사용한 여과를 사용하여 Pilot scale의 제품 생산을 시도한 결과 목표로 한 함량 35%이상의 단백질 추출물을 얻을 수 있음.(다음 사진 참조)



그림 20. Pilot 추출 공정을 통해 생산한 미강단백질 추출물

#### (4) 탈지미강을 활용한 미강단백질 농축 실험

- 미강은 탄수화물을 제외한 단백질, 지방, 회분, 식이섬유 등의 다른 영양성분이 고르게 함유되어 있다는 것이 특징임. 그러나 이 중 어느 하나를 농축하고자 할 때 이러한 고른 영양소 분포가 추출에 방해가 되는 요소가 될 수 있음. 특히, 식물성 단백질은 보통 탈지공정을 거쳐 지방을 제거한 후 남은 탈지박에 알칼리 또는 물, salt 용액 등을 처리하여 추출하는 것이 일반적 공정임. 로스팅, 압출 등 다양한 미강 안정화 공정을 적용한 후 지방을 추출하고, 여기서 생성된 탈지미강을 활용하여 단백질 추출 수율이 어떻게 변화하는지 알아보기 위하여 먼저 탈지미강 내 단백질 조성을 확인한 후, 알칼리를 사용한 단백질 추출 실험을 진행하였음.

##### (가) 재료 및 방법

- 로스팅 방식 및 extruding 방식으로 미강을 안정화 한 후, 안정화 미강에 10배의 hexane을 넣고 overnight한 후, 4,000rpm에서 10분 동안 원심분리기(모델명 : HA-1000-3, 제조사 : 한일과학산업)로 원심분리하여 추출하였음. 탈지미강 내 단백질 조성을 알아보기 위하여 다음과 같이 단백질을 용해도에 따라 분리추출하였음.(6)

- 탈지미강 50 g에 증류수 250 mL를 넣은 후, 상온에서 마그네틱 바를 넣고 1시간 동안 휘저어 주었음. 4,500rpm에서 15분 동안 원심분리를 하여 윗물을 모아 필터한 후, pH 4.1로 적정하여 상온에서 1시간 동안 방치하였음. 4,500rpm에서 15분 동안 원심분리기(모델명 : HA-1000-3, 제조사 : 한일과학산업)로 원심분리를 하여 침전물을 모아 증류수로 희석한 다음 다시 원심분리를 한 후, 이를 한 번 더 반복하여 albumin을 추출하였음. albumin을 추출한 후 남은 residue에 1 M NaCl 250 mL를 넣고, albumin과 같은 방식으로 진행하며, pH 4.3으로 적정하여 globulin을 추출하였음. globulin을 추출한 후 남은 residue에 80% 알코올 250 mL를 넣고 원심분리하여 얻은 윗물을 필터한 후, 3배의 아세톤을 넣고 4,500rpm에서 15분 동안 원심분리 하여 prolamin을 추출하였음. prolamin을 추출한 후 남은 residue에 0.01 M NaOH 250 mL를 넣고 albumin과 같은 방식으로 진행하며, pH 4.8로 적정하여 glutelin을 추출하였음. 추출한 albumin, globulin, prolamin, glutelin fraction을 동결 건조

시킨 후 무게를 측정하였음.

- 위 과정을 통해 미강 내 단백질의 조성을 확인한 후, extruding 방식으로 안정화처리된 미강에 n-hexane을 1:10(w/v)비율로 첨가하여 탈지한 후, 4,000rpm에서 10분간 원심분리기 (모델명 : HA-1000-3, 제조사 : 한일과학산업)로 원심분리하여 상등액을 분리제거하였음. 회수된 침전물에 1 N NaOH(제조사: 백광산업)용액을 첨가하여 pH 9.2까지 상승시킨 후 2 시간동안 저속교반하면서 단백질을 추출하였음. 이 후 1 N HCl(제조사: 백광산업)을 저속 교반하면서 첨가하여 pH 4.5로 떨어뜨린후 4,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리제거하였음. 침전물을 증류수에 분산시켜 세척한 후 분무건조기(모델명 : KL-8, 제조사 : 서강엔지니어링)로 분말건조를 실시하였음.

(나) 실험결과

- 탈지미강에서 추출한 단백질의 조성은 다음과 같음.

표 28. 탈지미강 내 단순단백질 종류 별 조성

단백질 종류	처리방법					
	생미강		Extruding		Roasting	
	수율*(%)	함량(%)	수율(%)	함량(%)	수율(%)	함량(%)
Albumin	1.45±0.62 <sup>a**</sup>	68.82±2.52 <sup>a</sup>	0.94±0.97 <sup>b</sup>	65.72±3.16 <sup>a</sup>	0.38±0.67 <sup>c</sup>	45.07±7.30 <sup>b</sup>
Globulin	0.42±0.23 <sup>a</sup>	19.78±1.20 <sup>b</sup>	0.24±0.50 <sup>b</sup>	16.92±1.67 <sup>b</sup>	0.25±0.35 <sup>b</sup>	29.45±2.38 <sup>a</sup>
Prolamin	0.21±0.15	9.81±0.79 <sup>b</sup>	0.18±0.40	12.30±1.74 <sup>b</sup>	0.16±0.21	19.54±1.82 <sup>a</sup>
Glutelin	0.03±0.01	1.58±0.56 <sup>b</sup>	0.07±0.01	5.06±1.26 <sup>a</sup>	0.05±0.03	5.94±3.17 <sup>a</sup>
Total	2.11±0.16 <sup>a</sup>		1.43±0.19 <sup>b</sup>		0.84±0.09 <sup>c</sup>	

n=3,

\*g/50g defatted rice bran,

\*\*The different superscript letter in the same line represents the fact that they are significantly different(P <0.5).

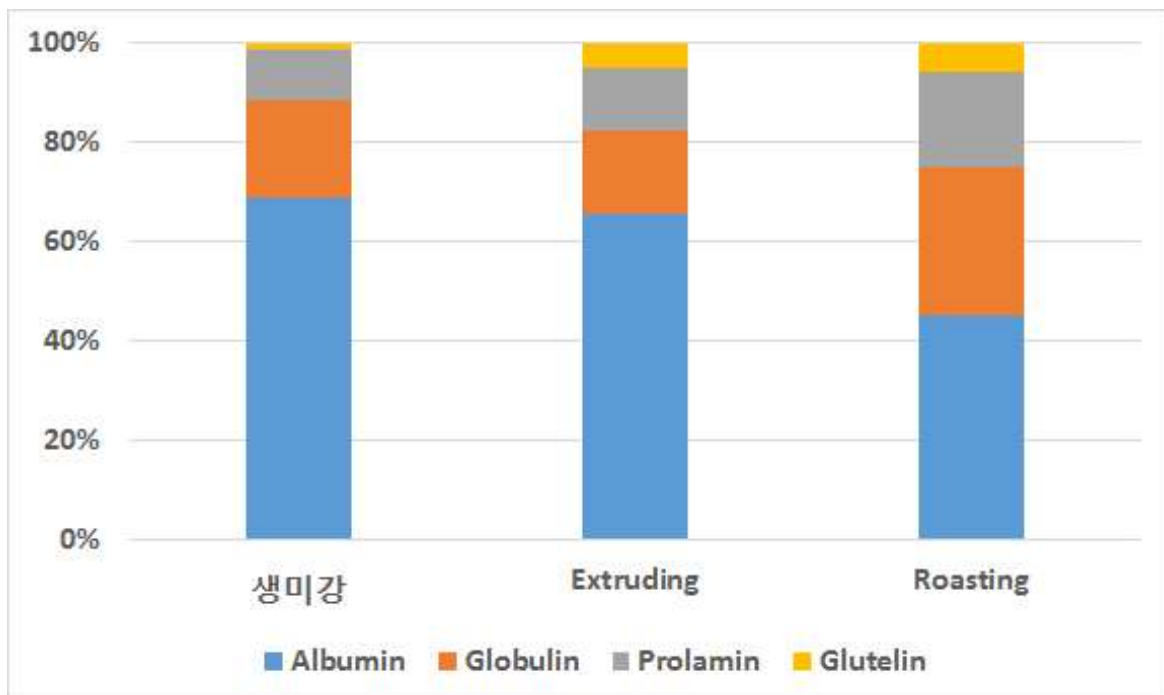
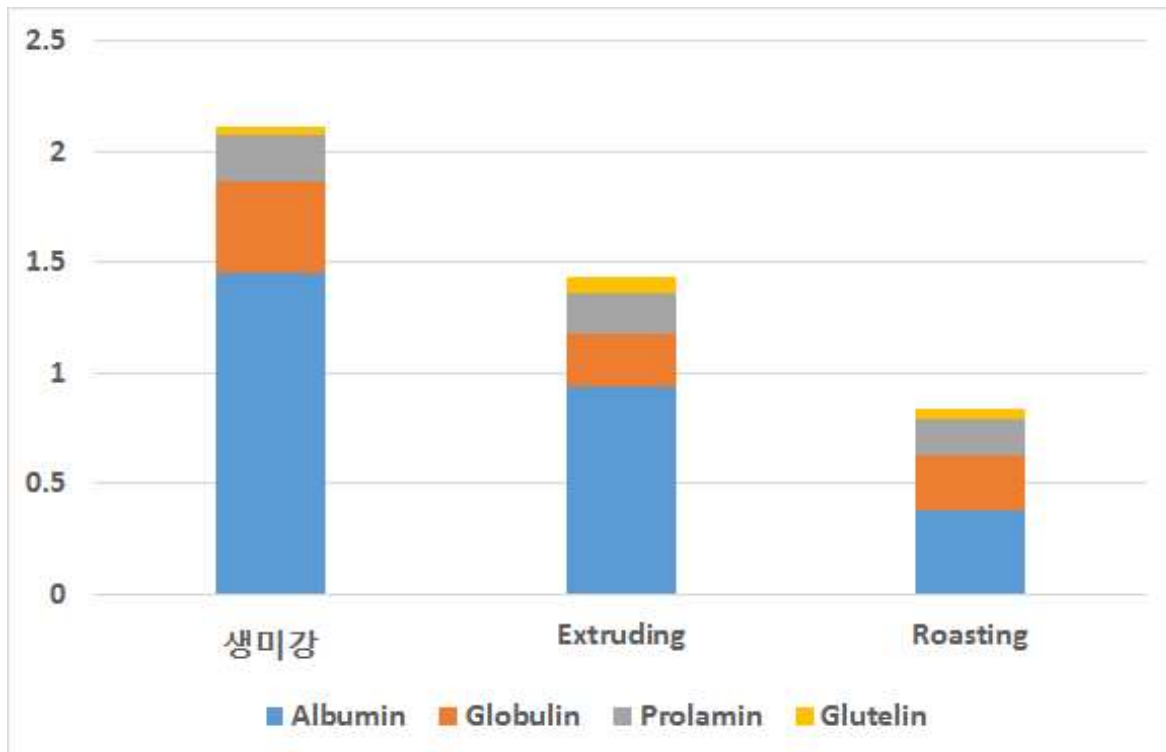


그림 21. 안정화 방법별 미강 단백질 조성 비교

- 생미강에서의 단백질 추출량이 가장 많은 반면, Extruding과 Roasting 처리 안정화 미강의 순으로 미강단백질 추출량이 감소하였음. 특히, 생미강에서는 단순단백질 중 알부민 함량이 눈에 띄게 높았는데, 알부민은 물에 가장 잘 녹는 단백질이라는 점을 감안할 때 안정화 공정 시 동반되는 열로 인해 알부민이 변성되었을 가능성이 높으며, 알부민을 제외한 나머지 단백질의 경우는 안정화 처리 방법별로 함량 변화가 크지 않았던 것을 보면, 전체적인 단백질 함량 감소와 알부민 변성을 방지하려면 가급적 도정 후 즉시 탈지하여 생미강 그대로 안정화하는 방법이 단백질 회수율을 높이기 위한 가장 좋은 방법이라고 생각됨. 그러나 미강을 안정화 처리하지 않으면 미강 품질이 균일하지 않을 것이기 때문에, 이에 따른 수율 변화 등 품질 문제를 추가 검토해 봐야 할 것임.

- Extruding을 통해 안정화한 탈지미강에서 추출한 단백질의 함량은 68%, 총 수율은 8.2%이었음. 탈지미강에서 알칼리 추출방식으로 단백질을 추출하는 공정은 여러 문헌을 통해 기 보고된 것으로서, 국내에서도 2009년 CJ제일제당에서 이와 같은 공정으로 상용화된 바 있음. 그러나 상용화된 미강단백질은 미강 도정 시 발생하는 peroxidase에 의한 갈변현상 및 알칼리 처리에 따른 착색효과로 인해 색상이 매우 어둡다는 단점이 있었으며, 쌀겨 고유의 냄새와 맛 등으로 인해 조미료로 가공 시 이취 문제가 다소 발생한다는 단점도 함께 발생하였음. 이러한 이취를 억제할 수 있는 방법은 70% 에탄올로 세척하는 등을 생각해 볼 수 있으나 아직 문헌 등으로 보고된 바는 없음.



### 3절 미강의 효소분해 특성 연구

#### 1. 미강의 효소분해 최적 조건 평가

가. 미강의 효소분해 최적 조건 평가

- 미강에 함유된 단백질을 조미소재화 하기 위하여 구성 성분인 아미노산으로 분해하기 위해 메이저업체에서 생산하는 정제효소를 이용한 가수분해 방법과, 본 연구과제의 사업화를 염두에 두고 경제적인 장점을 가진 미생물이 생산하는 효소군을 이용하는 방법으로 구분하여 연구를 진행함.

- 본 연구과제에서 이용한 메이저업체에서 생산하는 정제효소로는 NOVOZYMES사의 효소와 AMANO ENZYME사의 효소류를 이용함. 이들 메이저업체의 정제효소군을 미강의 가수분해 후 고액분리(여과)시 여과속도 및 수율향상을 목적으로 단백질 분해효소 이외에도 셀룰로스를 분해하는 효소와 L-Glutamine을 Glutamic acid로 변환하는 글루타미나제를 이용함.

- 이들 메이저업체에서 생산 판매하는 정제효소류는 매우 고가의 상품으로 본격적인 사업화를 염두에 둔 본 연구과제의 경우, 사업화 되었을 때의 경제적인 여건을 감안하여 미생물이 생산하는 효소류를 이용하는 방법에 대해서도 연구를 진행함.

- 미생물이 생산하는 효소류의 이용은 장류 양조산업에서 이용하는 황국곰팡이 종국을 검토하여 각각의 종국을 교체배양 및 가수분해 연구를 거쳐서 만들어지는 가수분해물의 특성을 연구하고 정제효소의 가수분해물과 비교함.

- 중국이 생산하는 효소의 특징으로는, 경제적인 장점 이외에도 정제효소가 가진 단순함에 비해 매우 다양한 종류의 효소군을 생산하게 되고, 그 결과 원료중의 각종 성분을 분해함으로써 가수분해 결과물에 복잡하고 다양한 정미특성을 가진 관능특성을 부여할 수 있는 장점이 있음.

- 장류 양조에서 이용하는 황국곰팡이 중국이 생산하는 효소로는 다음 표와 같이 복합적으로 다양한 효소를 생산함.

표 29. 황국곰팡이 종국이 생산하는 각종 효소

총칭	효소명	주요 기질과 생성물	역할
프로테아제	프로테아제 펩티다제	단백질로부터 펩타이드 펩타이드로부터 아미노산	단백질의 가용화 감칠맛, 착색
	글루타미나제	글루타민으로부터 글루타민산	감칠맛, 착색
아밀라제	$\alpha$ -아밀라제 글루코아밀라제	전분으로부터 텍스트린, 올리고당텍스트린, 올리고당으로부터 글루코스	젓산균, 효모에 의한 젓산, 에탄올의 생성
	펙틴리아제 펙틴에스테라제 폴리갈락트로나제	펙틴으로부터 불포화결합을 가진 갈락트로나이드 펙틴으로부터 폴리갈락트론산 폴리갈락트론산으로부터 올리고갈락트론산	식물 세포벽에 함유된 펩틴을 분해하여 여과성 향상
셀룰라제	셀룰라제C1	결정 셀룰로스로부터 활성형 셀룰로스	식물 세포벽에 함유된 크실로글루칸을 분해하여 여과성 향상
	셀룰라제Cx	활성형 셀룰로스로부터 셀로비오스	
	$\beta$ -글루코시다제	셀로비오스로부터 글루코스	
리파제	티로시나제	지방으로부터 지방산과 글리세롤	된장의 보향작용 갈변 핵산계조미료의 분해
	포스파타제	뉴클레오타이드로부터 뉴클레오시드	

(1) 정제 효소를 사용한 가수분해 조건 평가

(가) 미강 가수분해 효소 선정

① 1차 효소 가수분해 조건 평가

㉞ 효소 종류 선정

- 단백질은 아미노산들이 결합된 선형 고분자로서, 이 아미노산들은 아민기(-NH<sub>2</sub>)와 카르복실기(COOH)가 서로 대칭되게 정렬되어 물 분자 1개가 빠져나간 형태의 결합단위(펩타이드 결합)를 가지고 있음.

- 이 펩타이드 결합으로 이뤄진 폴리펩타이드 사슬(단백질)의 절단은 화학적인 방법 또는 효소적인 방법에 의해 폴리펩타이드 사슬을 절단할 수 있으며, 효소적인 절단의 경우 protease라는 효소를 이용함.

- Protease는 단백질의 펩타이드결합(-CO-NH-)의 가수분해를 촉매하는 효소의 총칭으로, proteinase와 peptidase로 구분됨. Proteinase는 단백질 분자의 펩타이드결합의 사슬중간을 가수분해하는 효소로, endopeptidase라고도 하며 고분자 단백질에 작용하면 급속한 저분자화가 일어나게 됨.

- Peptidase는 펩타이드 사슬의 아미노말단(-NH<sub>2</sub>) 혹은 카르복시말단(-COOH)의 펩타이드결합을 가수분해하는 효소로 exopeptidase라고도 하며, 펩타이드사슬의 말단에서부터 순

차적으로 아미노산을 유리시킴.

- 본 연구과제에서 미강 단백질을 분해하기 위한 효소 선정을 위하여 protease의 가수분해 특성을 확인함.

- 미강을 121℃에서 15분간 가열처리하고, 미강 중량 2배의 물을 균일하게 혼합한 다음, 여기에 Flavourzyme과 Alcalase, Protamex를 각각 구분된 테스트구에 10% 농도가 되게 독립적으로 첨가함. 50℃에서 14일간 가수분해를 진행하면서 매 1일 경과 시 마다의 경시적인 분해정도(FN/TN%)를 측정함.



그림 22. Protease 종류에 따른 미강 단백질 분해물

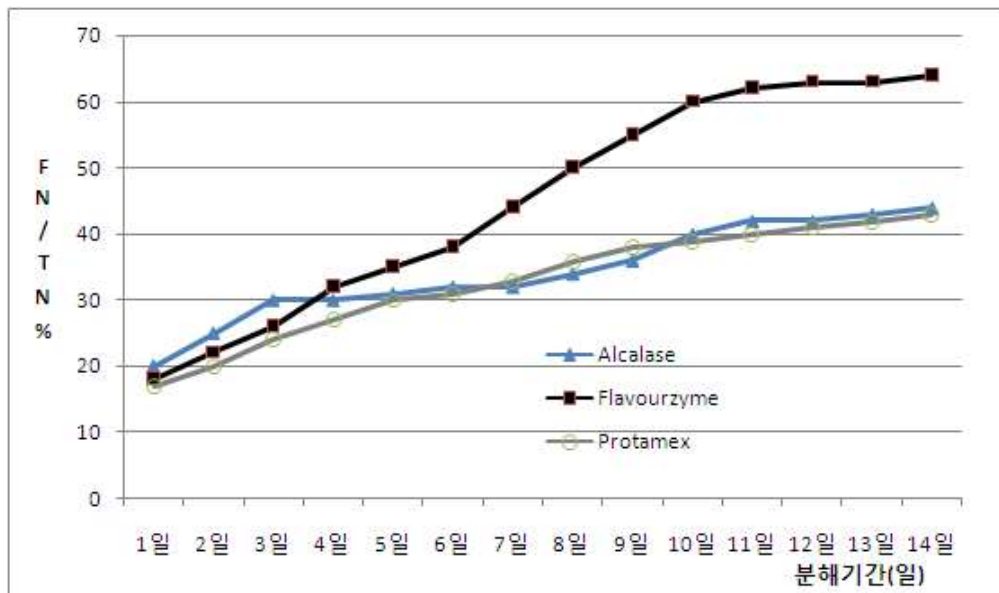


그림 23. Protease 종류에 따른 미강 단백질의 분해도

- 미강을 이용하여 3종의 protease의 가수분해 진행 특성을 확인한 결과, 동일 효소 농도에서 Flavourzyme의 가수분해 진행정도가 가장 우수하였으며, Alcalase 및 Protamex는 서

로가 유사한 양상으로 Flavourzyme보다 낮은 가수분해 진행정도를 나타냄.

- 3종의 효소를 독립적으로 사용하여 가수분해한 테스트구의 관능품질을 평가한 결과 짙은맛과 쓴맛을 동반하는 맛을 나타내어 관능적으로 좋지 않은 결과를 나타냄.

- 본 연구과제에서는 미강 중에 함유된 단백질을 효과적으로 분해하여 정미를 발현하고자 메이저업체에서 생산하는 효소류에 대한 각각의 개별적인 가수분해를 통하여 단일종류의 효소를 이용하는 것에 비해 각 효소를 조합하여 이용할 경우 관능적인 품질 및 수율향상에 대한 효과를 더욱 크게 하는 것으로 확인하여, 각 효소류를 조합하여 가수분해를 진행하기로 함.

- Endo 타입 및 exo 타입의 protease를 조합시켜서 이용하고자 하였으며, 가수분해 후 고액분리(여과) 과정에 있어서 원활한 고액분리와 수율향상을 고려하여 cellulase를 병행하여 가수분해 함.

- Cellulase계통의 효소인 Viscozyme과 Cellulast를 이용함으로써, 미강 원료중에 함유된 Cellulose류의 분해와 가수분해 공정물의 점도저하 효과로 인해 고액분리(여과)속도 향상 및 여과수율의 향상효과를 확인하기 위하여 예비테스트를 수행함. 그 결과는 다음 도표와 같음.

- 오토클래브에서 121℃, 15분간 가열처리한 미강에 끓여서 60℃로 식힌 물을 미강 중량의 2배량을 가하고, Flavourzyme을 5% 첨가한 테스트구와 Flavourzyme 5% 및 Viscozyme 0.1%, Cellulast 1%를 첨가한 테스트구를 만들고, 각각을 50℃ 항온수조에서 Cellulase계통의 효소를 이용한 테스트구의 동일 소요시간대에 있어서 여과속도와 여과수율이 향상되는 결과를 나타냄.



그림 24. Cellulase첨가 유무에 따른 고액분리(여과) 속도

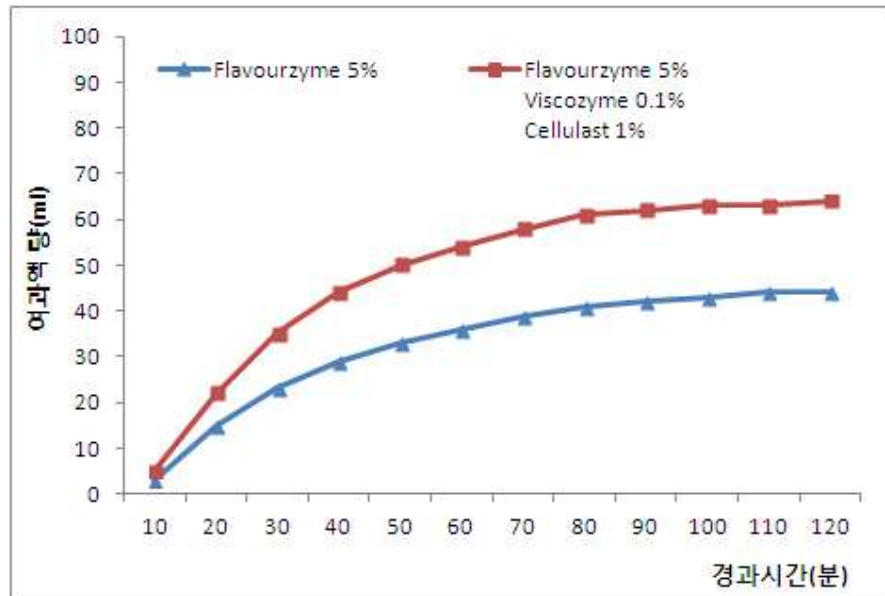
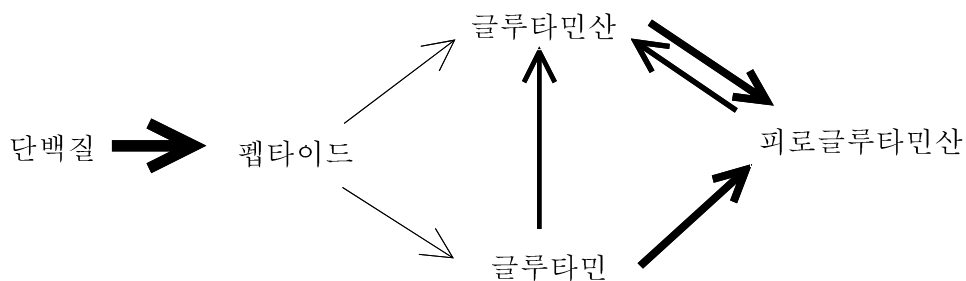


그림 25. Cellulase첨가 유무에 따른 고액분리(여과) 속도차이

- 또한 중요한 감칠맛 아미노산인 글루타민산의 안정적인 생성을 위해 glutaminase를 이 용함. 글루타민산은 조미소재의 감칠맛 성분 중에서 중심적인 역할을 하는 아미노산으로 glutaminase는 글루타민이 피로글루타민산으로 변하는 것을 막아서 정미성이 강한 글루타 민산 함량을 안정화시키는 역할을 하므로 조미소재 연구개발에 있어서 불가결한 효소임. 일 반적인 양조과정에서 글루타민산의 소장(消長)은 다음과 같음.



- 글루타민산의 생성 흐름은 위 그림과 같이 나타낼 수 있으며, 그림에서 화살표의 굵기 로 반응속도를 나타냄. 즉, 글루타민으로부터 피로글루타민산의 생성은 반응이 진행되기 때 우 쉬움. 따라서 글루타민의 상태로 두면 점차 정미성이 없는 피로글루타민산이 되어버리므 로, 글루타민을 글루타민산으로 변환하는 글루타민아제의 역할이 감칠맛이 강한 조미소재를 제조하는데 중요한 요소가 됨.

- 실험에 사용한 원료 미강은 (주)현도로부터 구입하여 사용하였으며, 시판 효소는 대종상사와 (주)가온트레이딩으로부터 구입하여 사용함.

표 30. 가수분해 효소의 종류 및 특성

Group	Enzyme	Origin	Activity
Protease	Flavourzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	Both endoprotease and exopeptidase
	Protamex	<i>Bacillus licheniformis</i>	Protease (Subtilisin) serine endoprotease
	Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Protease (Subtilisin) serine endoprotease
Cellulase, Xylanase	Viscozyme	<i>Aspergillus aculeatus</i>	arabanase, $\beta$ -glucanase, xylanase, cellulase, hemicellulase
	Celluclast	<i>Trichoderma reesei</i>	cellulase
Glutaminase		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	glutaminase

㉔ 염 농도 선정

- 효소를 이용한 미강의 가수분해에 있어서 가수분해 진행 과정 중에 외부로부터 유입되는 미생물로 인한 공정물의 변패에 충분한 주의를 함.
- 실험실 규모의 소규모 가수분해 테스트의 경우 관리여하에 따라 외부로부터의 유해미생물 오염을 충분히 방지할 수 있겠으나, 사업화를 염두에 두고 진행되는 본 연구과제의 진행에 있어 생산현장 규모의 크기로 진행될 경우 가수분해물의 품질을 열화시키는 각종 유해미생물의 오염에 대해서 대비가 필요함.
- 본 연구과제의 진행에서 유해미생물의 오염 생육을 차단할 목적으로 염분농도를 달리 하여 가수분해를 진행하고, 가수분해 진행과정 중에 공정물의 유해미생물 오염여부에 따른 관능품질의 열화여부 등을 체크하여 관능적으로 안정적인 가수분해물을 생산되는 조건을 찾고자 하였음.
- 미강을 내압유리병에 넣고 오토클래브를 이용하여 121℃에서 15분간 가열하여 살균한 다음, 여기에 끓여서 60℃로 식힌 물을 미강 중량의 2배를 가하여 혼합함. 추가적으로 염분농도가 0%, 2%, 5%, 8%, 10%, 13%, 15%, 17%, 20%가 되도록 정제염을 가하여 염분농도가 각각 다른 조건의 테스트구를 제조함. Flavouzyme 500MG 3%, Protamex 1%, Celluclast 1%, Glutaminase 0.2%를 각각의 테스트구에 동일한 조건이 되도록 첨가하고, 각 테스트구를 50℃ 항온수조에서 14일 동안 가수분해를 진행함. 각 테스트구별로 매 2일 경과 시 마다 경시적으로 샘플을 취하여 여과하고, 각각의 관능을 확인하여 미생물오염으로 인한 이취발생 여부를 체크함.



그림 26. 염분농도를 달리한 가수분해 테스트

표 31. 염분농도에 따른 미장 가수분해물의 경시적 관능 변화

염분 농도	경시적 관능확인 결과*						
	2일	4일	6일	8일	10일	12일	14일
0%	-	+	++	++	+++	+++	+++
2%	-	+	++	++	+++	+++	+++
5%	-	-	-	+	++	++	++
8%	-	-	-	-	-	+	+
10%	-	-	-	-	-	-	+
13%	-	-	-	-	-	-	-
15%	-	-	-	-	-	-	-
17%	-	-	-	-	-	-	-
20%	-	-	-	-	-	-	-

\*이미·이취없음:(-), 약한 이취(산취,부패취):(+) , 강한 이취:(++), 부패:(+++)

- 위 표에서 나타난 바와 같이 염분농도 15% 이하의 가수분해 테스트구에서는 가수분해 진행경과 중에 이미이취가 발생하는 결과를 보였으며, 이는 외부로부터 오염된 미생물에 의한 것으로 판단됨.

- 염분농도 15% 이상의 테스트구에서는 가수분해 진행 경과 중에도 이미이취의 발생이 없이 안정적인 가수분해가 진행되었으며, 사용하는 효소류의 내염성으로 인한 역가저하를 감안하여 미장 효소분해 테스트구의 염분농도를 15%로 설정하고 추가적으로 다각적인 테스트를 진행하기로 함.

#### ㉔ 가수량의 설정

- 통상적으로 양조간장의 가수량을 급수(汲水)라고 하며, 급수량은 염분농도와 함께 양조간장 제조기술상 매우 중요한 요인이 됨.
- 가수량이 적을 경우 성분이 높은 고품질의 가수분해물을 얻을 수 있지만, 한편으로는 원료 유래의 단백질이나 전분의 용해 이용율이 낮아지게 되고 전체적인 수율이 낮아지게 됨.
- 반대로 가수량을 많게 하면 원료중의 각종 성분의 용해율이 향상되어 수율도 향상되지만, 가수분해물의 성분이 전체적으로 낮아지게 되어 관능적으로 우수한 가수분해물을 얻는 것이 어려워지게 됨.
- 본 연구과제를 수행하는데 있어서 가수량의 설정은 원료인 미강의 단백질 함량이 탈지대두, 소맥글루텐 등과 같은 통상적인 단백질원료에 비해 크게 낮은 점을 감안하여, 가수분해 진행과정 중에 교반 등의 기계적인 작용이 일어날 수 있는 최소량의 가수량을 선택하기로 함.
- 오토클레브를 이용하여 121℃에서 15분간 가열처리한 미강에 끓여서 60℃로 식힌 물을 소량씩 가수하면서 교반 등의 기계적인 힘이 무리 없이 작용하는 가수량을 설정하고자 함.
- 테스트를 통하여 미강원료중량의 2배량을 가하는 것으로 가수량을 설정함.

#### ㉕ 가수분해 온도 및 pH 설정

- 본 연구과제 수행에서 Flavourzyme 등의 정제효소의 최적온도(Optimal temperature)는 50℃ 전후가 공통적인 점을 감안하여 가수분해 진행시의 유지온도를 50℃로 설정함.
- 사용하는 효소별 안정 pH 영역(Stable pH range)은 가수한 물과 미강의 혼합물의 pH인 pH 5.0 전후를 포함하므로, 별도의 pH 조절은 시행하지 않음. 이는 향후 사업화 시의 생산공정 전반에 무 Chemical화를 목표로 하고 있음을 염두에 둔 것임.

#### ② 2차 효소 가수분해 조건 평가

- 미강중의 단백질과 기타 미량성분을 효과적으로 분해하여 정미특성이 우수한 가수분해 효소 조건을 선정하기 위하여 1차 효소 가수분해 조건 평가에서 선정된 효소들을 배합 비율 조건별로 처리하여 가수분해를 시행함.
- 미강 가수분해를 위한 효소는 미강 단백질의 아미노산화를 위한 단백질분해효소 3종(flavourzyme, protamex, alcalase)과 미강의 섬유질 분해를 위한 당분해효소 2종(viscozyme, celluclast), L-glutamine을 가수분해하여 glutamic acid의 생성을 촉매하는 효소인 glutaminase를 사용하였으며, 각 효소에 대한 배합비율을 달리하여 혼합 처리하였음. 효소 배합 조건은 표 33에 나타냄.
- 미강 가수분해를 위해 멸균 처리한 미강 150 g을 유리병에 넣고 15% 염수 300 g과 혼합한 후 배합 조건에 따른 효소를 각각 처리하여 항온수조에 넣고 50℃에서 7일간 분해함. 7일간 분해 후 여과지로 여과하고 여과된 액을 85℃에서 15분간 처리하여 효소를 실활 시킴. 2~3일간 청징한 후 재 여과하여 미강 효소분해물을 준비함.



표 32. 가수분해 효소 배합 조건

Enzyme	첨가 비율 (%) <sup>*</sup>					
	A	B	C	D	E	F
Flavourzyme	1.00	3.00	6.00	1.00	3.00	6.00
Prtomex	0.50	1.00	1.00	0.50	1.00	1.00
Alcalase	0.00	0.00	0.00	0.60	0.60	0.60
Viscozyme	0.00	0.00	0.00	0.08	0.08	0.08
Celluclast	0.50	1.00	1.00	0.50	1.00	1.00
Glutaminase	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

\*미강 중량에 대한 비율

㉔ 효소 분해물의 일반성분

- 효소 배합 조건에 따른 효소 분해물의 조단백 함량, 총 질소(TN) 함량, 아미노 질소(FN) 함량, TN대비 FN %, 염도, brix, pH 등을 측정하여 비교 평가함.

- 조단백 함량과 총 질소는 Kjeldahl법, 아미노 질소는 Formol 적정법으로 측정하고, 염도와 brix는 염도계(ATAGO PAL-ES2)와 당도계(ATAGO PR201a)를 사용하여 측정함. pH는 pH meter(Mettler-toledo GmbH 8603)를 사용하여 측정함.

표 33. 효소 배합 조건에 따른 효소 분해물의 특성

효소 배합 조건	조단백 함량(%)	TN(%)	FN(%)	FN/TN (%)	염도 (%)	Brix (%)	pH
A	3.26	0.52	0.15	29.50	15.08	31.00	4.97
B	3.92	0.63	0.27	42.42	15.91	32.80	5.00
C	3.70	0.59	0.28	47.30	16.38	32.80	4.95
D	3.60	0.58	0.21	36.46	14.96	29.50	5.06
E	4.61	0.74	0.31	42.01	15.55	33.00	4.97
F	4.62	0.74	0.32	43.30	16.50	33.40	4.89

- 효소 분해물의 조단백 함량은 3.2%~4.6% 수준으로 나타남. 조단백 함량, 총 질소, 아미노 질소 함량은 전반적으로 첨가된 효소 비율이 높은 조건에서 높게 나타남.

- 총 질소 함량과 아미노 질소 함량의 경우 동일 조건에서 flavourzyme 함량 3%와 6% 처리(B와 C, E와 F 조건 비교)에 따른 차이는 크지 않은 것으로 보이나 분해정도를 나타내는 FN/TN 비율은 flavourzyme 함량 6% 첨가 조건에서 더 높게 나타났으며, 특히 C 조건에서 가장 높게 나타남.

- 동일 조건에서 alcalase와 viscozyme이 첨가된 조건의 아미노질소 함량은 첨가되지 않은 조건 보다 약간 높게 나타났으나(A와 D, B와 E, C와 F 조건 비교) 분해정도를 나타내

는 FN/TN 비율은 alcalase와 viscozyme이 첨가되지 않은 조건에서 더 높게 나타남(A와 D 제외).

- 염도는 15.0~16.5% 수준으로 나타났으며, brix는 31.0~33.4% 수준으로서 첨가된 효소의 비율이 높은 조건에서 약간 높은 경향을 나타냄.

- 효소 분해물의 pH는 pH 4.9~5.1 정도로 시료 간에 차이가 없는 것으로 나타남.

- 미강의 가수분해는 효소 조건 C에서 FN/TN 비율 47.3%로 가장 높은 분해율을 나타냈으나 조단백 함량, 총 질소 함량, 아미노 질소 함량 등의 결과를 종합하였을 때 효소 B, C, E, F 조건에서 분해 정도 차이가 크지 않은 것으로 판단되어짐. 따라서 관능 평가를 통해 관능적 기호도가 우수한 시료를 미강 가수분해를 위한 효소로 선정하기 함.

#### ㉞ 효소 분해물의 관능평가

- 효소 분해물의 관능평가는 매일식품(주)과 식품산업연구센터 연구원 중 관능평가에 훈련된 12명을 선정하여 감칠맛과 종합 기호도에 대해 5점 척도법으로 평가함. 1점으로 갈수록 기호도가 낮고, 5점으로 갈수록 높아지는 것으로 평가함.

표 34. 효소 배합 조건에 따른 효소 분해물의 관능 평가

효소 배합 조건	감칠맛	종합 기호도
A	2.25±0.62*	2.42±0.51
B	3.08±0.67	3.17±0.72
C	3.58±0.51	3.67±0.49
D	2.33±0.65	2.50±0.52
E	3.17±0.58	3.25±0.45
F	3.67±0.49	3.67±0.65

\*평균±표준편차(n=12). 1점, 아주 싫음; 3점, 보통; 5점, 아주 좋음.

