

보안과제( ), 일반과제( ○ )

과제번호 108161-3

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001249-01

## **쌀 가공 부산물을 활용한 쌀 단백질 및 천연보존제 제조기술 개발 및 산업화**

(Process development and industrial application of rice protein and natural preservatives from rice by-product)

(주)비케이바이오

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “쌀 가공 부산물을 활용한 쌀 단백질 및 천연보존제 제조기술 개발 및 산업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 12 월 19 일

주관연구기관명 : (주)비케이바이오

주관연구책임자 : 최 혁 준

세부연구책임자 : 최 혁 준

연 구 원 : 한 복 경

연 구 원 : 최 문 실

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 김 병 용

협동연구기관명 : 경원대학교

협동연구책임자 : 박 영 서



# 요 약 문

## I. 제 목

쌀 가공 부산물을 활용한 쌀 단백질 및 천연보존제 제조기술 개발 및 산업화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

- 쌀 가공 부산물인 주박과 탈지미강, 시럽박으로부터 고순도의 단백질, 식이섬유 및 피틴산과 이노시톨의 최적분리 및 제조공정을 확립하고 이를 이용하여 건강기능성 식품과 다이어트용 식품 및 즉석식품 등 다양한 형태의 식품과 사료를 개발하여 제품화함으로써 수입제품의 대체화와 수출화를 최종목표로 하였다.

### 2. 연구개발의 필요성

- 대한민국의 쌀 생산량은 증가하는 반면 소비량은 매년 줄고 있기 때문에 남는 쌀을 이용하여 탁주 등을 만들어 판매하고 있으며, 쌀을 이용한 식용유 및 조청 등의 개발 및 생산이 점차 증가하고 있고 이로부터 막대한 양의 쌀 가공 부산물이 생성되고 있다. 쌀 가공 부산물을 처리하기 위해서는 막대한 비용과 환경문제가 뒤따르게 되므로 현재 대부분 사료용이나 퇴비용으로 쓰이고 있는 실정이다. 따라서 부산물을 재가공하여 새로운 고부가가치 소재와 제품을 개발하여 부산물을 활용할 수 있는 연구가 절실히 필요하다.
- 쌀 단백질의 경우 대두단백질에 비해 알러지 유발문제에 있어 자유롭고 영양가도 풍부하여 현재 세계적으로 주목을 받고 있는 상황이다. 또한 단백질 및 식이섬유 등 쌀을 원료로 하여 생산된 제품은 소비자에의 인식 또한 매우 긍정적인 반응이다. 따라서 쌀 가공 부산물을 활용한 새로운 소재의 개발은 가공식품시장의 새로운 제품 개발 활성화에의 밑거름이 될 것이며 수입제품의 국산화를 도모하고 결과적으로 외화낭비 및 환경오염 방지, 지역농가 등의 소득증대에 크게 기여할 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 본 연구과제는 최종 목표를 달성하기 위하여 총 5개의 협동과제 및 위탁과제 그리고 세부 과제



를 구성하여 수행하였다.

- 제 1 협동과제에서는 쌀 가공 부산물로부터 단백질 및 식이섬유 분획을 분리하기 위한 실험을 실시하였다. 주박, 시럽박, 탈지미강 각 원료의 획득 및 보존법을 확립하고 특성을 평가한 뒤 단백질 및 식이섬유 분획의 분리를 위하여 효소의 종류, 시간, 온도 등 최적조건을 설정하였다. 분리된 각 분획의 분리 공정을 확립하고 보존 조건 별 shelf life 평가를 실시하였다.
- 제 2 협동과제에서는 쌀 미강으로부터 천연보존제(피틴산) 및 이노시톨의 제조 기술을 개발하였다. 미강의 획득 체계 및 보존법을 확립한 뒤 피틴산 및 이노시톨을 분리하기 위한 최적의 분리 조건을 확립하였다. 또한 개발된 피틴산 및 이노시톨을 이용하여 안정성 확인을 위한 실험을 실시하였고, 쌀밥의 저장성 향상에 미치는 영향에 관한 연구를 진행하였다. 이어 각 분획의 보존 조건별 shelf life 평가 연구를 실시하였다. 또한 제 1 협동과제를 통하여 개발된 수용성 쌀 단백질의 효능평가 실험을 진행하였다. *In vivo* 및 *in vitro* test를 실시하여 수용성 쌀 단백질의 간 보호 효과를 검증하였다.
- ㈜캠온과의 위탁 연구를 통해서도 수용성 쌀 단백질의 효능평가를 실시하였다. 본 과제를 통하여 개발된 수용성 쌀 단백질 ‘SRP70’을 Sprague-Dawley 랫드에 4주간 경구투여 한 뒤 forced swim test를 실시하여 ‘SRP70’의 경구투여가 랫드의 운동능력 향상에 미치는 영향에 관하여 연구하였으며, 희생 후 피로회복 지표가 되는 혈액 bio-marker 분석을 통하여 운동 후 피로회복에 미치는 영향에 관한 연구를 실시하였다.
- AZI와의 위탁 연구를 통해서도 제 1 협동과제 및 제 2 협동과제에서 개발된 각 분획의 대량생산을 위한 공정 최적화를 실시하였다. 수용성 및 불용성 단백질 그리고 불용성 식이섬유 제품의 품질평가 및 보존을 위한 연구를 실시하였으며 제품의 유통을 위한 방법을 확립하였다. 이어 각 분획의 대량생산을 위한 simulation을 실시하였고 대량생산을 위한 공정 및 설비를 최적화하였다. 또한 피틴산 및 이노시톨 제품에 대하여도 품질평가 및 보존을 위한 연구를 실시하였으며 유통방법의 연구 및 대량생산을 위한 공정 및 설비를 최적화하였다.
- 세부과제에서는 본 과제를 통하여 개발된 소재의 제품화 및 simulation을 진행하였다. 개발된 쌀 단백질 소재의 규격화를 실시하였고 수용성 쌀 단백질의 특성 파악을 위한 연구를 진행하였다. 수용성 쌀 단백질을 활용하여 rice milk 및 단백질 강화 음료 제조법을 개발하였으며 각 분획의 영양식, 다이어트 제품 등 여러 제품에의 적용을 통하여 상업화 가능성을 확인하였다. 또한 시장조사를 통하여 개발 소재의 활용 가능 범위를 확립하였다.