- 관능평가 결과 미강 효소 분해물은 효소 배합 조건에 따라 맛의 차이가 있음. 감칠맛의 기호도는 F 조건 효소 분해물이 3.67점으로 가장 높게 나타났으며, 종합 기호도는 C와 F 조건의 기호도가 3.67점의 동일 점수로 가장 높게 나타남.

- 관능적 기호도는 flavourzyme 비율이 높을수록 더 높게 나타났으며, 동일조건에서 alcalase와 viscozyme이 첨가된 조건에서 더 높게 나타남. 그러나 alcalase와 viscozyme 처리 유무보다는 flavourzyme 비율 증가가 시료의 풍미 향상에 도움이 되는 것으로 판단되어 짐.

- 그러나 미강을 원료로 한 효소 분해물이 전체적으로 조미소재로서 사용하기에 풍미가

약하다는 의견이 있음. 따라서 풍미 향상을 위한 원료에 대한 검토가 필요하다고 판단함. 원료 검토를 위한 효소는 FN/TN 비율이 높고 관능적 기호도가 우수한 C와 F의 두 조건으로 각각 처리하여 비교 평가함.

(나) 효소 분해 원료 선정

① 원료 배합비율 선정 조건

- 미강 효소 분해물의 풍미를 향상시키기 위하여 알레르기 프리 제품에 적합하며 조미소재로 활용 가능한 쌀 단백질을 첨가함.
- 미강과 쌀 단백질의 비율을 결정하기 위하여 미강과 쌀 단백질의 비율을 3:1, 1:1, 1:3으로 달리하여 쌀 단백질 첨가 비율에 따른 품질 특성을 분석함. 쌀 단백질을 첨가하지 않은 처리구를 대조구로 하여 함께 비교 평가함.
- 쌀 단백질은 (주)현도로부터 구입하여 사용함.
- 가수분해를 위한 효소는 효소 조건 선정 평가에서 선정된 C와 F의 두 조건으로 각각 처리하였으며, 가수분해는 상기의 방법과 동일하게 처리하여 효소분해물을 제조함.

② 효소 분해물의 일반성분

- 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 조단백 함량, 총 질소(TN) 함량, 아미노 질소(FN) 함량, TN대비 FN%, 염도, brix, pH 등을 측정하여 비교 평가하고 분석은 상기 방법과 동일한 방법으로 시행함.

표 35. 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 특성

효소 조건	미강:쌀 단백질 비율	조단백 함량(%)	TN(%)	FN(%)	FN/TN (%)	염도 (%)	Brix (%)	pH
C	대조구	3.88	0.62	0.28	45.16	16.38	33.70	5.02
	3:1	8.75	1.40	0.64	46.00	16.38	35.70	4.99
	1:1	14.06	2.25	0.89	39.56	16.74	37.50	5.02
	1:3	18.00	2.88	1.12	38.89	16.03	39.40	5.09
F	대조구	4.38	0.70	0.31	44.00	17.30	34.20	4.72
	3:1	9.56	1.53	0.74	48.49	17.30	35.20	4.77
	1:1	15.63	2.50	1.12	44.80	15.30	38.80	4.87
	1:3	19.56	3.13	1.37	43.80	14.90	41.90	4.90

- 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 조단백 함량은 3.8%~19.6% 수준으로 나타났으며, 총 질소는 0.6%~3.2%, 아미노 질소는 0.2%~1.4% 수준으로 나타나 쌀 단백질 첨가 비율이 증가할수록 증가하는 것으로 나타남. 원료 배합비율이 동일한 경우에는 F 효소 처리 조건에서 함량이 더 높게 나타남.

- 분해정도를 나타내는 FN/TN 비율은 38.9%~48.5% 정도로 나타났으며 두 효소 조건

모두 미강:쌀 단백질이 3:1의 비율에서 가장 높게 나타남. 쌀 단백질이 첨가된 경우 첨가 비율이 높을수록 FN/TN 비율은 낮게 나타남. 첨가된 쌀 단백질이 충분히 분해되지 못하는 것으로 생각됨. 효소 조건에 따라서는 C 효소 보다는 F 효소 조건에서 FN/TN 비율 더 높음.

- 염도는 C 효소 처리에서는 16%~17% 수준으로 조건에 따라 큰 차이 없었으며, F 효소 처리의 경우 쌀 단백질 첨가 비율이 높을수록 낮게 나타남.

Brix는 처리 효소과 관계없이 쌀 단백질 비율이 높을수록 높게 나타남.

### ③ 효소 분해물의 SDS-PAGE

- 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 펩타이드 패턴을 확인하기 위하여 SDS를 포함하는 polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 시행함.

- 효소 분해물을 4× sample buffer(62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 1% SDS, 0.005% bromophenol blue, 2-mercaptoethanol)와 섞어서 5분간 끓인 다음 3,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 층분리를 시킨 후 상등액을 4~10% separating gel에 loading함. 전기영동은 180 mA로 시행하였으며, staining buffer(coomassie brilliant blue R-250)로 1시간 염색한 후 destaining buffer(methanol 300 mL, acetic acid 100 mL, H<sub>2</sub>O 600 mL)로 탈색하여 분리된 펩타이드 패턴을 확인함.

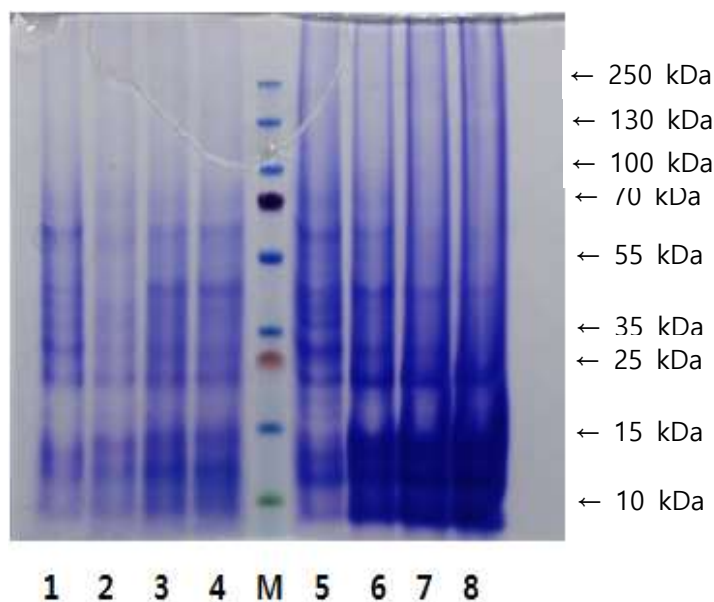


그림 27. 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 SDS-PAGE

1: C효소처리 대조구, 2: C효소처리 3:1, 3: C효소처리 1:1, 4: C효소처리 1:3, 5: F효소처리 대조구, 6: F효소처리 3:1, 7: F효소처리 1:1, 8: F효소처리 1:3, M: size marker.

- 효소 분해물의 SDS-PAGE 결과 70 kDa 이하의 여러 개의 펩타이드 밴드가 나타남. 쌀 단백질의 첨가 비율이 증가할수록 10~15 kDa의 펩타이드가 증가하는 경향을 나타냄.

C 효소처리 조건보다 F 효소처리 조건에서 밴드의 농도가 더 진하게 나타나는 것으로 보아 동일 원료에서 F 조건의 펩타이드 함량 더 높은 것으로 생각됨. 원료 배합비율에 따라서는

쌀 단백질 첨가 비율이 높아질수록 펩타이드 함량이 증가함. 이러한 결과는 조단백, 총 질소 및 아미노 질소 분석 결과와 비교적 일치하는 결과임.

④ 효소 분해물의 유리 아미노산 함량

- 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 유리 아미노산은 자동아미노산 분석기(HITACHI L-8900)를 이용하여 분석을 시행함. 표준용액은 Wako 표준 아미노산 Amino acid Mixture Standard Solution Type ANII(Wako, Cat No : 015-14401, Lot No : TSE8059), Type B(Sigma, Cat No : 016-08641, Lot No : TSK8775)를 사용함.

표 36. 유리 아미노산 분석조건

**분석조건**

System Amino acids analyzer (HITACH L-8900)  
 Column Column for physiological Fluids Analysis #2622(4.6 × 60 mm)  
 Injection vol. 20μL  
 Mobile phase

펌프	B1	B2	B3	B4	B5	B6
이동상	PF-1	PF-2	PF-3	PF-4	H2O	PF-RG
펌프	R1	R2	R3			
이동상	Nin	Nin-Buffer	5% Ethanol			

Time (min)	%B1	%B2	%B3	%B4	%B5	%B6	Pump1 Flow rate (mL/min)	Column Temp.	%R1	%R2	%R3	Pump2 Flow rate (mL/min)
0.0	100	0	0	0	0	0	0.350	38	50	50	0	0.3
2.0								30				
21.5	100	0	0	0	0	0						
21.6	80	20	0	0	0	0		60				
33.5	70	30	0	0	0	0						
33.6	10	90	0	0	0	0						
36.5								40				
43.5	10	90	0	0	0	0						
43.6	0	100	0	0	0	0						
50.5	0	100	0	0	0	0		70				
50.6	0	0	100	0	0	0						
68.4								45				
69.5	0	0	100	0	0	0						
69.6	60	0	0	40	0	0						
75.0	60	0	0	40	0	0						
75.1	0	0	0	100	0	0						
82.0	0	0	0	100	0	0						
82.1	0	20	0	80	0	0						
92.5								70				
99.5	0	20	0	80	0	0						
99.6	0	0	0	100	0	0						
112.5	0	0	0	100	0	0						
112.6	0	0	0	0	0	100						
116.0									50	50	0	
116.1									0	0	100	
121.5	0	0	0	0	0	100						
121.6	100	0	0	0	0	0						
125.0								38				
126.0									0	0	100	
126.1									50	50	0	
148.0	100	0	0	0	0	0						

표 37. 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 유리 아미노산-효소 조건 C

Free amino acid (mg%)	원료 배합비율 (미강:쌀단백질)			
	대조군	3:1	1:1	1:3
Aspartic acid	86.81	164.11	233.80	269.77
Glutamic acid	212.24	436.66	510.41	692.71
Asparagine	64.34	135.62	194.59	239.10
Serine	67.78	155.97	242.67	287.32
Glutamine	0.00	0.00	0.00	0.00
Histidine	43.85	95.51	163.18	179.79
Glycine	38.44	82.51	125.14	151.00
Threonine	62.41	135.82	214.09	249.42
Arginine	165.65	416.96	658.75	783.75
Alanine	97.36	215.41	344.61	391.52
Taurine	15.61	32.30	32.23	0.00
GABA	1.22	2.07	2.56	3.27
Tyrosine	78.21	172.96	165.85	170.78
Valine	105.81	257.18	431.22	502.23
Methionine	31.43	71.63	110.04	137.82
Phenylalanine	78.05	196.23	289.51	375.01
Isoleucine	67.34	161.52	260.13	312.85
Leucine	111.18	287.39	462.57	555.05
Lysine	87.48	219.72	354.89	424.17
Proline	56.90	120.59	187.44	225.06
Total	1,472.10	3,360.16	4,983.69	5,950.64

표 38. 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 유리 아미노산-효소 조건 F

Free amino acid (mg%)	원료 배합비율 (미강:쌀단백질)			
	대조군	3:1	1:1	1:3
Aspartic acid	109.53	185.80	238.81	302.89
Glutamic acid	254.42	569.00	810.79	1,024.14
Asparagine	79.39	222.25	335.46	449.13
Serine	84.29	207.34	305.99	401.09
Glutamine	0.00	0.00	0.00	0.00
Histidine	57.04	106.98	132.59	171.45
Glycine	48.75	99.31	133.87	171.22
Threonine	78.82	168.13	239.38	303.79
Arginine	210.95	467.37	669.69	845.31
Alanine	114.94	248.69	359.48	452.04
Taurine	14.66	25.03	35.26	44.18
GABA	13.34	21.81	25.96	30.73
Tyrosine	85.18	225.01	133.78	142.30
Valine	126.98	316.08	512.27	650.79
Methionine	40.00	90.48	125.02	150.35
Phenylalanine	87.63	255.33	372.99	473.25
Isoleucine	81.91	218.55	327.05	391.92
Leucine	137.53	379.61	571.93	651.88
Lysine	126.15	225.55	302.78	377.56
Proline	72.35	142.90	196.04	238.56
Total	1,823.86	4,175.21	5,829.12	7,272.59

- 효소 분해물의 유리 아미노산 총 함량은 1,820 mg%~7,230 mg% 정도로 처리 효소의 종류에 관계없이 쌀 단백질 비율이 높아질수록 함량이 증가하는 것으로 나타났으며, 동일 원료배합 비율에서는 C 보다는 F 효소 조건에서 함량이 더 높게 나타남.

- 검출된 아미노산 중에서는 감칠맛 성분인 glutamic acid와 단맛과 쓴맛 아미노산인 arginine의 함량이 높게 나타났으며, 단맛 아미노산인 alanine, valine, lysine과 쓴맛 아미노산인 leucine 등이 비교적 높은 수준임.

- 미강의 기능성 성분인 GABA의 경우 C 효소 처리 조건에서는 1.2 mg%~3.3 mg%, F 효소 처리 조건에서는 13.3 mg%~30.8 mg% 수준으로 효소 처리 조건에 따라 10배 정도 차이를 나타냄.



⑤ 효소 분해물의 관능평가

- 효소 분해물의 관능평가는 매일식품(주)과 식품산업연구센터 연구원 중 관능평가에 훈련된 12명을 선정하여 색, 향, 감칠맛, 종합 기호도에 대해 7점 척도법으로 평가함. 1점으로 갈수록 기호도가 낮고, 7점으로 갈수록 높아지는 것으로 평가함.

표 39. 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 관능 평가-효소 조건 C

미강:쌀 단백질 비율	색	향	감칠맛	종합 기호도
대조구	5.42±0.51*	5.42±0.51	4.00±0.60	4.83±0.83
3:1	5.58±1.00	5.42±0.79	6.25±0.75	6.42±0.51
1:1	5.00±1.04	4.58±0.51	5.58±1.00	5.00±0.60
1:3	4.25±1.42	4.25±0.75	5.00±0.60	3.75±0.45

\*평균±표준편차(n=12). 1점, 아주 싫음; 4점, 보통; 7점, 아주 좋음.

표 40. 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 관능적 묘사분석-효소 조건 C









원료 배합비율 (미강:쌀단백질)			
대조구	3:1	1:1	1:3
			
적당한 단맛이 있고 깔끔하나 감칠맛이 약함.	단맛이 좋고 깔끔한 감칠맛이 좋음.	감칠맛은 좋으나 텅텅하고 쿵쿵한 맛이 있음.	감칠맛은 있으나 쿵쿵한 맛이 강함.

표 41. 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 관능 평가-효소 조건 F

미강:쌀 단백질 비율	색	향	감칠맛	종합 기호도
대조구	5.25±1.54*	5.83±1.11	4.25±0.97	4.00±1.04
3:1	4.58±0.79	5.00±0.85	6.25±0.45	5.83±0.39
1:1	5.58±1.00	3.83±0.72	5.25±0.45	4.58±0.51
1:3	4.83±1.11	3.17±0.72	4.42±0.51	3.42±0.51

\*평균±표준편차(n=12). 1점, 아주 싫음; 4점, 보통; 7점, 아주 좋음.

표 42. 원료 배합비율에 따른 효소 분해물의 관능적 묘사분석-효소 조건 F

원료 배합비율 (미강:쌀단백질)			
대조구	3:1	1:1	1:3
			
맛이 깔끔하고 담백하나 감칠맛이 약함.	단맛이 있고 감칠맛이 좋음.	감칠맛은 있으나 쿼퀴한 맛이 있음.	감칠맛은 있으나 쿼퀴한 맛이 심하여 먹기 어려움.

- 효소 분해물의 관능평가 결과에 따라 원료(미강:쌀 단백질)의 배합 비율은 3:1의 비율이 관능적으로 우수하였으며, 3:1의 비율에서 효소 조건 C의 종합 기호도가 좀 더 우수한 것으로 나타남.

- 원료의 단가, 적정 아미노산 함량, 관능적 특성 등을 고려하여 최종 원료는 미강과 쌀 단백질을 3:1의 비율로 사용하기로 하였음.

(다) 효소 분해 시간 선정

① 원료 분해 시간 선정 조건

- 선정된 원료 조건과 효소 조건에서 최적화된 분해 시간을 선정하기 위한 실험을 수행함.

- 미강과 쌀 단백질의 비율을 3:1로 혼합하고, 가수분해를 위한 효소는 효소 조건 선정 평가에서 선정된 C와 F의 두 조건을 각각 적용함. 가수분해는 상기의 방법과 동일한 조건으로 13일간 분해하여 효소 분해물을 제조함.

- 가수분해 진행 과정 중에 경시적인 분해정도 등을 체크하기 위하여 3일, 5일, 7일, 10일, 13일 경과했을 때 시료를 취하여 성분의 분석 및 관능평가를 실시함.

② 효소 분해물의 일반성분

- 분해 시간 경과에 따른 효소 분해물의 조단백 함량, 총 질소(TN) 함량, 아미노 질소(FN) 함량, TN대비 FN%, 염도, brix, pH 등을 측정하여 비교 평가함.
- 분석은 상기 방법과 동일한 방법으로 시행함.

표 43. 분해 시간에 따른 효소 분해물의 일반성분

효소 조건	분해 경과일	조단백 함량(%)	TN(%)	FN(%)	FN/TN (%)	염도 (%)	Brix (%)	pH
C	3일	8.25	1.32	0.546	41.36	16.28	34.30	4.88
	5일	8.13	1.30	0.560	43.08	15.91	33.90	5.03
	7일	8.75	1.40	0.620	44.29	16.38	34.70	4.92
	10일	8.94	1.43	0.650	45.45	15.91	34.80	4.92
	13일	9.00	1.44	0.653	45.41	16.21	34.90	4.94
F	3일	9.00	1.44	0.602	41.81	16.26	35.00	4.85
	5일	9.4	1.50	0.630	42.00	15.67	35.50	4.94
	7일	9.56	1.53	0.652	42.61	16.03	35.50	4.96
	10일	9.69	1.55	0.670	43.23	16.03	35.80	4.85
	13일	9.63	1.54	0.665	43.18	15.92	35.80	4.92

- 분해시간 경과에 따른 효소 분해물의 조단백 함량은 8.1%~9.69% 수준으로 나타났으며, 총 질소는 1.3%~1.55%, 아미노 질소는 0.54%~0.67% 수준으로 나타나 분해시간이 경과됨에 따라서 총질소 및 아미노산성질소가 증가하는 것으로 나타남.
- 분해정도를 나타내는 FN/TN 비율은 41.3%~45.45% 정도로 나타났으며 두 효소 조건 모두 분해시간이 경과됨에 따라 FN/TN비율은 증가하는 것으로 나타났으나, 증가속도는 완만한 증가폭을 나타냄. 이는 3일 경과 후부터 샘플링을 한 것으로, 분해 초기에 급속한 가수분해가 일어나고, 이후에는 완만한 증가폭을 보이는 것에 기인한 것으로 판단됨.
- 두 효소조건 모두 가수분해 10일에서 FN/TN 비율이 가장 높은 것으로 나타남.
- TN과 FN 함량은 동일한 시간에서 효소조건 F가 C에 비해 높았으나, FN/TN의 비율은 C 효소 조건에서 좀 더 높은 것으로 나타남.
- 염도는 16% 전후 수준으로 조건에 따라 큰 차이 없음.
- Brix는 분해시간 경과에 따른 변화폭은 거의 없는 것으로 나타남.

③ 효소 분해물의 SDS-PAGE

- 효소 분해 시간에 따른 효소 분해물의 펩타이드 패턴을 확인하기 위하여 단백질 전기영동을 시행함.
- 전기영동은 상기 방법과 동일한 조건으로 시행함.

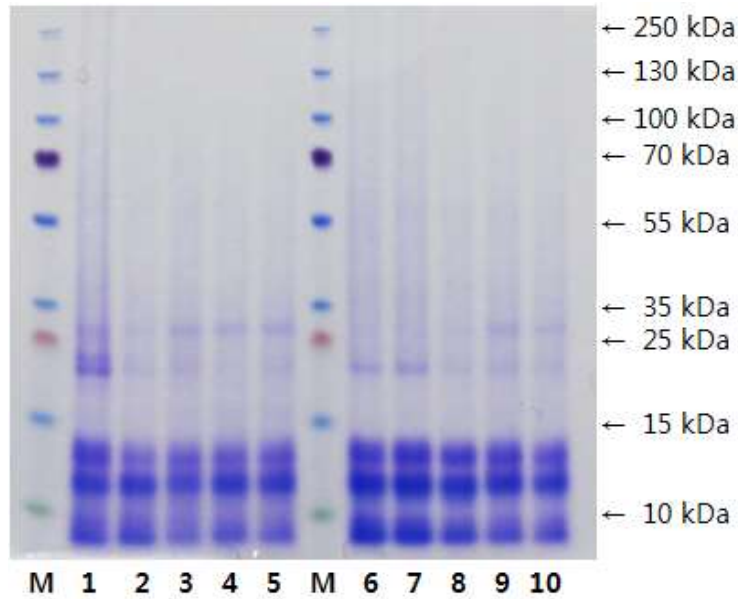


그림 28. 효소 분해 시간에 따른 효소 분해물의 SDS-PAGE

1: C효소 3일 분해, 2: C효소 5일 분해, 3: C효소 7일 분해, 4: C효소 10일 분해, 5: C효소 13일 분해, 6: F효소 3일 분해, 7: F효소 5일 분해, 8: F효소 7일 분해, 9: F효소 10일 분해, 10: F효소 13일 분해, M: size marker.

- 분해 시간에 따른 효소 분해물의 SDS-PAGE 결과 분해 시간이 경과할수록 분해 초기에 20 kDa 정도의 단백질은 분해가 더 진행되는 것으로 보이나 15 kDa 이하에서 나타나는 주요 펩타이드 밴드는 유사한 패턴으로 분해 시간에 따른 특이적인 사항은 나타나지 않음. 분해 초기의 펩타이드화에서 시간이 경과할수록 아미노산화가 진행될 것으로 예상됨.

#### ④ 효소 분해물의 유리 아미노산 함량

- 효소 분해 시간에 따른 효소 분해물의 유리 아미노산은 자동아미노산 분석기(HITACHI L-8900)를 이용하여 상기의 방법과 동일하게 분석함.

표 44. 효소 분해 시간에 따른 효소 분해물의 유리 아미노산-효소 조건 C

Free amino acid (mg%)	효소 분해 시간				
	3일	5일	7일	10일	13일
Aspartic acid	163.49	159.73	195.56	198.98	199.18
Glutamic acid	505.10	499.10	574.04	576.88	577.02
Asparagine	188.17	189.59	221.69	223.77	223.82
Serine	165.61	166.57	196.71	199.46	199.96
Glutamine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Histidine	95.05	93.23	103.91	103.57	103.85
Glycine	77.78	77.25	93.68	93.97	93.81
Threonine	141.12	138.95	159.03	159.40	160.23
Arginine	441.73	440.03	470.98	501.39	503.14
Alanine	209.28	206.09	237.14	258.35	257.96
Taurine	18.36	19.64	26.39	26.75	26.83
GABA	19.11	14.20	22.83	24.26	24.95
Tyrosine	230.87	202.70	182.79	160.53	158.42
Valine	310.75	307.72	339.02	338.16	338.69
Methionine	76.28	74.62	83.52	84.13	84.57
Phenylalanine	238.10	234.08	262.96	264.66	265.03
Isoleucine	204.99	193.23	223.87	223.99	224.62
Leucine	337.22	337.06	380.59	384.11	384.77
Lysine	207.33	203.96	228.80	228.09	228.82
Proline	107.16	107.92	124.14	132.46	132.56
Total	3,737.52	3,665.67	4,127.64	4,182.89	4,188.23

표 45. 효소 분해 시간에 따른 효소 분해물의 유리 아미노산-효소 조건 F

Free amino acid (mg%)	효소 분해 시간				
	3일	5일	7일	10일	13일
Aspartic acid	166.38	190.21	193.30	210.49	211.16
Glutamic acid	521.51	569.86	569.65	584.55	586.14
Asparagine	208.14	231.89	235.00	236.50	236.66
Serine	172.45	192.84	197.69	203.43	203.21
Glutamine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Histidine	103.00	102.52	104.70	103.50	104.59
Glycine	69.42	79.15	78.98	86.05	86.27
Threonine	158.34	168.76	173.67	171.55	172.16
Arginine	462.39	496.88	492.19	496.35	495.83
Alanine	211.34	250.31	249.79	258.14	254.37
Taurine	17.93	21.28	22.00	21.58	22.78
GABA	17.22	26.55	24.26	30.07	31.13
Tyrosine	246.46	253.49	195.50	173.03	170.46
Valine	347.86	369.36	364.20	350.28	348.95
Methionine	84.37	93.18	92.75	86.67	85.12
Phenylalanine	262.45	286.57	276.97	269.18	268.34
Isoleucine	225.80	242.39	238.69	230.68	228.11
Leucine	377.99	408.94	407.08	393.13	392.95
Lysine	210.09	223.86	221.20	225.50	225.74
Proline	91.30	101.70	106.85	119.83	121.76
Total	3,954.42	4,309.73	4,244.48	4,250.50	4,245.73

- C 효소 처리 시 분해 시간에 따른 효소 분해물의 유리 아미노산 총 함량은 3,665 mg%~4,188 mg% 수준으로 대체로 분해 시간이 경과함에 따라 높아지는 경향이었음. 감칠맛 아미노산과 기타 맛 성분 아미노산 역시 총 아미노산 함량과 유사한 경향을 나타냈으나 분해 7일 이후부터는 시료에 따라 큰 차이 없는 것으로 나타남. 그러나 tyrosine의 경우 분해 시간이 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타남.

- F 효소 처리 시 분해 시간에 따른 효소 분해물의 유리 아미노산 총 함량은 3,954 mg%~4,250 mg% 수준으로 분해 5일까지 증가하다 그 이후부터는 큰 차이 없이 유사한 수준으로 나타남. 감칠맛 아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid는 분해시간이 증가함에 따라 서서히 증가하였으나, 분해 10일 이후부터는 거의 유사한 수준이었음. Tyrosine의 경우

C 효소 처리에서와 같이 분해 시간이 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타남.

- 미강의 기능성 성분인 GABA의 경우 C 효소 처리 조건에서는 14.2 mg%~25.0 mg%, F 효소 처리 조건에서는 17.2 mg%~31.2 mg% 수준으로 두 조건 모두 분해 13일에서 가장 높은 함량을 나타냄. 그러나 분해 10일 결과와 유사한 수준으로 나타남.

⑤ 효소 분해물의 관능평가

- 분해 시간에 따른 효소 분해물의 관능평가는 매일식품(주)과 식품산업연구센터 연구원 중 관능평가에 훈련된 12명을 선정하여 색, 향, 감칠맛, 종합 기호도에 대해 7점 척도법으로 평가함. 1점으로 갈수록 기호도가 낮고, 7점으로 갈수록 높아지는 것으로 평가함.

표 46. 분해 시간에 따른 효소 분해물의 관능 평가-효소 조건 C

분해시간	색	향	감칠맛	종합 기호도
3일	4.25±0.97*	4.25±0.97	5.00±0.85	5.25±0.83
5일	4.79±0.72	4.64±0.81	5.65±0.45	5.83±0.78
7일	5.25±1.14	5.00±0.85	6.02±0.51	6.18±0.97
10일	5.64±0.45	5.42±0.60	6.38±0.42	6.56±0.79
13일	5.25±0.68	5.25±0.68	6.24±0.72	6.38±0.45

\*평균±표준편차(n=12). 1점, 아주 싫음; 4점, 보통; 7점, 아주 좋음.

표 47. 분해 시간에 따른 효소 분해물의 관능 평가-효소 조건 F

분해시간	색	향	감칠맛	종합 기호도
3일	4.58±0.79*	3.42±0.51	5.24±0.50	5.08±0.92
5일	4.83±0.92	4.21±0.45	5.58±0.62	5.42±1.25
7일	5.02±1.68	4.72±1.21	6.14±0.79	5.94±0.58
10일	5.42±0.60	5.25±0.45	6.42±0.51	6.30±0.72
13일	5.38±0.62	5.18±0.94	6.38±0.60	6.24±0.60

\*평균±표준편차(n=12). 1점, 아주 싫음; 4점, 보통; 7점, 아주 좋음.

- 관능평가 결과 미강 효소 분해물은 분해시간이 경과됨에 따라 맛의 차이가 있음. C 효소와 F 효소로 가수분해한 감칠맛의 기호도는 10일 경과된 F 조건 효소 분해물이 6.42점으로 가장 높게 나타났으며, 종합 기호도는 10일 경과된 C 조건의 기호도가 6.56점으로 F 조건에 비해 높게 나타남.

- 관능적 기호도는 분해시간이 경과될수록 높게 나타났으나, 13일 보다는 10일 경과된 경우가 가장 높은 결과를 나타냄. 분해시간이 이를 넘어설 경우 오히려 관능적 기호도가 떨어지는 것으로 나타남.

- 그러나 C 조건 및 F 조건 모두 효소 분해물이 전체적으로 조미소재로서 사용하기에 풍미가 약하다는 의견이 있음. 이는 Flavourzyme과 같은 endo-exo Both 타입 효소를 고농도로 사용할 경우 충분하게 요구되는 관능품질에 도달할 것으로 판단되지만, 본격적인 사업화 단계에서 고비용으로 인한 경제적인 단점이 될 것이므로 정제효소 외에 양조용 종국을 함께 이용하는 등의 추가적인 방안에 대한 검토가 필요할 것으로 판단되어짐.

(라) 효소 분해물의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량

- 관능적 품질이 우수한 10일 분해 효소분해물의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량을 분석함.

- 효소 분해물 20 mL에 에틸아세테이트 20 mL 첨가하여 잘 혼합한 후 3,000 rpm에서 30분 원심분리 하여 에틸아세테이트 분획층만 수거함. 남은 잔사에는 에틸아세테이트를 다시 넣어 2회 반복하고 회수된 에틸아세테이트 추출물을 감압·농축한 후 80% 메탄올 20 mL로 정용하여 HPLC로 분석함.

표 48. 10일 경과 효소 분해물의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량

시료	함량 (mg%)	
	ferulic acid	coumaric acid
C 효소 분해물	1.84	0.62
F 효소 분해물	4.66	1.18

- 10일 경과 효소 분해물의 ferulic acid와 coumaric acid 함량은 F 효소 조건(4.66 mg%와 1.18 mg%)이 C 효소 조건(1.84 mg%와 0.62 mg%)보다 2배 정도 높은 것으로 나타남.

(마) 효소 분해물의 나트륨저감 효능 평가

- 관능적 품질이 우수한 10일 경과 C 효소 분해물과 F 효소 분해물의 나트륨저감 효능 평가는 훈련된 매일식품과 식품산업연구센터 직원 12명이 NaCl 표준용액에 대한 표준 짠맛 강도를 습득한 후 시험용액의 짠맛 강도를 측정하여 평가함.

- NaCl 표준용액의 짠맛 강도는 0.8% NaCl 용액 0.8점, 1.0% NaCl 용액 1.0점, 1.2% NaCl 용액 1.2점, 1.4% NaCl 용액 1.4점, 1.6% NaCl 용액 1.6점, 1.8% NaCl 용액 1.8점으로 하였음.

- 평가를 위한 각 효소분해물은 짠맛을 인지할 수 있는 적정 농도인 6%, 8%, 10%로 준비한 후 각 농도에 대한 짠맛 강도를 평가함. 짠맛 강도 평가 후 동일한 짠맛 강도에서 NaCl 표준용액과 농도별 효소 분해물의 나트륨 함량을 측정하여 나트륨 저감율(%)을 계산함. 나트륨 저감율(%)=[100-(시험용액의 나트륨 함량/표준용액의 나트륨 함량×100)].



표 49. 효소 분해물의 나트륨 저감율

시료	농도 (%)	짠맛 강도	나트륨 함량 (mg%)		나트륨 저감율 (%)
			시험용액	표준용액*	
C 효소 분해물	6	0.98	393.33	342.60	12.90
	8	1.32	526.67	456.80	13.27
	10	1.62	646.67	571.00	11.70
F 효소 분해물	6	0.87	346.67	334.20	3.60
	8	1.23	493.33	445.60	9.68
	10	1.48	593.33	557.00	6.12

\*시험용액과 동일한 짠맛 강도에서의 표준용액의 나트륨 함량

- 효소 분해물의 짠맛 강도는 C 효소 분해물은 0.98~1.62 수준으로 나타났으며, F 효소 분해물은 0.87~1.48 수준으로 동일농도에서 C 효소 분해물이 짠맛 강도가 더 높은 것으로 나타남.

- 나트륨 저감율 역시 C 효소 분해물(11.7%~13.3%)이 F 효소 분해물(3.6%~9.7%)보다 더 높은 저감율을 나타냄. C 효소 분해물의 경우 8% 용액에서 13.27%로 가장 높은 저감율을 나타냈으며, 농도가 가장 높은 10% 용액에서 11.7%로 가장 낮은 저감율을 나타냄. F 효소 분해물 역시 8% 용액에서 9.68%로 가장 높은 저감율을 나타냈으나, 농도가 가장 낮은 6% 용액에서 3.60%로 가장 낮은 저감율을 나타내며 농도 의존적인 경향성은 보이지 않았음.

- 대표적인 감칠맛 아미노산인 glutamic acid가 F 효소조건에서 좀 더 높음에도 불구하고 짠맛 강도 및 나트륨 저감율이 C 효소조건에서 더 우수함은 glutamic acid 외의 다른 아미노산 또는 다른 성분과의 상호작용에서 기인하는 것으로 생각됨.

## (2) 중국을 이용한 가수분해 조건 평가

### (가) 미장 가수분해 중국 선정

#### ① 중국 선정 조건

- 메이저업체에서 생산 판매하는 정제효소류는 매우 고가의 상품으로 본격적인 사업화를 염두에 둔 본 연구과제의 경우, 사업화 되었을 때의 경제적인 여건을 감안하여 미생물이 생산하는 효소류를 이용하는 방법에 대해서도 연구를 진행함.

- 주로 장류 양조산업에서 이용하는 황국곰팡이 중국을 검토하여 각각의 중국을 고체배양 및 가수분해 연구를 거쳐서 만들어지는 가수분해물의 품질 특성을 연구함.

- 중국이 생산하는 효소의 특징으로는 경제적인 장점 이외에도 정제효소가 가진 단순함에 비해 매우 다양한 종류의 효소군을 생산하게 되고, 그 결과 원료중의 각종 성분을 분해함으로써 가수분해 결과물에 복잡하고 다양한 정미특성을 가진 관능특성을 부여할 수 있는 장점이 있음.

- 특히 메이저업체에서 생산하는 정제효소를 고농도로 이용하기에 부담이 되는 사업화단계에서 요구되는 관능품질 수준을 만족시키기 위해서는 양조산업용 효소생산 미생물을 적

극적으로 검토해야 될 것이라고 판단함.

- 장류 양조에서 이용하는 황국곰팡이 중국이 생산하는 효소로는 다음 표와 같이 복합적으로 다양한 효소를 생산하게 됨.

- 정제효소의 경우 비용이 비싸기 때문에 가수분해 공정상의 비용 절감을 위하여 효소 생성능이 강한 미생물 균주를 탐색하고 이를 사용한 가수 분해 최적 조건을 평가함.

가수분해를 위한 중국은 충무중국, 수원중국, 일본중국 1, 일본중국 2, 일본중국 3, 일본중국 4를 사용함. 중국의 종류 및 특성은 표 51에 나타냄.

표 50. 중국 종류 및 특성

구분	생산업체명	균종	용도
충무중국	충무발효(주)	<i>Aspergillus oryzae</i>	장류용(범용)
수원중국	수원발효연구소	<i>Aspergillus oryzae</i>	장류용(범용)
일본중국1	일본양조공업주식회사	<i>Aspergillus oryzae</i>	MC-01 간장양조용
일본중국2	일본양조공업주식회사	<i>Aspergillus oryzae</i>	MP-01 담색된장용
일본중국3	일본양조공업주식회사	<i>Aspergillus oryzae</i>	EM-2 된장용
일본중국4	일본양조공업주식회사	<i>Aspergillus oryzae</i>	F균 감주,염국용



그림 29. 일본중국

## ② 중국을 이용한 고체배양 조건

- 가수분해를 위해 필요로 하는 효소를 메이저효소업체가 판매하는 정제효소 외에 양조용 미생물이 생산하는 효소를 활용하고자 적정한 중국(코오지균)의 선정 및 이를 이용한 고체배양 조건을 연구함.

- 고체배양 조건 연구에 활용한 중국은 선정된 충무중국, 수원중국, 일본중국 1, 일본중국 2, 일본중국 3, 일본중국 4중, 수원중국 및 충무중국, 일본중국 1을 사용함.

- 고체배양에서 만들어지는 코오지의 품질을 좌우하는 영향인자로는 중국(황국곰팡이)의 생육에 영향을 미치는 인자들로서 수분, 온도, 습도 외에 잡균의 오염정도를 들 수 있음.

- 중국은 황국곰팡이(*Aspergillus oryzae*)의 포자를 모은 것으로 중국의 발아 및 균체증식 속도는 35℃ 근처에서 가장 왕성하게 일어남. 하지만 황국곰팡이를 고체배양하는 주된 목적

이 황국곰팡이가 생육하면서 만들어내는 protease를 비롯한 30여종의 효소를 이용하고자 함에 목적이 있으므로 균체의 생육만을 고려한 온도조건을 설정하는 것은 효과적이지 않음.

- 고체배양온도 및 습도 조건을 다음과 같이 설정하여 미강 3 : 쌀단백 1의 비율로 혼합한 원료를 이용하여 전처리를 거치고 고체배양을 진행한 다음, 만들어진 koji를 내압유리병에 넣고, 15%농도의 소금물을 koji량의 2배량을 가한 다음, 50℃로 유지하면서 가수분해를 진행함.

표 51. 온습도 조건별 고체배양 진행

조건	고체배양 시간(0 - 42시간)			가수분해물 FN/TN%
	0 - 18h	18 - 27h	27 - 42h	
조건 1 30℃ 습도유지	온도 30℃ 습도 98%	온도 36℃ 습도 98%	온도 30℃ 습도 96%	57.3
조건 2 32℃ 습도유지	온도 32℃ 습도 98%	온도 36℃ 습도 98%	온도 32℃ 습도 96%	
조건 3 36℃ 습도유지	온도 36℃ 습도 98%	온도 36℃ 습도 98%	온도 34℃ 습도 96%	56.6
조건 4 32℃ 약간 건조	온도 32℃ 습도 98%	온도 36℃ 습도 96%	온도 30℃ 습도 94%	
조건 5 32℃ 건조	온도 32℃ 습도 98%	온도 36℃ 습도 94%	온도 30℃ 습도 92%	52.8

- 중국의 고체배양은 품온을 코오지균의 번식적온인 30-36℃로, 상대습도를 95%이상으로 유지하는 것이 필요함.

- 위 표 52에 나타낸 것과 같이, 고체배양의 온도를 32℃로 설정하고, 96%이상의 충분한 습도를 유지한 조건 2의 경우가 가수분해물의 분해정도(FN/TN%)가 가장 높았음.

- 코오지균이 생산하는 protease나 amylase등의 효소는 본래는 코오지균 자신의 균체를 만들기 위한 재료나 균체합성에 필요한 에너지를 획득하기 위해 생산하는 것이므로, 발아와 동시에 효소생산이 시작되어 코오지균의 증식과 병행하여 생산됨. 통상 효소생산에 최적온도는 amylase는 37℃ 부근, protease의 생산적온은 33℃ 부근임.



그림 30. 고체배양 koji의 가수분

- 본 연구과제에서 주로 이용하고자 하는 효소는 amylase보다는 protease를 이용하고자 하므로, protease의 생산적온을 목표로 하여 고체배양의 온도를  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였음.

### ③ 종국을 이용한 가수분해 조건

- 가수분해를 위한 원료는 정제효소 가수분해 조건 평가에서 선정된 원료 조건인 미강:쌀 단백질 3:1의 배합비율로 혼합하여 사용함.

- 멸균 처리된 원료 100 g에 종류별 종국 0.3 g을 각각 투입하고 온도  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 습도 85% 이상에서  $46\pm 1$ 시간 동안 고체배양(Koji making)시킴.

제국이 완료된 코지를 유리병에 넣고 15% 염수 200 g과 혼합하고 정미 성분을 향상시키기 위한 분해효소 glutaminase를 원료의 0.2% 농도로 첨가하여 항온수조에 넣고  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 분해시킴.

- 7일 분해 후 여과지로 여과하고, 여과된 액을  $85^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 처리하여 분해 반응을 정지시킴. 반응 정지 후 2~3일간 청징하여 재 여과한 액을 시료로 사용함.

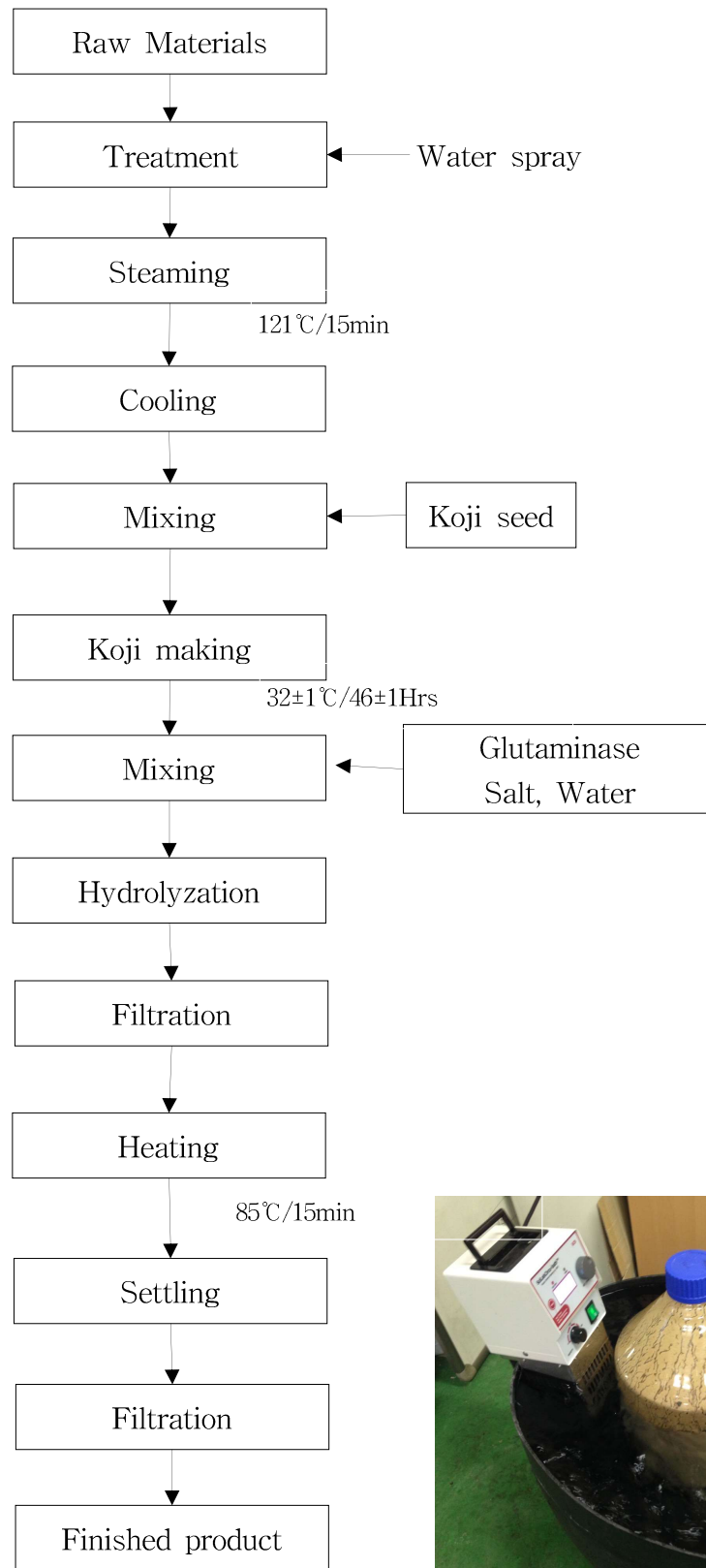


그림 31. 종국을 이용한 가수분해 Process

④ 중국 분해물의 일반성분

- 처리 중국에 따른 가수 분해물의 조단백 함량, 총 질소(TN) 함량, 아미노 질소(FN) 함량, TN대비 FN%, 염도, brix, pH 등을 측정하여 비교 평가함.
- 분석은 상기 방법과 동일한 방법으로 시행함.

표 52. 중국의 종류에 따른 가수 분해물의 특성

처리 중국	조단백 함량(%)	TN(%)	FN(%)	FN/TN (%)	염도 (%)	Brix (%)	pH
충무중국	3.19	0.51	0.27	52.05	14.25	22.50	4.80
수원중국	3.88	0.62	0.35	56.36	14.07	25.70	4.96
일본중국 1	3.80	0.61	0.36	59.87	14.48	25.00	5.16
일본중국 2	3.86	0.62	0.27	43.04	13.53	24.80	4.89
일본중국 3	3.59	0.57	0.31	53.66	13.89	24.70	4.94
일본중국 4	3.23	0.52	0.28	54.15	13.77	24.00	4.95

- 처리 중국에 따른 가수 분해물의 조단백 함량은 3.1%~3.9% 수준으로 나타났으며, 총 질소는 0.5%~0.7%, 아미노 질소는 0.2%~0.4% 수준으로, 정제효소를 처리한 조건 보다 2 배 이상 낮은 함량을 나타냄. 정제 효소에 비해 분해율은 떨어짐.
- 분해정도를 나타내는 FN/TN 비율은 43.0%~59.9% 수준으로 일본중국 1이 59.87%로 가장 높은 분해율을 나타냈으며, 그 다음으로 수원중국 > 일본중국 4 > 일본중국 3 > 충무중국 > 일본중국 2 순으로 나타남.
- 염도는 13.5% ~14.5% 수준으로 조건에 따라 큰 차이 없음.
- Brix는 22.5%~25.7% 수준으로 수원중국이 25.7%로 가장 높았으며 그 다음으로 일본중국 1 > 일본중국 2 > 일본중국 3 > 일본중국 4 > 충무중국 순으로 나타남.
- pH는 pH 4.8~pH 5.2 수준으로 나타남.

⑤ 중국 분해물의 SDS-PAGE

- 중국 종류에 따른 가수 분해물의 펩타이드 패턴을 확인하기 위하여 단백질 전기영동을 시행함.
- 전기영동은 상기 방법과 동일한 조건으로 시행함.

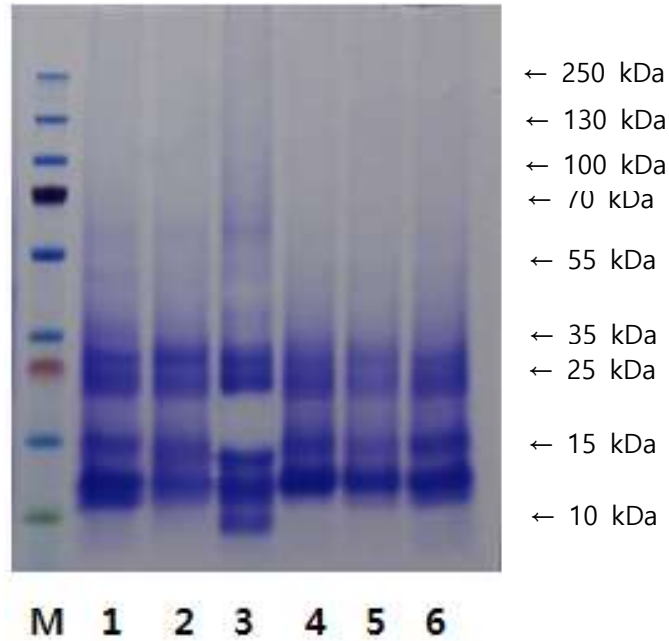


그림 32. 종국 종류에 따른 가수 분해물의 SDS-PAGE

1: 충무종국, 2: 수원종국, 3: 일본종국 1, 4: 일본종국 2, 5: 일본종국 3, 6: 일본종국 4, M: size marker.

- 종국처리 가수 분해물의 SDS-PAGE 결과 35 kDa 이하에서 주요 펩타이드 밴드가 나타남. 처리된 시료 모두 약 10~15 kDa 사이의 펩타이드 함량이 비교적 많은 것으로 나타나 미강 단백질과 쌀 단백질의 펩타이드화가 상당히 진행된 것으로 판단됨.

- 종국에 따라 분해된 펩타이드 패턴은 대부분 유사하게 나타났으나, 일본종국 1의 경우 다른 종국과 구분되는 패턴을 나타내며 10 kDa 이하의 저분자 까지 분해된 것으로 나타남.

⑥ 종국 분해물의 유리 아미노산 함량

- 종국 종류에 따른 가수 분해물의 유리 아미노산은 자동아미노산 분석기(HITACHI L-8900)를 이용하여 상기의 방법과 동일하게 분석함.

표 53. 중국 종류에 따른 가수 분해물의 유리 아미노산

Free amino acid (mg%)	처리 중국					
	충무중 국	수원중 국	일본중국 1	일본중국 2	일본중국 3	일본중국 4
Aspartic acid	196.36	273.97	234.01	202.19	200.70	193.93
Glutamic acid	402.78	541.42	486.00	431.30	423.65	402.91
Asparagine	0.00	15.63	0.00	0.00	20.07	0.00
Serine	107.86	180.42	172.80	133.73	125.49	129.02
Glutamine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Histidine	70.52	88.78	85.94	82.80	74.02	71.17
Glycine	99.64	125.90	114.11	94.15	87.29	90.01
Threonine	67.38	114.89	108.66	88.00	80.23	80.07
Arginine	3.77	4.86	7.73	277.22	15.39	40.62
Alanine	159.89	207.41	190.44	183.69	163.36	156.78
Taurine	5.85	10.13	7.72	0.00	5.11	5.82
GABA	31.86	28.97	13.99	31.37	36.58	31.69
Tyrosine	137.40	197.07	187.50	186.88	172.77	157.29
Valine	157.02	233.41	216.25	207.75	177.11	169.73
Methionine	54.75	77.72	73.10	76.41	71.92	63.76
Phenylalanine	125.00	183.36	173.37	183.00	162.60	145.09
Isoleucine	94.19	146.62	135.14	125.13	106.39	100.05
Leucine	200.68	279.19	251.12	266.35	239.40	214.45
Lysine	177.86	217.70	211.98	207.59	192.46	175.13
Proline	138.52	167.66	152.78	120.47	111.28	116.85
Total	2,231.33	3,095.12	2,822.67	2,898.02	2,465.83	2,344.39

- 중국 가수 분해물의 유리 아미노산 총 함량은 2,231 mg%~3,095 mg% 수준으로 수원 중국이 3,095.12 mg%로 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 일본중국 2 > 일본중국 1 > 일본중국 3 > 일본중국 4 > 충무중국 순으로 나타남.

- 종류별 차이는 있으나 감칠맛 아미노산 및 기타 맛 성분 아미노산 함량도 총 아미노산 함량과 비슷한 경향임.

- Arginine의 경우 일본중국 2에서 특이적으로 높은 함량을 나타내었으며, 일본중국 4도 다른 시료에 비해서는 높은 수준으로 나타남.

- 검출된 아미노산 중에서는 감칠맛 성분인 glutamic acid가 가장 높은 비율로 나타났으



며, 감칠맛 아미노산인 aspartic acid, 단맛 아미노산인 lysine, 단맛과 쓴맛 아미노산인 valine, 쓴맛 아미노산인 leucine 등이 비교적 높은 수준임.

- 미강의 기능성 성분인 GABA의 경우 13.9 mg%~36.6 mg% 수준으로 나타남. 처리 종국에 따라서는 일본종국 3 > 충무종국 > 일본종국 4 > 일본종국 2 > 수원종국 > 일본종국 1순으로 나타남.

- 중국 처리 가수 분해물의 아미노산 함량의 경우 정제 효소 처리 분해물에 비해 비교적 낮게 나타남.

⑦ 중국 분해물의 관능평가







- 처리 종국에 따른 가수 분해물의 관능평가는 매일식품(주)과 식품산업연구센터 연구원 중 관능평가에 훈련된 12명을 선정하여 색, 향, 감칠맛, 종합 기호도에 대해 7점 척도법으로 평가함. 1점으로 갈수록 기호도가 낮고, 7점으로 갈수록 높아지는 것으로 평가함.

표 54. 중국 종류에 따른 가수 분해물의 관능 평가

처리 종국	색	향	감칠맛	종합 기호도
충무종국	4.35±0.45*	4.08±0.60	4.52±0.51	4.48±0.38
수원종국	5.08±1.02	5.24±0.72	5.84±0.72	5.78±0.84
일본종국 1	5.16±0.45	5.68±0.85	6.00±0.85	6.12±0.59
일본종국 2	4.98±0.79	5.10±0.42	5.90±0.60	6.00±0.48
일본종국 3	5.02±0.60	5.14±0.39	5.80±1.25	5.98±0.64
일본종국 4	5.00±1.11	5.08±0.51	5.84±0.59	5.82±0.82

\*평균±표준편차(n=12). 1점, 아주 싫음; 4점, 보통; 7점, 아주 좋음.

표 55. 중국 종류에 따른 가수 분해물의 관능적 묘사분석

처리 중국		
충무중국	수원중국	일본중국 1
		
전체적 풍미가 약하고 멩멍한 맛.	맛이 진하지 않으나 깔끔하고 감칠맛이 좋음.	감칠맛이 좋고 향미의 조화가 좋음.
처리 중국		
일본중국 2	일본중국 3	일본중국 4
		
깔끔한 맛은 좋으나 감칠맛이 약하고 쓴맛이 있음.	고소한 향이 있으나 짠맛만 나고 감칠맛이 약함.	감칠맛은 있으나 쿵쿵한 맛이 있으며 쓴맛이 있음.

- 관능평가를 통하여 감칠맛과 종합기호도는 일본중국 1을 적용한 시료에서 가장 높은 것으로 나타남.

- 총 6종의 중국을 대상으로 고체배양 후 가수분해를 진행하여, 그 결과물의 성분 분석 및 관능평가를 종합하여 일본중국 1의 경우가 가장 우수한 요건을 갖추고 있는 것으로 판단되었으며, 메이저업체에서 판매하는 정제효소의 경제적인 사용량으로는 구현되지 않았던 본 연구과제의 목표인 분해정도(FN/TN%)인 55% 목표를 상회하는 결과를 얻을 수 있었음.

(나) 중국 분해 시간 선정

① 원료 분해 시간 선정 조건

- 미강과 쌀 단백질의 비율을 3:1로 혼합하고, 원료를 균일하게 혼합하면서 끓여서 식힌 물을 스프레이하여 원료의 수분을 조절함. 이것을 오토클래브를 이용하여 121℃에서 15분간 가열하여 살균한 다음 실온까지 냉각시킴.

- 중국으로 일본중국 1을 균일하게 혼합하여, 32±1℃에서 46시간동안 고체배양을 거쳐 가수분해에 필요한 황국곰팡이의 효소를 생산함. 가수분해는 상기의 방법과 동일한 조건으로 13일간 분해하여 중국을 이용한 효소 분해물을 작성함.

- 가수분해 진행 과정 중에 경시적인 분해정도 등을 체크하기 위해, 3일, 5일, 7일, 10일 경과했을 때 샘플을 취하여 일반성분의 분석 및 관능평가를 실시함.

② 종국을 이용한 효소 분해물의 일반성분

- 분해 시간 경과에 따른 효소 분해물의 조단백 함량, 총 질소(TN) 함량, 아미노 질소(FN) 함량, TN대비 FN%, 염도, brix, pH 등을 측정하여 비교 평가함.
- 분석은 상기 방법과 동일한 방법으로 시행함.

표 56. 중국 분해 시간에 따른 가수 분해물의 특성

분해 경과일	조단백 함량(%)	TN(%)	FN(%)	FN/TN (%)	염도 (%)	Brix (%)	pH
3일	5.31	0.85	0.442	51.94	16.50	31.4	5.06
5일	5.94	0.95	0.503	52.89	16.03	31.8	5.11
7일	5.94	0.95	0.504	53.05	15.55	31.8	5.13
10일	6.56	1.05	0.588	56.00	16.15	32.9	5.04
13일	6.43	1.03	0.577	56.02	15.85	32.8	5.06

- 분해시간 경과에 따른 종국을 이용한 효소 분해물의 조단백 함량은 5.31%~6.56% 수준으로 나타났으며, 총 질소는 0.85%~1.03%, 아미노 질소는 0.44%~0.59% 수준으로 나타나 분해시간이 경과됨에 따라서 총질소 및 아미노산성질소가 증가하는 것으로 나타남.

- 분해정도를 나타내는 FN/TN 비율은 51.94%~56.025% 정도로 나타났으며, 분해시간이 경과됨에 따라 FN/TN비율은 증가하는 것으로 나타났으나, 증가속도는 완만한 증가폭을 나타냄. 이는 3일 경과후부터 샘플링을 한 것으로, 분해 초기에 급속한 가수분해가 일어나고, 이후에는 완만한 증가폭을 보이는 것에 기인한 것으로 판단됨.

- TN, FN 및 FN/TN 비율은 분해 10일에서 가장 높은 것으로 나타남.

- Brix는 분해시간 경과에 따른 변화폭은 크지 않으나 약간의 상승폭을 나타냄.

③ 중국 분해물의 SDS-PAGE

- 중국 분해 시간에 따른 가수 분해물의 펩타이드 패턴을 확인하기 위하여 단백질 전기영동을 시행함.

- 전기영동은 상기 방법과 동일한 조건으로 시행함.

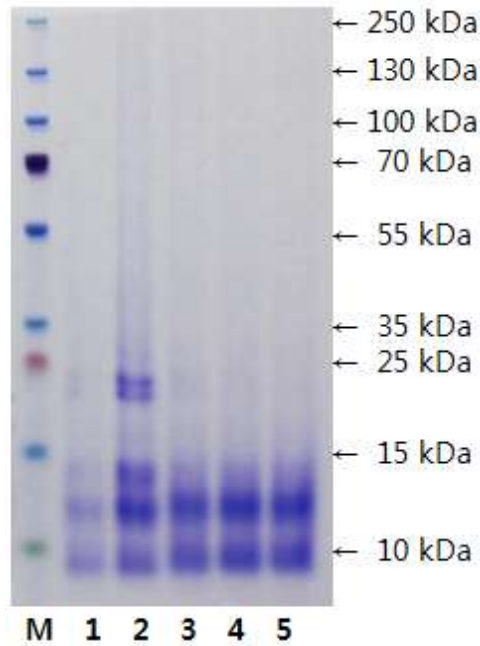


그림 33. 중국 분해 시간에 따른 가수 분해물의 SDS-PAGE

1: 3일 분해, 2: 5일 분해, 3: 7일 분해, 4: 10일 분해, 5: 13일 분해, M: size marker.

- 중국 분해물의 SDS-PAGE 결과 분해 3일에는 밴드 농도가 연하게 나타난 것으로 보아 분해가 충분히 이루어지지 않은 것으로 여겨짐. 분해 5일 부터는 밴드 농도로 보아 분해가 더 진행되었음을 확인할 수 있었으며, 7일 이후부터는 15 kDa 이하로 더 깔끔한 형태의 패턴을 나타냄. 그러나 분해 7일 이후부터는 펩타이드 패턴의 뚜렷한 차이는 없음.

#### ④ 중국 분해물의 유리 아미노산 함량

- 중국 분해 시간에 따른 가수 분해물의 유리 아미노산은 자동아미노산 분석기(HITACHI L-8900)를 이용하여 상기의 방법과 동일하게 분석함.

표 57. 중국 분해 시간에 따른 가수 분해물의 유리 아미노산

Free amino acid (mg%)	중국 분해 시간				
	3일	5일	7일	10일	13일
Aspartic acid	195.98	226.34	251.91	288.15	288.86
Glutamic acid	386.05	423.24	454.11	492.99	494.01
Asparagine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Serine	135.97	153.58	166.84	187.17	189.11
Glutamine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Histidine	60.86	67.09	69.95	74.45	75.51
Glycine	76.39	81.72	96.65	111.03	112.32
Threonine	86.26	97.49	105.67	115.71	116.42
Arginine	215.37	254.51	177.81	122.28	121.35
Alanine	159.74	169.36	184.56	200.92	201.75
Taurine	5.23	6.89	7.76	9.79	9.99
GABA	19.17	17.45	21.78	22.84	23.06
Tyrosine	147.95	148.09	171.57	186.07	186.11
Valine	185.89	187.68	214.06	229.41	230.23
Methionine	62.54	53.18	68.15	75.47	75.31
Phenylalanine	145.43	148.22	167.13	180.80	181.49
Isoleucine	116.25	123.26	139.70	150.37	150.55
Leucine	206.78	221.48	240.46	262.83	262.74
Lysine	155.76	170.15	176.53	186.12	187.19
Proline	104.61	118.87	125.88	143.76	145.82
Total	2,466.23	2,668.61	2,840.51	3,040.16	3,051.82

- 중국 분해물의 유리 아미노산 총 함량은 2,466 mg%~3,052 mg% 수준으로 분해시간이 증가할수록 높게 나타났으나 분해 10일 이후부터는 유사한 수준이었음. 중국에 의한 분해는 10일 정도에 거의 완료되는 것으로 생각됨.

- 감칠맛 아미노산 및 기타 맛 성분 아미노산 함량도 총 아미노산 함량과 유사한 경향으로 나타났으나, arginine의 경우 분해 5일 이후부터 감소하는 경향을 나타냄.

- 미강의 기능성 성분인 GABA의 경우 17.4 mg%~23.1 mg% 수준으로 분해시간이 증가함에 따라 다소 증가하는 경향이었으나 시료에 따라 큰 차이는 없음.

⑤ 중국 분해물의 관능평가

- 중국 분해시간에 따른 가수 분해물의 관능평가는 매일식품(주)과 식품산업연구센터 연구원 중 관능평가 경험이 있는 12명을 선정하여 색, 향, 감칠맛, 종합 기호도에 대해 7점 척도법으로 평가함. 1점으로 갈수록 기호도가 낮고, 7점으로 갈수록 높아지는 것으로 평가함.

표 58. 분해 시간에 따른 효소 분해물의 관능 평가-일본1 중국

분해시간	색	향	감칠맛	종합 기호도
3일	4.35±0.51*	3.92±0.81	5.08±0.79	4.92±0.50
5일	4.58±0.75	4.76±1.42	5.42±1.04	5.28±0.60
7일	4.98±1.00	5.04±0.79	5.96±0.83	5.78±0.92
10일	5.24±0.60	5.74±0.45	6.20±0.94	6.12±0.60
13일	5.18±0.45	5.68±0.51	6.10±0.67	6.04±0.58

\*평균±표준편차(n=12). 1점, 아주 싫음; 4점, 보통; 7점, 아주 좋음.

- 관능평가 결과 미강과 쌀단백을 이용한 중국 효소 분해물은 분해시간이 경과됨에 따라 맛의 차이가 있음. 일본중국 1이 생산하는 효소를 이용하여 가수분해한 감칠맛의 기호도는 10일 경과된 가수분해물이 6.2점으로 가장 높게 나타났으며, 종합 기호도는 10일 경과된 가수분해물의 기호도가 6.12점으로 분해시간 중 가장 높게 나타남.

- 관능적 기호도는 분해시간이 경과될수록 높게 나타났으며, 10일 경과된 경우가 가장 높은 결과를 나타냄. 분해시간이 이를 넘어설 경우 오히려 관능적 기호도가 소폭 떨어지는 것으로 나타남.

(다) 중국 분해물의 Ferulic acid 및 coumaric acid 함량

- 중국 분해조건 설정 실험을 통해 최종 선정된 조건인 미강과 쌀 단백질을 3:1로 하여 일본중국 1로 각각 10일간 분해시킨 중국 분해물의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량을 분석함.

- 시료는 상기 효소 분해물과 동일하게 처리하여 HPLC로 분석함.

표 59. 중국 분해물의 Ferulic acid 및 Coumaric acid 함량

시료	함량 (mg%)	
	ferulic acid	coumaric acid
중국 분해물	3.49	0.61

- 중국 분해물의 ferulic acid와 coumaric acid 함량은 3.49 mg%와 0.61 mg%로 ferulic acid의 경우 F 효소 분해물 보다는 낮은 함량이었으나, C 효소 분해물 보다는 약 2배 가까

이 높은 함량이었음. 그러나 coumaric acid 함량은 C 효소 분해물과 유사한 수준으로 나타남.

(라) 중국 분해물의 나트륨저감 효능 평가

- 최종 선정된 중국 분해물의 나트륨저감 효능 평가는 매일식품과 식품산업연구센터 직원 12명이 NaCl 표준용액에 대한 표준 짠맛 강도를 습득한 후 시험용액의 짠맛 강도를 측정하여 평가함. 평가 방법은 상기 효소 분해물 평가와 동일한 방법으로 시행함.

표 60. 중국 분해물의 나트륨 저감율

시료	농도 (%)	짠맛 강도	나트륨 함량 (mg%)		나트륨 저감율 (%)
			시험용액	표준용액*	
중국 분해물	6	0.97	386.67	339.00	12.33
	8	1.33	533.33	452.00	15.25
	10	1.67	666.67	565.00	15.25

\*시험용액과 동일한 짠맛 강도에서의 표준용액의 나트륨 함량

- 중국 분해물의 짠맛 강도는 0.97~1.67 수준으로 나타났으며, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보임.

- 나트륨 저감율은 12.3%~15.3% 수준으로 나타남. 저감율은 6% 용액에서 12.33%로 가장 낮게 나타났으며, 8%와 10% 용액은 15.25%로 동일하게 나타났으며, 이는 효소 분해물 나트륨저감 평가에서 높은 저감율을 나타낸 C 효소 분해물보다도 더 높은 저감율을 나타냄.

## 4절 미강효소분해물의 scale up 생산조건 연구

### 1. 중국효소와 정제효소균 조합 가수분해 연구

- 1차년도 연구에서 미강과 쌀단백질의 고체배양과 가수분해 조건에 가장 뛰어난 중국은 일본중국으로 선정되었으나, 사업화단계의 경제성을 고려하여 국산인 수원중국으로 교체하기로 함.

- 수원 중국(*Aspergillus Oryzae*)효소와 정제효소의 조합을 활용한 효소분해 조건을 이용하여 미강의 가수분해연구와 이것의 scale up 생산조건을 검토함.

#### 가. 1차 중국효소와 정제효소균 조합 가수분해

- 안정화미강(1,875 g, 75%)과 쌀단백질(625 g, 25%)을 혼합한 후 121°C에서 15분간 autoclave하여 멸균처리 한 뒤, 수분조절을 통해서 혼합물의 수분이 45~55%가 되게 한 후 수원중국(7.5 g, 0.3%)을 첨가하여 32±1°C에서 46±1시간 고체배양함. 이 후 정제효소 flavourzyme, protamex, alcalase, viscozyme, celluclast, glutaminase를 아래 표 1의 비율로 넣은 다음 15% 염수 5 L를 혼합하여 50±1°C 항온수조에서 10일간 가수분해함. 이를 여과 후, 85°C에서 15분간 가열 처리하여 효소를 실활시켜 미강효소분해물을 생산하였음.

표 61. 가수분해 효소 배합조건

Enzyme	배합비(%)	첨가량(g)
Flavourzyme	6.00	150
Protamex	1.00	25
Alclase	0.60	15
Viscozyme	0.08	2
Cellulast	1.00	25
Glutaminase	0.20	5



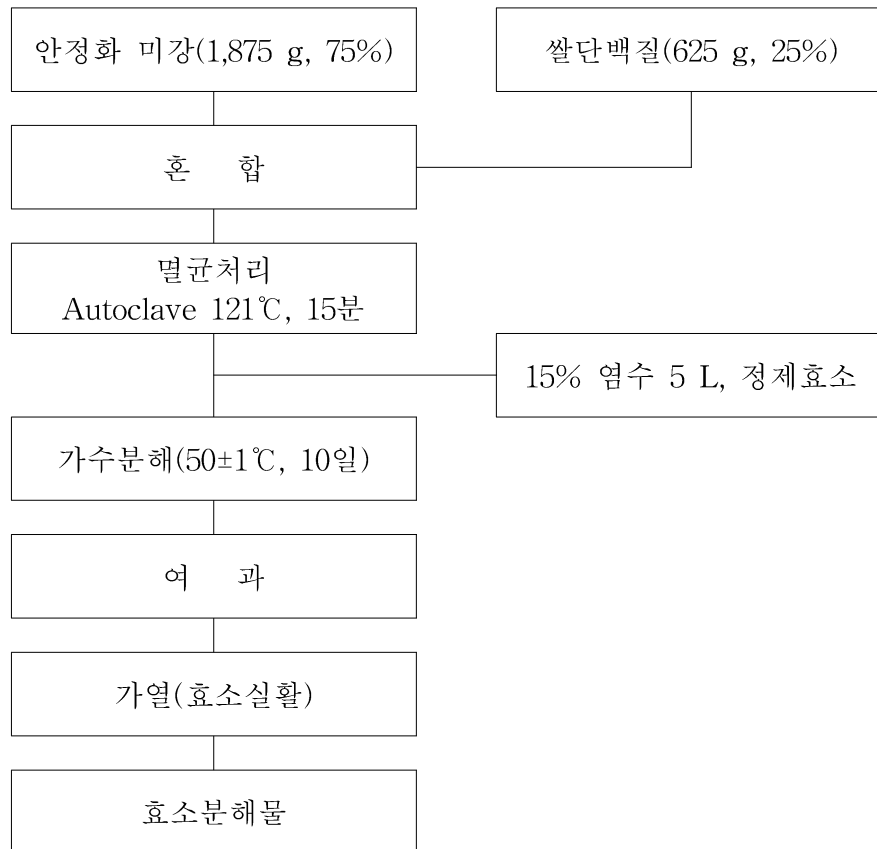


그림 34-1. 미강효소분해물의 생산과정 도식도 (정제효소)

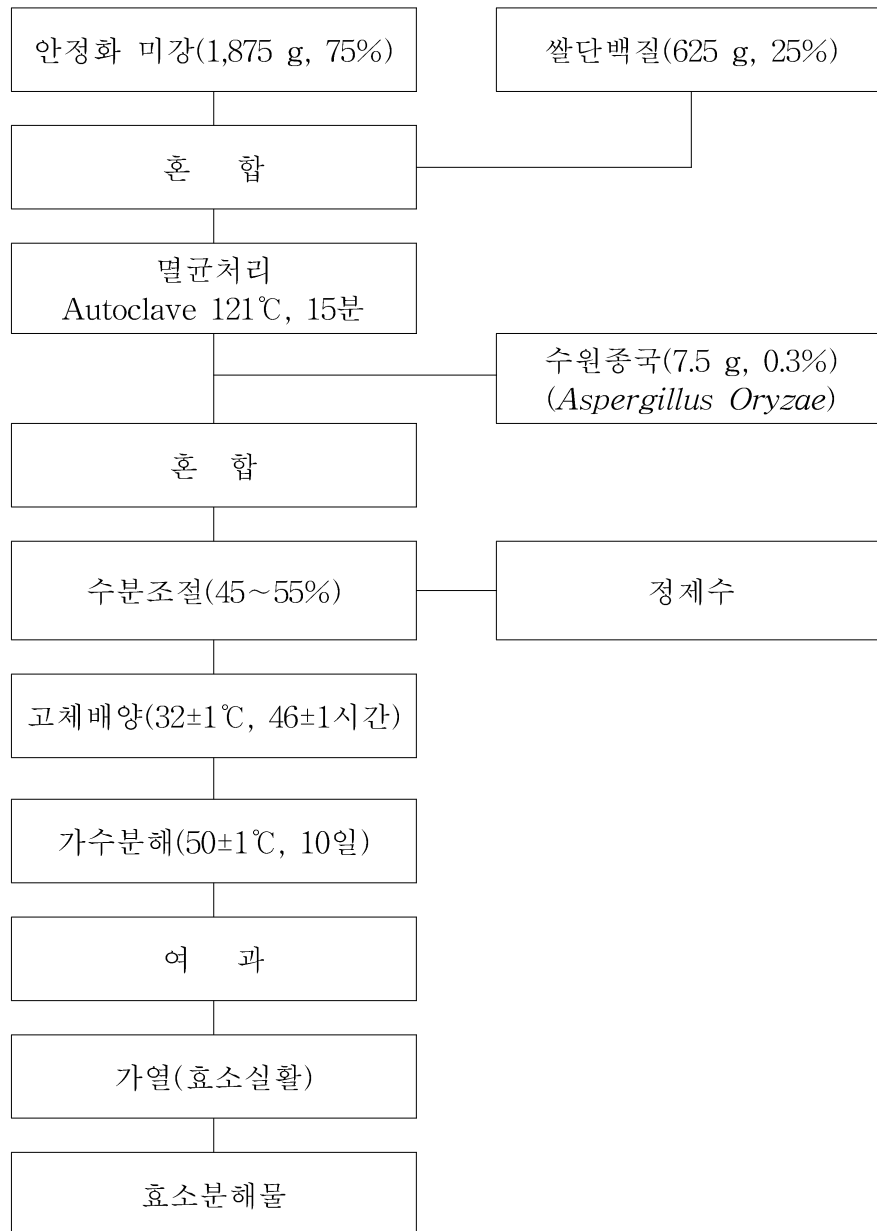


그림 34-2. 미강효소분해물의 생산과정 도식도 (중국효소)

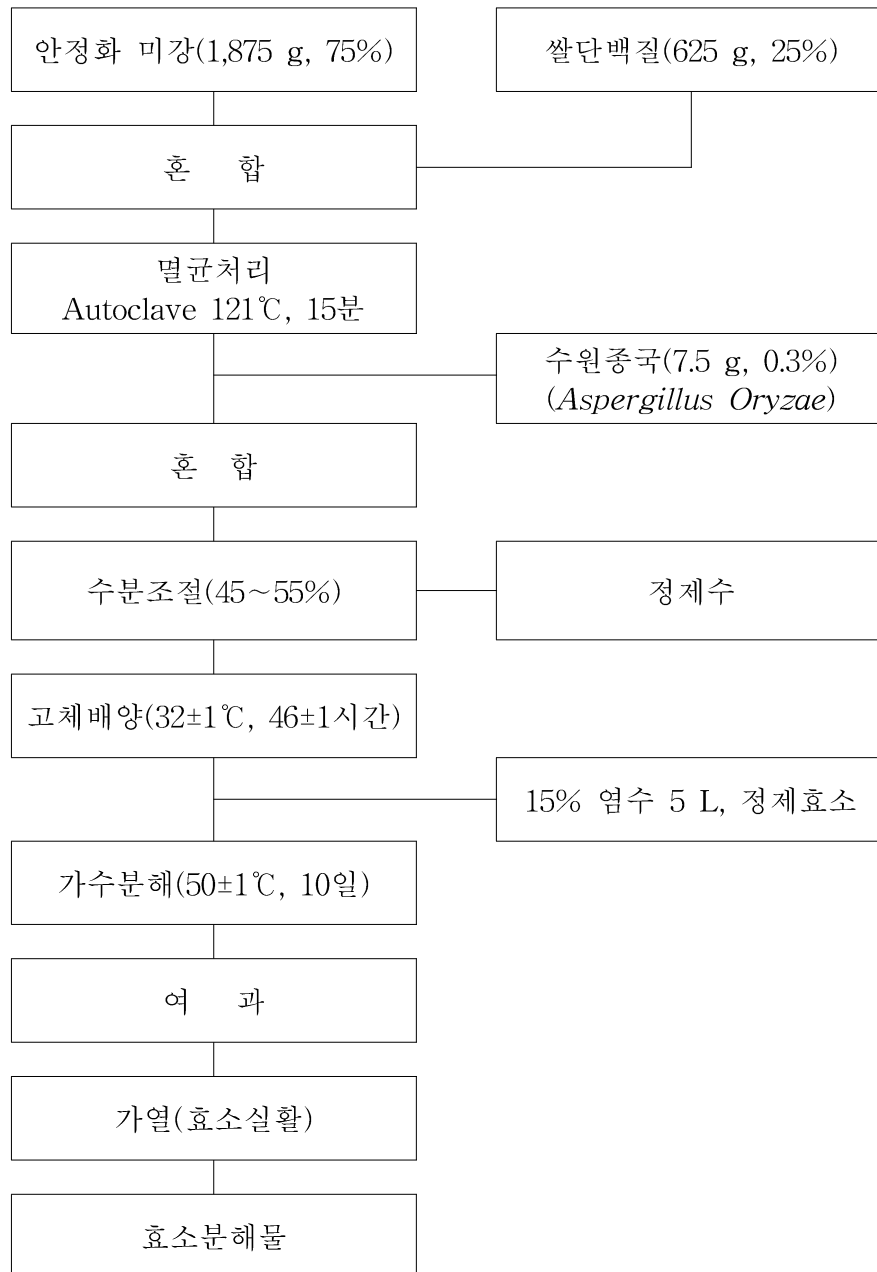


그림 34-3. 미강효소분해물의 생산과정 도식도 (정제효소+중국효소)



그림 35. 미강효소분해물의 생산과정

(1) 일반성분 분석

- 종국효소와 정제효소균 조합 가수분해물의 품질확인을 위해 pH, TN, FN, 분해율, NaCl, Brix를 측정하였음.