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 쌀 부산물로부터 단백질 및 식이섬유 분획 제조기술 개발

- 쌀단백질 제조 및 식이섬유 제조를 위한 최적의 조건을 확립하였다. 쌀 가공 부산물인 주박, 시럽박, 탈지미강 원료의 구성성분을 분석하고 개발을 위한 적용시험을 실행하여 최적의 소재 개발을 위한 원료를 선정하였다. 수용성 및 불용성 단백질의 경우 원료의 단백질 함량이 가장 높은 시럽박을 최적의 원료로 선정하였으며 수세공정을 통하여 70% 이상 조단백질을 포함하는 불용성 쌀 단백질의 제조 공정을 확립하였다. 또한 최적의 단백질 분해 효소의 선정 및 반응 온도, 반응시간 등의 설정을 통하여 최적의 수용성 쌀 단백질 제조를 위한 기술을 개발하였다. 또한  $\alpha$ -amylase, protease, cellulase 효소의 복합 처리를 통하여 총 식이섬유 함량 60% 이상의 식이섬유 분획의 제조기술을 개발하였다. 소재의 개발 후에는 scale up을 통한 제조 공정의 재현성을 확인하였고 mass balance 확인 결과 불용성 쌀 단백질의 경우 약 60~75%, 수용성 쌀 단백질 20~30% 및 불용성 식이섬유 40~50%로 나타났다.
- 각 분획의 shelf life 평가를 시험을 실시하였다. 수용성 단백질의 경우 장기 저장을 위하여 분말상으로 제조하였으며 단백질 및 식이섬유 분획 모두 수분함량 10% 이하의 조건에서 일반세균수 5,000 CFU/g 이하 및 대장균 및 대장균군 음성의 조건을 설정하였다. 또한 가속 시험을 통하여 각 분획의 성분 함량 및 색, 변패취 등의 변화를 고려하여 알루미늄 파우치에 밀봉하여 2년의 유통기한을 설정하였다.

##### 2. 쌀 미강으로부터 천연보존제(피틴산) 및 이노시톨 제조 기술 개발

- 탈지 미강으로부터 피틴산 추출을 위한 최적 조건은 0.5% 황산을 이용하여 미강으로부터 피틴산을 추출한 후 거즈로 고형 불순물을 제거하고 흡착 수지인 HP20 컬럼을 통과한 다음 IRA-416 이온교환 수지를 이용하여 용출되는 피틴산을 농축하는 과정으로 확립하였다. 이노시톨은 피틴산을 160℃에서 6시간동안 가수분해한 후 가수분해 결과 생성된 인산기를  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 첨가하여 pH 6.5로 조정하여 침전시켜 제거하여 이노시톨을 회수한 다음 농축 과정을 통하여 결정화시켰다.
- 쌀밥에 여러 농도의 피틴산 또는 이노시톨을 .01, 0.1, 1%의 농도로 첨가한 후 일정시간동안 저장하면서 저장 기간별 pH 및 색도의 변화와 총균수의 변화를 측정된 결과, 피틴산 또는 이노시톨을 1% 첨가한 시료는 pH가 초기값을 유지하였다. 1% 피틴산을 첨가한 시료는 저장 72시간까지도 총균이 검출되지 않았으며 색도의 변화가 관찰되지 않았다.

- 1% 피틴산이 함유된 경우 pH 5.5-7.0의 모든 pH 범위에서 *S. Typhimurium*의 생육을 완전히 저해시켰다. 닭고기, 돼지고기, 소고기에서의 피틴산의 *S. Typhimurium*에 대한 항균효과를 측정된 결과 닭고기와 돼지고기에서 1% 피틴산 첨가 시 각각 2.2 log와 1.9 log 단위의 항균효과를 나타내었다. 피틴산을 식육에 1% 첨가하였을 경우, 식육의 pH는 약 0.2~0.3 감소하였다. *Escherichia coli* O157:H7에 대해서는 0.5% 피틴산 첨가 시 약 1.3 log 단위의 생육저해효과를 나타내었다. 또한 식육에 피틴산의 첨가량이 증가함에 따라 TBARS 값이 감소하는 것으로 나타나 phytic acid가 항산화능이 우수한 것으로 확인되어 식품 보존제로서 이용할 수 있을 것으로 판단되었다. 피틴산 제품의 유통기한을 6개월로 설정하였다.
- 수용성 쌀단백질 SRP70의 랫트에 대한 LD50 값은 2,000 mg/kg 이상이었으며, 간세포에 1,000 µg/mL 처리하였을 경우 독성이 관찰되지 않았고, 간 보호활성이 관찰되었다. 수용성 쌀단백질 SRP70 1.0 g/kg 처리 시 혈액 내 RBC, Hb, Hct, MCV, MCHC 수치에는 변화가 없었고 간세포 내 catalase, glutathione peroxidase 활성이 증가하였다.

### 3. 수용성 쌀단백질의 효능 평가

- 수용성 쌀 단백질 'SRP70'의 운동능력 향상 및 운동 후 피로회복에 미치는 영향에 관한 실험을 진행하였다. Sprague-Dawley 랫드를 대상으로 'SRP70'을 각 저농도 67 mg/kg/day, 중농도 335 mg/kg/day, 고농도 670 mg/kg/day로 하여 4주간 경구투여 하였고 forced swim test를 실시하여 각 군별 운동 시간을 측정하였다. 또한 forced swim test 이후 랫드를 희생한 뒤 피로회복의 지표가 되는 혈액 bio-marker인 혈중 포도당 농도 및 혈중 크레아티닌 농도 그리고 혈청 암모니아 농도를 측정하여 피로회복의 정도를 측정하였다.
- 시험 결과 각 농도 군에 대하여 SRP70의 경구투여가 운동능력 향상에 미치는 효과에 관한 유의적 결과는 나타내지 않았음이 확인되었다. 반면 운동 후 피로회복 지표인 bio-marker의 측정 결과 glucose 경우 control 군에서 70.80 mg/dl, SRP의 섭취 농도 별 혈중 glucose 농도가 각각 88.00, 91.71, 98.80 mg/dl로 점차 증가하는 것으로 확인되었다. 혈중 크레아티닌 농도의 경우 대조군의 크레아티닌 함량 0.64 mg/dl, SRP70의 섭취 농도별 결과 0.66, 0.67, 0.66 mg/dl로 혈중 크레아티닌 농도에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 혈장 암모니아의 경우 대조군의 혈장 암모니아 농도 753.57 µg/dl이며 SRP70 섭취 농도군 별 각각 694.29, 638.00, 600.71 µg/dl의 결과를 얻었다. 결론적으로 SRP70의 경구투여가 운동능력 향상에 미치는 효과는 확인할 수 없었으나 운동 후 피로회복에는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

#### 4. 쌀 부산물 유래 단백질, 탄수화물, 피틴산, 이노시톨의 대량 생산 공정의 최적화

- 수용성 및 불용성 단백질 및 식이섬유 소재의 품질평가 및 대량생산을 위한 공정을 확립하였다. 각 제품의 단백질, 지방, 회분, 수분, 탄수화물의 함량 등의 구성성분을 기준으로 식품으로서의 품질관리 기준에 적합 여부를 조사하여 품질평가의 요인을 설정하였다. 각 소재의 생산 공정은 수세공정, 효소반응공정 및 원심분리를 이용한 탈수공정, 농축공정, 건조공정 그리고 분쇄공정, 포장공정을 통하여 확립되었으며 각 공정의 최적화 공정을 확립하였다. 피틴산 및 이노시톨 제품에 대해서도 품질 평가 및 보존성에 관한 연구를 실시하였다. pH, 온도, 통액속도, 통액의 방향, 수지재생 등을 고려하여 품질평가 방법을 확립하였다. 대량생산 공정은 추출, 여과, 중화, 회수, 재용해, 탈이온, 용출, 농축 공정을 통하여 피틴산 제조 공정을 확립하였으며 제조된 피틴산을 base로 하여 가수분해 및  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 의 첨가 및 pH 조정, 인산기 제거 공정 그리고 농축공정을 통하여 이노시톨 생산 공정을 최적화 하였다.