- 총질소(TN)함량은 Kjeldahl법으로 가수분해액 2 mL을 삼각플라스크에 넣고 촉매 7 g 과 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mL을 가하여 2시간동안 가열 및 분해시킨 다음 냉각 후 Kjeldahl 증류장치를 이용하여 증류하고 이때 분리되어 나오는 NH<sub>3</sub>를 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>용액에 포집하고 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 표준용액으로 적정하여 아래의 식으로 계산하였음.

$$TN(\%) = \frac{1.4 \times (V1 - V2) \times F}{S \times 1,000} \times 100$$

(V1: 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 적정 mL, V2: Blank의 적정치, F: 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 factor, S: 시료채취량)

- 포르몰태질소(FN)는 중성 포르말린액을 첨가하여 pH 8.4로 적정한 후 계산하였고 분해율은 포르몰태질소를 총질소로 나눈 값에 100을 곱하여 나타냄.

- 염도는 Mohr법에 따라 시료 0.08~0.1 g에 정제수 50 g, 10% K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 용액을 2~3방울 떨어뜨린 다음 0.1 N AgNO<sub>3</sub>을 가하여 적갈색이 15초간 사라지지 않을 때까지 소요된 질산은 용량으로 산출하였음.

$$\text{NaCl}(\%) = 0.5845(F) \times 0.1 \text{ N AgNO}_3 \text{ 소비 mL양} / \text{시료 무게(g)}$$

- Brix는 Brix meter(PAL-a, ATAGO, JAPAN)를 이용하여 측정하였음.

표 62. 중국효소와 정제효소균 조합에 따른 효소분해물의 일반성분

성분	함량	비고
pH	5.71	
NaCl(w/v%)	14.93	
Brix(%)	35.10	
TN(w/v%)	1.29	
FN(w/v%)	0.73	
분해율(%)	56.59	55% 이상 목표

- 중국효소와 정제효소 조합에 따른 일반성분은 pH 5.71, 염분 함량 14.96%, Brix 35.10%, TN 1.29 w/v%, FN 0.73 w/v%, 분해율 56.59%였음. 효소 조합결과 목표치 55% 이상인 분해율을 보여 앞으로 이를 미강과 쌀단백질 가수분해 시 적용하기로 함.

## (2) 관능검사

- 효소조합에 따른 가수분해물의 5점 척도 관능검사를 통해 기호도를 알아봄(5점: 매우 좋다, 4점 : 좋다, 3점 : 보통이다, 2점 : 나쁘다, 1점 : 매우 나쁘다). 관능검사요원은 현재 매일식품(주)에 재직 중인 연구원 10명을 선정하여 색, 향, 짠맛, 감칠맛, 전반적인 선호도에 대한 기호도 조사를 실시함. 평가시료는 상온의 물에 5%(w/w) 용액으로 희석하여 70 mL 화이트컵에 30 mL씩 담아 평가 후 입에 남아있는 맛을 제거할 물과 함께 제공하였으며 각 용기에는 난수표를 이용하여 번호를 붙임.

표 63. 효소 조합에 따른 분해물의 관능검사

기호도	시료	정제효소	중국효소	중국효소+정제효소
색		3.8	4.2	3.8
향		3.2	3.6	4.2
짠맛		3.7	3.8	3.8
감칠맛		3.8	3.8	4.2
종합기호도		3.8	3.8	4.0

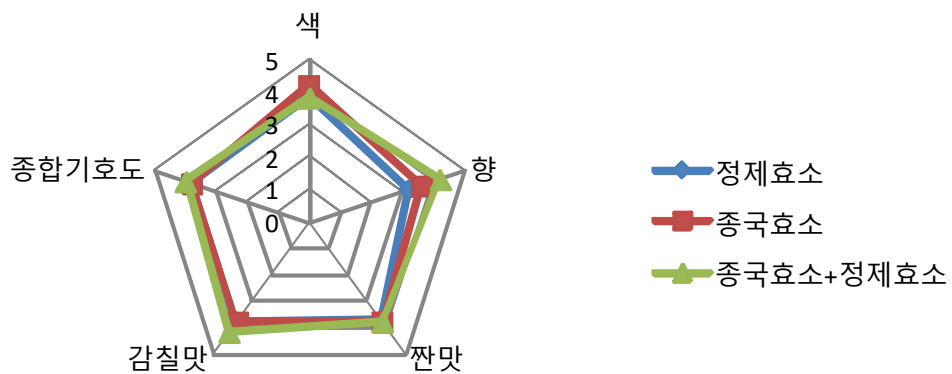


그림 36. 효소 조합에 따른 분해물의 관능 비교

- 효소 사용 종류에 따른 분해물의 관능검사 결과 색은 중국효소분해물이 4.2로 가장 기호도가 좋았으나 정제효소 혹은 효소 조합에 따른 분해물은 3.8로 같았음. 향은 효소조합분해물이 가장 높은 4.2이고 정제효소분해물이 3.2로 가장 낮은 기호도를 보였음. 짠맛은 세 시료 모두 비슷하게 나타났으며 감칠맛에서는 효소조합분해물이 4.2로 가장 높았음. 종합적 기호도 또한 효소조합분해물이 4.0으로 가장 높았음.

- 분해율과 마찬가지로 효소조합에 따른 시료 간 관능 특성 차이가 크게 나지 않는 것으로 나타나 중국효소와 정제효소의 조합으로 가수분해를 결정함.

나. 2차 증숙효소와 정제효소균 조합 가수분해

- 멸균처리하면 고압과 수분으로 인해 원료가 굳어져 덩어리지는 현상이 발생함. 이는 현장 적용 시 어려움이 생길 수 있기 때문에 멸균처리 없이 가수분해해보기로 함.
- 원료 굳어짐 문제로 안정화미강, 쌀단백질 혼합물을 비멸균 처리 후 나머지 가수분해 공정은 1차 효소조합과 동일한 방식으로 진행함.
- 미강효소분해물 품질확인을 위해 pH, NaCl, Brix, TN, FN, 분해율 분석과 관능검사를 실시하고 방법은 상기와 같음.



멸균처리 한  
안정화 미강, 쌀단백질 혼합물



멸균처리 하지 않은  
안정화 미강, 쌀단백질 혼합물

그림 37. 원료의 멸균처리 유무

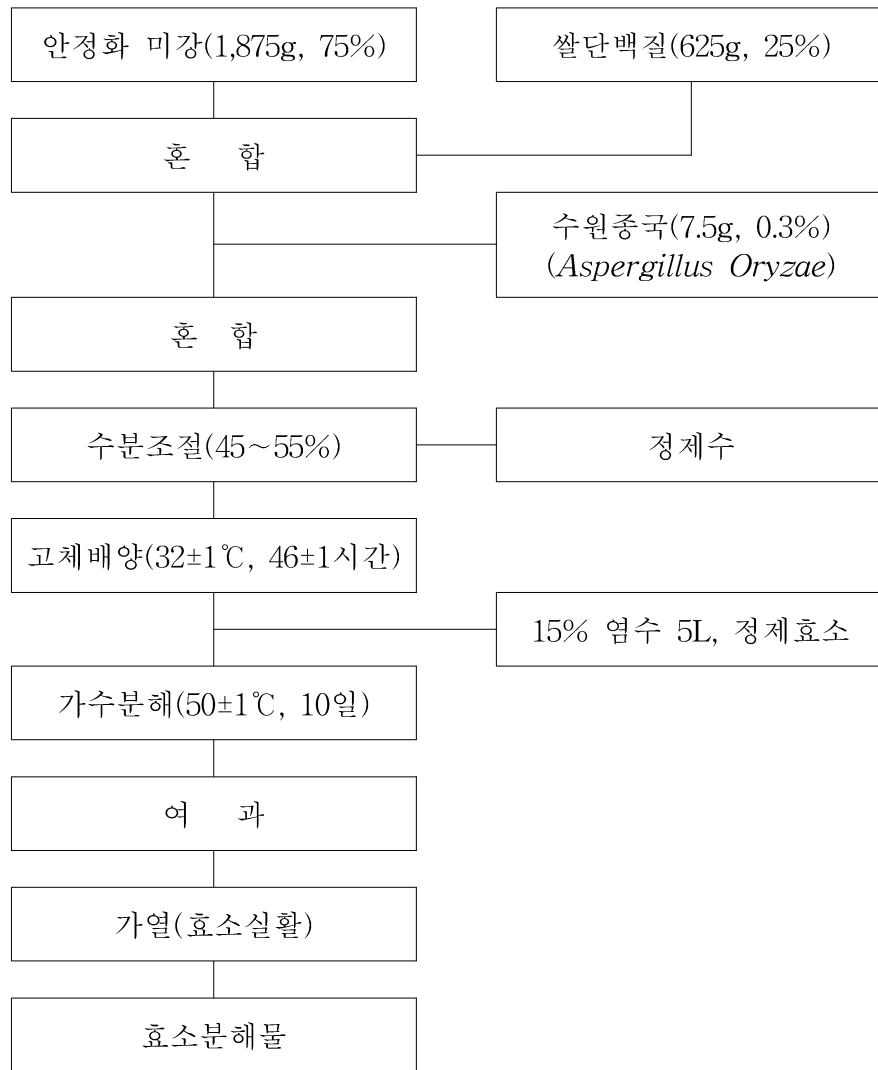


그림 38. 개선된 미강효소분해물의 생산과정 도식도



(1) 일반성분 분석

- 멸균처리 하지 않은 효소분해물의 pH는 5.21, 염분 함량 14.72%, Brix 35.80%, TN 1.38 w/v%, FN 0.78 w/v%, 분해율 56.23%로 분석됨.

표 64. 멸균처리하지 않은 효소분해물의 일반성분

성분	함량	
	멸균처리 ×	멸균처리 ○
pH	5.21	5.71
NaCl(w/v%)	14.72	14.93
Brix(%)	35.80	35.10
TN(w/v%)	1.38	1.29
FN(w/v%)	0.78	0.73
분해율(%)	56.23	56.59

- 쌀단백질 멸균처리 유무는 효소분해액의 분해율에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타남.
- 공정 단축과 제조원가 절감을 위해 현장 scale up 시 쌀단백질 원료의 멸균처리 공정 삭제하기로 함.
- 그러나 정제효소의 원가가 높기 때문에 향후 사업화를 위해서 그 종류와 함량을 줄여 보기로 함.

(2) 관능검사

- 원료의 멸균처리 여부에 따른 분해물의 관능검사 결과 색은 멸균처리하지 않은 분해물이 3.8, 멸균처리 한 분해물이 3.6이었으며, 향은 멸균처리 한 분해물이 4.2로 멸균처리하지 않은 분해물 4.0 보다 좋았음.
- 짠맛은 멸균처리 하지 않은 분해물이 3.8로 기호도가 더 좋았으며, 감칠맛과 종합적인 기호도는 시료 간 차이가 없는 것으로 나타나 원료의 멸균처리 유무는 관능에 큰 차이는 없는 것으로 사료됨.

표 65. 원료의 멸균처리 여부에 따른 관능검사

기호도	시료	멸균처리	
		×	○
색		3.8	3.6
향		4.0	4.2
짠맛		3.8	3.4
감칠맛		4.2	4.2
종합기호도		4.4	4.4

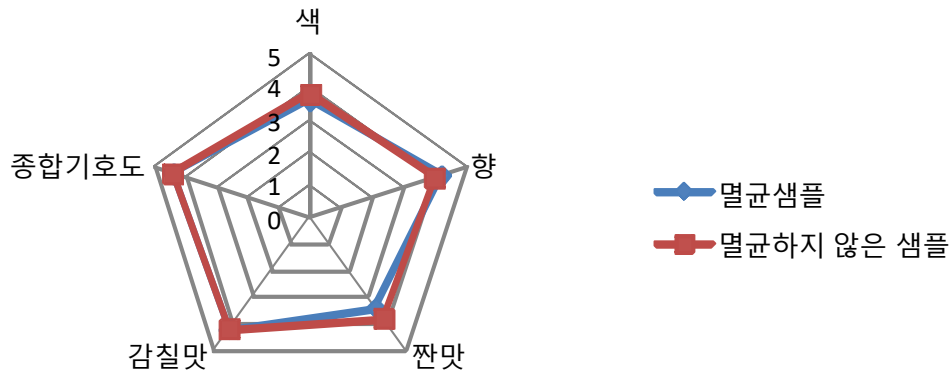


그림 39. 원료의 멸균처리 여부에 따른 관능 비교

### 다. 3차 중국효소와 정제효소균 조합 가수분해

- 1차년도 연구에서 미강과 쌀단백질의 고체배양과 가수분해 조건에 가장 뛰어난 중국은 일본중국으로 선정되었으나, 사업화단계의 경제성을 고려하여 국산인 수원중국으로 교체하기로 함.

- 중국은 다양한 효소균을 생산하여 가수분해물의 복잡한 정미특성을 만들어 주기 때문에 고체배양에서 만들어지는 코오지(koji)의 품질에 영향을 미치는 인자 중 수분과 중국의 단백질 분해율을 높이기 위해 고체배양 시간을 추가적으로 검토함.

#### (1) 수원중국을 이용한 고체배양 시 수분 관리

- 고체배양 중 주요 관리 인자는 온도, 수분, 시간으로 현장 고체발효 시 제곡기에서 자동으로 수분 조절을 진행하지만 Pilot Test에서는 인큐베이터를 통해 고체배양을 하므로 수분 관리를 지속적으로 해줘야 함.

- 수원종국의 단백질 분해정도인 FN/TN(%)는 56.36%로 실험 종국 중에서 높은 편이었으나, 일본종국 수준(59.87%)으로 분해율을 높이기 위해서 고체배양 중 수분조절 방식을 변경시켜 테스트함.

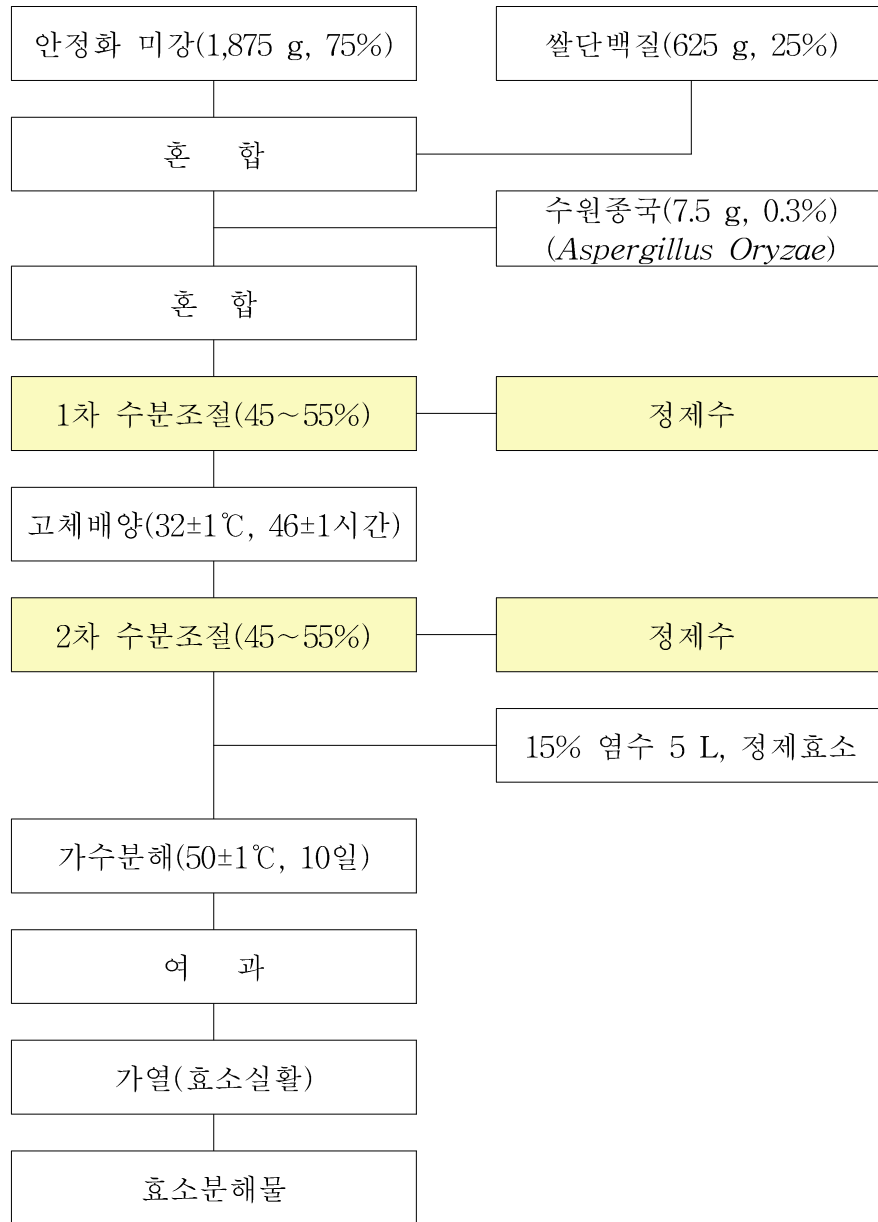


그림 40. 수분조절 추가 공정 미강효소분해물의 생산과정 도식도

- 고체배양 시 수분 조절 전과 후 분해율은 각각 56.23%와 57.1%로 검토되어 수분조절 전보다 수분 조절 후의 분해율이 높게 나타 남.

표 66. 수분 조절 전·후 미강효소분해물 분해율

	수분조절	
	전	후
분해율(%)	56.23	57.1

- 색과 종합적인 기호도는 시료의 차이가 나타나지 않고 향, 짠맛, 감칠맛의 경우 시료 간 약간씩 차이가 있지만 원료의 멸균처리 유무는 관능결과 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨.

표 67. 수분 조절 전·후 미강효소분해물 관능비교

구분	수분조절 전	수분조절 후
색	3.8	3.8
향	4.0	4.2
짠맛	3.8	3.6
감칠맛	4.2	4.4
종합기호도	4.4	4.4

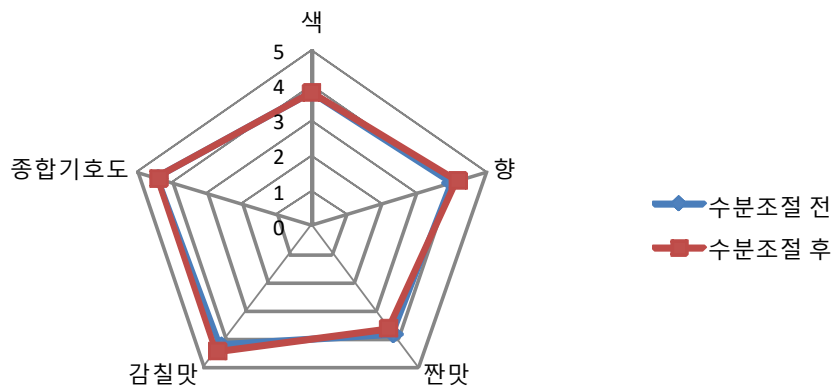


그림 41. 수분 조절 전·후 미강효소분해물 관능비교

(2) 고체배양 시간별 koji의 액화력, 당화력, pH 및 아미노태 질소 함량 측정

- 1차년도 연구에서 고체배양 최적 온도와 시간은 32±1℃에서 46시간으로 검토되었음.
- 그러나 종국 변경으로 인한 가수분해율이 떨어지는 것을 방지하기 위해 고체배양에서 만들어지는 코지(koji)를 시간별로 액화력, 당화력, pH, AN을 측정·비교하여 최적의 고체배양 시간을 검토함.
- 고체배양시간이 길어짐에 따라 포자착생 등 과배양이 일어나 효소분해액의 관능의 변화가 일어날 수 있기 때문에 최대 57시간까지 발표시간을 두고 실험하였음.
- 코지 100 g과 증류수 200 mL를 혼합하여 54.6℃ 항온수조에서 1시간 동안 가열하고 이를 메스실린더에 1시간 동안 여과 한 후 그 여액의 눈금을 확인하여 액화력을 측정함. 또한 여과액을 Brix meter를 이용하여 당화력을 측정함.
- pH는 삼각플라스크에 코지 20 g과 증류수 80 mL를 정량하고 1시간 동안 실온에 방치한 후 여과하여 pH meter를 이용하여 측정함.
- 아미노태 질소(AN)의 측정은 코지 5 g를 250 mL로 정용한 후 25 mL를 취한 다음, 중성 포르말린 용액 20 mL와 증류수 20 mL를 첨가하여 0.1 N NaOH로 pH 8.4까지 적정하고 다음 식에 의해 계산하였음.

$$AN(mg\%) = \frac{(A - B) \times 1.4 \times F \times 100}{\text{시료량}(g)}$$

A : 0.1 N NaOH용액의 시료 적정량(mL)

B : 0.1 N NaOH용액의 blank 시험 적정량(mL)

F : 0.1 N NaOH용액의 factor

표 68. 고체발효시간별 코지 분석 결과

구분	0~24h	24~33h	33~48h	48~57h
액화력(mL)	25	26	29	28
당화력(%)	9.0	9.7	10.1	10.2
pH	5.60	5.58	5.62	5.64
AN(mg%)	15.54	19.92	22.77	22.75

- 액화력과 당화력이 높다는 것은 α-amylase와 β-amylase의 활성이 높아 효소분해력이 높은 것으로 판단 할 수 있는데, 액화력과 당화력은 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였으나 48시간 이후에는 큰 변화가 없었음.
- pH는 5.58~5.64 범위로 시간경과에 따라 큰 차이는 없어 과발효로 인한 pH의 낮아짐은 보이지 않았음.
- AN함량 또한 시간이 지남에 따라 증가하였지만 48시간 이후에는 큰 변화가 없었음.
- 액화력, 당화력, pH, AN 함량을 검토하였을 때 고체배양은 48시간이 가장 알맞은 시간으로 사료됨.

(3) 정제효소 비율 변경

- 기존의 정제효소 6 가지 이용은 사업화 시 많은 효소 종류로 인한 경제성이 떨어지므로 그 비율을 변경해보기로 함.
- 지미아미노산인 글루탐산의 안정적인 생산을 위해 glutaminase를 제외한 protease, cellulase는 주요 기질과 생성물별로 나눈 다음, 각 그룹을 대표하는 효소를 선정하고 첨가 비율을 검토하였음.
- Protease계열인 flavourzyme, protamex, alcalase 중 동일 효소 농도에서 가수분해 진행 정도가 가장 높은 flavourzyme을 대표 protease로 선정함.
- Cellulase인 viscozyme과 celluclast중에서는 여과 속도와 수율이 증가한 celluclast을 선정하였음.
- 이들의 첨가 비율은 아래 표와 같고 이들의 효소분해물을 제조하여 기존 효소분해물의 분해율과 비교하여 최적의 효소 비율을 검토하였음.
- 또한 관능검사를 통해 효소 비율 변경으로 인한 관능적 차이를 알아봄.

표 69. 가수분해 효소 변경 비율

Enzyme	첨가비율(%)						
	control (기준)	A	B	C	D	E	F
Flavourzyme	6.00	6.00	6.00	5.00	5.00	4.00	4.00
Protamex	1.00	-	-	-	-	-	-
Alcalase	0.60	0.6	-	0.60	-	0.60	-
Viscozyme	0.08	-	-	-	-	-	-
Celluclast	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Glutaminase	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

- 가수 분해 효소 첨가비율별 분해율은 55.8%~56.4%로 나타남.
- 분해율은 기존 시료에서 56.6%로 최대였지만, 나머지 효소 첨가비율에서도 모두 목표 분해율인 55%이상으로 나타났음.

표 70. 가수분해 효소 변경 비율별 분해율

시료	분해율(%)
control(기준)	56.6
A	56.2
B	56.4
C	56.0
D	56.2
E	55.4
F	55.8

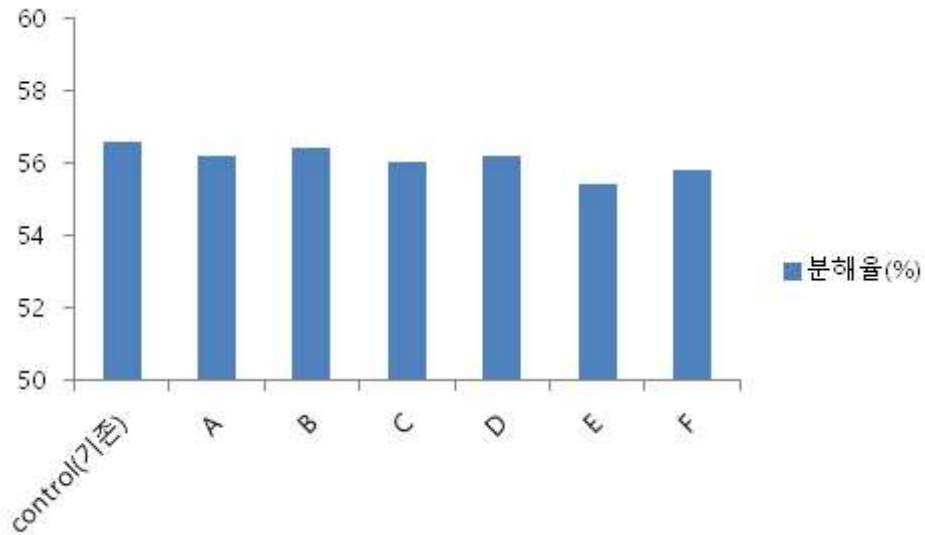


그림 42. 가수분해 효소 변경 비율별 분해율

- 가수분해 효소 변경 비율별 관능검사는 색, 향, 짠맛, 감칠맛, 종합적인 기호도 5 가지 항목에 대한 기호도를 알아봄.

- 색은 시료 모두 3.8~4.0으로 비슷한 선호도를 보이고 향은 3.8로 모든 시료에서 선호도의 차이가 없었음. 짠맛은 A에서 가장 낮은 선호도를 보이고 나머지 시료들은 3.6~3.8로 큰 차이가 없고, 감칠맛은 4.0~4.6로 A시료가 가장 높았음. 종합적인 기호도는 4.0~4.2로 시료 간 차이가 크지 않았음.

표 71. 가수분해 효소 변경 비율별 관능검사

구분	Control	A	B	C	D	E	F
색	4.0	3.8	4.0	4.0	4.0	3.8	4.0
향	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
짠맛	3.6	3.4	3.8	3.6	3.8	3.6	3.6
감칠맛	4.2	4.6	4.4	4.4	4.2	4.0	4.2
종합기호도	4.0	4.2	4.2	4.2	4.0	4.2	4.2

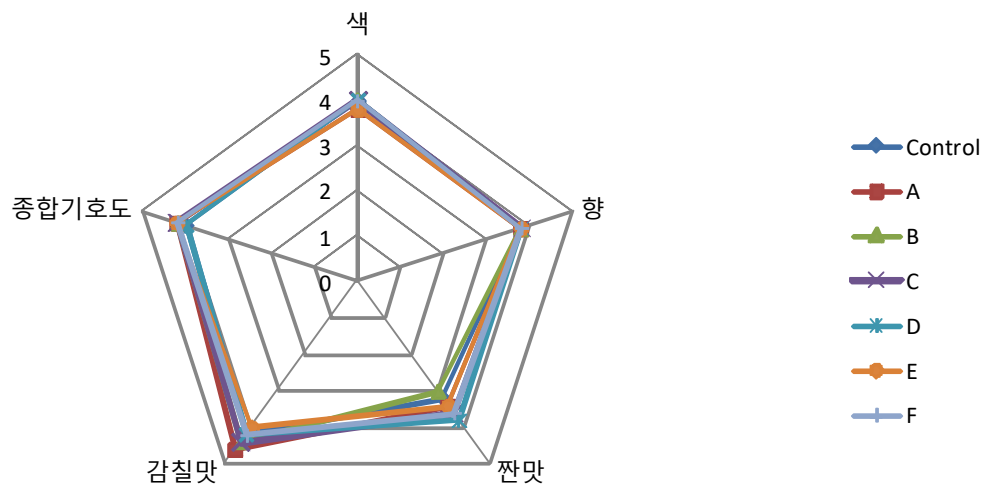


그림 43. 가수분해 효소 변경 비율별 관능검사

- 조미소재로써의 기준으로 분해율이 높고 감칠맛이 높은 A가 적당하지만 사업의 경제성을 고려할 때 정제효소의 가짓수를 줄이는 것이 중요함. 이에 목표 분해율 55%이상으로 측정되고 관능에서 좋은 선호도를 보인 효소비율 F(flavourzyme 4 : celluclast 1 : glutaminase 0.2)를 scale up 공정에 적용하기로 하였음.

라. Scale up 생산

- 상기의 실험 결과를 바탕으로 미강효소분해물의 scale up 테스트를 진행하였음. 생산공정은 아래와 같음.



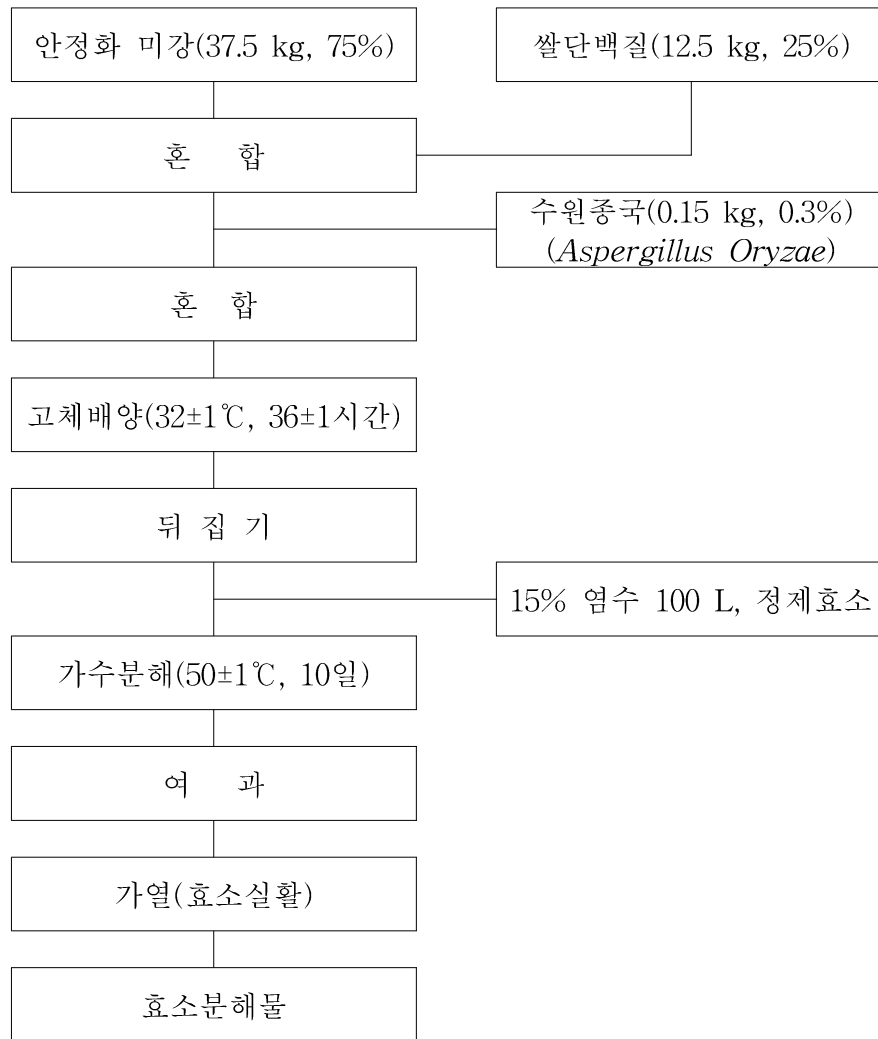


그림 44. Scale up 미강효소분해물의 생산과정 도식도

표 72. Scale up 정제효소 첨가량

Enzyme	배합비(%)	첨가량(g)
Flavourzyme	4.00	200
Celluclast	1.00	50
Glutaminase	0.20	10

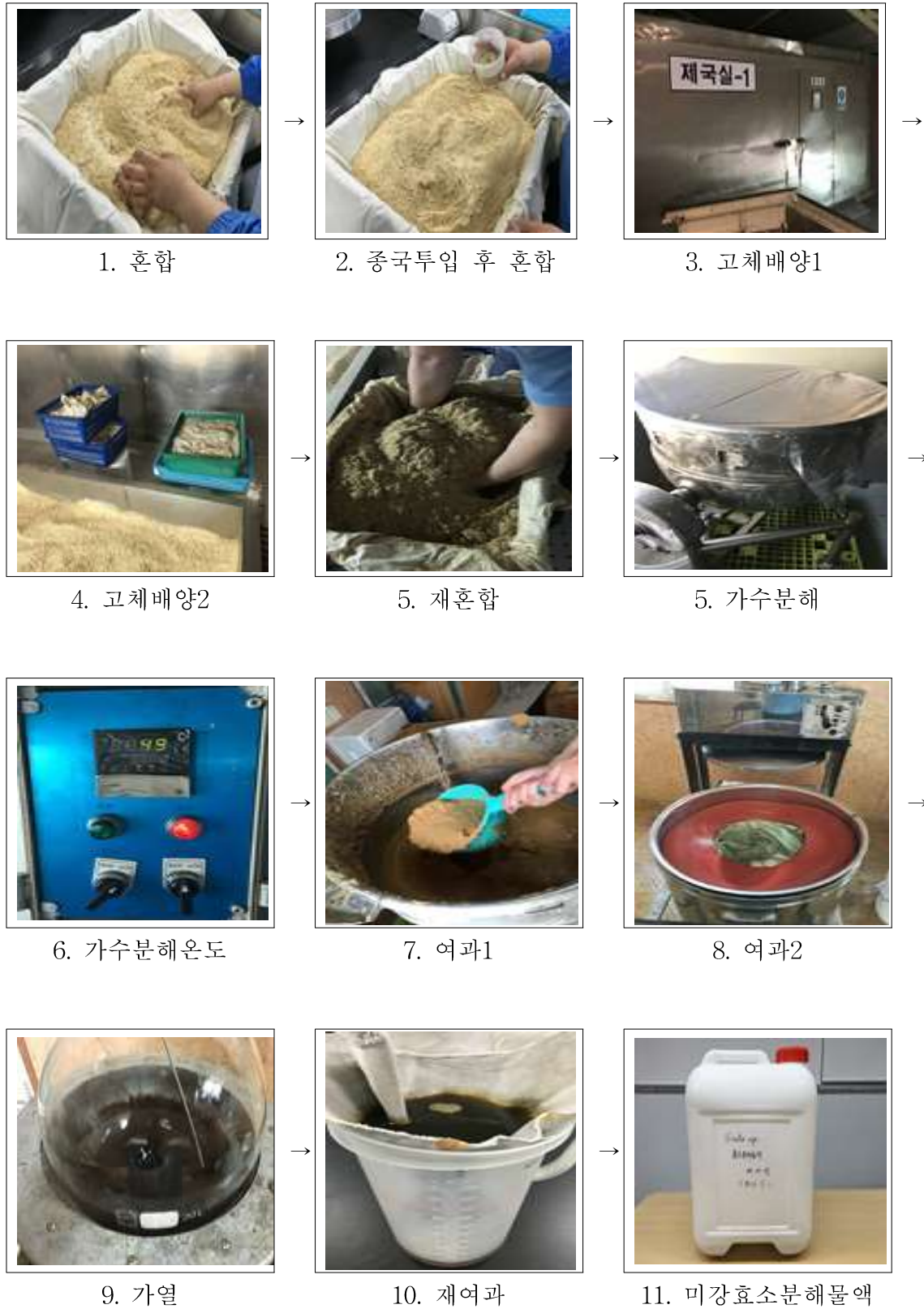


그림 45. 최종 Scale up 제조 공정

(1) 고체배양 시간별 koji의 액화력, 당화력 비교

- Scale up으로 인한 Pilot Test 분석 결과와 비교하기 위해 고체배양 시간별 코지를 분석하였으며 방법은 상기와 같음.

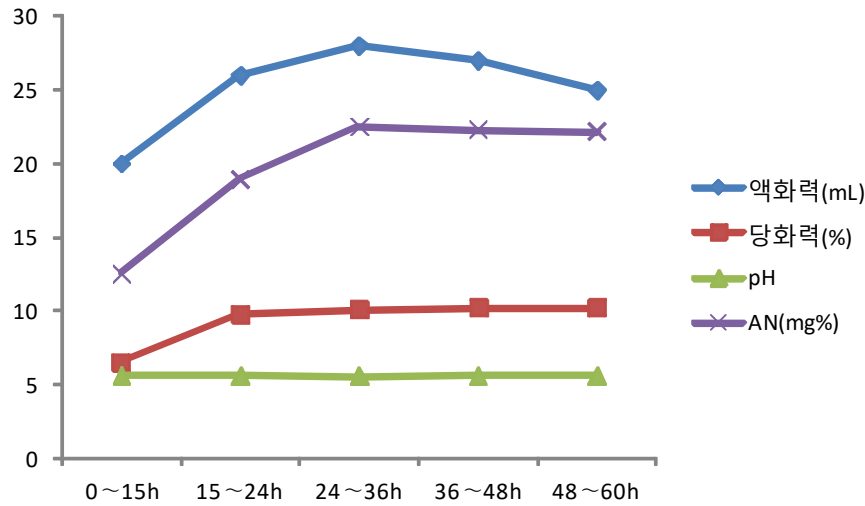


그림 46. Scale up 후 고체발효시간별 코지 변화

표 73. Scale up 고체발효시간별 코지 분석 결과

구분	0~15h	15~24h	24~36h	36~48h	48~60h
액화력(mL)	20	26	28	27	25
당화력(%)	6.5	9.8	10.1	10.2	10.2
pH	5.64	5.62	5.59	5.60	5.62
AN(mg%)	12.54	18.94	22.51	22.28	22.15

- 고체배양 시간이 증가함에 따라 액화력은 증가하다가 48시간 이후로는 감소하는 추세임.
- 당화력은 시간경과에 따라 증가하는 양상이지만 고체배양 24시간 후에는 큰 변화가 없음.
- pH는 5.59~5.62 범위로 시간 경과에 따른 큰 차이는 보이지 않음.
- AN 역시 시간 경과에 따라 증가하는 추세지만 36시간 후에는 큰 변화가 없음.
- 상기 실험결과를 바탕으로 최적의 고체배양 시간은 36시간임.

(2) 가수분해 시간 선정

- Scale up으로 인한 가수분해 시간 경과에 따른 최적 가수분해시간을 선정하기 위해 분해율을 검토함.

- 이 때 고체배양 시간별 조건도 동일하게 적용하여 고체배양과 가수분해시간별 차이를 살펴봄.

(가) 가수분해 시간별 효소분해물의 분해율

- 고체배양 15시간 후 가수분해 시간별 분해율은 43.50~51.92%로 시간이 지남에 따라 증가하는 양상이지만 가수분해 15일째부터는 감소함. TN, FN 역시 시간 경과에 따라 증가함.

표 74. 고체배양 15시간 후 가수분해 시간별 분해율

구분	가수분해 시간별(15h)				
	3일	7일	10일	13일	15일
TN(w/v%)	1.35	1.38	1.42	1.40	1.44
FN(w/v%)	0.59	0.67	0.73	0.73	0.73
분해율(%)	43.50	48.21	51.68	51.92	50.84

- 고체배양 24시간 후 가수분해 시간별 분해율은 45.83~54.35%로 시간이 지남에 따라 증가하고 가수분해 13일째부터는 감소하며 TN, FN 역시 같은 양상을 보임.

표 75. 고체배양 24시간 후 가수분해 시간별 분해율

구분	가수분해 시간별(24h)				
	3일	7일	10일	13일	15일
TN(w/v%)	1.32	1.42	1.48	1.47	1.45
FN(w/v%)	0.61	0.73	0.80	0.80	0.79
분해율(%)	45.83	51.69	54.26	54.35	54.13

- 고체배양 36시간 후 가수분해 시간별 분해율은 46.17~57.40%로 시간이 지남에 따라 증가하고 가수분해 13일째부터는 감소하는 것이 고체배양시간이 다른 시료와도 비슷한 양상을 띠며. TN, FN 역시 비슷한 양상임.

표 76. 고체배양 36시간 후 가수분해 시간별 분해율

구분	가수분해 시간별(36h)				
	3일	7일	10일	13일	15일
TN(w/v%)	1.36	1.40	1.46	1.48	1.47
FN(w/v%)	0.63	0.74	0.84	0.85	0.84
분해율(%)	46.17	52.50	57.40	57.23	57.07

- 고체배양 24시간 후 가수분해 시간별 분해율은 50.29~54.35%로 시간이 지남에 따라 증가하는 양상이지만 가수분해 13일째부터는 감소함.

표 77. 고체배양 48시간 후 가수분해 시간별 분해율

구분	가수분해 시간별(48h)				
	3일	7일	10일	13일	15일
TN(w/v%)	1.40	1.42	1.45	1.43	1.43
FN(w/v%)	0.70	0.77	0.83	0.82	0.82
분해율(%)	50.29	54.15	57.15	57.13	57.06

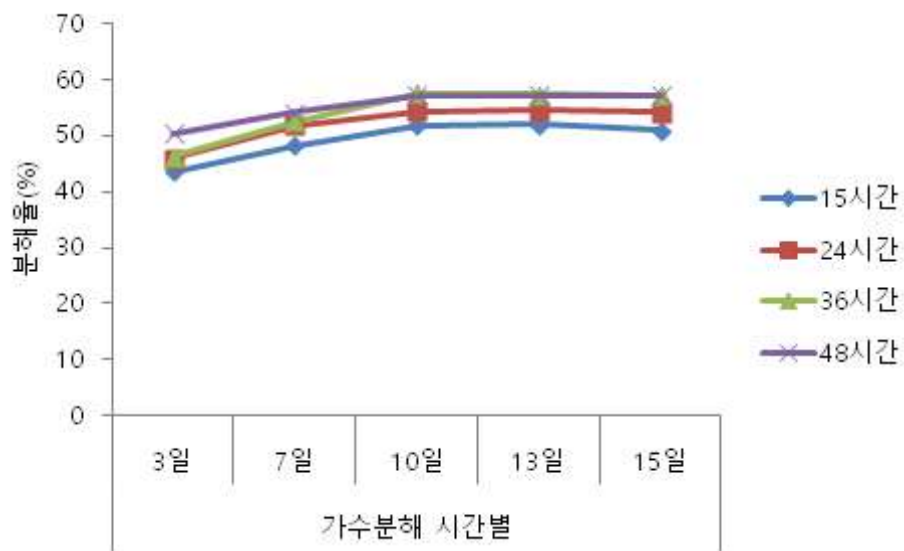


그림 47. 고체배양 시간과 가수분해 시간별 분해율 비교

- 종합적으로 고체배양시간별로 최종 가수분해의 최적 시간을 검토했을 때 가수분해 시간 경과에 따라 분해율이 증가하지만 13일 혹은 15일째부터는 감소함.
- 고체배양 36시간에 가수분해 10일일 때 분해율이 57.40%로 가장 높음.
- 상기 코지의 AN이 가장 높게 분석된 고체배양 시간은 36시간이었고 가수분해 또한 36시간에서 분해율이 가장 높아 최적의 고체배양 시간은 36시간이며 가수분해시간은 10일임.

(나) 최종 Scale up 품질 확인

- Scale up 후 종국효소와 정제효소균 조합으로 안정화 미강 효소가수분해물을 생산하여 완제품의 품질확인을 위해 일반성분과 아미노산 분석 및 관능검사를 실시함.

① Scale up 효소분해물의 일반성분

- 분석은 상기와 같은 방식으로 실시하였음.
- pH는 4.94, 염분 함량 15.02%, Brix 34.80%, TN 1.42 w/v%, FN 0.81 w/v%, 분해율 57.25%로 분석됨.
- Scale up 전 시료와 비교하여 오히려 분해율이 약간 증가하고 나머지 일반성분에도 큰 차이가 없는 것으로 보아 scale up 공정이 최적화되었다고 사료됨.

표 78. Scale up 효소분해물의 일반성분

성분	함량		비고
	after scale up	before scale up	
pH	4.94	5.21	
NaCl(w/v%)	15.02	14.72	
Brix(%)	34.80	35.80	
TN(w/v%)	1.42	1.38	
FN(w/v%)	0.81	0.78	
분해율(%)	57.25	56.23	55% 이상 목표

② 유리아미노산 분석

- 식품에서 유리 아미노산의 종류와 함량은 맛의 특성에 매우 중요한 요인으로 작용함. 효소분해 시료의 유리 아미노산 함량을 분석하여 조미소재로서의 특성을 평가하고자 함.
- 유리 아미노산은 아미노산 분석기(HITACH L-8900)를 이용하여 1차년도와 동일한 방법으로 분석함.
- Scale up한 효소분해물과 농축액의 유리 아미노산 총 함량은 5089.23 mg%이었음.
- Glutamic acid가 677.73 mg%, aspartic acid 542.10 mg%로 아미노산 중 지미 아미노산의 함량이 가장 높았음.
- Glutamic acid는 대표적인 감칠맛 성분이며, glycine, alanine, proline, threonine, serine 등은 단맛을, leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, arginine은 쓴맛을 유발하는 아미노

산으로 알려져 있는데 감칠맛, 쓴맛, 단맛 아미노산이 고르게 분포하여 기존에 다른 연구에서 쌀 유래 효소분해물이 쓴맛을 강하게 발현하는 것과는 다르게 본 연구에서 개발된 소재는 감칠맛과 풍미가 우수할 것으로 생각됨.

- 미강의 기능성 성분인 GABA의 경우 효소분해물에서 61.49 mg%의 함량을 나타내어 기능성 조미소재로의 가능성도 엿보임.

표 79. Scale up 효소분해물의 유리아미노산 함량

Amino acid	mg%
Asp	542.10
Thr	228.10
Ser	291.75
Glu	677.73
Gly	160.64
Ala	371.87
Val	397.25
Met	115.75
Ile	289.35
Leu	470.44
Tyr	316.24
Phe	305.03
g-ABA	61.49
Lys	285.84
His	122.79
Arg	263.47
Pro	189.39
Total	5089.23

### ③ Scale up 효소분해물의 관능검사

- 최종 scale up 공정으로 생산된 미강효소분해물의 관능검사를 실시하여 pilot 공정 제품과 비교함.

- 색과 짠맛은 scale up 공정이 pilot에 비해 낮은 기호도를 보였으나 향, 감칠맛, 종합적인 기호도는 더 높아 분해율뿐만 아니라 관능에서도 좋은 결과를 얻었음. 분해율이 높은 효

소분해물은 그 안에 지미아미노산 성분이 많아 감칠맛이 높은 것으로 사료되고 이는 관능 결과에도 영향을 미침. 안정화미강효소분해물은 감칠맛에서 4.4로 높은 기호도를 보여 앞으로 천연조미소재로써 여러 가지 식품에 적용할 수 있을 것으로 예상됨.

표 80. Pilot 공정과 scale up 공정 후 효소분해물 관능 비교

구분	Pilot Test	Scale up
색	4.0	3.8
향	3.8	4.2
짠맛	3.6	3.2
감칠맛	4.2	4.4
종합기호도	4.4	4.4

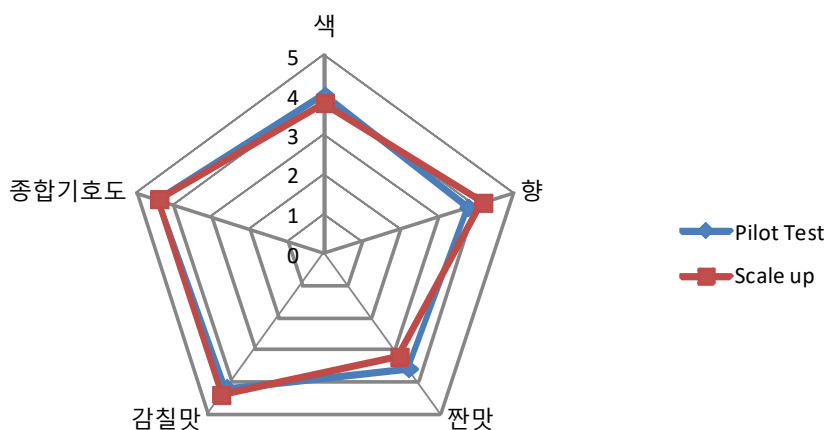


그림 48. Pilot 공정과 scale up 공정 후 효소분해물 관능 비교

## 2. 미강효소분해물을 이용한 조미소재의 고부가가치화 연구

- 식품의 고유한 맛을 향상시키고 가공식품 자체의 자연적인 맛을 충족시키기 위한 천연 조미소재의 이용은 날로 높아지고 있음<sup>1)</sup>.
- 이러한 천연 조미소재는 일반적으로 쇠고기 가수분해물(beef extracts)이 많으며 현재 다양한 원료의 천연 조미소재들이 시중에 선보이고 있음.
- 일반 가공용 간장과 이를 이용한 조미료의 원료는 보통 탈지대두를 사용하여 콩 알레르기가 있는 사람들은 피할 수밖에 없음.
- 또한 효소분해물은 펩타이드계 조미료로써 종래 아미노산계 조미료만으로 제공하지 못한 펩타이드의 복잡하고 지속적인 코쿠미(kokumi)를 줄 수 있음.



- 소비자의 선택의 폭을 넓혀 줄 수 있도록 hypoallergic 원료인 미강과 쌀단백질을 이용한 조미소재 제품의 다양화와 고급화를 위해 액상과 분말의 제형으로 제조하기로 함.

가. 미강효소분해물의 조미소재 제형의 다양화

(1) 액상 형태의 조미소재

- 효소분해물은 일반 간장의 대용품, 농축액은 조미액의 원료로 이용할 수 있고 농축과정을 통하여 효소분해물의 이취를 개선할 수 있어 두 가지 형태의 액상 조미소재가 가능함.

- 가열하여 효소를 실활시킨 미강효소분해물액을 히팅맨틀(Glas-Col, HMIC-F500)을 이용하여 60~65℃에서 -0.08~0.09 MPa로 감압농축한 다음, 염이 석출되었을 때에 맞춰(Brix 75.0±1.0%) 감압농축을 끝내고 여과하여 제품으로 하고 품질특성을 확인하기 위해 일반성분을 상기와 같이 분석하였음.

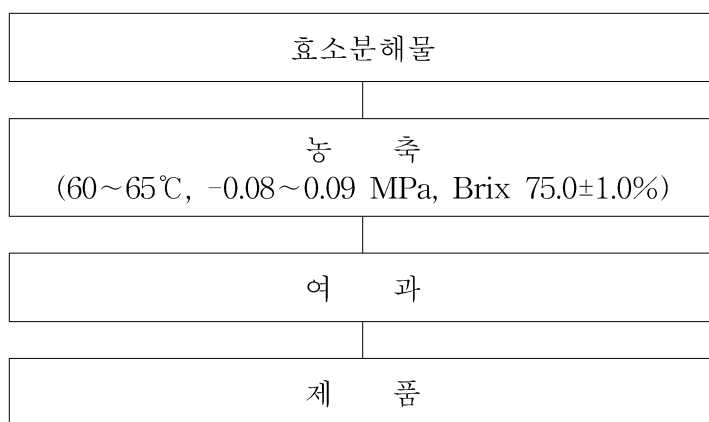


그림 49. 미강효소분해농축액 제조 공정도



그림 50. 미강효소분해농축액 제조 공정 사진

- 미강효소분해물의 일반성분은 아래 표에 나타냄. 효소분해물과 농축액을 비교했을 때 pH는 농축액이 4.42로 효소분해물 4.94보다 낮았음. 염분 함량은 농축액이 23.90%로 효소분해물에 비해 약 1.59배 높았으며 Brix와 TN 또한 56.50%, 3.75%로 각각 1.62배, 2.65배 높아 농도 의존적인 경향이 보였음.

표 81. 미강효소분해물농축액의 일반성분

일반성분	미강효소분해물	농축액
pH	4.94	4.42
NaCl(w/v%)	15.02	23.90
Brix(%)	34.80	56.50
TN(w/v%)	1.42	3.76

(2) 미강효소분해물 분말 개발

- 보통 가공용 간장의 분말화는 분무건조(spray dry, SD)와 진공건조(vacuum dry, VD) 두 가지 방식으로 이루어짐.

- SD는 입자가 고우며 간장 본연의 맛이 강하게 느껴지는 라면스프, 과자 시즈닝 등에 사용되며, VD는 간장 분말의 reaction flavor를 특징으로 조미료, 라면 스프 등에 사용됨.

(가) 분무건조 테스트

- 가열하여 효소를 실활시킨 미강효소분해물을 분무건조기(Pilot 분무건조기 KL-8, 서강 엔지니어링, Chungnam, Korea)를 이용하여 atomizer 18,500~19,000 rpm, 투입 온도 185~190℃, 배출 온도 85~100℃ 범위에서 진행함.

- 분무건조기 기계 벽 안에 달라 효소분해물액이 달라붙는 것을 방지하기위해 소금과 말토덱스트린을 부형제로 이용하여 검토함.

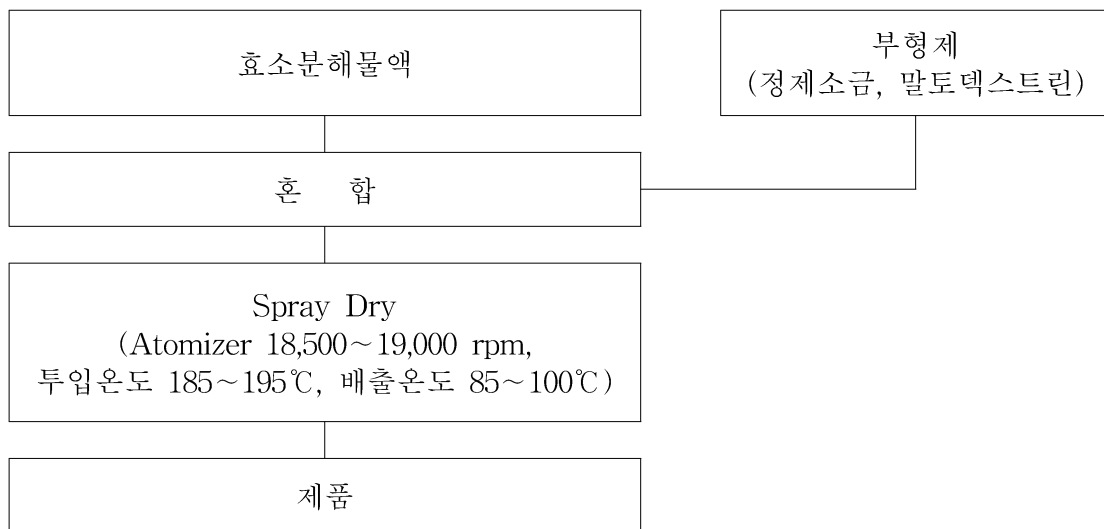


그림 51. Spray Dry 제조 공정도



그림 52. 분무공정 사진

표 82. 분무건조 배합비

시료	배합비(%)		
	미강효소분해물액	소금	말토덱스트린
A	100	-	-
B	95	5	-
C	90	-	10
D	85	5	10

- A(효소분해물여과액 100%)의 경우 분말이 잘 이루어지지 않고 SD 기계 벽과 분말 수집용기에 달라붙음.
- B(효소분해물여과액 95% + 소금 5%)의 경우 분말이 잘 이루어지지 않고 SD 기계 벽과 분말 수집용기에 달라붙어 A와 큰 차이를 보이지 않음.
- C(효소분해물여과액 90% + 말토덱스트린 10%)의 경우 분말이 만들어 지나 SD 배관 및 분말 수집용기에 달라붙음.
- D(효소분해물여과액 85% + 소금 5% + 말토덱스트린 10%)의 경우 분말이 잘 만들어져 분무 건조 시 배합비로 알맞음.
- 부형제로 소금과 말토덱스트린의 양을 증가시키면 분말화는 잘 되지만 상대적으로 효소분해물 양은 줄어들어 전체적인 품질이 낮아지므로 최대량을 소금 5%, 말토덱스트린 10%로 함.

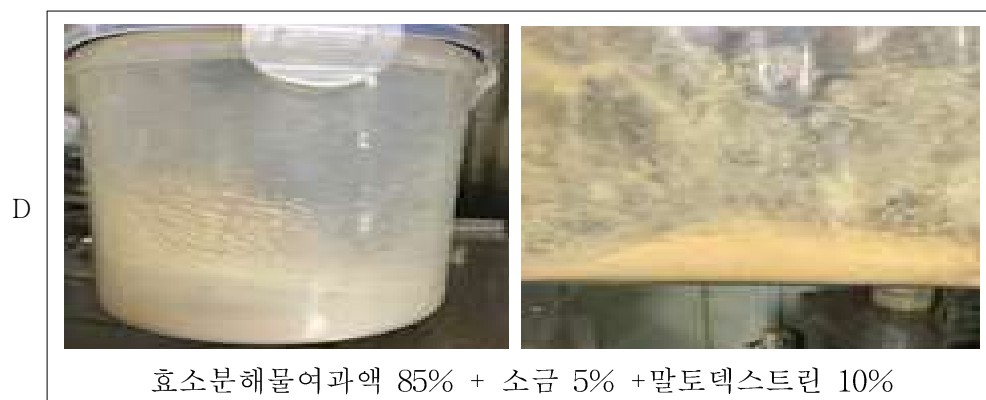
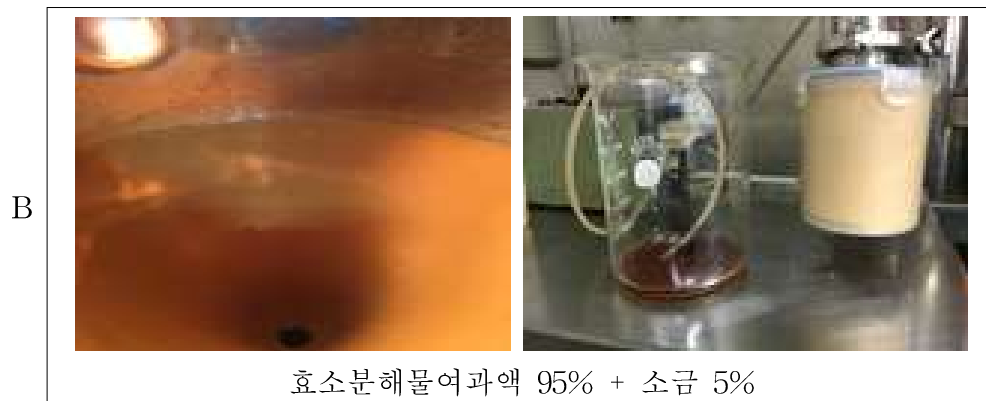


그림 53. 분무건조 배합비별 제품 사진

(나) 진공건조 테스트

- 가열하여 효소를 실활시킨 미강효소분해물액을 히팅맨틀(Glas-Col, HMIC-F500)을 이용하여 감압농축으로 Brix 75.0±1.0%로 농축하여 진공건조기(JEIO, OV-12)이용하여 온도 65~70℃에서 24시간 건조한 후 그 분말을 분쇄기로 분쇄하여 제품화 함.

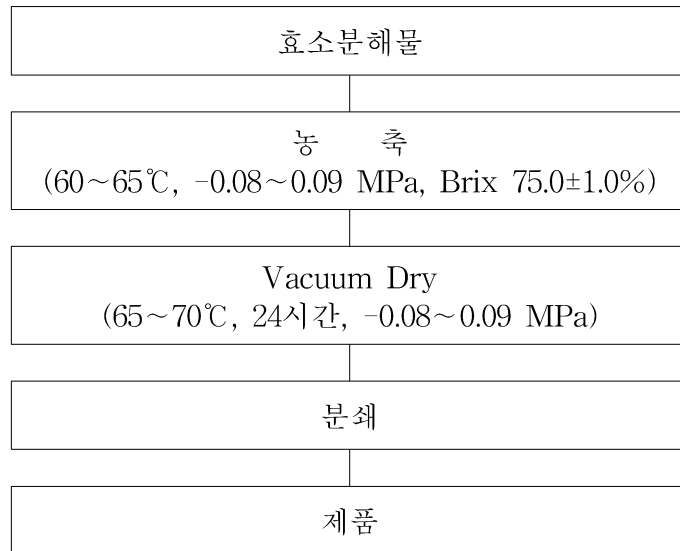


그림 54. Vacuum Dry 제조 공정도



1. 농축1



2. 농축2



3. Vacuum Dry 1



4. Vacuum Dry 2



5. Vacuum Dry 3



6. 분쇄 전



7. 분쇄



8. 제품

그림 55. Vacuum Dry 제조 공정

(3) 미강효소분해물의 각 제형별 일반성분

- VD와 SD의 분말화 공정에 따른 염도, 수분, TN 함량은 관능적 품질과 밀접한 관련이 있어 조미소재로써 적합한 분말화 공정을 검토하기 위해 분석을 실시함.

표 83. 효소분해물의 각 제형별 일반성분

	w/w%		
	NaCl	moisture	TN
SD	35.29	3.50	2.75
VD	43.14	4.80	4.30

- 염도는 VD가 43.14%로 SD 35.29%에 비해 약 1.2배 높았음. 수분은 SD가 VD에 비해 더 적었는데 이는 분말화 공정의 온도차이가 100℃이상 나기 때문으로 사료됨. TN함량은 VD가 SD에 비해 약 1.6배 높은 4.30%였음.

- 분말공정은 VD가 SD에 비해 TN함량이 높아 감칠맛을 내는 조미소재로써 더 적합하다고 판단됨.

## 5절 미강효소 분해물 및 조미소재의 기능성 평가

### 1. 미강효소분해물과 액상 형태의 조미소재 시료의 품질특성 분석

가. 미강효소분해물 시료의 SDS-PAGE

- Scale up 공정을 통하여 제조된 효소분해물과 농축액 시료의 단백질 분해 정도 및 펩타이드 패턴을 확인하기 위하여 단백질 전기영동을 시행함.
- 전기영동은 1차년도와 동일한 방법으로 시행함.

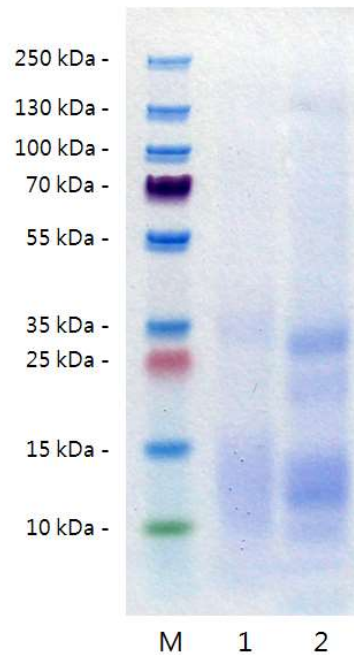


그림 56. 효소분해 시료의 SDS-PAGE  
M: size marker, 1: 효소분해물, 2: 농축액

- 효소분해 시료의 SDS-PAGE 결과 효소분해물은 10~15 kDa과 약 35 kDa에서 낮은 농도로 끌리는 듯한 형태의 펩타이드가 검출됨. 효소분해물의 농축액은 좀 더 뚜렷한 band 형태를 나타내면서 10~15 kDa 사이와 25~35 kDa 사이에 주요 band가 형성되었으며, 15~25 kDa 사이와 15 kDa 이하에서 minor band들이 나타남.

- 효소분해물과 농축액의 주요 펩타이드 band 패턴은 유사한 것으로 보이며, 다만 농축 공정을 통한 농도 증가에 의하여 농축액 시료의 펩타이드 패턴이 뚜렷해진 것으로 생각됨.
- 큰 분자량의 단백질은 나타나지 않으므로 분해 과정을 통하여 미강과 쌀 단백질이 유리 아미노산 및 저분자 펩타이드로의 분해가 상당히 이루어진 것으로 확인됨.

나. 효소분해 시료의 관능평가

- Scale up 효소분해 시료의 관능평가는 매일식품(주)과 식품산업연구센터 연구원 중 관능평가에 훈련된 12명을 선정하여 색, 향, 감칠맛, 종합 기호도에 대해 7점 척도 법으로 평





가함. 1점으로 갈수록 기호도가 낮고, 7점으로 갈수록 기호도가 높아지는 것으로 평가함.

표 84. 효소분해 시료의 관능 평가

시료	색	향	감칠맛	종합 기호도
효소분해물	5.67±1.03*	5.17±0.75	5.83±0.41	5.50±0.84
농축액	4.33±0.52	5.00±0.89	5.67±1.03	5.00±1.10

\*평균±표준편차(n=12). 1점, 아주 싫음; 3점, 보통; 5점, 아주 좋음.

표 85. 효소분해 시료의 관능적 묘사분석

효소분해 시료	
효소분해물	농축액
	
맛이 담백하며 순수한 감칠맛이 느껴짐	감칠맛과 풍미는 좋은 편이나 맛의 조화도가 다소 떨어짐

- 평가항목 중 색은 농축액의 탁도로 인하여 효소분해물이 높은 점수를 얻었으며, 향과 감칠맛 항목은 농축액에 비해 효소분해물이 근소하게 높은 점수를 받음. 종합 기호도는 효소분해물 5.50점, 농축액 5.00점으로 효소분해물이 더 높은 점수를 받음.

- 패널 평가에서 효소분해물은 순수한 감칠맛이 강하게 느껴진 반면, 농축액은 감칠맛 외에 다른 풍미가 느껴지면서 오히려 감칠맛이 간섭을 받아 조화도가 떨어진다는 의견이었음. 그러나 두 시료 모두 감칠맛 소재로서 우수한 특성이 발견되는 것으로 확인됨.

#### 다. 효소분해 시료의 나트륨 저감 효능

- Scale up 공정으로 제조된 효소분해물과 농축액은 감칠맛이 강한 소재로서 식품 가공이나 조리에 이용 시 짠맛 증강 효과를 나타내어 소금 첨가량을 줄일 수 있음. 따라서 두 시료의 짠맛 증강 효과를 통한 나트륨 저감 효능을 평가하고자 함.

- 나트륨 저감 효능 평가는 훈련된 식품산업연구센터 직원 12명이 NaCl 표준용액에 대한 표준 짠맛 강도를 습득한 후 시험용액의 짠맛강도를 측정하여 평가함.

- NaCl 표준용액의 짠맛 강도는 0.6% NaCl 용액 0.6점, 0.8% NaCl 용액 0.8점, 1.0% NaCl 용액 1.0점, 1.2% NaCl 용액 1.2점, 1.4% NaCl 용액 1.4점, 1.6% NaCl 용액 1.6점으로 하였음.

- 효소분해물은 짠맛을 인지할 수 있는 적정 농도인 5%, 7%, 10%로 준비하였고, 농축액

은 4%, 5%, 6%로 준비하여 각 농도에 대한 짠맛 강도를 평가함. 짠맛 강도 평가 후 동일한 짠맛 강도에서 NaCl 표준용액과 농도별 효소분해 시료의 나트륨 함량을 측정하여 나트륨 저감율(%)을 계산함.

$$\text{나트륨 저감율(\%)} = [1 - (\text{시험용액의 나트륨함량} \div \text{표준용액의 나트륨함량})] \times 100$$

표 86. 효소분해 시료의 나트륨 저감율

시료	나트륨 함량(%)	농도(%)	짠맛 강도	나트륨 함량(mg%)		나트륨 저감율(%)
				표준용액*	시험용액	
효소분해물	5.74	5.0	0.78	313.10	287	8.34
		7.0	1.10	439.67	401.8	8.61
		9.0	1.40	559.58	516.6	7.68
농축액	6.83	4.0	0.85	339.75	273.2	19.59
		5.0	1.08	433.01	341.5	21.13
		6.0	1.32	526.27	409.8	22.13

\*시험용액과 동일한 짠맛 강도에서 표준용액의 나트륨 함량

- 효소분해물의 경우 7.68~8.61% 수준의 나트륨 저감율을 나타내었으며, 농도 7%에서 가장 높은 저감율을 나타냄. 농도 의존적인 경향은 나타나지 않음.
- 농축액의 경우 농도 의존적으로 나트륨 저감율이 증가하여 19.59~22.13%의 높은 저감율을 나타냄. 감칠맛 성분인 glutamic acid와 풍미에 영향을 주는 유리 아미노산 함량이 효소분해물에 비해 농축된 효과로서 짠맛 증강 효과를 높여주는 것으로 사료됨.

## 라. 효소분해 시료의 기능성분 분석

### (1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 분석

- 폴리페놀 화합물은 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones, lignans, resveratols 등을 총칭하며, 식물계에 널리 분포되어 있음. 폴리페놀에 존재하는 다수의 히드록실기(-OH)는 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가지고 있어 항산화 효과 및 항암, 항염 효과가 뛰어남.

- 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로 자연계에 널리 분포하고 있으며, 활성산소종을 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있음.

- 미강에는 페놀 화합물이 다량 존재하며 쌀의 기능성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려짐. 본 연구에서는 미강을 원료로 제조된 효소분해 시료에서 기능성 성분으로서 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정하고자 함.

- 시료의 전처리를 위하여 효소분해물과 농축액 20 mL에 에틸아세테이트 20 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 에틸아세테이트 분획층을 수거함.

남은 잔사에 에틸아세테이트를 넣어 2회 반복 추출한 후 회수된 에틸아세테이트 추출물을 감압·농축한 다음 80% 메탄올 10 mL로 정용하여 분석 시료로 사용함.

- 총 폴리페놀의 측정은 Folin-Denis 법을 변형하여 시행함. 농도별로 희석한 시료 50  $\mu$ L에 2% sodium carbonate 1 mL를 가하고 50% Folin-Ciocalteu 시약 50  $\mu$ L를 혼합하여 30분 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정함.

- 총 플라보노이드의 측정은 시료 70  $\mu$ L를 50% ethanol 430  $\mu$ L에 희석하여 5% sodium nitrite 50  $\mu$ L를 혼합 후 상온에서 1시간 동안 방치함. 그 다음 10% aluminium nitrate 50  $\mu$ L를 가하여 상온에서 6분 동안 다시 방치한 후 1N NaOH 500  $\mu$ L를 넣고 510 nm에서 흡광도를 측정함.

표 87. 효소분해 시료의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

시료	총 폴리페놀(mg%)	총 플라보노이드(mg%)
효소분해물	61.36	26.27
농축액	114.84	71.92

- 효소분해물과 농축액의 총 폴리페놀은 각각 61.36 mg%, 114.84 mg%이며, 총 플라보노이드 함량은 26.27 mg%, 71.92 mg%를 나타냄.

- 쌀에서 페놀 화합물은 백미에는 8.56 mg%, 현미에는 33.8 mg%가 존재한다고 알려져 있으므로 효소분해 시료의 폴리페놀 함량은 비교적 높은 편이며, 폴리페놀 성분들에 의한 효소분해 시료의 건강 기능성을 기대할 수 있을 것으로 사료됨.

## (2) Ferulic acid 및 coumaric acid 함량 분석

- 미강의 주요 페롤산은 ferulic acid와 coumaric acid로 알려져 있으며, 효소분해 시료에서 2종의 페롤산 함량을 분석하고자 함.

- 시료는 총 폴리페놀 분석을 위한 전처리 시료를 사용하여 1차년도에 설정된 HPLC 분석 조건을 이용하여 분석을 시행함.

표 88. 효소분해 시료의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량

시료	함량(mg%)	
	Ferulic acid	Coumaric acid
효소분해물	0.61	0.27
농축액	1.24	0.64

- Ferulic acid와 coumaric acid의 함량은 효소분해물에서 각각 0.61 mg%, 0.27 mg%이며, 농축액에서는 각각 1.24 mg%, 0.64 mg%를 나타내어 농축액 시료에서 2배 이상 높은 함량을 나타냄.

- 그러나 1차년도 평가 시료(ferulic acid 1.8~4.7 mg%, coumaric acid 0.6~1.2 mg%)에 비해 비교적 낮은 함량을 나타내어 이러한 결과는 효소분해 공정의 변화에 따른 영향으로 생각됨.

마. 효소분해 시료의 항산화 효능 평가

- 활성 산소종은 대부분의 전자운반 과정 혹은 에너지대사 과정 중 불완전하게 환원되거나 cytokine 등 다양한 작용의 자극에 의해 생성됨. 정상적인 경우에는 체내에 존재하는 항산화 시스템에 의해 활성 산소종이 제거되지만 이 시스템의 작동이 원활하지 못하면 세포가 산화적 손상을 받게 됨.

- 최근 심혈관계질환, 노화 및 동맥경화 등에 활성산소가 관여한다는 사실들이 밝혀지면서 항산화 시스템을 유지하기 위한 항산화 소재 개발 및 기능성 식품의 이용이 활발해지고 있음.

- 본 연구에서 개발된 효소분해 시료의 생리활성으로 항산화 효능을 평가하기 위하여 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정함.

(1) DPPH 라디칼 소거능 평가

- 항산화 활성 측정 방법 중 하나인 DPPH법은 항산화 활성을 가지는 물질이 DPPH 유리 라디칼에게 전자를 공여해줌으로써 유리 라디칼이 소거되고 이때 탈색이 일어나는 원리를 이용하여 시료의 항산화 능력을 측정하는 방법으로서 항산화 활성 측정에 널리 사용되고 있는 방법임.

- 실험 방법은 1차년도와 동일하게 시행함.

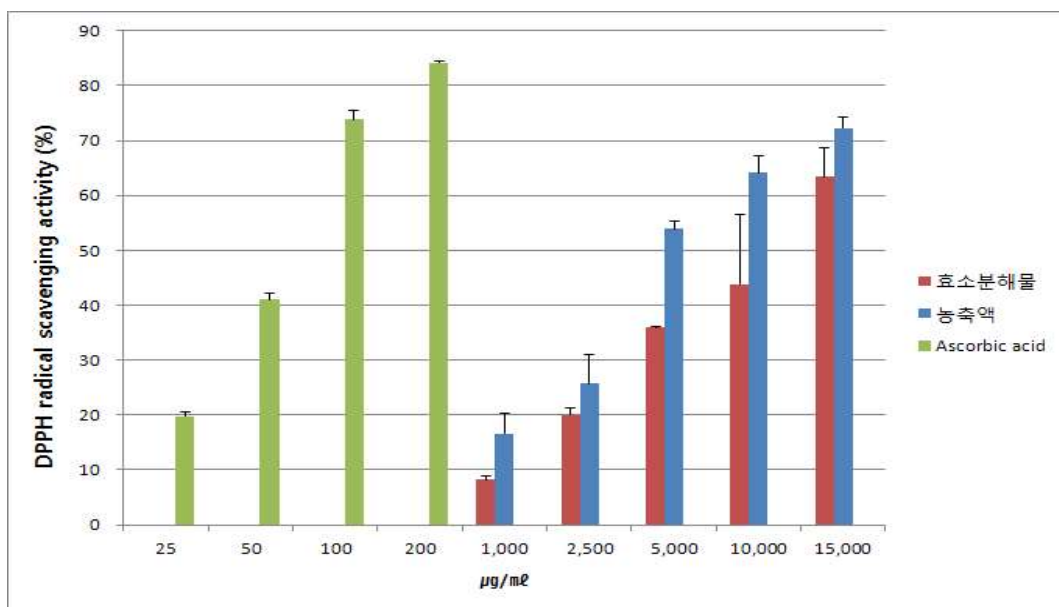


그림 57. 효소분해물과 농축액의 DPPH 라디칼 소거능

- Scale up 효소분해 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냄. 각각의 농도에서 농축액이 효소분해물에 비해 활성이 더 높게 나타남.

- 50%의 DPPH 라디칼을 소거하는데 필요한 시료 농도를 50% DPPH scavenging concentration(DPPH SC50)으로 표시하며, 효소분해물에서 DPPH SC50은 11.57 mg/mL, 농축액은 4.65 mg/mL를 나타냄.

(2) ABTS 라디칼 소거능 평가

- ABTS 라디칼 소거능은 산화유도제인 potassium persulfate와의 반응에 의해 형성된 ABTS 양이온이 시료 중의 항산화 물질에 의해 제거될 때 일어나는 탈색 반응을 이용하여 물질의 항산화 능력을 측정하는 방법임.

- 실험 방법은 1차년도와 동일하게 시행함.