#### 5. 쌀 부산물 유래 소재의 제품화 및 응용

- 수용성 쌀 단백질의 특성 조사를 위한 연구를 진행하였다. 조단백질 함량 70% 이상인 SRP70을 대상으로 ninhydrin HPLC 분석을 통해 구성 아미노산 조성을 분석한 결과 구성 아미노산의 비율은 현미 및 불용성 쌀 단백질 'RP70' 그리고 수용성 쌀 단백질 SRP70 모두 거의 동일한 비율로 아미노산이 구성되어있음이 확인되었으며 SRP70의 BCAA (Branched Chain Amino Acid)의 비율이 16.98%임이 확인되었다. 또한 HR-MS 분석을 통하여 SRP70의 분자량 분포 분석을 실시하였고 그 결과 분자량 1,000 Da 이하 및 대부분이 300~700 Da의 펩타이드 물질로 구성되어 있음이 확인되었다. 대부분의 pH 범위에서 안정하며 등전점 pH 4.2임이 확인되었으며 1% 수용액 상태에서 100℃의 온도 및 12주간의 상온 저장에 대해서도 안정함이 확인되었다.
- 수용성 쌀 단백질을 활용하여 쌀음료 및 단백질 강화 음료를 개발하였다. 자체적으로 개발한 쌀 당화액을 base로 제조 한 뒤 본 연구를 통하여 개발된 SRP70을 이용하여 음료의 단백질 함량을 우유 단백질 함량인 1 mg/ml 수준으로 맞추고 milky powder 및 flavor, gum 등을 첨가하여 기호도를 향상시켜 제조하였다. 또한 단백질 보충 음료 개발을 수행, 수용성 쌀 단백질 1.3 g을 함유하는 200 ml 캔 음료로 1일 4캔 권장 성인 1일 단백질 보충제 섭취량을 충족시키는 음료 제조법을 개발하였고 관능검사 결과 상업적 활용 가능성을 확인할 수 있었다.
- 본 과제에서 개발된 소재의 대체 가능한 상품에 대하여 시장 조사를 실시하였고 개발된 각 소재를 활용하여 시리얼 및 영양식, 다이어트식, 즉석밥, 통조림, 셀러드 및 떡 가공품 등에

적용을 시도하여 시중 제품에의 대체 가능성을 확인하였다. 또한 쌀 가공 부산물의 단순 공정을 통하여 사료 제품의 제조 공정 또한 개발하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구사업을 통하여 쌀 가공 부산물로부터 불용성 단백질 및 수용성 단백질, 불용성 식이섬유 소재의 제조기술 개발 및 시제품 개발에 성공하였으며 수용화도가 높은 고품질의 수용성 쌀 단백질의 생산 기술을 확보하였다. 또한 동물실험의 효능평가를 통하여 수용성 쌀 단백질의 간 보호 효과가 뛰어난이 확인되었다.
- 본 과제를 통하여 개발된 수용성 단백질 및 식이섬유 소재의 생산을 실시 할 계획이다. 최우선적으로 수용성 쌀 단백질의 제품화를 계획하고 있으며, OEM 업체를 탐색하고 시 생산을 시도하여 생산에 가장 적합한 공장을 선정할 계획이다. 나아가 생산된 수용성 쌀 단백질 소재를 이용하여 기능성 단백질 음료를 개발, (주)비케이바이오에서 추진하고 있는 유통 network를 활용하여 제품의 판매를 추진할 계획이다.
- 본 연구의 지적재산 성과물은 특허 출원 4건, 논문 투고 5건이며, 소재화를 위한 공정개발 5건(수용성 쌀단백질, 불용성 쌀단백질, 식이섬유, 피틴산, 이노시톨), 제품화 개발 6종(단백 강화 음료, 라이스 밀크, 씨리얼, 죽, 다이어트 선식, 즉석밥)을 개발하였다.
- 향후 사업화 계획은 가장 차별화가 가능하여 우선 개발 소재로 선정한 수용성 쌀단백질 소재의 대량 생산을 위한 연구와 제품의 기능적 차별화를 위한 기작의 재현 연구, GLP기관에서의 안전성 연구 등을 추진할 예정이며, 생산된 수용성 쌀단백질 소재를 판매를 활성화를 위한 B to B 사업, 자체 음료 개발품의 적용을 통해 수요 확대를 추진할 계획이다.

# SUMMARY

## I. Title

Process development and industrial application of rice protein and natural preservatives from rice by-product

## II. Purpose and Necessity of Project

### 1. Purpose of Project

- The purpose of this project is to develop the optimum separation and manufacturing process of high purity proteins, dietary fibers, phytic acid, and inositol from rice by-products and manufacture various types of foods and feeds such as health benefic foods, dietary foods, and instant foods, and thereby substitute the imports and export the developed products.

### 2. Necessity of Project

- Although the rice production in Korea is increasing, its consumption is decreasing every year, and for this reason rice wine is being manufactured using surplus rice. Also the development and production of oil and syrup using rice is gradually increasing, and thereby enormous amount of rice by-product is generated. Due to the cost and environmental problems in disposal of rice by-product, great part of it is used for animal feeds or for compost. Therefore the study on utilization of by-products by developing new high value-added materials and products by reprocessing the by-products is urgently needed.
- Compared with soy protein, rice protein is attracting worldwide because it is free from allergenicity and is nutritious. The awareness of consumer is also very positive on the product that is manufactured with proteins and dietary fibers from rice. Therefore the development of new materials by utilizing rice by-product will be foundation on activating new product development, and substitute imports. As a result, it will contribute greatly on income increase of local farm, prevention of environment pollution and waste of foreign currency.

### III. Scope of Project

- This project was performed by organizing total five main project team, collaboration team, and commissioned team in order to accomplish the final goal.
- For the 1st collaboration team, the experiment to separate protein and fiber fraction from rice by-products were undertaken. After establishing the preservation and acquisition method of each material such as wine meal, syrup meal, de-fatted rice bran and evaluating the properties, optimum condition for the enzymes, time, and temperature was set up in order to separate protein and fiber fraction. Separation process of each fraction was established and the shelf life at each storage condition was evaluated.
- For the 2nd collaboration project, we had developed the manufacturing technique of inositol and phytic acid from rice bran. After establishing the preservation method and obtaining system of rice bran. Also we implemented the experiment for checking safety using developed phytic acid and inositol, we progressed the study on influence that is effected to stability of rice. Also we implemented the study on shelf life evaluation by the preservation condition of each material. Also we progressed the efficiency evaluation of water-soluble rice protein that is developed through 1st collaboration project. By implementing *in vivo* and *in vitro* test, we verified the effect on liver protection of water - soluble rice protein.
- Through commissioned research with Chemon, we implemented the efficiency evaluation of water-soluble rice protein. After orally administrating water soluble rice protein SRP70 that was developed through this project to Sprague-Dawley rat for 4 weeks, we implemented forced swim test and studied on the effect that the oral administration of SRP70 had given to mobility improvement of rats. And after sacrifice through analysis of blood bio-marker which can be acopic indicator they had implemented the study on the influence that is given to fatigue recovery after exercise.
- Through commissioned research with AZI, they had implemented the process optimization for mass production of each material which is developed in 1st collaboration project and 2nd collaboration project. The study for preservation and product quality evaluation of water-soluble and insoluble protein and insoluble fiber product was implemented, had established the method in order to distribute products. Subsequently we implemented on simulation for mass production of each material and optimized the process and facilities for

mass production. Also regarding phytic acid and inositol, we implemented the study for product quality evaluation and preservation and optimized on the study of distribution method and the process and facilities for mass production.