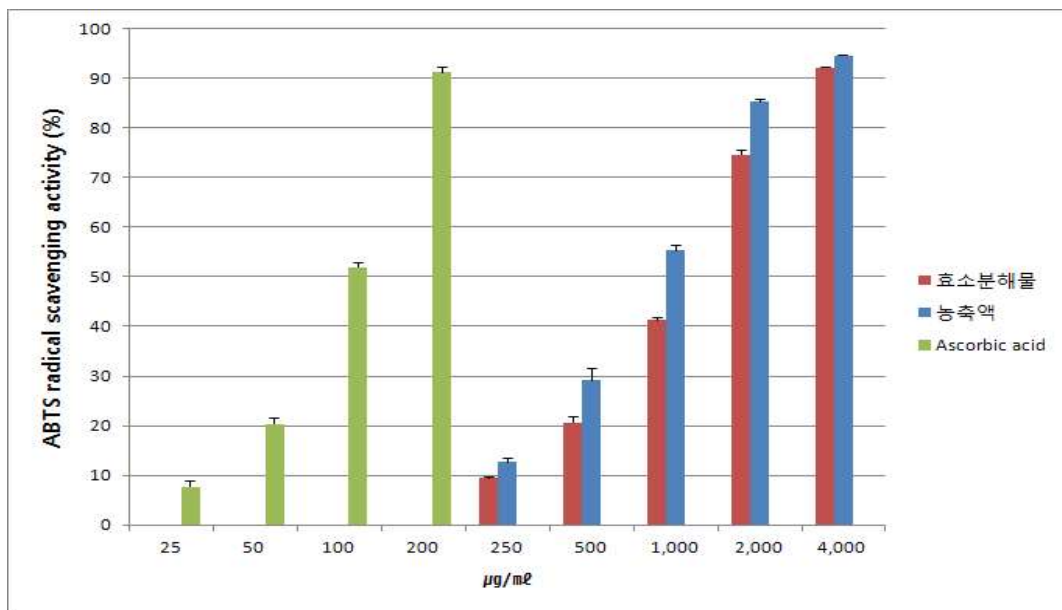


그림 58. 효소분해물과 농축액의 ABTS 라디칼 소거능

- 실험 결과 효소분해 시료의 ABTS 라디칼 소거능은 DPPH 라디칼 소거능과 유사하게 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냄. 동일 시료 농도에서 DPPH에 비해 ABTS 라디칼 소거능이 더 높게 나타남. 이는 ABTS는 DPPH와 같은 라디칼이지만 DPPH는 free 라디칼이며 ABTS는 cation 라디칼이라는 점에서 차이가 나며, 항산화 물질에 따라 두 라디칼에 결합하여 제거하는 능력에서 차이가 나는 것으로 생각됨.

- 50%의 ABTS 라디칼을 소거하는데 필요한 시료 농도를 50% ABTS scavenging concentration(ABTS SC50)으로 하는데, 효소분해물에서는 1.26 mg/mL, 농축액은 0.90 mg/mL를 나타내어 DPPH 라디칼 소거능 결과와 유사하게 농축액의 활성이 더 우수하게 평가됨.

- 효소분해 시료의 항산화활성은 폴리페놀 성분에서 상당히 발현되는 것으로 추정됨.

바. 효소분해 시료의 항암활성 평가

- 식생활의 서구화 및 외식의 증가에 따라 암, 뇌혈관질환, 심장질환 등이 주된 사망원인으로 보고되고 있으며, 특히 암은 사망원인 1위를 차지하고 있음. 최근 자연식품 중에서 기

능성 물질을 섭취하려는 요구의 증가와 함께 천연 항산화물질과 같은 생리활성 물질의 개발이 진행되고 있음.

- 본 연구에서 개발된 효소분해 시료의 생리활성으로서 항암 활성을 평가하기 위하여 인체 위암, 결장암, 간암 세포를 대상으로 증식 억제능을 평가함.

- 암세포 배양 : 암세포 성장 억제효과 측정을 위한 AGS 인체 위암 세포(AGS 21739 human gastric adenocarcinoma cell), HT-29 인체 결장암 세포(HT-29 30038 human colon carcinoma cell) 및 HepG2 인체 간암 세포(HepG2 88065 human hepatoblastoma cell)는 KCLB(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용함. AGS와 HT-29 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640(Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양함. HepG2 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 DMEM(Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양함. 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일마다 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 계대 배양하면서 실험에 사용함.

- 세포 생존율 측정(XTT assay) : 암세포 증식 정도는 XTT assay로 측정함. 배양된 위암 및 결장암 세포는 48 well plate에 well당 5×10<sup>4</sup> cells/mL가 되도록 0.5 mL씩 seeding하고 간암 세포는 48 well plate에 well당 6×10<sup>4</sup> cells/mL가 되도록 0.5 mL씩 seeding하여 incubator에서 24시간 동안 부착한 후 배지를 제거함. 암세포에 시료가 0~2,000 µg/mL 농도로 첨가된 배지 0.5 mL를 각각 처리하여 3일 동안 배양함. 배양 후, XTT-phenazine methosulfate(PMS) 용액(1 mg XTT-10 µg PMS/mL of media without phenol) 125 µL을 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 생성된 formazan을 microplate reader(MQX200R, BioTek Instruments, Windoski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정함. 배양 세포의 생존율은 시료가 첨가되지 않은 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였으며, 각 실험구의 결과 비교는 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의수준을 검정함.

(1) AGS 위암 세포 증식 억제

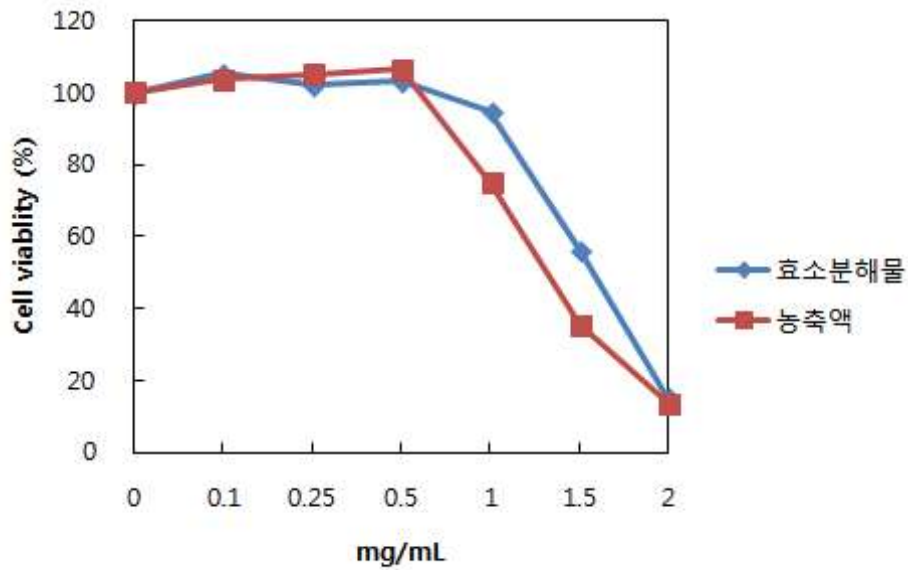


그림 59. 효소분해물과 농축액의 AGS 세포 증식 억제

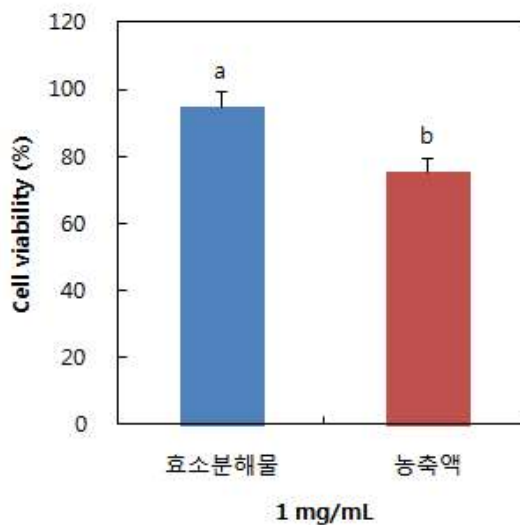


그림 60. 1 mg/mL 농도에서 효소분해물과 농축액의 AGS 세포 증식 억제능 비교

- 효소분해물과 농축액을 농도별로 처리하여 AGS 위암 세포에 대한 증식 억제 활성을 평가한 결과 무처리군의 세포생존도 100%를 기준으로 두 시료 모두 1, 1.5, 2 mg/mL 농도에서 농도의존적으로 위암 세포 증식 억제 효과를 나타냄.

- 1 mg/mL의 농도에서 효소분해물은 94.6%, 농축액은 75.2%의 위암 세포 생존율을 나타내어 농축액의 항암활성이 더 우수한 것으로 나타남. 그러나 2 mg/mL의 농도에서는 각각의 생존율이 15.1%와 13.8%로 큰 차이를 나타내지 않음.

(2) HT-29 결장암 세포 증식 억제

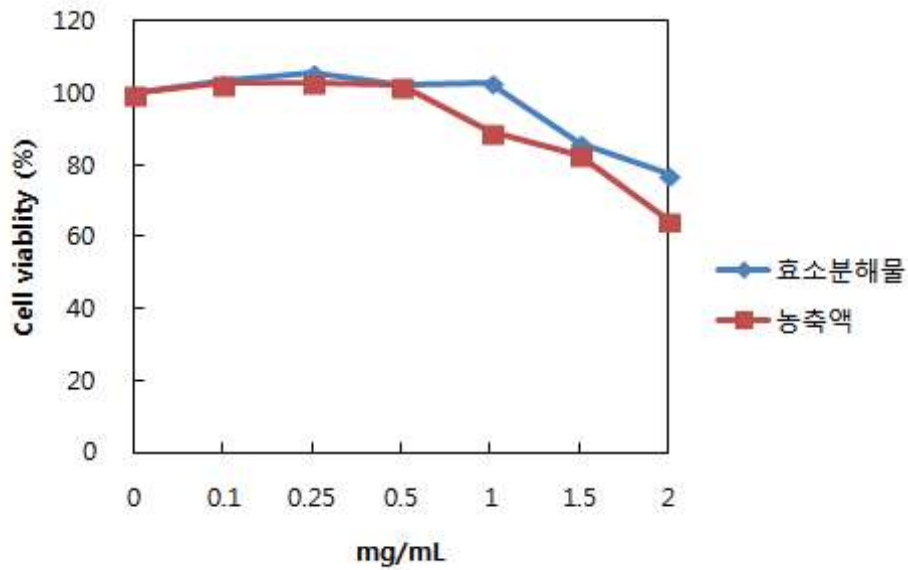


그림 61. 효소분해물과 농축액의 HT-29 세포 증식 억제

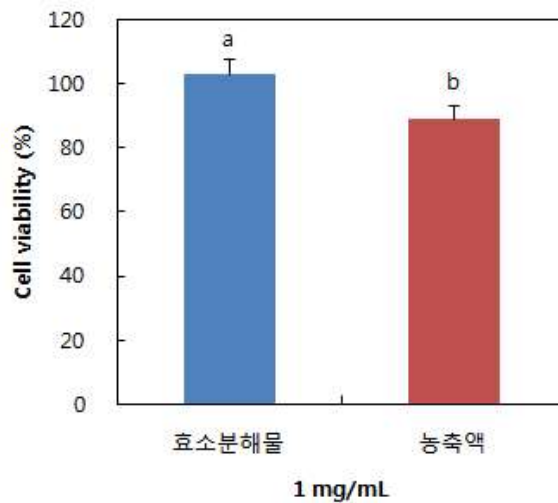


그림 62. 1 mg/mL 농도에서 효소분해물과 농축액의 HT-29 세포 증식 억제능 비교

- 효소분해물과 농축액을 위암 세포와 동일한 농도로 처리하여 HT-29 결장암 세포에 대한 증식 억제 활성을 평가함. 위암 세포와 다소 다르게 효소분해물은 1.5 mg/mL 이상의 농도에서, 농축액은 1 mg/mL 이상의 농도에서 농도의존적으로 암세포 증식 억제 효과를 나타냄.

- 1 mg/mL의 농도에서 효소분해물은 103.1%, 농축액은 89.2%의 결장암 세포 생존율을 나타내어 농축액의 항암활성이 더 우수하였으나, 위암 세포에 비해 생육 저해 활성은 낮게 나타남.

- 효소분해물과 농축액의 농도에 따른 결장암 세포 생존율은 1.5 mg/mL 농도에서 각각



86.3%와 82.9%, 2 mg/mL 농도에서 각각 77.7%와 64.7%를 나타냄.

(3) HepG2 간암 세포 증식 억제

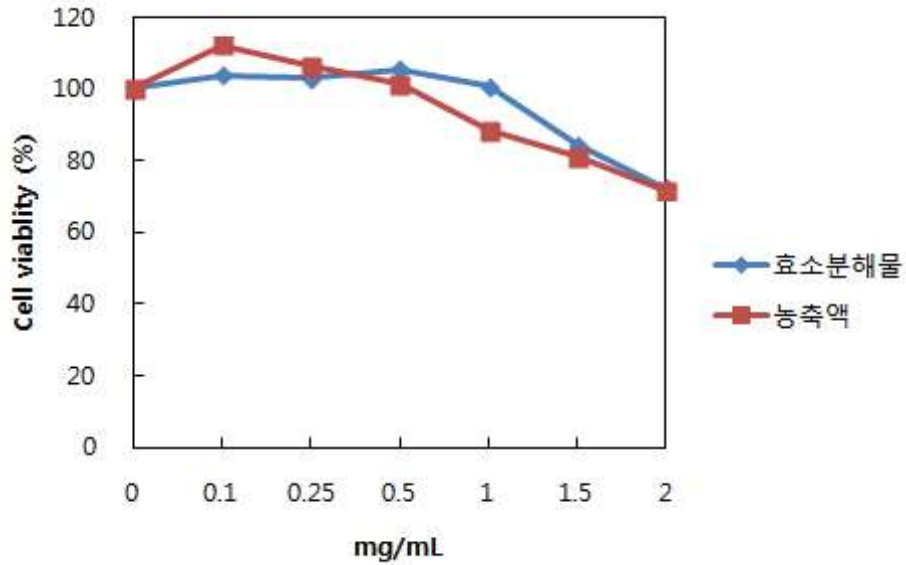


그림 63. 효소분해물과 농축액의 HepG2 세포 증식 억제

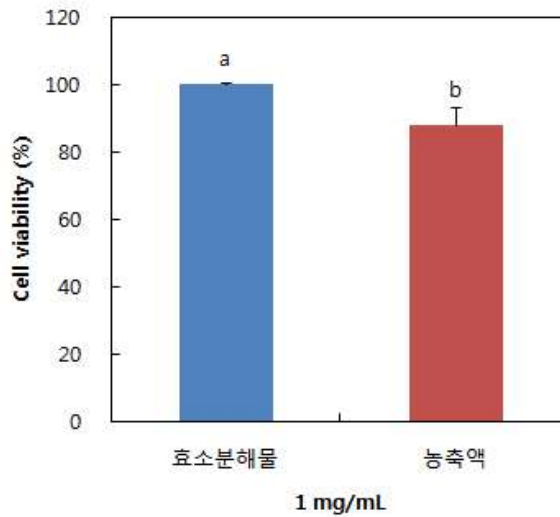


그림 64. 1 mg/mL 농도에서 효소분해물과 농축액의 HepG2 세포 증식 억제능 비교

- 효소분해물과 농축액을 위암 및 결장암 세포와 동일한 농도로 처리하여 HepG2 간암 세포에 대한 증식 억제 활성을 평가함. 결장암 세포와 유사하게 효소분해물은 1.5 mg/mL 이상의 농도에서, 농축액은 1 mg/mL 이상의 농도에서 농도의존적으로 암세포 증식 억제 효과를 나타냄.

- 1 mg/mL의 농도에서 효소분해물은 100.5%, 농축액은 88.3%의 간암 세포 생존율을 나타내어 농축액의 항암활성이 더 우수하였으나, 그 이상의 농도에서 효소분해물과 농축액의

처리에 의한 암세포 생존율은 1.5 mg/mL 농도에서 84.3%와 81.3%, 2 mg/mL 농도에서 각각 72.4%와 71.6%를 나타내어 시료 간에 큰 차이를 나타내지 않음.

- 위암(AGS), 결장암(HT-29), 간암(HepG2) 세포의 3종의 암세포에 대한 효소분해물과 농축액의 암세포 증식 억제능을 비교한 결과 효소분해물은 1 mg/mL 이상에서 위암 세포를, 1.5 mg/mL 이상에서 결장암과 간암 세포의 증식을 억제하였으며, 농축액은 1 mg/mL 이상에서 3종의 암세포 증식을 모두 억제하는 것으로 나타남.

- 농축액 시료는 미강 유래의 폴리페놀 성분 등이 효소분해물에 비해 다량 함유되어 항암 활성이 더 우수한 것으로 추정됨.

#### 마. 효소분해 시료의 항염증활성 평가

- 염증은 감염으로 인한 인체 조직손상을 막는 방어기전으로 발진, 발열, 통증과 같은 증상을 수반함. 그러나 염증반응이 장기간 지속적으로 반복될 경우 신경퇴행성질환과 같은 각종 만성질환과 암을 유발할 수 있음.

- 대식세포는 인체 내 면역반응에서 일산화질소(NO)와 프로스타그란딘(PG)과 pro-inflammatory cytokine 등과 같은 염증매개물질의 생성에 관여하고 이를 조절함. 염증매개물질은 염증반응을 유도하며, 숙주의 면역반응이 적절하게 대응하지 못할 경우 염증성 질환을 유발함.

- Nitric oxide synthase(NOS)에는 neuronla NOS, endothelia NOS, inducible NOS(iNOS)가 있는데 이 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며, 과도한 생성은 조직손상과 유전자 변이 등을 일으킴. 따라서 염증반응으로부터 생성되는 NO와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있음.

- 본 연구에서 효소분해 시료의 생리활성으로 항염증활성을 평가하기 위하여 대식세포에 대한 세포독성을 측정하고 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 LPS로 유도된 대식세포의 NO 생성 억제 효과를 확인하고자 함.

#### (1) 세포독성 측정

- 대식세포로부터 염증매개 물질의 억제효과는 세포독성으로 인해 RAW 264.7 세포가 사멸되는 것에 의해서도 나타날 수 있으므로 RAW 264.7 세포에 미치는 시료의 독성을 알아보기 위하여 XTT assay를 시행함.

- 세포 배양 : 항염증활성 측정을 위한 RAW 264.7 세포(40071 mouse male cell)는 KCLB(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용함. RAW 264.7 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 DMEM (Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양함. 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일마다 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 계대 배양하면서 실험에 사용함.

- 세포 독성 평가(XTT assay) : 시료에 대한 세포 독성은 XTT assay로 측정함. 배양된 세포는 48 well plate에 well당 5×10<sup>4</sup> cells/mL가 되도록 0.5 mL씩 seeding한 후 incubator에서 24시간 동안 부착한 후 배지를 제거함. 세포에 시료가 0~500 µg/mL 농도로 첨가된 배지 0.5 mL를 각각 처리하여 3일 동안 배양함. 배양 후, XTT-phenazine methosulfate(PMS) 용액(1 mg XTT-10 µg PMS/mL of media without phenol) 125 µL을

첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 생성된 formazan을 microplate reader(MQX200R, BioTek Instruments, Windoski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정함. 배양 세포의 생존율은 시료가 첨가되지 않은 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였으며, 각 실험구의 결과 비교는 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 유의수준을 검정함.

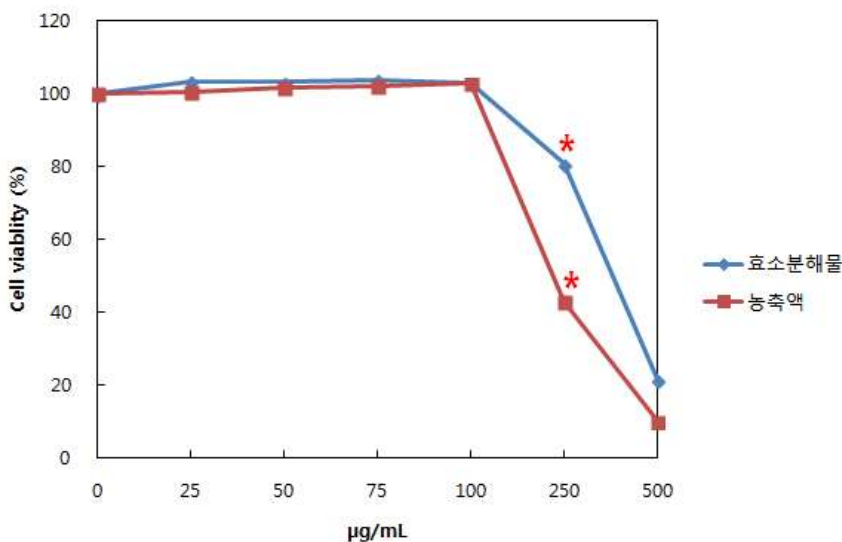


그림 65. 효소분해물과 농축액이 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

- 효소분해물과 농축액을 25, 50, 75, 100, 250 및 500 µg/mL의 농도로 첨가하여 세포 생존율을 측정된 결과 100 µg/mL 농도까지 두 시료 모두 독성을 나타내지 않았으나, 250 µg/mL 이상의 농도에서는 농도의존적으로 세포 생존율이 저하됨.
- 따라서 항염증활성 평가를 위한 시료의 농도는 100 µg/mL까지로 결정하여 수행함.

## (2) Nitric oxide 생성 억제 효과

- Nitric oxide(NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서 L-arginine을 기질로 하여 nitric oxide synthase에 의해 생성되며, 신경계, 면역계, 심장혈관계에 있어서 중요한 전달 물질로 신경독성 및 신경보호성의 기능을 동시에 나타냄.

- 그러나 병리적인 조건 하에서 NO 발현량의 과도한 증가는 산화적 스트레스의 유발을 통해 염증을 유발하게 되고 조직의 손상을 가져오게 됨.

- LPS(lipopolysaccharide)는 세포 내 독소로서 대식세포를 자극하여 다양한 신호기작을 활성화시킴으로서 NO와 같은 염증 매개 물질을 분비하여 염증을 유발시킴.

- 효소분해물과 농축액의 항염증 활성을 평가하기 위하여 LPS로 자극을 유도한 RAW 264.7 세포에서 농도별로 시료를 처리한 후 NO 생성량의 변화를 분석함.

- NO 함량 측정 : RAW 264.7 세포를 48 wells plate에  $1 \times 10^4$  cells/well의 세포를 분주한 후 24시간 배양한 다음 배지를 제거하고 0.5 µg/mL LPS와 시료가 함유된 배양액을 첨가하여 3일 동안 배양함. NO의 양을 측정하기 위하여 배양액 50 µL와 Griess reagent[1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine

dihydrochloride in water] 50  $\mu\text{L}$ 를 반응시켜 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정함. NO 함량은  $\text{NaNO}_2$  표준곡선을 작성하여 측정함. 대조군은 시료대신 배지만을 사용하여 비교하였으며 각 실험구의 결과 비교는 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 유의수준을 검정함.

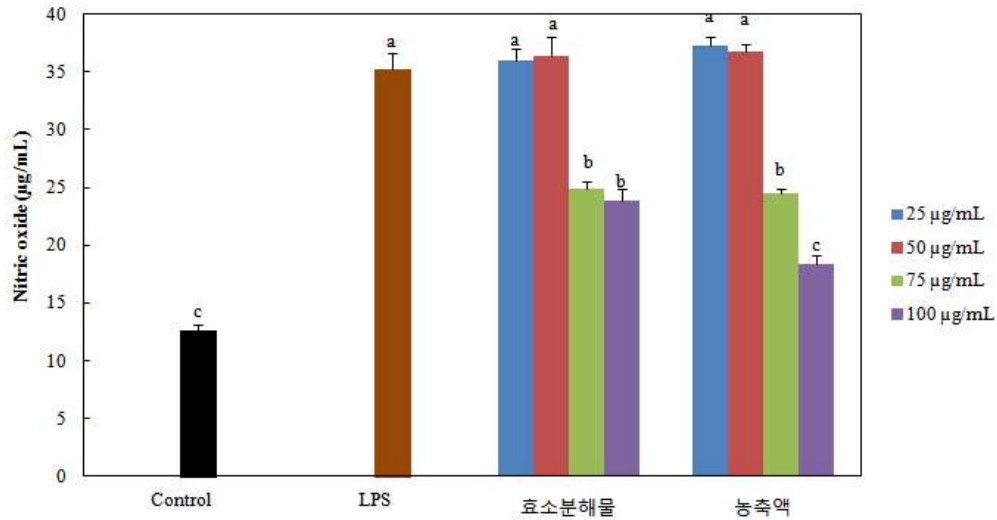


그림 66. RAW 264.7 세포에서 NO 생성량에 대한 효소분해물과 농축액의 영향

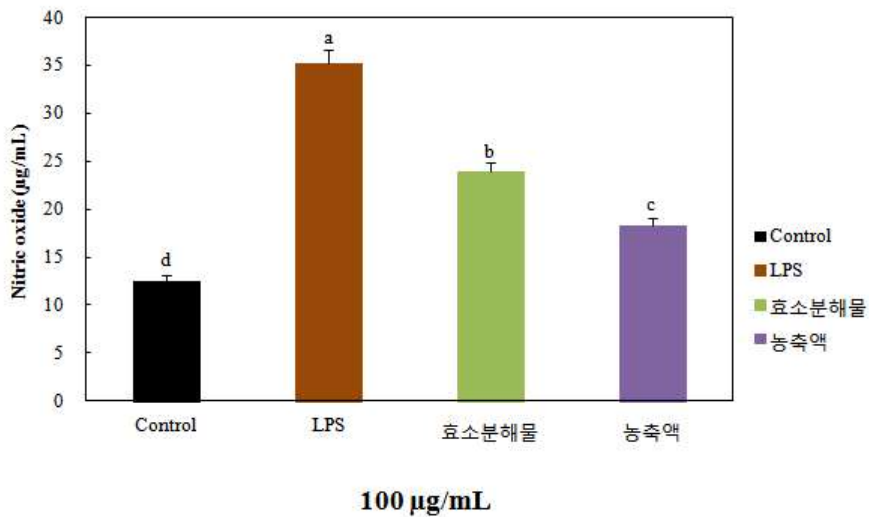


그림 67. 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 효소분해물과 농축액의 NO 생성량 비교

- 실험 결과 효소분해물과 농축액은 50  $\mu\text{g/mL}$  농도 이하에서는 NO 생성량이 LPS 처리구와 유사한 수준이었으나, 75  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타남.

- 특히 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 농축액 시료(18.4  $\mu\text{g/mL}$ )는 LPS 처리군(35.2  $\mu\text{g/mL}$ )에 비해 NO 생성량이 52%까지 감소하였으며, 효소분해물에 비해 농축액의 NO 생성 억제 효과

가 더 우수하였음.

- 본 연구 결과를 통해 효소분해물과 농축액은 염증반응에 관여하는 NO의 생성을 억제 시킴으로써 항염증효과가 있는 것으로 사료됨.

#### 사. 효소분해 시료의 Angiotensin-converting enzyme(ACE) 저해 활성

- 고혈압은 순환기계통 질병의 근원이 되는 만성 퇴행성 질환으로 노인 인구가 증가할수록 발병율이 증가하고 있음. 30대 남성의 1/3, 60세 이상은 절반 이상이 고혈압을 가지고 있을 만큼 유병율이 높아 고혈압의 치료 및 예방이 중요시 되고 있음.

- 고혈압의 원인으로는 renin-angiotensin 계가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있으며, angiotensin I converting enzyme(ACE)이라는 효소가 관여하고 있음. 생체 중에 존재하는 불활성형의 angiotensin I은 ACE에 의해 혈관벽 수축 작용이 있는 angiotensin II로 전환되며, 생체 내 혈압강하 인자인 bradykinin을 불활성화시킴으로써 혈압이 상승하게 됨.

- ACE 억제제로서 사용되는 화학합성약품이 여러 부작용을 나타내는 것으로 보고되면서 천연 항고혈압 활성제가 연구되고 있음. 본 연구에서 효소분해 시료의 생리활성으로 ACE 저해 활성이 있는지 평가하고자 함.

- ACE 저해효과는 angiotensin-converting enzyme kit-WST(dojindo, A502-10)를 이용하여 측정함. 3-hydroxybutylyl-Gly-Gly-Gly를 기질(20 µL)로 하여 ACE 효소 20 µL와 시료 20 µL를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킴. 반응액에 working solution 200 µL를 처리하고 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정함. 각 시료의 ACE 저해효과는 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타냄. 대조군은 시료대신 증류수를 사용하여 비교하였으며 각 실험구의 결과 비교는 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의수준을 검정함.

$$\text{ACE inhibitory activity (\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

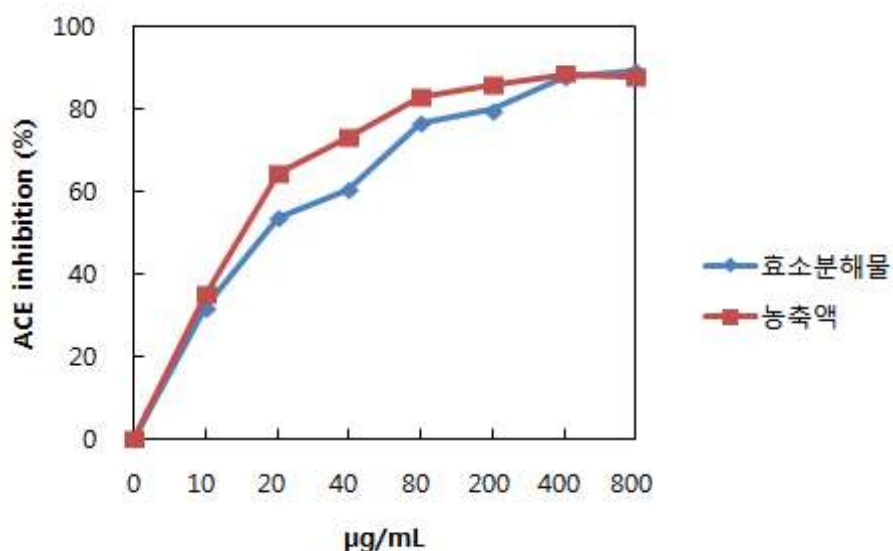


그림 68. 효소분해물과 농축액의 ACE 저해 활성

표 89. ACE 저해 활성에 대한 IC50

시료명		IC <sub>50</sub> (µg/mL)
대조구	Quercetin	7.5±0.1
실험구	효소분해물	16.5±0.2
	농축액	14.0±0.1

- 효소분해물과 농축액은 모두 농도 의존적으로 ACE 저해 활성이 증가하였으며 효소분해물의 IC<sub>50</sub>은 16.5 µg/mL, 농축액의 IC<sub>50</sub>은 14.0 µg/mL로 나타나 농축액의 ACE 저해 활성이 더 우수한 것으로 나타남.

- 다른 연구보고에서 헛개나무 물 추출물은 4 mg/mL의 농도에서 ACE 저해 활성이 75.8%로 나타났으며, 두충 추출물은 1 mg/mL의 농도에서 28.05%의 저해 활성을 나타냄. 32개 생약재 추출물에서 파고지의 ACE 저해 활성이 가장 높았으며, 10 mg/mL 농도에서 65.2%의 억제율을 나타냄.

- 이상의 천연소재들과 비교하여 본 연구에서 제조한 효소분해 시료의 ACE 저해 활성은 상당히 낮은 농도에서 나타나므로 심혈관계 질환을 개선시킬 수 있는 식품소재로서 가능성이 있을 것으로 사료됨.

#### 아. 효소분해 시료의 성분 분석

- 효소분해 시료의 제형화 및 제품화를 위하여 일반성분 분석 및 비타민과 무기질의 미량성분 분석을 시행함.

##### (1) 일반성분 분석

- Scale up 효소분해물과 농축액의 일반성분은 수분, 회분, 조단백, 조지방, 탄수화물, 열량 항목으로 분석함. 수분은 상압가열건조법으로, 회분은 550°C에서 회화한 후 측정하였으며, 조단백은 Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법을 이용하여 측정함. 탄수화물은 시료 100g 중에서 수분, 회분, 조단백, 조지방 함량을 감하여 얻은 양으로 표시함.

표 90. 효소분해 시료의 일반성분

시료	수분 (%)	조단백 (%)	조지방 (%)	회분 (%)	탄수화물 (%)	열량 (Kcal/100g)
효소분해물	71.79	7.91	0.21	13.26	6.83	65.84
농축액	49.30	17.72	0.37	17.43	15.18	155.48

- 효소분해물의 수분은 71.79%, 조단백 7.91%, 조지방 0.21%, 회분 13.26%, 탄수화물 6.83%를 나타냄.

- 농축액은 수분 49.30%, 조단백 17.72%, 조지방 0.37%, 회분 17.43%, 탄수화물 15.18%를 나타냄. 효소분해물에 비해 농축되어 수분이 적으며 다른 성분은 상대적으로 모두 증가하였으며, 특히 탄수화물과 조단백의 증가율이 높은 것으로 나타남.

(2) 비타민, 무기질 분석

- Scale up 효소분해 시료의 비타민 5종(Vit B1, Vit B2, 나이아신, Vit B6, Vit E)과 무기질 6종(Ca, K, Mg, P, Fe, Mn)을 분석함.

표 91. 효소분해 시료의 비타민 함량

시료	비타민 (mg%)				
	Vit B <sub>1</sub>	Vit B <sub>2</sub>	나이아신	Vit B <sub>6</sub>	Vit E
효소분해물	0.07	0.21	0.13	-	0.33
농축액	0.11	0.49	0.36	-	0.55

- 효소분해물과 농축액 모두 비타민 E, 비타민 B2, 나이아신, 비타민 B1 순으로 높은 함량을 나타냈으며, 비타민 B6는 검출되지 않음. 비타민 항목에 따라 농축액이 효소분해물에 비해 1.6~2.8배 더 높은 함량을 나타냄.

표 92. 효소분해 시료의 무기질 함량

시료	무기질 (mg%)					
	Ca	K	Mg	P	Fe	Mn
효소분해물	8.10	603.40	170.79	96.39	1.34	1.22
농축액	11.91	1,300.10	171.98	147.64	0.52	0.03

- 무기성분 분석결과 효소분해물과 농축액 모두 칼륨(K), 마그네슘(Mg), 인(P)의 순서로 함량이 높게 나왔으며, 칼슘(Ca), 철(Fe), 망간(Mn)은 비교적 낮은 함량으로 검출됨.

- 농축액에서 칼륨은 효소분해물에 비해 2배 이상 높은 함량을 나타내었으며, 칼슘과 인은 1.5배 정도 높은 함량을 나타냄. 반면 마그네슘은 유사한 함량을 나타내었으며, 철과 망간은 농축액 시료에서 더 낮게 검출됨. 이러한 차이는 농축 시 탈염공정에서 무기원소의 특성에 따라 함량의 변화가 다르게 발생한 것으로 추정됨.

## 2. 미강효소분해물 분말 시료의 품질특성 분석

### 가. VD와 SD분말의 SDS-PAGE

- 분말화 공정에 따른 제형 시료의 펩타이드 패턴을 확인하고 비교하기 위하여 단백질 전기영동을 시행함.
- 각 분말은 3배의 증류수를 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였으며, 전기영동은 상기와 동일한 조건으로 시행함.

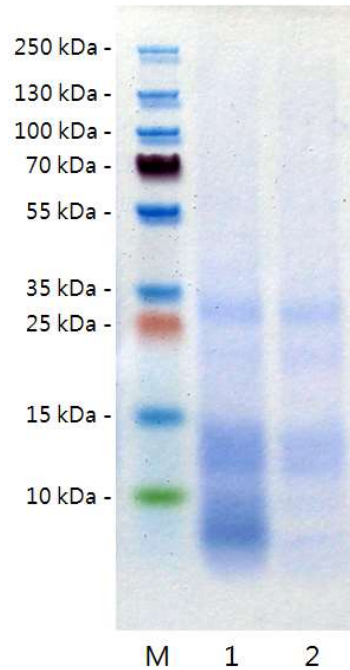


그림 69. 분말 시료의 SDS-PAGE

M: size marker, 1: VD 분말, 2: SD 분말

- 분말 제형 시료의 SDS-PAGE 결과 10 kDa 이상의 펩타이드 패턴은 두 시료가 유사하면서 VD 분말에 비해 SD 분말의 단백질 농도가 낮게 나타남. 10 kDa 이하에서는 SD 분말의 경우 펩타이드가 거의 없는 반면 VD 분말은 주요 band가 뚜렷하게 형성되었음.
- 농도의 차이는 공정에 따라 원료인 효소분해물의 배합 비율 차이에서 기인하며, 펩타이드 패턴의 차이는 분말화 공정의 차이로 나타나는 것으로 추정됨.

### 나. VD와 SD분말의 유리 아미노산 함량

- 분말화 공정의 차이에 따른 두 시료의 품질 특성을 분석하기 위하여 유리 아미노산 함량을 분석하고 비교하고자 함.
- 유리 아미노산을 분석하기 위하여 분말 0.2 g에 물 10 mL를 가하여 30분간 진탕하고 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 물층을 감압하여 농축한 잔사에 0.02 N 염산으로 정용하여 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과한 시료를 분석에 사용함.
- 분석방법은 상기와 동일한 조건으로 시행함.



표 93. 분말 시료의 유리 아미노산

Free amino acid (mg%)	VD 분말	SD 분말
Aspartic acid	1,012.28	832.79
Glutamic acid	1,270.83	1,020.06
Asparagine	0.00	0.00
Serine	545.58	401.68
Glutamine	0.00	0.00
Histidine	117.47	85.81
Glycine	251.55	190.33
Threonine	456.53	308.09
Arginine	81.16	47.32
Alanine	628.03	421.05
Taurine	26.59	0.00
GABA	53.92	49.99
Tyrosine	614.05	339.18
Valine	1,067.93	613.23
Methionine	321.26	196.34
Phenylalanine	488.26	304.81
Isoleucine	567.38	362.43
Leucine	879.08	478.26
Lysine	366.64	246.40
Proline	336.42	260.90
Total	9,084.96	6,158.67

- VD 분말과 SD 분말의 유리 아미노산 총 함량은 각각 9,084.96 mg%와 6,158.67 mg%를 나타냄.

- 두 시료 모두 감칠맛 성분인 glutamic acid와 aspartic acid의 함량이 높게 나타남. 감칠맛 성분은 VD 분말에서 전체 아미노산의 25%를, SD 분말에서는 전체 아미노산의 30%의 비중을 차지하여 감칠맛이 강한 소재로 추정됨.

- VD 분말에서는 쓴맛을 발현하는 valine과 leucine, isoleucine의 함량도 높게 검출되었으나, alanine, serine, threonine 등 단맛을 발현하는 아미노산의 함량도 비교적 높게 검출되어 다양한 풍미를 나타낼 것으로 생각됨.

- SD 분말에서도 valine, leucine, alanine, serine 등 맛의 발현에 기여하는 아미노산들의 함량이 고르게 분포함.

- 미강의 기능성 성분인 GABA의 경우 VD 분말에서는 53.92 mg%, SD 분말에서는 49.99 mg%를 나타냄.