- In the sub-project team, we implemented the simulation and merchandising of material that was developed through this project. We had implemented the material standardization of developed rice protein and progressed the study for the properties of water-soluble rice protein, By utilizing water-soluble rice protein, developed the manufacturing method of rice milk and forced protein beverage and they checked the possibility of the commercialization through applying to several products like nutritious meals and dietary products of each material. Also through market research, we had established possible application range of developed material.

#### IV. Results of Project

##### 1. Development of protein and dietary-fiber extract method from rice by-products.

- We had established the optimum condition for manufacturing the fiber and rice protein. After analysing the component of wine meal, syrup meal, rice bran materials which is by product of rice and implemented the application test for development and selected the raw material for optimum material development. In the case of water soluble and insoluble protein, we had chosen the syrup meal which has highest protein contents as optimum material. Through washing process, we had established the manufacturing process of insoluble rice protein that contains more than 70% of crude protein. Also through setting of time, temperature and selecting the optimum enzyme, developed the technique for optimum water-soluble rice protein. Also through complex process of  $\alpha$ -amylase, protease, cellulase developed the manufacturing technique of fiber material that the total fiber content is more than 60%. After developing the material, they had checked the reproducibility of manufacturing process through scale up. As a result of checking mass balance, in the case of insoluble rice protein, the result is 60~75%, in the case of water soluble rice protein, it is 20~30%, and in the case of insoluble fiber, it is 40~50%.
- Shelf-life test of each fraction was undertaken. Soluble proteins were prepared in powder for the long term storage, The maximum viable cell count of total bacteria, *E. coli*, and coliform bacteria in protein and dietary fiber fractions was set up to 5,000



cfu/g, negative, and negative, respectively. The shelf-life of products sealed in aluminium pouch was set up to 2 years by acceleration test considering content of component, color, or off-flavors.

## 2. Development of phytic acid and inositol extract method from rice bran.

- Optimum conditions for the extraction of phytic acid from de-fatted rice bran are as follows; Phytic acid was extracted with 0.5% sulfuric acid followed by removing solid contaminants using gauze and passed HP20 resin. The flow-through was absorbed onto IRA-416 resin and the resulting eluent was concentrated. Inositol was prepared by hydrolyzing phytic acid at 160°C for 6 hours and the resulting phosphate group was removed by adding Ca(OH)<sub>2</sub> at pH 6.5 followed by concentration and crystallization.
- Phytic acid or inositol was added to cooked rice with a concentration of 0.01, 0.1, and 1.0%, and the changes in pH, color, and viable cell number of total bacteria was checked. during the storage at various temperature. pH of cooked rice added with 1.0% phytic acid or inositol maintained initial pH. Total bacteria was not detected and the color of sample did not change for 72 hours of storage.
- One percentage of phytic acid inhibited the growth of *S. Typhimurium* at pH 5.5-7.0. When phytic acid was added to chicken meat, fork, and beef, 1% of phytic acid inhibited *S. Typhimurium* at the level of 2.2 and 1.9 log in the chicken meat and fork, respectively. Addition of 1% phytic acid decreased pH of these meat at the level of 0.2 to 0.3. Similarly, addition of 0.5% phytic acid reduced the viable cell number of *Escherichia coli* O157:H7 at the level of 1.3 log. As the amount of phytic acid increased, TBARS value decreased and this result reflects high antioxidant activity of phytic acid, and thereby phytic acid can be used as food additives. The shelf-life of phytic acid could be 6 months.
- LD<sub>50</sub> value of soluble rice protein, SRP70, was over 2,000 mg/kg rat, and the toxicity on liver cells was not detected when liver cells were treated with 1,000 µg/ml of SRP70. Moreover, SRP70 showed good protective effect on the liver cells. When rat was treated with 1.0 g/kg of SRP70, the levels of RBC, Hb, Hct, MCV, and MCHC did not change, whereas the activities of catalase and glutathione peroxidase in the liver cells increased.

3. Test of the effects for the exercise capacity and fatigue recovery after exercise using soluble rice protein.

- The effect of soluble rice protein (SRP70) on the improvement of exercise capacity and fatigue recovery after exercise was examined. SRP70 was administrated orally to Sprague-Dawley rat at the concentration of 67, 335, and 670 mg/kg/day for 4 weeks and the exercise time of each group was checked by doing forced swim test. Rats were sacrificed after forced swim test and levels of blood glucose, creatine, ammonia, the bio-marker for fatigue recovery, were checked.
- Oral administration of SRP70 did not affect on the improvement of exercise capacity for each group. When bio-marker for fatigue recovery was checked, however, blood glucose concentration of control group was 70.80 mg/dl and that of SRP-treated group increased in proportion to the SRP concentration. In case of blood creatine, control group showed 0.64 mg/dl but intake of SRP did not affect on the level of blood creatine. In addition, levels of blood ammonia slight changed from 753.57  $\mu\text{g/dL}$  of control group to 694.29, 638.00, or 600.71  $\mu\text{g/dl}$  of each sample groups. As a result, oral administration of SRP70 did not affect on the improvement of exercise capacity for each group, but showed fatigue recovery effect after exercise.

4. Optimizing of bulk production processing.

- Quality evaluation and process for mass production of soluble and insoluble proteins and dietary fiber were established. Parameters for quality evaluation was set-up by examining the suitability of product with quality management criteria based on the components such as protein, lipid, ash, water, and carbohydrate contents of each product. Manufacturing process of each product was established through washing, enzyme process, dehydration using centrifugation, concentration, drying, grinding and packaging process, and each process was optimized. Quality evaluation and shelf-life test were also done for the phytic acid and inositol, and quality evaluation method was established by considering pH, temperature, flow rate and direction, and regeneration of resin. Mass production process for the phytic acid was established through extraction, filtration, neutralization, recovering, resolublization, ion removal, elution, and concentration processes. Manufacturing process for inositol was optimized through hydrolysis of phytic acid, addition of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , adjustment of pH, removal of phosphate,

and concentration process.