다. VD와 SD분말의 관능 평가



- VD와 SD의 분말화 공정에 따라 펩타이드 패턴 및 유리 아미노산 함량이 다르게 나타나며, 이러한 특성은 관능적 품질과 밀접한 관련이 있음. 조미소재로서 적합한 분말화 공정을 비교·평가하기 위하여 관능 평가를 시행함.

- 관능 평가를 위하여 각 시료를 증류수에 염도 1%로 희석한 용액을 제조하여 상기의 방법과 동일하게 평가를 진행함.

표 94. 분말 시료의 관능 평가

시료	색	향	감칠맛	종합 기호도
VD 분말	6.00±0.63	5.17±1.33	5.67±0.52	5.83±0.75
SD 분말	5.83±0.75	4.33±0.82	5.00±1.10	4.33±0.82

표 95. 분말 시료의 관능적 묘사 분석

분말 제형 시료	
VD 분말	SD 분말
	
감칠맛이 좋으며 깔끔하고 이미, 이취가 없음	감칠맛이 다소 약하고 약간 느끼하며 후미가 좋지 않음.

- VD 시료는 색, 향, 감칠맛, 종합 기호도의 모든 항목에서 SD 시료보다 점수가 높게 나타남. 색에 대한 기호도는 차이가 크지 않았으나 패널 평가에서 VD 시료는 감칠맛이 좋고 이미·이취가 느껴지지 않은 반면, SD 시료는 감칠맛이 VD 시료에 비해 비교적 약하며 후미가 좋지 않은 것으로 나타남.

- 관능 평가 결과 SD 시료는 기호도가 낮은 결과를 나타내어 제품화에 부적합한 것으로 평가됨.

라. VD와 SD 분말의 나트륨 저감 효능

- 분말화 공정에 따른 각 시료의 짠맛 증강 효과를 통한 나트륨 저감 효능의 차이를 비교하고자 함. 평가 방법은 상기의 방법과 동일하게 시행함.

표 96. 분말 시료의 나트륨 저감율

시료	나트륨 함량(%)	농도(%)	짠맛 강도	나트륨 함량(mg%)		나트륨 저감율(%)
				표준용액*	시험용액	
VD 분말	18.94	1.5	0.73	293.11	284.1	3.08
		2.0	0.98	393.04	378.8	3.62
		2.5	1.25	499.63	473.5	5.23
SD 분말	17.28	1.5	0.67	266.47	259.2	2.73
		2.0	0.88	353.07	345.6	2.12
		2.5	1.10	439.67	432	1.74

\*시험용액과 동일한 짠맛 강도에서의 표준용액의 나트륨 함량

- VD 분말은 농도 의존적으로 나트륨 저감율이 증가함. 1.5% 농도에서 3.08%의 저감율에서 2.5% 농도에서는 5.23%의 저감율로 증가함.

- 반면 SD 분말은 농도 의존적으로 나트륨 저감율이 감소함. 1.5% 농도에서 2.73%의 저감율에서 2.5% 농도에서는 1.74%의 저감율로 감소하여 VD 분말과 상이한 경향을 나타냄.

- 그러나 두 분말 시료 모두 효소분해물(7.36~8.61%)과 농축액(19.59~22.13%)에 비해 비교적 낮은 나트륨 저감 효능을 나타냄.

#### 마. VD와 SD 분말의 기능성분 분석

##### (1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 분석

- VD와 SD 분말의 기능성분 함량을 비교하기 위하여 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 상기의 방법으로 분석을 시행함.

표 97. 분말 시료의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

시료	총 폴리페놀(mg%)	총 플라보노이드(mg%)
VD 분말	153.00	117.45
SD 분말	145.45	69.56

- VD 분말과 SD 분말의 총 폴리페놀은 각각 153.00 mg%, 145.45 mg%로 큰 차이를 나타내지 않았으나, 총 플라보노이드 함량은 각각 117.45 mg%, 69.56 mg%를 나타내어 시료 간 차이가 크게 나타남.

- 분말화 공정에 따라 각 기능 성분의 안정성이 다르게 나타나는 것으로 생각됨.

(2) Ferulic acid 및 coumaric acid 함량 분석

- VD 분말과 SD 분말의 ferulic acid와 coumaric acid의 함량을 비교하였으며, 분석 방법은 상기와 동일하게 시행함.

표 98. 분말 시료의 ferulic acid 및 coumaric acid 함량

시료	함량(mg%)	
	Ferulic acid	Coumaric acid
VD 분말	2.07	1.13
SD 분말	1.40	0.72

- VD 분말의 ferulic acid와 coumaric acid의 함량이(2.07 mg%, 1.13 mg%) SD 분말의 함량(1.40 mg%, 0.72 mg%) 보다 더 높은 것으로 나타남. SD 공정에서 효소분해물 원료의 함량이 더 적을 뿐만 아니라 고온 처리에 의하여 페룰산 성분의 손실이 발생한 것으로 추정됨.

바. VD와 SD 분말의 항산화 효능 평가

- 분말화 공정에 따른 VD와 SD 분말의 항산화 효능을 비교하기 위하여 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정함.

(1) DPPH 라디칼 소거능 평가

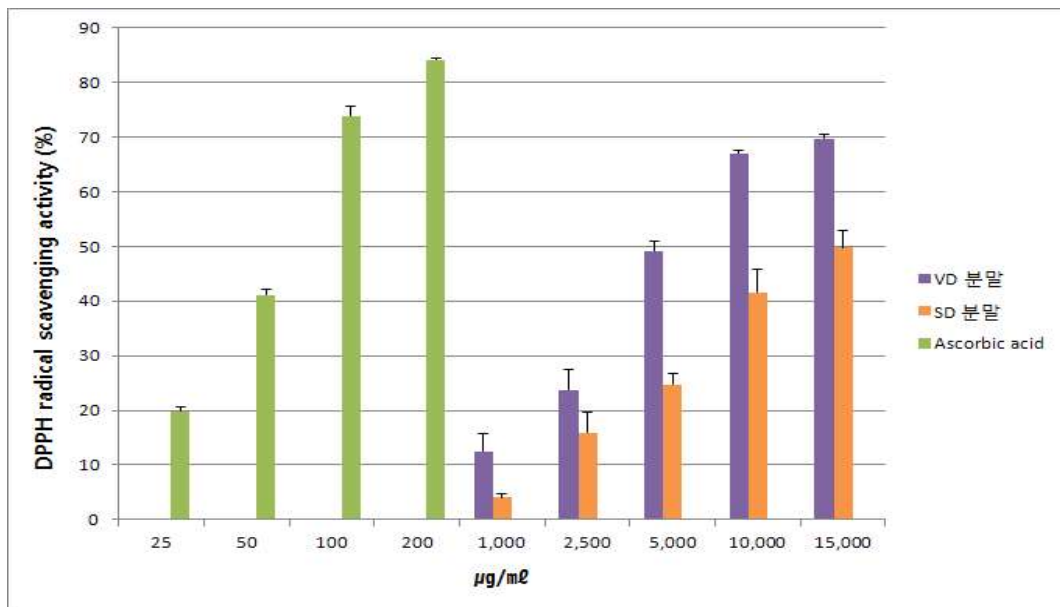


그림 70. 분말 시료의 DPPH 라디칼 소거능

- 두 분말 시료 모두 농도 의존적으로 활성이 증가하였으나, 동일 농도에서 VD 분말이 SD 분말보다 더 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냄.

- 50% DPPH scavenging concentration(DPPH SC50)은 VD 분말에서 5.23 mg/mL, SD 분

말에서 15.17 mg/mL를 나타내어 3배 정도의 차이를 보임.

(2) ABTS 라디칼 소거능 평가

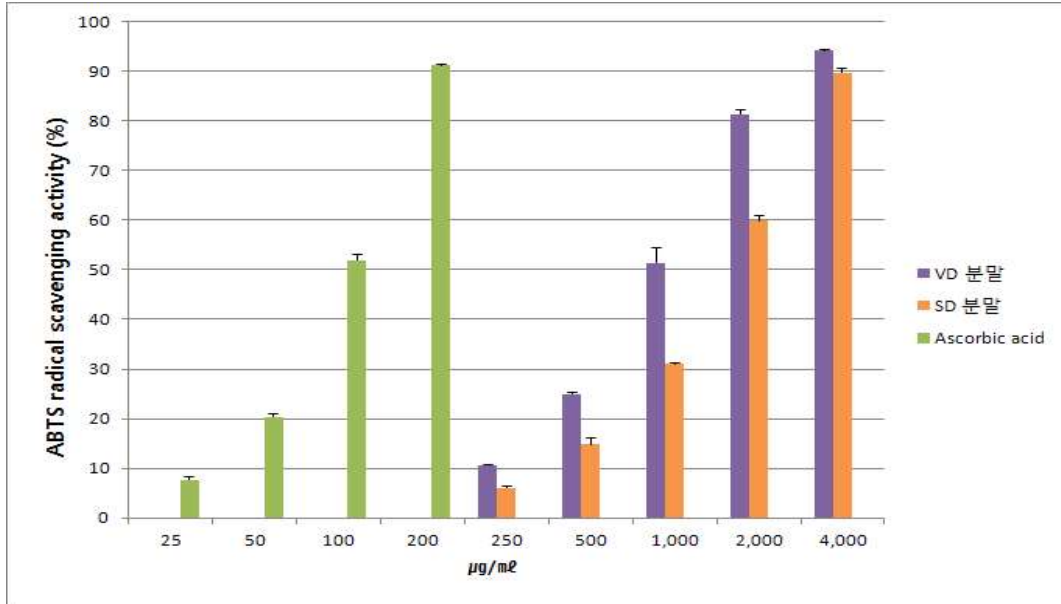


그림 71. 분말 시료의 ABTS 라디칼 소거능

- 두 분말 시료 모두 DPPH 라디칼 소거능과 동일하게 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, 동일 농도에서 VD 분말이 SD 분말보다 더 높은 소거능을 나타냄.
- 50% ABTS scavenging concentration(ABTS SC50)은 VD 분말에서는 0.95 mg/mL, SD 분말에서는 1.66 mg/mL로 나타나 시료간에 1.7배 정도의 차이를 나타냄.

사. VD와 SD 분말의 항암활성 평가

- 분말 제형인 VD와 SD 시료의 생리활성으로서 항암활성을 측정하고 비교하기 위하여 AGS(위암), HT-29(결장암), HepG2(간암) 세포에 대한 세포 증식 억제능을 평가함.
- 실험 방법은 상기의 방법과 동일하게 수행함.

(1) AGS 위암 세포 증식 억제

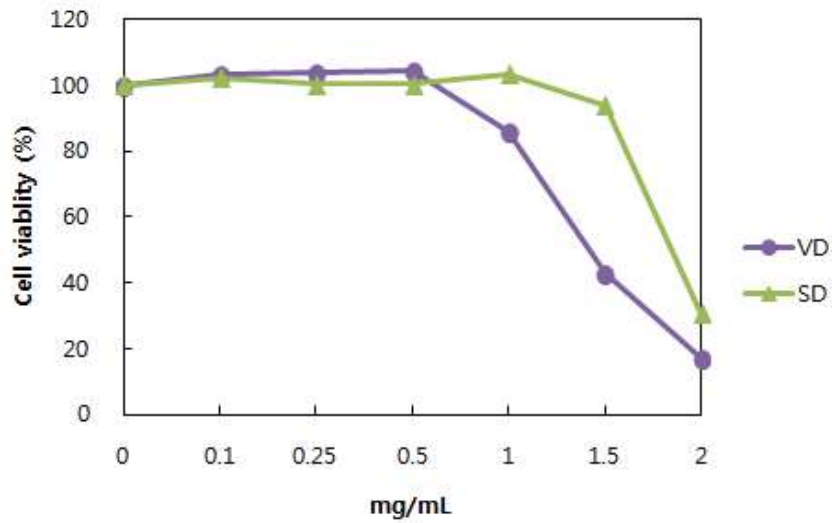


그림 72. VD와 SD 분말의 AGS 세포 증식 억제

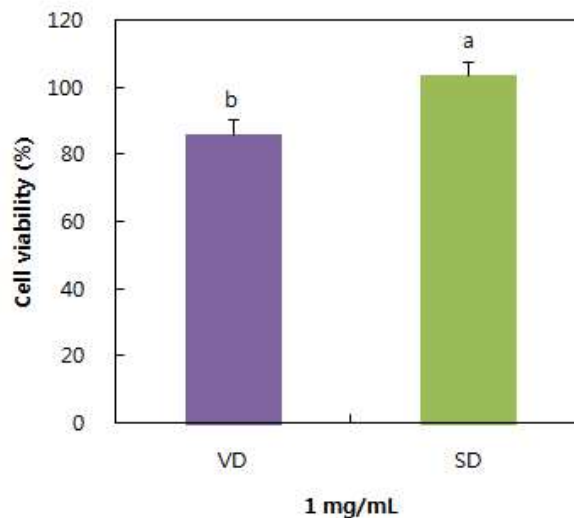


그림 73. 1 mg/mL 농도에서 VD와 SD 분말의 AGS 세포 증식 억제능 비교

- VD와 SD 분말 시료를 농도별로 처리하여 AGS 위암 세포에 대한 증식 억제 활성을 평가함. VD 시료는 0.5 mg/mL 농도까지는 증식 억제능을 보이지 않았으나, 1, 1.5, 2 mg/mL 농도에서 농도 의존적으로 위암 세포 증식 억제 효과를 나타냄. SD 시료는 1.5 mg/mL 농도 이상에서 증식 억제 효과를 나타냄. 동일 농도에서 SD 보다는 VD 분말의 억제능이 더 우수한 결과를 보임.

- 1 mg/mL의 농도에서 VD 분말은 85.7%, SD 분말은 103.5%의 위암 세포 생존율을 나타냄. 2 mg/mL 농도에서는 VD와 SD 분말은 각각 17.2%와 30.7%의 위암 세포 생존율을 나타내어 VD 분말의 항암 활성이 높게 나타났으나, 효소분해물의 농축액(13.8%) 보다는 다소 낮게 나타남.

(2) HT-29 결장암 세포 증식 억제

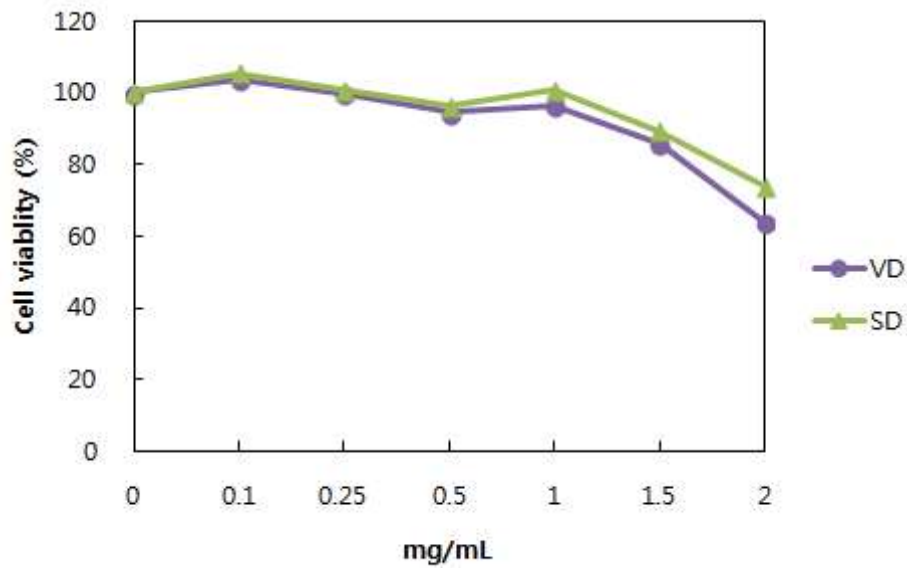


그림 74. VD와 SD 분말의 HT-29 세포 증식 억제

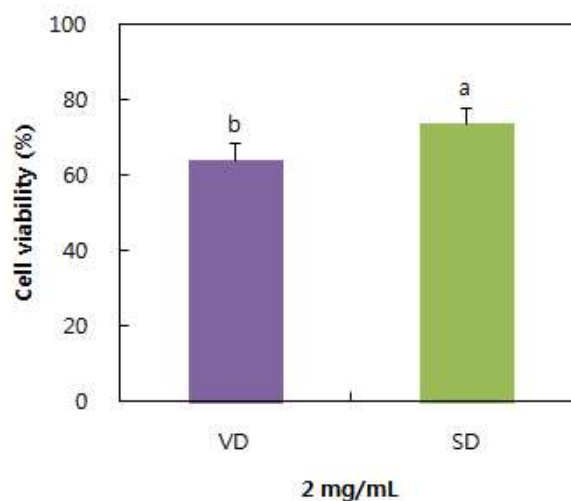


그림 75. 2 mg/mL 농도에서 VD와 SD 분말의 HT-29 세포 증식 억제능 비교

- VD와 SD 분말 시료를 농도별로 처리하여 HT-29 결장암 세포에 대한 증식 억제 활성을 평가한 결과 위암 세포의 결과와 유사하게 VD 시료는 1 mg/mL 이상에서, SD 시료는 1.5 mg/mL 이상에서 농도 의존적으로 결장암 세포의 증식 억제 효과를 나타냄. 동일 농도에서 SD 보다는 VD 분말의 억제능이 더 우수한 결과를 보임.

- 2 mg/mL 농도에서 VD와 SD 분말은 각각 63.8%와 73.7%의 암세포 생존율을 나타내어 VD 분말의 항암 활성이 높게 나타났으나, 두 시료 모두 위암세포에 대한 증식 억제능에 비해 결장암 세포에 대한 억제능이 낮게 나타남.

- VD 분말의 경우 효소분해물 농축액의 결장암 세포 증식 억제능 결과와 유사한 수준을 나타냄.

(3) HepG2 간암 세포 증식 억제

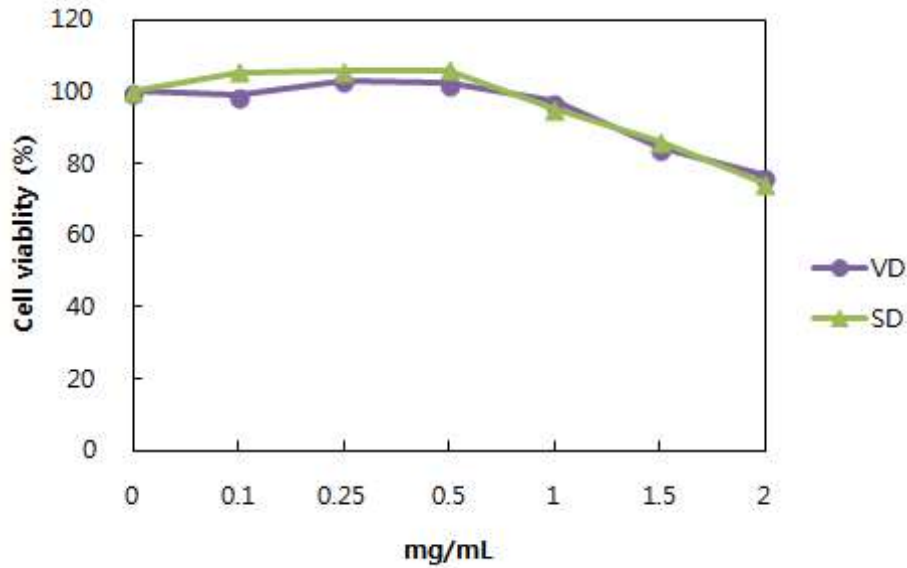


그림 76. VD와 SD 분말의 HepG2 세포 증식 억제

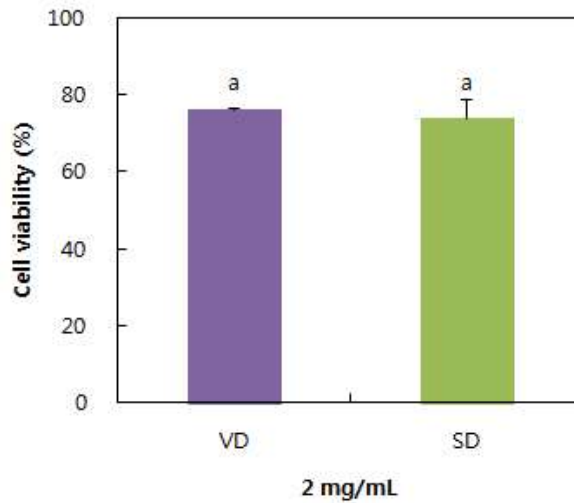


그림 77. 2 mg/mL 농도에서 VD와 SD 분말의 HepG2 세포 증식 억제능 비교

- VD와 SD 분말 시료를 농도별로 처리하여 HepG2 간암 세포에 대한 증식 억제 활성을 평가한 결과 두 시료 모두 1 mg/mL 이상의 농도에서 증식 억제능을 나타냄.
- 2 mg/mL 농도에서 VD와 SD 분말은 각각 76.3%와 74.1%의 암세포 생존율을 나타내어 위암 및 결장암 세포에 대한 결과와 달리 시료 간의 유의적 차이는 나타나지 않음.
- 위암(AGS), 결장암(HT-29), 간암(HepG2) 세포의 3종의 암세포에 대한 VD와 SD 분말의 암세포 증식 억제능을 비교한 결과 두 시료 모두 위암 세포에 대한 증식 억제능이 우수하였으며, 위암과 결장암 세포에서는 VD 분말의 항암 활성이 더 우수한 반면 간암 세포에서는 유의적인 차이를 나타내지 않아 암세포의 종류에 따라 다소 다른 결과를 나타냄.



아. VD와 SD 분말의 항염증활성 평가

- VD와 SD 분말의 항염증활성을 비교하기 위하여 대식세포에 대한 세포독성을 측정하고, 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 LPS로 유도된 대식세포에서 VD와 SD 분말에 의한 NO 생성 억제 효과를 확인하고자 함.

(1) 세포독성 측정

- VD와 SD 분말 시료가 RAW 264.7 세포에 미치는 독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행함. 실험은 상기와 동일한 방법으로 수행함.

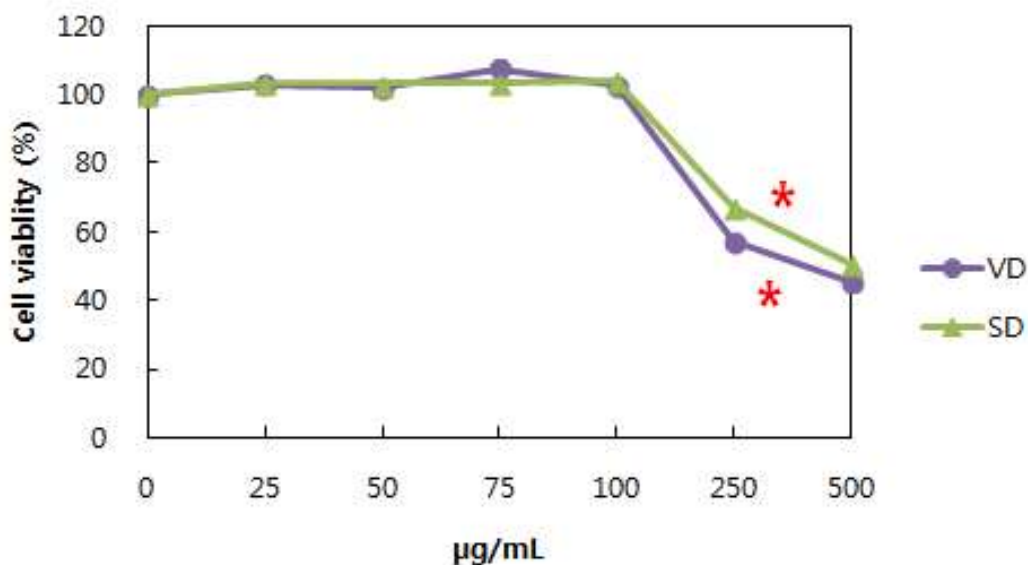


그림 78. VD와 SD 분말이 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

- VD와 SD 분말 시료를 25, 50, 75, 100, 250 및 500 µg/mL의 농도로 첨가하여 세포 생존율을 측정된 결과 100 µg/mL 농도까지 두 시료 모두 독성을 나타내지 않았으나, 250 µg/mL 이상의 농도에서는 농도의존적으로 세포 생존율이 저하됨. 대식 세포에 대한 독성 평가 결과는 효소분해물과 농축액 시료에서 독성을 나타낸 농도와 유사한 수준으로 나타남.

- 항염증활성 평가를 위한 각 시료의 농도는 100 µg/mL 이하의 농도로 수행함.

(2) Nitric oxide 생성 억제 효과

- VD와 SD 분말의 항염증 활성을 평가하기 위하여 LPS로 자극을 유도한 RAW 264.7 세포에서 농도별로 시료를 처리한 후 NO 생성량의 변화를 분석함.

- 실험은 상기의 방법과 동일하게 수행함.

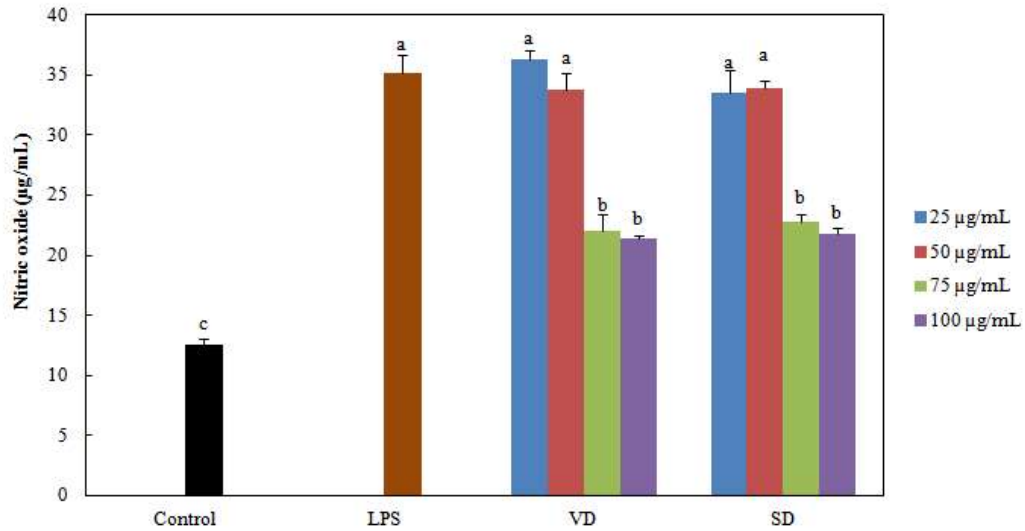


그림 79. RAW 264.7 세포에서 NO 생성량에 대한 VD와 SD 분말의 영향

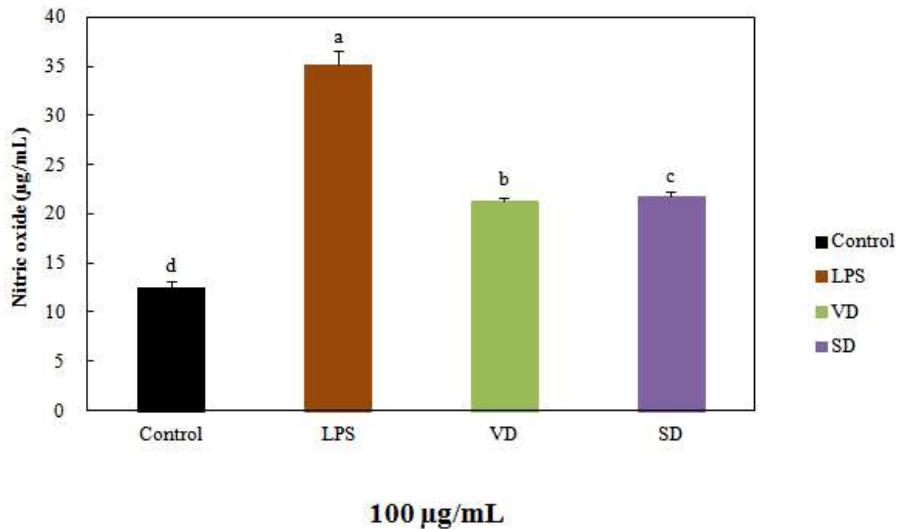


그림 80. 100 µg/mL 농도에서 VD와 SD 분말의 NO 생성량 비교

- 실험 결과 VD와 SD 분말 모두 50 µg/mL 농도 이하에서는 NO 생성량이 LPS 처리군과 유사한 수준이었으나, 75 µg/mL 이상의 농도에서 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타남.

- VD와 SD 분말 시료의 처리에 의한 NO 생성량은 시료 농도 75 µg/mL에서 각각 22.0 µg/mL와 22.8 µg/mL, 시료 농도 100 µg/mL에서 각각 21.4 µg/mL와 21.8 µg/mL를 나타냄. 시료 농도 증가에 따른 NO 생성량의 차이가 크게 나타나지 않으며, VD와 SD 시료 간에도 NO 생성 억제 효과는 유사한 수준으로 나타남.

- 효소분해물 및 농축액의 항염증활성과 비교하여 시료 농도 75 µg/mL에서는 분말 시료의 NO 생성 억제 효과가 더 우수하였으나, 시료 농도 100 µg/mL에서는 농축액 시료의 NO 생성 억제 효과가 가장 우수함.

- 시료 100 µg/mL 농도에서 LPS 처리군(35.2 µg/mL)에 비해 VD와 SD 분말 처리군의

NO 생성량이 각각 60.8%와 61.9%까지 감소하여 염증반응에 관여하는 NO의 생성을 억제시킴으로써 항염증효과가 있는 것으로 사료됨.

자. VD와 SD 분말의 Angiotensin-converting enzyme(ACE) 저해 활성

- VD와 SD 분말 시료의 생리활성으로 ACE 저해 활성 여부를 평가하고, 시료 간 차이를 비교하고자 함.

- 실험은 상기와 동일한 방법으로 수행함.

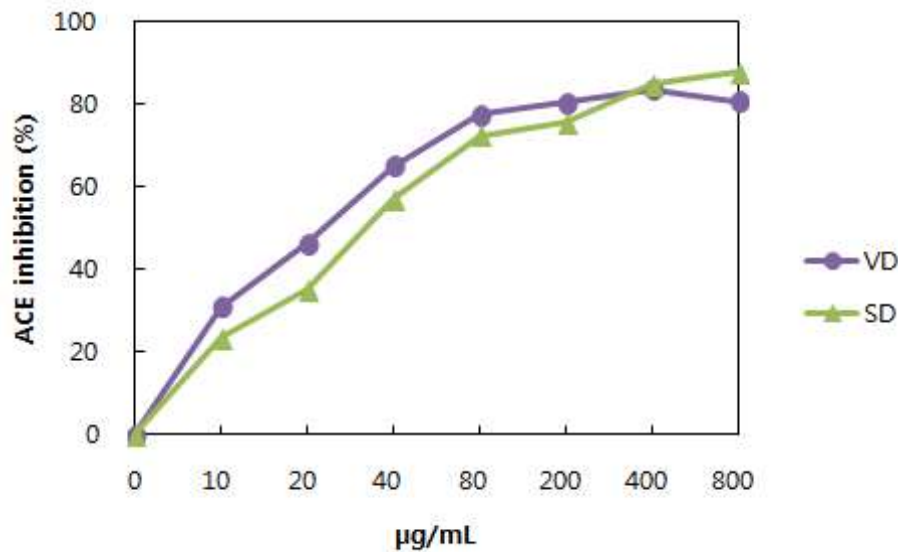


그림 81. VD와 SD 분말의 ACE 저해 활성

표 99. ACE 저해 활성에 대한 IC50

시료명	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
대조구	Quercetin	7.5±0.1
실험구	VD 분말	18.4±0.9
	SD 분말	30.7±0.5

- VD와 SD 분말 모두 농도 의존적으로 ACE 저해 활성이 증가하였으며 800 µg/mL 농도를 제외하고, 나머지 농도 구간에서는 VD 분말의 저해 활성이 우수한 것으로 나타남.

- VD 분말의 IC<sub>50</sub>은 18.4 µg/mL, SD 분말의 IC<sub>50</sub>은 30.7 µg/mL로 나타나 SD 분말에 비해 VD 분말의 ACE 저해 활성이 우수하였으나, 효소분해물(IC<sub>50</sub>=16.5 µg/mL)이나 농축액(IC<sub>50</sub>=14.0 µg/mL)에 비해 다소 낮은 활성을 나타냄.

- 그러나 기존에 보고된 천연소재들과 비교하여 VD와 SD 분말의 ACE 저해 활성은 상당히 낮은 농도에서 나타나므로 조미소재 뿐만 아니라 건강기능성 식품소재로도 활용이 가능할 것으로 사료됨.

차. VD 분말의 성분 분석

- 공정에 따른 VD와 SD 분말을 제조하여 품질 특성과 건강기능성을 비교한 결과 조미소 재로서 가장 중요한 관능적 특성뿐만 아니라 대부분의 평가 항목에서 VD 분말이 더 우수한 것으로 평가됨.

- 제품화를 위한 품목으로 VD 분말을 선정하여 일반성분 분석 및 비타민과 무기질의 미량성분 분석을 시행함.

(1) 일반성분 분석

- 일반성분은 수분, 회분, 조단백, 조지방, 탄수화물, 열량 항목으로 분석함.

표 100. VD 분말의 일반성분

시료	수분 (%)	조단백 (%)	조지방 (%)	회분 (%)	탄수화물 (%)	열량 (Kcal/100g)
VD 분말	4.74	27.19	2.51	47.19	23.71	204.80

- VD 분말은 수분은 4.74%, 조단백 27.19%, 조지방 2.51%, 회분 47.19%, 탄수화물 23.71%를 나타내어 회분 함량이 가장 높았으며, 다음으로 조단백 함량이 높게 나타남.

(2) 비타민, 무기질 분석

- VD 분말의 비타민 5종(Vit B1, Vit B2, 나이아신, Vit B6, Vit E)과 무기질 6종(Ca, K, Mg, P, Fe, Mn)을 분석함.

표 101. VD 분말의 비타민 함량

시료	비타민 (mg%)				
	Vit B <sub>1</sub>	Vit B <sub>2</sub>	나이아신	Vit B <sub>6</sub>	Vit E
VD 분말	0.06	0.59	0.56	-	1.07

- VD 분말에서 비타민 E의 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, 다음으로 비타민 B2, 나이아신 순으로 함량이 검출됨. 비타민 B1의 함량은 매우 낮았으며, 비타민 B6는 불검출됨.

표 102. VD 분말의 무기질 함량

시료	무기질 (mg%)					
	Ca	K	Mg	P	Fe	Mn
VD 분말	48.96	1,980.64	445.37	440.44	2.67	0.88

- VD 분말의 무기질은 칼륨(K)의 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, 다음으로 마그네슘과 인의 함량이 높게 나타남. 칼슘, 철, 망간은 비교적 낮은 함량으로 검출되었으며, 이러한 경향은 효소분해물의 무기질 분석결과와 동일한 것으로 나타남.

## 6절 미강효소분해물을 이용 reaction flavor 조건 연구를 통한 초고부가가치화 연구

### 1. Maillard reaction에 기초한 reaction flavor 조건연구

- 보통 효소분해물의 경우 산가수분해물에 비해 이취가 도드라지는 특징 때문에 상품성이 떨어지는 경우가 많음.
- 이에 효소분해물에 존재하는 성분을 전구물질로 하고 기질과 반응조건을 달리한 maillard 반응을 적용하면 목적하는 reaction flavor를 발현시키면서 이취를 masking시킬 수 있음.
- Maillard 반응은 식품의 색소형성 및 풍미의 변화에 큰 역할을 하는데 구체적으로 aldehyde류, ketone류와 amine을 함유한 환원당류와 peptide류 및 단백질류가 서로 반응하는 것으로 이를 통하여 식품의 가치뿐만 아니라 기호성을 증진시킴.
- 이에 maillard 반응을 통해 미강효소분해물로 다양한 향미를 가지는 조미소재를 개발하고자 적합기질 선정 및 반응조건을 검토하고 그 반응액의 pH, 색가, 유리아미노산 분석 및 관능검사를 통해 그 특성을 확인하였음.

#### 가. 적합기질 선정 예비 실험

- 효소분해물에 적용가능한 reaction flavor를 찾기 위해 우선 양조간장원액을 베이스로 예비 실험을 진행하여 묘사분석을 통해 관능적 특성을 알아보고 maillard 반응에 적합한 아미노산의 농도와 반응시간을 검토함.
- Cysteine, methionine, proline 3 종 아미노산과 당류는 가격이 저렴하여 일반적으로 산업체에서 많이 사용하는 xylose를 선정하였음. 반응조합은 xylose와 양조간장원액의 비율을 20%로 최종 부피를 50 mL로 정용하였고, 반응은 대기압상태에서 water bath를 이용하여 100°C에서 30, 60, 90, 120분 동안 수행시킴.
- 양조간장 원액에 아미노산과 당을 한 가지씩 혼합한 단독기질 반응액의 관능적 묘사분석 결과는 다음과 같음.

표 103. 3종 아미노산 reaction flavor의 관능적 묘사분석

아미노산	농도 (%)	관능특징
Cysteine	0.5	90분 이후부터 타이어 탄 냄새가 나며 약간의 다시마 풍미가 남.
	1.0	0.5%에 비해 단맛이 나며 반응시간이 60분일 때 관능이 가장 좋음.
	1.5	향은 다른 농도와 비슷하며 60분경과 이후부터 느끼한 맛이 강하게 남.
	2.0	느끼한 맛이 너무 강하며 전체적인 맛의 균형이 어울리지 않음.
Methionine	0.1	시간이 증가할수록 고기 향과 열은 감자 향이 강해지지만 90분 이후부터는 쓴 향이 강하게 남.
	0.3	0.1% 보다 향이 강함. 리액션시간이 오래 될수록 향이 강하나 0.1%보다 맛이 깔끔하고 부드러우며 60분 가열한 테스트 제품군의 관능이 가장 좋음.
	0.5	90분 이후부터는 고무 타는 냄새가 나며 120분 이상 가열할 때 스모크향이 강함.
	0.7	고기향이 너무 강하게 나타나며 쓴맛이 나며 전체적인 풍미가 좋지 않음.
Proline	0.5	가열 90분 이후부터는 쓴 향이 강하게 남.
	1.0	0.5% 보다 향이 강하지만 고기 특유의 향은 적음.
	1.5	가열 90분 이후부터는 고무 타는 냄새가 남.
	2.0	짠맛이 너무 강하게 나며 전체적인 풍미가 잘 어울리지 않음.

- Cystein 첨가량이 2.0% 일 때 느끼한 맛이 너무 강하고 전체적인 맛의 균형이 어울리지 않아 첨가량을 0.5~1.5%로 설정하고 가열시간은 90분이 지나면 타이어 탄 냄새가 나기 시작하는 등 이취가 발생하여 최대 60분으로 설정함.