5. Applications of developed materials from rice by products.

- Characteristics of soluble rice proteins (SRP70) were studied. When the amino acid composition of SRP, of which content of crude proteins was over 70%, was analyzed using ninhydrin HPLC, it was found that the amino acid compositions of brown rice, insoluble rice proteins (RP70), and soluble rice proteins (SRP70) were almost the same, and the ratio of BCAA (branched chain amino acid) of SRP70 was 16.98%. When molecular weight range of SRP70 was analyzed using HR-MS, it was confirmed that SRP70 consisted of peptides of which molecular weight was lower than 1,000 Da and most of them were in the rang of 300~700 Da. SRP70 was stable at wide range of pH and its isoelectric point was pH 4.2. It was also stable at 100°C and safe microbiologically at room temperature for 12 weeks in 1% solution.
- Rice beverage and protein supplement beverage were developed using soluble rice protein. Saccharified rice solution was manufactured as base and the protein content of rice beverage was adjusted to 1 mg/ml, of which level was the same as protein content in milk, using SRP70, and milky powder, flavor, gum were supplemented for the taste improvement. Manufacturing process of the protein supplement beverage which contains 1.3 g of soluble rice proteins was developed as 200 ml can-type, and its daily amount of intake would be 4 cans which meets the daily amount of intake of protein supplement for adult. Sensory evaluation of these products confirmed the possibility of commercialization.
- Market research was undertaken for the applicable products using raw materials developed through this study and it is confirmed that the raw materials developed through this study can be applied to cereals, nourishing foods, dietary foods, instant cooked rice, canned foods, salads, and rice cakes. Also Manufacturing process of feeds product was developed by simplification of rice by-product process.

## V. Outcome of Project and Application Plan.

- Manufacturing techniques of insoluble and soluble proteins, and insoluble dietary fiber using rice by-products were developed and their prototypes were successfully obtained through this project. Also commercialization technologies of high quality soluble rice proteins were developed. It was confirmed that soluble rice protein showed excellent protective effects on liver.
- Soluble rice protein and dietary fiber developed through this project will be commercialized in the near future. OEM company will be recruited for the manufacturing prototype products and suitable processing plant will be selected. Furthermore, Health benefit protein beverages will be developed using processed rice protein and the developed products will be promoted for the sales using marketing network which is carried by BK bio Co., Ltd.
- Currently, four patents were applied, six research papers were submitted, five processes (soluble and insoluble rice proteins, dietary fibers, phytic acid, inositol) and six products (protein reinforced beverage, rice milk, cereal, porridge, dietary uncooked food, instant cooked rice) were developed.
- Future commercialization plan is to research for the mass production of soluble rice protein which is selected for the differentiated products with high priority of development, to reproducibility study of mechanism for the functional differentiation of products, to study of safety carried by GLP facility, to conduct B to B business for the boosting of soluble rice proteins sales, and to expand the product demand through the application of products developed in this project.



# CONTENTS

Chapter 1. Summary of the research and development project	21
Chapter 2. Situation of the technology in domestic and foreign	23
Chapter 3. Contents and results of the research and development	25
Paragraph 1. Collaborative project: Development of protein and dietary-fiber extract method from rice by product	
1. Establishment of raw material's obtain and preservation method	
2. structure material's analysis and character evaluation of raw materials	
3. Extract of rice protein and dietary fiber from rice by-product	
4. Separation process's establishment of protein and dietary fiber	
5. Set up of shelf-life as storage conditions	
Paragraph 2. Collaborative project: Development of phytic acid and inositol extract method from rice bran	
1. Establishment of raw material's obtain and preservation method	
2. Extract of phytic acid and inositol from rice bran	
3. Stability test of phytic acid and inositol	
4. Storage test of cooked rice using phytic acid and inositol	
5. Test of shelf-life as storage conditions	
6. Safety test of soluble rice protein	
7. Effects of soluble rice protein for the liver	
Paragraph 3. Researches commissioned (Chemon): Test of soluble rice protein for the liver	
1. Effects of soluble rice protein 'SRP70' on exercise performance of Sprague-Dawley rats	
2. Effects of soluble rice protein 'SRP70' on fatigue recovery of Sprague-Dawley rats after exercise performance	
Paragraph 4. Researches commissioned (AZI): Optimizing of bulk produce processing.	
1. Optimizing of bulk produce processing and quality test using protein and dietary fiber	
2. Optimizing of bulk produce processing and quality test using phytic acid and inositol	

Paragraph 5. Main project: Applications of materials developed from rice by products.

1. Standardization of rice protein
2. Study of characteristics of soluble rice protein
3. Simulation of the developed materials to commercialized products

Chapter 4. The attainment of the goal and contribution for related field	219
Chapter 5. The results of the research and development and the application plan	223
Chapter 6. Foreign technology information obtained during the project	227
Chapter 7. References	231

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황	23
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1절 1	협동과제: 주박, 시럽박, 미강으로부터 단백질 및 식이섬유 분획 제조 기술 개발	
1.	원료의 획득 체계 및 보존법의 확립	
2.	쌀 가공 부산물의 구성물 분석 및 특징 평가	
3.	쌀 가공 부산물로부터 수용성 단백질, 불용성 단백질 및 식이섬유 분리 및 분리조건 확립	
4.	단백질 및 식이섬유 분리공정의 확립	
5.	각 분획의 shelf-life 평가	
제 2절 2	협동과제: 쌀 미강으로부터 천연보존제(피틴산) 및 이노시톨 제조 기술 개발 그리고 쌀 단백질의 효능평가	
1.	미강 원료의 획득 체계 및 보존법 확립	
2.	미강으로부터 피틴산 및 이노시톨 분리 및 최적 분리조건 확립	
3.	피틴산과 이노시톨의 안정성 확인	
4.	피틴산과 이노시톨을 이용한 쌀밥의 저장성 향상	
5.	각 분획의 shelf life 평가	
6.	수용성 쌀단백질 SRP70의 안전성 평가	
7.	수용성 쌀단백질 SRP70의 간보호 효과	
제 3절	위탁과제 : 수용성 쌀단백질의 효능평가	
1.	수용성 쌀단백질 SRP70의 4 주간 경구투여가 Sprague-Dawley 랫드의 운동능력 향상에 미치는 영향 시험	
2.	수용성 쌀단백질 SRP70의 4 주간 경구투여가 Sprague-Dawley 랫드의 운동 후 피로회복에 미치는 영향 시험	
제 4절	위탁과제: 쌀 부산물 유래 단백질, 식이섬유, 피틴산, 이노시톨의 대량 생산 공정의 최적화	
1.	단백질 및 식이섬유 소재의 품질평가 및 대량생산 공정의 확립	
2.	피틴산, 이노시톨 제품의 소재의 품질평가 및 대량생산 공정의 확립	
제 5절	세부과제 : 쌀 부산물 유래 소재의 응용 및 제품화	
1.	쌀단백질의 규격 및 성적서	
2.	쌀단백질의 특성 연구	



3. 쌀 부산물 유래 소재의 제품화 및 응용

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	219
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	223
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	227
제 7 장	참고문헌	231

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

- 통계청 조사 결과 2008년도 국내 쌀 생산량은 2007년에 비해 4.7% 증가하였으나 쌀의 국내 소비량은 2007년 1인당 76.9 kg으로 2006년에 비해 2.4% 감소하였다.
- 그러나 쌀의 생산량은 증가하는 반면 소비량은 매년 줄고 있기 때문에 남은 쌀을 이용하여 탁주 등을 만들어 판매하고 있으며, 쌀을 이용한 식용유 및 조청 등의 개발 및 생산이 점차 증가하고 있고 이로부터 막대한 양의 쌀 가공 부산물이 생성되고 있다.
- 쌀 가공 부산물을 처리하기 위해서는 막대한 비용과 환경문제가 뒤따르게 되므로 현재 대부분 사료용이나 퇴비용으로 쓰이고 있는 실정이다.
- 따라서 부산물을 재가공하여 새로운 고부가가치 소재와 제품을 개발하여 부산물을 활용할 수 있는 연구가 절실히 필요하다.
- 쌀 단백질의 경우 대두단백질에 비해 알러지 유발문제에 있어 자유롭고 영양가도 풍부하여 현재 세계적으로 주목을 받고 있다. 현재 널리 사용되고 있는 대두유래 소재의 경우 GMO 관련 문제가 있는 반면 쌀의 경우는 GMO의 문제가 없기 때문에 쌀을 이용한 단백질을 더 선호하는 경향으로 바뀌고 있는 추세이다.
- 현재 미국 및 쌀을 주식으로 하는 여러 국가에서도 쌀 가공 부산물을 활용한 연구들이 활발히 진행되고 있으나, 쌀 유래 단백질에 대한 연구는 미국, 파키스탄 등에 국한되어 있으며, 기술적인 한계로 인해 상업화 진행에 한계가 있는 실정이다.
- 따라서 본 연구는 쌀 가공 부산물을 활용한 기존의 수입품 및 GMO, 알러지 반응 등의 문제를 일으킬 수 있는 대두 및 우유 유래 소재를 대체함으로써 수입제품의 국산화를 도모하고 결과적으로 외화 낭비 및 환경오염 방지, 지역농가 등의 소득증대를 목적으로 한다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 국내 식품업계에서 단백질 공급원으로써 주요 제품군은 콩에서 분리한 분리대두단백(ISP, Isolated Soy Protein) 및 우유에서 분리한 유청단백(WPC, Whey Protein Concentrate)에 국한되어 있으며, 단백질 함량에 있어서 30~80% 정도의 수준의 제품이 고기 대용 용도로의 일반식품 및 유아식 및 다이어트 건강식품의 기본 단백질원으로 사용되어 지고 있으나, 80% 이상 단백질 함유 제품인 고순도 품목의 내재화 개발은 수입 원료들과의 경쟁력 등의 이유로 인해 상업화 진행되어 지지 않고 있다.
- ISP의 경우는 미국, 유럽 등 해외에서 거의 전량이 수입되고 있으며, 유전자변형식물에서 유래되어 최근 이슈화되고 있는 식품안전성 문제로도 제기될 수 있어 그 개발에 어려움을 겪고 있는 현실이며, WPC의 경우 치즈 제조 시 발생하는 부산물을 활용해 일부 국산화되어 있으나, 그 생산량이 많지 않고 일부 햄, 만두, 돈가스, 햄버거, 스프, 캔디, 아이스크림 등에 사용되어 지는 낮은 단백질 함량을 갖는 저순도의 제품만이 내재화하여 국내에서 유통어지고 있는 현실이다.
- 과자, 케익, 아이스크림, 뉴트리션 바, 햄, 소시지 등에 다양하게 사용되는 식품용 단백질 시장규모는 연간 1조 7,000억원에 달하고 이중 1조 3,000억원 이상을 대두 단백질이 점유하고 있으며. 유청분말의 수입 동향이 05~07년까지 평균 4~5만톤 규모로 32,513,000 USD, 50,456,000 USD, 67,086,000 USD로 꾸준히 증가세를 보이고 있다.
- 국내 탈지대두단백 생산규모는 1만 300톤으로 TSP 6,300톤(61.2%), CSP 1,500톤(14.7%), ISP 2,500톤(24.1%)으로 구성되며, TSP(Texured Soy Protein)은 단백질 함유율이 50%로 제일제당, 신동방, 서림에서 생산하고 있다.
- 쌀 단백질은 대두단백질에 비해 알러지 유발문제에 있어 자유롭고 영양가도 풍부하여 현재 세계적으로 주목을 받고 있다. 현재 널리 사용어지고 있는 대두유래 소재의 경우 GMO 관련 문제가 있는 반면 쌀의 경우는 GMO의 문제가 없기 때문에 쌀을 이용한 단백질을 더 선호하는 경향으로 바뀌고 있는 추세이다.
- 미국 Sunrich사를 비롯한 유수의 해외 기업들이 쌀 단백질에 대한 연구를 진행하고 있으나, 현재까지 구체적인 개발 성과가 없고, 쌀을 주산지로 하는 동남아시아를 비롯한 여러 국가에서 부산물을 활용한 연구들이 활발히 진행되고 있으나, 쌀 유래 단백질에 대한 연구는 미국, 파키스탄 등에 국한되어 있으며, 기술적인 한계로 인해 상업화 진행에 한계가 있는 실정이다.

- 현재 국내 대기업에서 탈지미강을 이용한 쌀 단백질 추출에 대한 특허를 가지고 있으며 쌀 단백질을 추출 및 생산하기 위해 중국의 대기업과 협력하여 중국현지에 공장을 지어 미강 단백질을 생산하고 있다.
- 그러나 현재 국내 시장 상황을 미루어 볼 때, 시판중인 쌀 단백질 제품의 경우 단백질의 수용화 관련 문제 및 원료 수급 문제 그리고 맛에 있어 문제점을 가지고 있어 소재 사용에 있어 소비자들의 선호도는 매우 높으나 제품에의 적용에 있어 그 요구에 부흥하고 있지 못하고 있는 실정이다.
- 본 연구를 통하여 개발된 쌀 단백질의 경우 쌀을 가공하고 난 후의 부산물을 이용하여 개발된 것으로 쌀로부터 추출되는 단백질 보다 제조 원가가 저렴하고, 단순 공정을 통하여 고순도의 단백질 및 식이섬유 소재를 분리하여 그 활용도가 매우 높다는 장점이 있다.
- 또한 수용성 쌀 단백질의 경우 시판중인 국내 및 국외의 쌀 단백질과 비교하여 물에 대한 용해도가 매우 높고 맛에 있어서도 월등한 평가를 받아 앞으로의 국내 쌀 단백질 시장에 있어 높은 비율을 차지할 수 있을 것으로 예상되며 또한 국내로의 수출효과도 창출 할 수 있을 것으로 예상된다.
- 결론적으로 본 과제를 통하여 현재 대부분 폐기되고 있는 쌀 가공부산물을 원료로 활용하여 단백질 및 식이섬유 소재를 분리하는 방법 및 공정을 개발함으로써 기존의 수입품 및 GMO, 알러지 반응 등의 문제를 일으킬 수 있는 대두 및 우유 유래 소재를 대체함으로써 수입제품의 국산화를 통한 외화 낭비를 줄일 수 있고, 부산물을 재활용하고 고부가화 함으로써, 환경의 개선 및 지역농가 등의 소득 증대를 기대할 수 있다. 또한 기능성식품, 영양식 등 광범위하게 적용되고 있는 대두단백을 쌀단백질로 대체하여 새로운 제품개발에 광범위하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 1 협동과제: 주박, 시럽박, 미강으로부터 단백질 및 식이섬유 분획 제조기술 개발