- Methionine 첨가량이 0.7% 일 때 고기향이 너무 강하게 나타나며 쓴맛이 나 첨가량을 0.1~0.5%로 설정하고 가열시간은 90분이 지나면 타이어 타는 냄새가 나기 시작하는 등 이취가 발생하여 최대 60분으로 설정함.

- Proline 첨가량이 2.0% 일 때 짠맛이 너무 강하고 전체적인 풍미가 잘 어울리지 않아 첨가량을 0.5~1.5%로 설정하였으며 가열시간은 90분이 지나면 타이어 탄 냄새가 나기 시작하는 등 이취가 발생하여 가열시간은 최대 60분으로 설정함.

나. Reaction flavor의 제조공정

- 효소분해물의 경우 시판 간장처럼 당류를 첨가하지 않아 가열하더라도 maillard 반응이 일어나지 않기 때문에 반응이 빠른 5탄당인 xylose를 일정량 첨가하여 실시함.

- Maillard 반응조건과 원부재료 배합비에 따라서 미강효소분해액과 methionine, cysteine, proline, xylose를 아래 표와 같이 혼합하여 반응조에 넣고 교반하면서 반응물의 온도를 90℃로 유지하면서 30, 60분 동안 반응시켜 maillard 반응에 의한 reaction flavor를 제조하였음.

표 104. Methionine 반응 조건

Substrate	Amino acid		Sugar	water (g)	EVP* (g)	Retention temp.(°C)/ time(min)
	Methioine(g)		Xylose(g)			
M1	0.1			59.4		
M2	0.3		0.5	58.9		
M3	0.5			58.4		
M4	0.1			59.2		
M5	0.3		1.0	58.7		90/30
M6	0.5			58.2		
M7	0.1			59.0		
M8	0.3		1.5	58.5		
M9	0.5			58.0	40	
M10	0.1			59.4		
M11	0.3		0.5	58.9		
M12	0.5			58.4		
M13	0.1			59.2		
M14	0.3		1.0	58.7		90/60
M15	0.5			58.2		
M16	0.1			59.0		
M17	0.3		1.5	58.5		
M18	0.5			58.0		

\*EVP ; Enzymatically hydrolyzed vegetable protein



표 105. Cysteine 반응 조건

Substrate	Amino acid	Sugar	water (g)	EVP (g)	Retention temp.(°C)/ time(min)
	Cysteine(g)	Xylose(g)			
C1	0.5		59.0	40	90/30
C2	1.0	0.5	58.5		
C3	1.5		58.0		
C4	0.5		58.5		
C5	1.0	1.0	58.0		
C6	1.5		57.5		
C7	0.5		58.0		
C8	1.0	1.5	57.5		
C9	1.5		57.0		
C10	0.5		59.0		90/60
C11	1.0	0.5	58.5		
C12	1.5		58.0		
C13	0.5		58.5		
C14	1.0	1.0	58.0		
C15	1.5		57.5		
C16	0.5		58.0		
C17	1.0	1.5	57.5		
C18	1.5		57.0		

표 106. Proline 반응 조건

Substrate	Amino acid		Sugar	water (g)	EVP (g)	Retention temp.(°C)/ time(min)
	Proline(g)		Xylose(g)			
P1	0.5			59.0	40	90/30
P2	1.0		0.5	58.5		
P3	1.5			58.0		
P4	0.5			58.5		
P5	1.0		1.0	58.0		
P6	1.5			57.5		
P7	0.5			58.0		
P8	1.0		1.5	57.5		
P9	1.5			57.0		
P10	0.5			59.0		90/60
P11	1.0		0.5	58.5		
P12	1.5			58.0		
P13	0.5			58.5		
P14	1.0		1.0	58.0		
P15	1.5			57.5		
P16	0.5			58.0		
P17	1.0		1.5	57.5		
P18	1.5			57.0		



그림 82. Reaction Flavor 제조 공정도

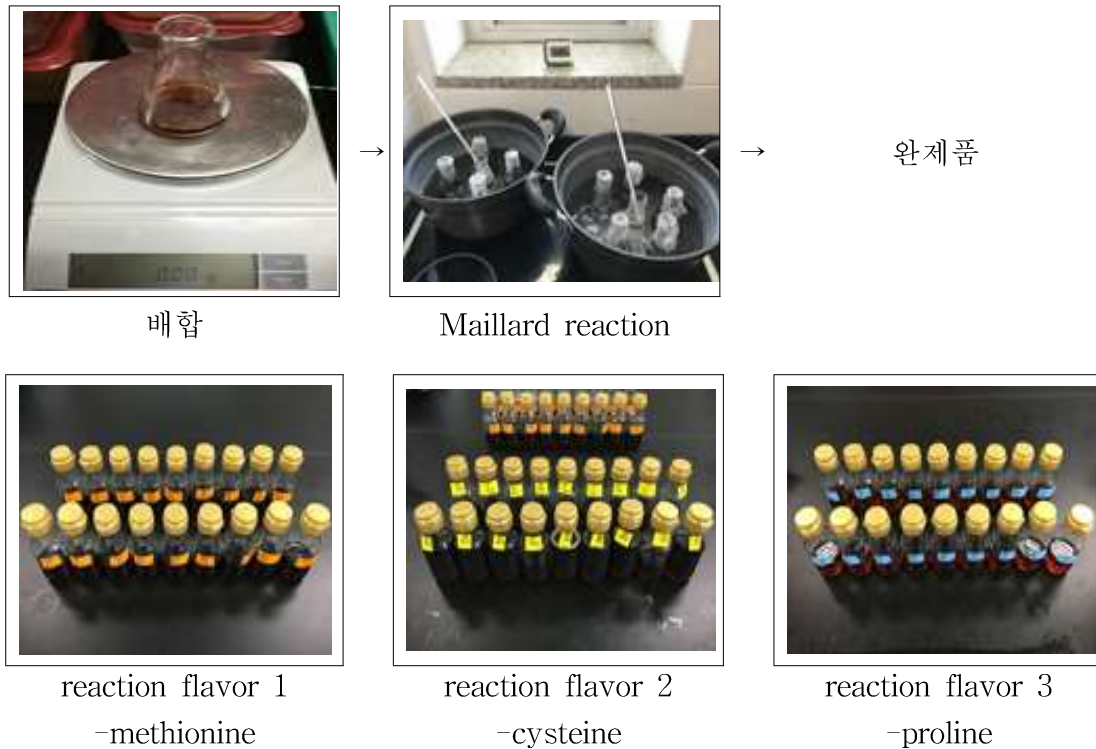


그림 83. Maillard reaction 공정 사진 및 제품

## 2. Maillard reaction에 기초한 reaction flavor 품질 확인

### 가. Reaction flavor의 흡광도 및 pH 변화

- 효소분해물의 색은 간장과 마찬가지로 대부분 carbonyl 화합물과 amino acid, peptide, protein 등 amino화합물을 기질로 하는 maillard 반응을 통해 형성됨2).

- 적당한 갈변은 색과 향기를 좋게 하여 품질을 향상시키나, 지나친 갈변은 영양성분을 감소시키고 맛이나 향기에 나쁜 영향을 끼쳐 간장의 품질을 저하시키는 요인이 되기도 하여 색은 굉장히 중요한 요소임2).

- 흡광도를 통한 색 변화와 pH를 확인하여 reaction flavor를 위한 maillard 반응에 적합한 조건을 찾고자 함.

- 상기 maillard 반응에 의해 제조한 reaction flavor를 냉각 후 원심분리하여 상등액을 5 mL를 취하여 250 mL 메스플라스크에 넣고 정용하여 시험용액으로 함. 증류수를 blank로 하고 spectrophotometer(Model:SV6100 Visible Spectrophotometer)를 사용하여 보통 간장 색 측정으로 쓰이는 500 nm에서 측정 후 희석배수를 곱하여 색가를 구함.

- 3종 아미노산의 reaction flavor는 모두 반응시간과 xylose 양이 증가함에 따라 pH가 낮아지는 경향을 보임. 반응시간이 증가할수록 반응액의 pH가 감소하는 이전의 보고와 유사함.

표 107. Methionine reaction flavor의 pH 및 색가

Substrate	pH	색가
M1	5.01	2.75
M2	5.02	2.80
M3	5.02	2.90
M4	4.98	2.85
M5	4.99	2.90
M6	5.00	2.90
M7	4.99	3.00
M8	4.98	3.05
M9	4.97	3.05
M10	4.97	2.95
M11	4.96	3.05
M12	4.95	3.10
M13	4.96	3.05
M14	4.95	3.05
M15	4.94	3.10
M16	4.95	3.10
M17	4.94	3.20
M18	4.93	3.20

- 보통 산업체에서 간장색 측정으로 쓰이는 500 nm 흡광도 값은 적색색소의 최대 흡수 파장으로 그 값이 높을수록 진한 색을 띤다.

- 색가는 methionine > proline > cysteine 순으로 낮은 수치를 보임. 반응시간이 길어질수록 색가 또한 증가하는 양상임.

표 108. Cysteine reaction flavor의 pH 및 색가

Substrate	pH	색가
C1	4.88	2.20
C2	4.78	1.75
C3	4.74	1.70
C4	4.86	1.95
C5	4.74	1.70
C6	4.75	1.70
C7	4.82	1.95
C8	4.98	1.90
C9	4.97	1.95
C10	4.80	1.95
C11	4.98	1.85
C12	4.96	1.75
C13	4.77	2.20
C14	4.95	2.05
C15	4.94	1.9
C16	4.78	2.20
C17	4.98	2.10
C18	4.97	2.00

표 109. Proline reaction flavor의 pH 및 색가

Substrate	pH	색가
P1	4.97	2.20
P2	5.00	2.20
P3	5.00	2.25
P4	4.98	2.20
P5	4.93	2.80
P6	4.94	3.05
P7	4.92	3.15
P8	4.93	3.40
P9	4.93	3.40
P10	5.00	2.50
P11	4.97	2.55
P12	4.96	2.55
P13	4.97	2.85
P14	4.92	2.95
P15	4.93	3.05
P16	4.95	3.00
P17	4.91	3.00
P18	4.90	3.10

나. 1차 Reaction flavor의 관능적 특성

- 단독기질 반응액의 관능적 특성은 아미노산의 종류와 xylose의 양, 반응시간에 따라 맛에 차이가 있었음.
- +는 맛의 강도를 뜻하며 개수가 많아질수록 강도가 센 것을 뜻함(+: 약, +++: 중간, +++++: 강)
- Methionine reaction flavor의 대표적 맛 관능 특성은 전반적으로 1시간 반응시간에서 단맛, 탄 맛, 짠맛의 강도가 30분 반응시간에 비해 강했음.
- Xylose 함량이 높을수록 반응액의 입안 지속성 등 바디감은 좋아지지만 Bunt 향이 증가하고 감자 특유의 향이 증가하여 관능이 떨어짐.
- M6(methionine 0.5%, xylose 1.0%, 가열시간 30분)의 관능검사 결과 Sweety와 Salty가 조화로우며 Brunt향과 감자 특유의 향이 적어 관능이 가장 좋음.
- Methionine의 경우 maillard 반응 시 튀긴 감자맛과 새우크래커 맛이 난다고 하는데 reaction flavor의 경우 맛의 큰 특징은 없어 그 양을 늘려 재 실험하기로 함.

표 110. Methionine reaction flavor의 관능적 특성

Substrate	Taste & odor characteristics				
	Meaty	Sweety	Burnt	Acidy	Salty
M1	+	+		+	+
M2	+	+		+	+++
M3	+	+		+	+++
M4	+	+	+	+	+++
M5	+	+	+	+	+++
M6	+	+++	+	+	+++
M7	+	+	+	+	+++
M8	+	+	+	+	+++
M9	+	+++	+	+	++++
M10	+	+	+++	+	++++
M11	+	+++	+++	+	++++
M12	+	+++	++++	+	++++
M13	+	+	+++	+	++++
M14	+	+++	+++	+	++++
M15	+	+++	++++	+	+++++
M16	+	+	++++	+	++++
M17	+	+++	++++	+	+++++
M18	+	+++	+++++	+	+++++

- Cysteine은 합황 아미노산으로 첨가 시 황 냄새가 난다고 알려져 있는데 함량이 많아 질수록 느끼한 맛이 강하게 나타났음.
- 고기 향은 methionine과 proline 반응액보다 아주 강하며 가열 시간이 증가할수록 더 증가하는 경향임.
- C13(cysteine 0.5%, xylose 1.0%, 가열시간 1시간)의 Meaty향과 Burnt향이 조화로우며 지미가 적절히 지속되어 가장 좋음.
- 고기 향은 좋지만 그에 수반되는 느끼한 맛의 강도가 세서 관능이 떨어지므로 cysteine 함량을 줄여서 재 실험하기로 함.

표 111. Cysteine reaction flavor의 관능적 특성

Substrate	Taste & odor characteristics				
	Meaty	Sweety	Burnt	Acidy	Salty
C1	+++	+		+	+
C2	+++	+		+	++
C3	+++	++	+	+	+++
C4	+++	+	+	+	++
C5	+++	++	++	+	+++
C6	+++	+++	++	+	+++
C7	+++	+	+	+	++
C8	+++	++	++	+	+++
C9	+++	+++	+++	+	++++
C10	+++++	++	++	+	++++
C11	+++++	+++	+++	+	++++
C12	+++++	+++	++++	+	++++
C13	+++++	++	+++	+	++++
C14	+++++	+++	+++	+	++++
C15	+++++	+++	++++	+	+++++
C16	+++++	++	++++	+	++++
C17	+++++	+++	++++	+	+++++
C18	+++++	+++	+++++	+	+++++



- Proline의 경우 methionine이나 cysteine과는 다르게 고기 맛이 강하지 않으며 함량이 많을수록 단맛이 강한 특징을 보임.
- 가열시간이 길어질수록 짠 맛의 강도가 강해짐.
- 단맛을 내는 아미노산인 proline은 고기 향이 아닌 다른 flavor로의 접근이 필요한 듯함.

표 112. Proline reaction flavor의 관능적 특성

Substrate	Taste & odor characteristics				
	Meaty	Sweety	Burnt	Acidy	Salty
P1		+			++++
P2		+			+++
P3		+			+++
P4		+	+		+++
P5		++	+		+++
P6		++	+		+++
P7		++	+		+++
P8		+++	+		+++
P9		+++	+		+++
P10		++	+++		++++
P11		+++	+++		++++
P12		+++	+++		++++
P13		++	+++		++++
P14		+++	+++++		+++++
P15		+++	+++++		+++++
P16		++	+++++		++++
P17		+++	+++++		+++++
P18		++++	+++++		+++++

#### 다. Reaction flavor의 유리아미노산 함량 비교

- 상기 maillard 반응을 통한 아미노산 종류별 reaction flavor 중 가장 관능이 좋은 시료를 선택하여 다양한 기질을 넣지 않은 효소분해물을 control로 유리아미노산 함량을 분석하여 비교함.

- 유리아미노산 함량은 methionine, cysteine, proline reaction flavor 각각 2352.31 mg%, 3077.10 mg%, 2782.00 mg% 이었음.

- Cysteine reaction flavor가 가장 유리아미노산 함량이 많았으며, methionine reaction flavor의 경우 control보다 작은 유리아미노산 함량을 보였음.

- Reaction flavor별 유리 아미노산 경향은 유사하며 첨가된 아미노산 함량이 첨가하지 않은 다른 시료에 비해 그 함량이 증가함을 볼 수 있었음.

- 유리아미노산 함량은 모두 지미 아미노산인 glutamic acid와 aspartic acid 이 가장 많고, 단맛을 주는 아미노산인 alanine, serine, threonine, proline, glycine의 함량도 높으며, 쓴맛을 내는 leucine, valine, isoleucine, phenylalanine, lysine의 함량 또한 높아 타 연구에서 쌀 유래 효소분해물이 쓴맛을 강하게 발현하는 것과는 차별되는 감칠맛 등이 풍부한 조미소재로써 적용이 가능할 것으로 사료됨.

표 113. Reaction flavor 별 유리아미노산 함량

Free Amino Acid	mg%			
	Control	M6	C13	P5
P-Ser	9.04	10.16	15.45	11.11
Tau	8.59	10.22	11.72	12.56
Urea	0.00	0.00	552.04	0.00
Asp	241.64	226.22	239.07	269.19
Thr	104.25	98.23	101.89	115.15
Ser	129.92	120.88	128.73	143.66
Glu	284.95	262.63	280.54	314.08
a-AAA	8.65	7.47	51.38	9.29
Gly	73.98	67.85	73.54	80.36
Ala	162.66	151.39	161.78	179.37
Cit	122.20	110.64	128.30	134.28
a-ABA	0.00	0.00	2.82	0.00
Val	183.95	171.78	176.27	195.46
Cys	0.00	0.00	76.23	0.00
Met	50.12	129.67	39.13	41.25
Ile	124.97	116.20	118.12	132.13
Leu	197.58	183.24	191.11	214.00
Tyr	110.06	110.72	115.70	122.53
Phe	121.21	114.74	121.52	134.37
b-Ala	32.88	33.21	33.39	36.83
b-AiBA	27.34	31.10	29.10	30.52
GABA	21.07	20.61	21.01	23.38
EOHNH <sub>2</sub>	9.28	10.02	8.07	8.51
NH <sub>3</sub>	63.71	58.99	61.80	63.41
Orn	47.88	42.93	47.24	51.67
Lys	120.24	108.61	117.47	129.66
His	52.28	47.04	54.53	56.82
Arg	32.21	29.92	32.98	35.37
Hypro	1.79	0.00	0.00	5.10
Pro	82.21	77.83	86.15	231.93
Total	2424.68	2352.31	3077.10	2782.00

라. 2차 reaction flavor의 관능적 특성

- 1차 reaction flavor에서 선정된 효소분해물과 향이 조화로운 아미노산인 methionine, cysteine 2종을 이용하여 재 관능검사를 실시하여 안정화미강효소분해물과 어울리는 최적의 reaction flavor 조건을 검토함.

(1) 2차 reaction flavor 반응 조건

- 아미노산 첨가량 및 가열시간은 methionine의 경우 0.5%, 0.7%, 1.0% 함량, 가열 30분, cysteine은 0.1%, 0.3%, 0.5% 함량으로 가열 1시간, 공통적으로 xylose 1.0% 효소분해물 40%를 첨가하고 가열 온도는 90℃로 함.

표 114. Methionine reaction flavor 반응 조건

Substrate	Amino acid	Sugar	water (g)	EVP (g)	Retention temp.(°C)/ time(min)
	Methioine(g)	Xylose(g)			
M6-1	0.5		58.5		
M6-2	0.7	1.0	58.3	40	90/30
M6-3	1.0		58.0		

표 115. Cysteine reaction flavor 반응 조건

Substrate	Amino acid	Sugar	water (g)	EVP (g)	Retention temp.(°C)/ time(min)
	Cysteine(g)	Xylose(g)			
C13-1	0.1		58.9		
C13-2	0.3	1.0	58.7	40	90/60
C13-3	0.5		58.5		

(2) 2차 reaction flavor 관능적 특성

(가) Methionine

- 1차 관능 결과 methionine 함량이 적어 methionine이 발현하는 맛의 특징이 적게 느껴져 그 함량을 증가시켜 보았음.

- Methionine 함량이 증가할수록 짠맛의 강도가 세지며 감자향이 강해져서 전체적으로 관능이 떨어짐.

- M6-1(methionine 0.5%, xylose 1%, 가열시간 30분)의 관능검사 결과 Sweety와 Salty가 조화로우며 Burnt향과 감자 특유의 향이 적어 관능이 가장 좋아 선정 함.

표 116. Methionine reaction flavor의 관능적 특성

Substrate	Taste & odor characteristics				
	Meaty	Sweety	Burnt	Acidy	Salty
M6-1	++	+++	++	++	+++
M6-2	++	++	++	++	++++
M6-3	++	++	++	++	++++

(나) Cysteine

- Cysteine의 함량이 적을수록 Meaty향이 적어져 Reaction Flavor 특징을 나타내지 못함.
- C13-3(cysteine 0.5%, xylose 1.0%, 가열시간 1시간)의 Meaty향이 가장 잘 어울어지며 전체적인 맛 조화가 좋아 선정 함.

표 117. Cysteine reaction flavor의 관능적 특성

Substrate	Taste				
	Meaty	Sweety	Burnt	Acidy	Salty
C13-1	+	++	+	++	++
C13-2	+	++	++	++	++
C13-3	++	++	+++	++	+++

(3) 2차 Reaction flavor의 흡광도 및 pH 변화

- 최종 품질 확인을 위해 reaction flavor의 흡광도를 통한 색가와 pH를 검토함.
- Methionine reaction flavor의 pH는 4.95~5.01 범위이며 색가는 2.85~3.05로 농도가 증가함에 따라 색가도 증가하는 경향이 있음
- Cysteine reaction flavor의 pH는 4.79~4.81범위이며 색가는 1.60~2.20으로 methionine보다 모두 낮게 측정되었음. Cysteine 농도가 증가함에 따라 색가는 반대로 감소하는 경향임.

표 118. 2차 methionine reaction flavor의 pH 및 색가

Substrate	pH	색가
M6-1	5.01	2.85
M6-2	4.95	2.95
M6-3	4.95	3.05

표 119. 2차 cysteine reaction flavor의 pH 및 색가

Substrate	pH	색가
C13-1	4.79	2.20
C13-2	4.79	1.85
C13-3	4.81	1.60



미강효소분해물+정제수

Methionine  
reaction flavor

Cysteine  
reaction flavor

그림 84. Reaction flavors

### 3. 다양한 종류의 reaction flavor 생산 조건 연구

- 함황화합물과 xylose의 반응액에서 고기 향미 부여에 더욱 효과적이라는 보고5)에 따라 선정된 reaction flavor의 고기 풍미를 좀 더 향상시키기 위하여 함황 채소 중 양파를 선택하여 추가 적용시킴.
- 양파는 이번 실험에선 간 양파를 사용하였지만 양파 추출물이나 건조 양파 분말을 이용할 수 있음.

#### 가. 양파 첨가량을 달리한 reaction flavor 반응 조건

- 미강효소분해물과 xylose를 기본 기질로 하여 methionine, cysteine, 황화물 채소인 양파 등의 전구체를 각 반응조합에 따라 50 mL의 증류수에 용해하여 90℃에서 30, 60분 동안 maillard 반응시킴.
- 2차 maillard 반응 결과 가장 관능이 좋은 methionine과 cysteine의 reaction flavor 조합을 사용하되 양파의 첨가량만 달리해 봄. 양파 양은 예비실험을 통해 최소량과 최대량을 정하였음.

표 120. Methionine reaction flavor 반응 조건

Substrate	Amino acid		Sugar	Onion (g)	water (g)	EVP (g)	Retention temp.(°C)/ time(min)
	Methioine(g)	Xylose(g)					
M6-1-1				0.5	58.0		
M6-1-2	0.5	1.0		1.0	57.5	40	90/30
M6-1-3				1.5	57.0		

표 121. Cysteine reaction flavor 반응 조건

Substrate	Amino acid		Sugar	Onion (g)	water (g)	EVP (g)	Retention temp.(°C)/ time(min)
	Cysteine(g)	Xylose(g)					
C13-3-1				0.5	58.0		
C13-3-2	0.5	1.0		1.0	57.5	40	90/60
C13-3-3				1.5	57.0		

나. 양과 첨가량을 달리한 reaction flavor 관능적 특성

- M6-1-3(Methionie 0.5%, Xylose 1.0%, 양파 0.5% 가열온도 90도, 가열시간 30분)의 관능이 가장 좋음.
- 각 시료간의 특별한 차이는 없지만 양파 첨가량이 많을수록 양파 향이 강해져 맛 발란스가 좋지 않음.

표 122. 양과 첨가량을 달리한 methionine reaction flavor 관능적 특성

Substrate	Taste & odor characteristics				
	Meaty	Sweety	Burnt	Acidy	Salty
M6-1-1	++	+++	++	+	++
M6-1-2	++	+++	++	+	+++
M6-1-3	++	+++	++	+	+++

- C13-3-3(Cysteine 0.5%, Xylose 1.0%, 양파 1.5%, 가열온도 90도, 가열시간 60분의 관능이 가장 좋음.
- 양파의 첨가량이 많을수록 양파 특유의 향은 나지 않으며 Meaty향이 증가하고 전체적인 맛 강도도 강해져 전체적인 맛의 균형이 좋음.

표 123. 양과 첨가량을 달리한 cysteine reaction flavor 관능적 특성

Substrate	Taste & odor characteristics				
	Meaty	Sweety	Burnt	Acidy	Salty
C13-3-1	++	+++	+	+	++
C13-3-2	+++	+++	+	+	+++
C13-3-3	++++	+++	+	+	+++

- 양과뿐만 아니라 마늘, 생강, 파 등의 함황 채소를 첨가하거나 이들의 mixing을 통해 다양한 reaction flavor를 기대할 수 있음.

다. Reaction flavor의 제조공정

- 액상의 reaction flavor뿐만 아니라 제형의 다양화를 위해 분말화를 시도하였고 아래 표는 그 공정과 최종시제품임.

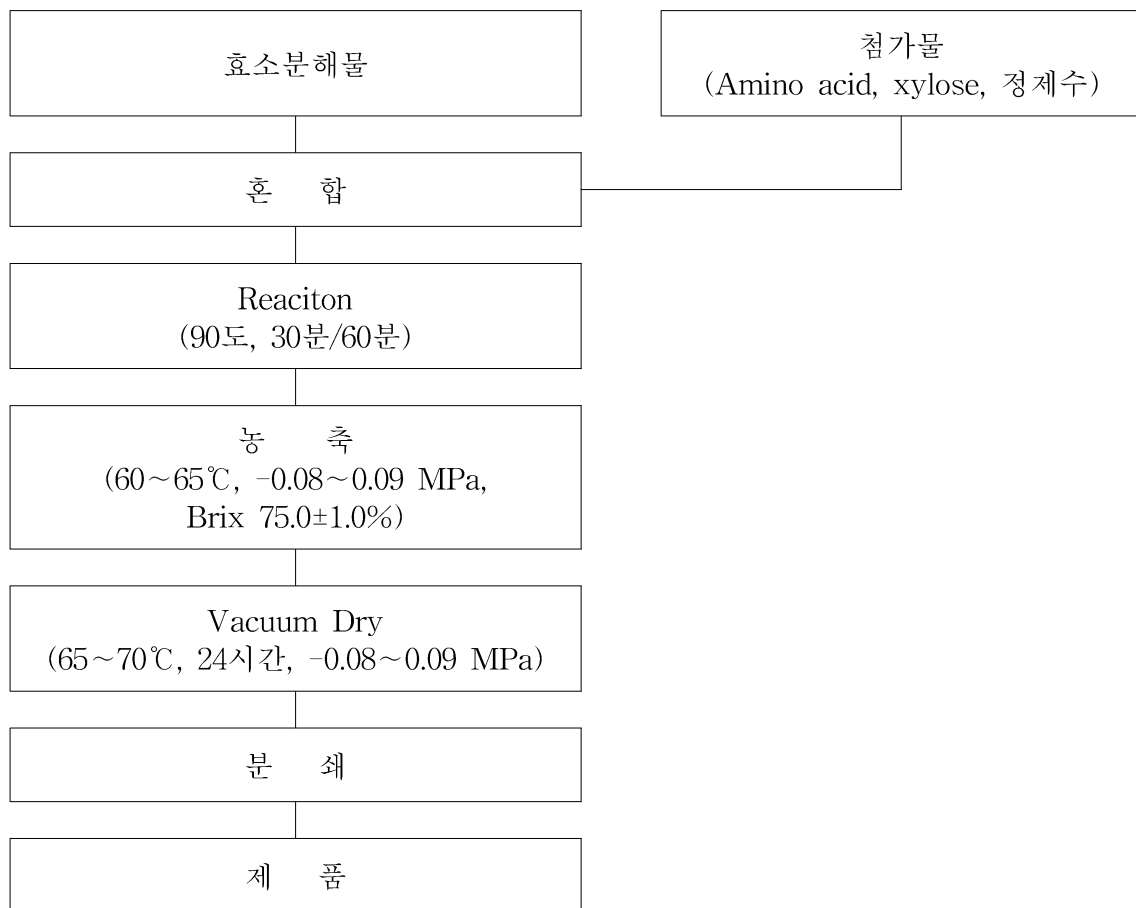


그림 85. Reaction Flavor 제조 공정도



그림 86. Reaction flavor의 제조공정



○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0
			향후 3년간 매출	7억원
		관련제품	개발후 현재까지	0
			향후 3년간 매출	10억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : 1 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : 1 %
	세계시장 경쟁력순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		1위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3년		
	소요예산(백만원)		300		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			-	7억	31억
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	3	5
		국외	0	1	2
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		소스류, 장류, 식품소재류			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		0	2	3
	수 출		0	0.5	1

## 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 4-1. 목표달성도

항 목	기 준	달성내용	달성도(%)
○ 미강의 효소분해에 의한 아미노산화율(%)	- TN대비 FN% 55%이상 - 관능평가 평점 3.5이상 (5점만점)	- TN대비 FN% : 56.0% - 관능평가 평점 : 4.2점 (5점만점)	40
○ Maillard Reaction에 기초한 Reaction Flavor 개발 건	- Reaction Flavor 개발 2건 이상	- Methionie, Cystein을 이용한 Reaction Flavor 개발 (2건)	20
○ 미강(米糠)의 식품 원료로서의 품질유지 안정성 연구 개발	- 미강 안정화 기술 확보 : 1달동안 산가 변화 10이하	- 처리군 2종 산가변화 10이하 : Roasting, 연속식열처리	5
○ 미강의 효소분해 최적화를 위한 미강처리기술 연구	- 유리 단백비율 개선 - 대조구 대비 10% 수율향상	- size reduction 단백추출시 35.9% 수율향상	10
○ 수율향상을 위한 미강 원료 처리 기술개발	- 단백농축기술 확보 - 단백질함량 35% 이상	- 미강추출물 단백질함량 : Lab scale 75.0% Pilot scale 37.05%	5
○ 기능성 성분 분석 및 아미노산 패턴 분석	- 기능성 성분 2종 이상 분석 - 아미노산 함량 및 패턴 분석 완료 여부	- 기능성 성분 2종 이상 분석 : Ferulic acid, Coumaric acid 함량 분석 - 아미노산 함량 및 패턴분석 완료	10
○ Salt enhancer로서의 효능 평가	- Salt 10% 이상 감소 효과	- 효소분해농축액 나트륨저감율 : 효소분해물 7.8~8.61% 효소분해물농축액 19.59~22.13%	5
○ <i>in vitro</i> 기능성 평가	- 유효 기능성 1건 이상	- 유효 기능성 4건 (항산화, 항암, 항염, 항고혈압 활성)	5
합계			100

### 4-2. 관련분야 기여도

- 해당사항 없음

## 5. 연구결과의 활용계획

- 본 과제를 통해 개발된 효소분해공법을 이용한 미강유래 천연조미소재는 저알러지성의 천연 조미소재로서 그간 풍부한 영양성분, 기능성성분 등 우수한 특성에도 불구하고 조미소재로서 이용하지 않았던 미강을 본격적으로 이용한다는 점에서 의의가 큼.
- 본 과제의 효소분해공법을 이용한 미강을 원료로 하는 알레르기-프리 천연조미소재는 일반적인 조미소재의 원료인 대두, 소맥를 원료로 하는 조미소재에 비해 저알러지성이므로, 아토피 등 알러지 관련 질환을 가지고 있는 어린이나 청소년, 노약자 계층을 위한 식품으로서의 사용이 기대되고 있으며, 특히 이와 관련된 시장이 이미 형성되어 있는 일본 등의 선진국 시장에 효과적으로 진출할 수 있을 것이 기대되어 수출증대에도 이바지 하고자 함.
- 미강유래 단백질소재로 만드는 효소분해 조미소재는 미강단백이 가지고 있는 아미노산 함량이 기존에 많이 사용하는 대두나 밀과는 다르기 때문에 다른 맛을 나타내어, 그동안 이용해왔던 기존의 맛과는 다른 차별화된 맛을 내줄 수 있는 가능성이 있다는 점에서 마케팅 전략의 차별화와 기존 소재와의 블렌딩을 통해 새로운 조미소재 시장을 창출할수 있다는 점에서 매우 유망한 소재로 발전시켜 나갈 계획임.
- 국내에서 연간 36만톤이 생산되지만, 거의 대부분 사료로 이용되고 식품으로 이용되지 못하는 농업부산물인 미강으로부터 고부가가치 소재를 생산한다는 점에서, 녹색 산업의 발전과 농가소득의 증가 및 경제 활성화를 유도해 낼수 있어 국가적으로 크게 장려 할 수 있는 신규 산업을 만들어 나갈 계획임.
- 본 과제를 통한 산업화의 기대효과는 다음과 같음.

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	200	400	800	1,600	3,100
경제적 파급효과	200	400	600	800	1,000	3,000
부가가치 창출액	100	500	700	1,000	2,000	4,300
합 계	400	1,100	1,700	2,600	4,600	10,400

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

- 본 연구과제를 통해 개발되는 효소분해 공법을 이용하여 미강을 원료로 하는 천연조미소재의 가장 큰 장점은, 현재 시중에 유통되고 있는 대부분의 천연조미소재가 대두, 밀과 같은 알레르겐을 함유한 곡물 등을 원료로 하고 있는데에 비해, 본 연구과제로 개발되는 천연조미소재는 이와 같은 알레르겐으로부터 자유롭다는 점에서, 조미소재로서의 기본특성인 정미력에 더하여 여타 조미소재가 가질 수 없는 품질특성이라고 할 수 있음. 이는 단순하게 가격적인 경쟁력만으로 한정될 수 없는 특성화된 경쟁력이라고 할 수 있을 것이임.
- 그러나, 소비자의 입장에서 가능한 한 가격적인 장점을 갖춰야 할 점은 불가결한 요소인바,

본 연구과제를 통해 개발되는 알레르기-프리 천연조미소재의 가격경쟁력에 대한 영향력이 큰 원료인 미강 및 추출단백의 제조원가 인하요인을 찾아서 연구해야 할 것으로 생각됨.

- 본 연구과제에서 개발되어진 미강과 미강추출물의 단백질 함량 및 가격을 비교하면 아래와 같음.

	미강			미강추출물
	생미강	Roasting 안정화	Extruding 안정화	
조단백질함량	14%	14%	14%	35%
제조원가(원/kg)	300	3,000	2,400	20,000

- 미강과 미강추출물 비교시 미강보다 미강추출물이 약 2배정도의 많은 단백질 함량을 보이 나, 식품용으로 사용할 수 없는 생미강을 제외한다고 해도 단백질이 농축된 미강추출물은 안정화된 미강의 약 6.67~8.33배로서 제조원가 차이가 현격히 큼. 기존 국내에서 장류의 원료 등으로 사용되던 미강은 생미강으로, 저장중에 발생하는 품질변화 문제로 인해 실제로는 거의 쓰이지 않는 실정임.
- 한편, 일본에서는 같은 용도로 탈지미강이 사용되고 있으며, 탈지미강에 대해서는 국내에서 도 기존에 여러 가지 연구가 진행된 바 있으며 대표적인 연구사례로서 전은례, 전난희, 2011, “탈지미강을 첨가한 고추장의 저장 중 품질특성”, 한국조리식품과학회지, 27(4), 89-98 을 들 수 있음. 그러나, 탈지미강은 국내에서 식품원료 용도로 구입할 수 없는 소재이므로, 안정화미강 사용이 불가피함.
- 미강추출물은 현재 가격이 높은 수준이나, 추출물 생산량의 약 4배에 달하는 부산물의 활용 방안을 찾아 판매가능하게 된다면 kg당 10,000원 이하로 충분히 낮출 수 있는 상황이 될 것 임. 미강추출시 동시에 생성되는 불용성 부산물은 식이섬유가 50%이상인 고식이섬유 소재 로, 해외에서는 간혹 퇴비나 사료용 원료로 이용되거나 고식이섬유 식품소재로서 씨리얼이 나 튀김가루 등에 사용되는 경우가 있지만 국내에서는 단백질 추출 중심의 미강추출물 생산 이 진행된 사례가 없어 부산물 역시 아직 판매되거나 실용화된 사례는 없음.
- 또한, 미강 추출물의 가격 경쟁력을 높이기 위해서는 먼저 미강추출공정에서 배치당 추출량 을 늘리고, 분무건조 방식의 연속식 생산공정을 도입할 경우, 현재 배치타입의 진공건조 공 정을 취하는 건조방식보다 약 2~2.5배의 가공비 절감을 이끌어 낼 수 있을 것으로 예상됨. 여기에 추출부산물 활용 판매까지 더해진다면, kg당 5,000원 이하의 가격으로 생산이 가능 할 것으로 판단되어, 안정화미강 사용시보다 경제적인 미강 단백질 소재 공급이 가능할 것 임.

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

## 7. 연구개발결과의 보안등급

보안등급분류	일반과제
결정사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
해당사항 없음.								

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 따른 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실 안전점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진실시, 보험가입 등) 및 기타 당해 연구개발사업 수행 시 필요한 연구실안전은 한국식품연구원 원내 규정을 준수하여 실험 윤리 및 실험 방법 준수하도록 책임 및 지도, 실험실 안전수칙 준수, 실험실 안전 관리를 위한 분기별 안전점검 실시, 화학물질 및 가스 사용에 따른 분기별 소방점검 실시, 매년 유해인자 확인에 따른 건강검진 실시 및 연구활동 종사자 보험가입을 이행하였음.

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	고순도 미강단백질 추출물 제조방법	(주)아이 엔비	-	대한민국	-	2015.02.28	-	-
2	논문	미강과 쌀 단백질의 비율과 분해 시간에 따른 효소분해물의 품질특성	(제)전남생물 산업진흥원 식품산업연구 센터, 매일식품(주)	저자	한국식품영 양과학회지 /대한민국	-	2016년 10월호 (게재확정)	단독사사	-
3	특허	미강 및 쌀단백질의 효소분해물을 포함하는 알리지 프리 천연조미소재의 제조방법 및 이로부터 제조된 천연조미소재	매일식품 (주)	-	대한민국	-	2016.09.13	-	-

## 11. 기타사항

- 해당사항 없음

## 12. 참고문헌

- 2012 KHIDI 보건산업통계집, 한국보건산업진흥원
- 2012년도 식품 및 식품첨가물 생산실적 통계, 식품의약품안전처
- 2012년 식품유통연감
- 2013년 식품산업 분석보고서, 한국보건산업진흥원
- 厚生労働科學研究費補助金「食物アレルギーの發症・重症化予防に關する研究」

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.