#### 1. 주박원료의 획득 체계 및 보존법의 확립

- 두 종류의 주박(청주박, 탁주박)을 40~70℃사이의 단계별 온도에 따라 건조하여 형태변화를 관찰하였다. 수분함량이 상대적으로 많은 청주박의 경우 열풍건조를 할 경우 심한 악취와 함께 곰팡이가 피어 사용할 수 없는 상태가 되었다. 반면 수분이 적은 탁주박의 경우 40~70℃의 각 온도별로 건조를 하여 형태변화를 관찰하였고 60℃ 이상에서 건조 시는 주박이 탄화하여 사용할 수 없는 것으로 나타났다.
- 주박의 경우 수분으로 인한 무게증가와 변패가 발생하므로, 주박을 열풍건조기로 건조시킨 후 건조 주박(건주박)을 믹서기를 이용하여 분쇄, 보관 하여 시료로 사용하였다. 청주박(수분함량 91.56%)의 경우 Fig. 1-1A와 같이 액체였으며 열풍건조기를 통해서 건조하였을 때는 많은 수분함량으로 인해 Fig. 1-1B와 같이 곰팡이와 이취가 발생하여 시료로서 적합하지 않았다.
- 탁주박(수분함량 69.68%)의 경우 청주박과는 달리 어느 정도 수분이 제거된 상태였으며, 열풍건조기에서 40, 50, 60, 70℃에서 48~72시간동안 건조하여 분쇄하였을 때는 Fig. 1-1D와 같았다. 60℃ 이상에서 건조하였을 경우에는 탁주박의 탄화로 인해 시료로서 사용 불가능했으며 40℃와 50℃에서 72시간동안 건조하였을 때 시료로서 가장 적합한 상태였다.

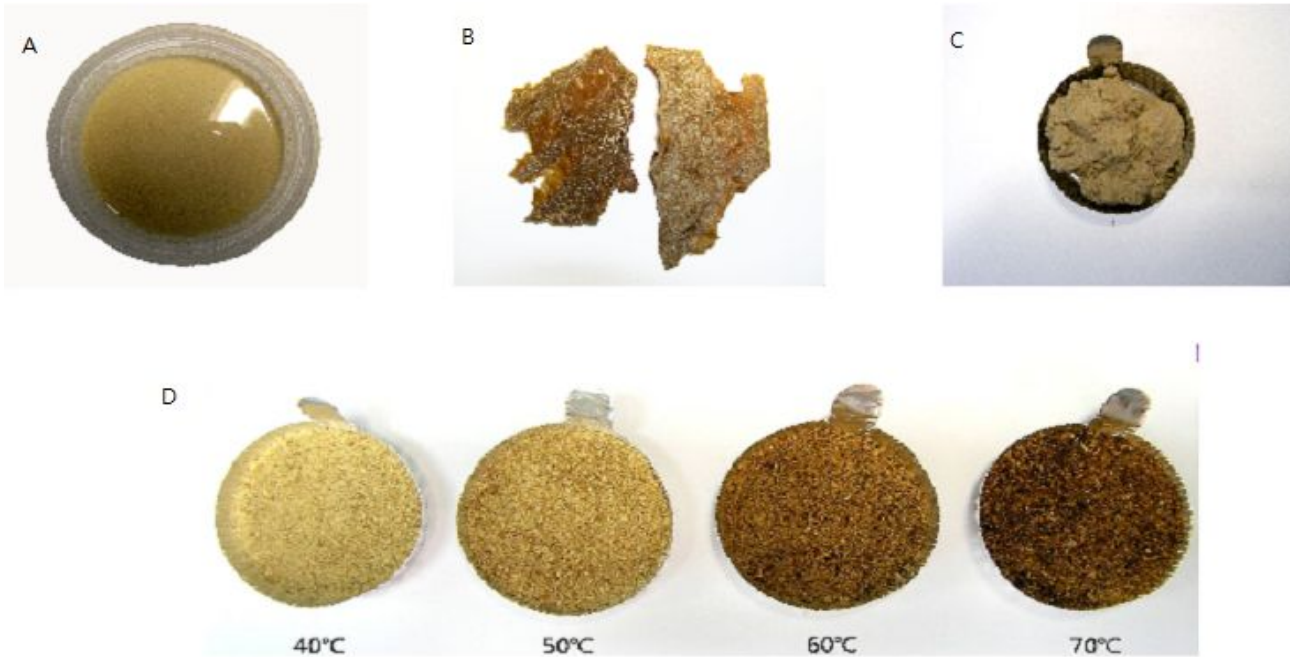


Fig. 1-1. Pictures of dried rice wine meal.

## 2. 쌀 가공 부산물의 구성물 분석 및 특징 평가

### (1) 탁주박, 미강 및 시럽박 일반 성분 분석

- AOAC 방법에 따라 탁주박, 미강 및 시럽박의 일반성분을 조단백질, 조지방, 조회분, 수분으로 나누어 분석을 하였다. 주박의 본 시료는 쌀로서 일반쌀과의 일반성분 분석비교를 통해서 상대적으로 쌀에 비해 조단백질 함량과 조지방 함량이 높은 것으로 나타났다.

### (2) 분석 및 특징 평가

- 구성물의 일반 성분은 단백질, 지방, 회분, 수분 및 탄수화물로 나뉘어 분석하였으며, 각각의 성분 분석은 AOAC방법에 따라 Kjeldahl Nitrogen Analysis(조단백), Soxhlet method(조지방), Dry ashing(조회분), Air oven method(수분)으로 분석하였다. 탄수화물의 경우 단백질, 지방, 회분 그리고 수분을 제외한 나머지를 확으로 계산하였다.
- 쌀 가공 부산물인 탁주박과 탈지미강, 쌀 시럽박을 수세 처리하여 수용성분을 모두 제거한 후, 단백질, 지방, 회분, 수분, 탄수화물 함량을 측정하였다(Table 1-1). 수세과정과 보관 중에 습도나 온도에 의해 조성이 조금씩 변하였다. 수세 처리한 쌀 부산물은 가공 전에 비해 단백질 함량이 상대적으로 높아졌고, 탄수화물 함량은 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 탁

주박의 경우 효모에 의한 분해로 탄수화물 분획이 감소한 것을 알 수 있고, 탈지미강의 경우 회분 분획이 온전한 쌀에 비해 증가한 것으로 나타났다. 또한, 쌀 시럽박의 경우 탄수화물 당화 효소반응으로 인해 탄수화물 분획이 현저히 적어진 것으로 나타났다.

Table 1-1. Proximity composition of rice and rice byproducts

	Rice	Rice wine meal	Defatted rice bran	Rice syrup meal
Crude Protein (%)	6.12-8.67	25.3±0.6	18.7±0.1	45.1±0.9
Crude Lipid (%)	0.35-0.45	4.3±0.0	4.3±0.0	8.1±0.2
Crude Ash (%)	0.59-0.63	0.4±0.0	11.2±0.2	0.8±0.0
Moisture content (%)	13.22~14.23	6.4±0.2	7.2±0.3	6.3±0.3
Carbohydrate (%)	76.6~79.12	63.6±0.4	58.6±0.3	36.7±0.1

(3) 쌀 부산물의 수세 횟수에 따른 무게 변화

- 시료(탁주박, 탈지미강, 쌀 시럽박)의 수용성 분획을 제거하기 위해 증류수로 수세를 하였고 수용성분획의 제거는 수세 횟수에 따른 무게변화를 통해 알 수 있었다. 수세 횟수에 따른 무게 변화는 아래의 Fig. 1-2에 나타내었는데, 그림에서 알 수 있듯이 탁주박과 탈지미강은 3회, 쌀 시럽박은 4회 이상을 수세하였을 때 그 무게 변화가 없는 것을 알 수 있었으며 이때의 횟수만큼 수세한 쌀 부산물을 이후 실험의 시료로 사용하였다.

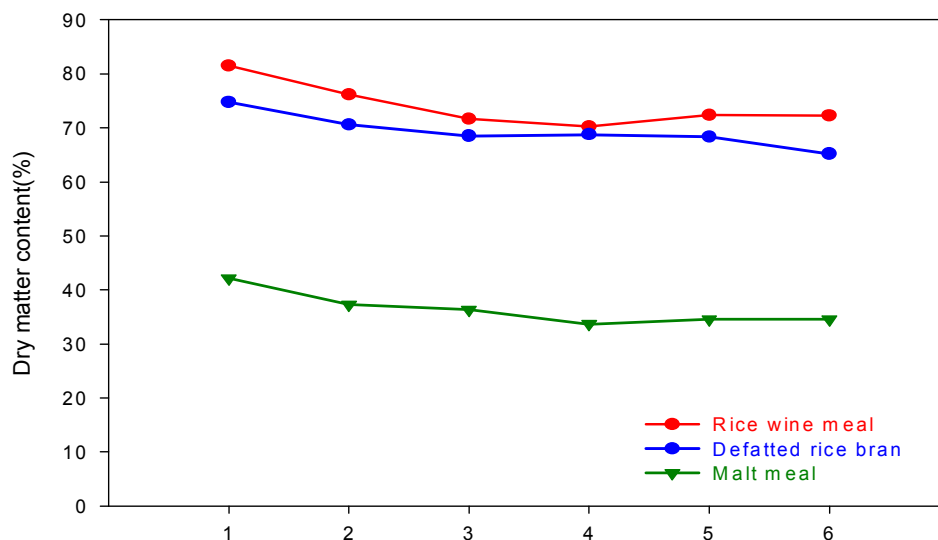


Fig. 1-2. Weight variation according to time of washing of rice by-products.



### 3. 쌀 가공 부산물로부터 수용성 단백질, 불용성 단백질 및 식이섬유 분리 및 분리조건 확립

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 수용성 단백질의 분리 및 분석

###### ● 시료의 제조

본 실험에서 사용된 쌀 부산물은 탁주박(인천탁주 협동제조장), 탈지미강(세림현미), 쌀시럽박(동희)을 사용하였다. 쌀 부산물에 존재하는 수용성 단백질을 제거하기 위해 시료 100 g에 증류수 400 ml를 가하여 5분간 교반을 한 뒤 이를 20분간 원심분리(3,000 x g)를 하여 얻어진 침전물을 dry oven에 24시간 동안 건조하여 무게를 측정하였다. 증류수를 가하여 수세하는 횟수에 따라 각각 무게를 측정한 후 그 무게의 변화가 없을 때의 시료를 수용성 성분이 완전히 제거된 시료로 결정하여 마쇄한 후 40 mesh의 표준체를 통과시켜 이후 실험의 시료로 사용하였다.

###### ● 쌀 부산물로부터 수용성 단백질의 분리 및 분석

본 실험에서는 효소를 이용하여 단백질을 수용화한 후 이때 생성된 수용성 단백질을 Lowry protein assay, 건조 후 무게차이, 효소처리 후 남은 침전물의 Kjeldahl protein assay를 통하여 비교 분석하였다.

###### ● 효소

이 실험에 사용된 효소들은 상업적으로 널리 사용되는 Protamex(Novozyme, Denmark), Neutralse(Novozyme, Denmark), Flavourzyme(Novozyme, Denmark), Alcalase(Novozyme, Denmark), Protease M(Amino, Japan), Protease N(Amino, Japan), Protease A(Amino, Japan) 그리고 Molsin F(Kikoman, Japan)와 같이 총 8가지의 효소를 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 Protease의 최적조건은 Table 1-2와 같으며, 실험에 사용된 조건은 괄호안의 값으로 표시하였다.

Table 1-2. Optimum conditions for 8 commercial proteases used in this experiment

Name	Company	pH	Temperature (°C)
Protamex	Novozyme	5.5-7.5 (7)	35-60 (40)
Neutrase	Novozyme	5.5-7.5 (7)	45-55 (45)
Flavourzyme	Novozyme	5-7 (7)	50 (50)
Alcalase	Novozyme	6.5-8.5 (7)	60 (60)
Protease M	Amano	4.5 (4.5)	50 (50)
Protease N	Amano	7 (7)	55 (55)
Protease A	Amano	7 (7)	50 (50)
Protease F	Kikoman	3 (3)	50 (50)

● 시료의 효소 처리(단일)

수용성 성분이 완전히 제거된 시료 5 g에 증류수(28.3 ml)를 첨가하여 15% 현탁액 형태로 제조하고, 1 N HCl 혹은 1 N NaOH를 사용하여 기존에 알려진 효소들의 최적 pH를 조절하고, 최적 온도에서 시료의 고형분 대비 0.1%의 효소를 첨가한 후 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 현탁액을 20분간 원심분리(3,000×g)를 하고 이때 얻어진 상등액과 침전물, 그리고 침전물의 건조 후 무게변화를 통하여 생성된 단백질의 양을 비교하였다.

● 시료의 효소 처리(혼합)

단일효소 처리로 얻어진 결과를 토대로 가장 효과가 좋은 효소 3개를 선별하여 혼합할 수 있는 모든 종류(4가지)로 혼합하여 단일처리와 같은 방법으로 최적 pH와 최적 온도에서 4시간 동안 반응한 후 20분 동안 원심분리(3,000×g)하여 상등액과 침전물을 분리, 분석하였다.

● 단백질 분석

수용성 단백질의 분석은 Lowry protein assay 방법을 이용하였다.(11) 즉, Lowry protein assay kit (TP0300-1KT, Sigma)를 이용하여 분석한 시료를 분광광도계를 사용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하고 아래의 식을 사용하여 2와 3에서 얻어진 상등액의 수용성 단백질량을 계산하였다. 이 때 Lowry protein assay에서 사용된 standard curve는 Fig. 1-3과 같다.

$$\text{Soluble protein content (mg/ml)} = \frac{O.D - 0.1143}{0.0034 \times 1000} \times D$$

(O.D=575 nm에서의 흡광도, D=희석배수)

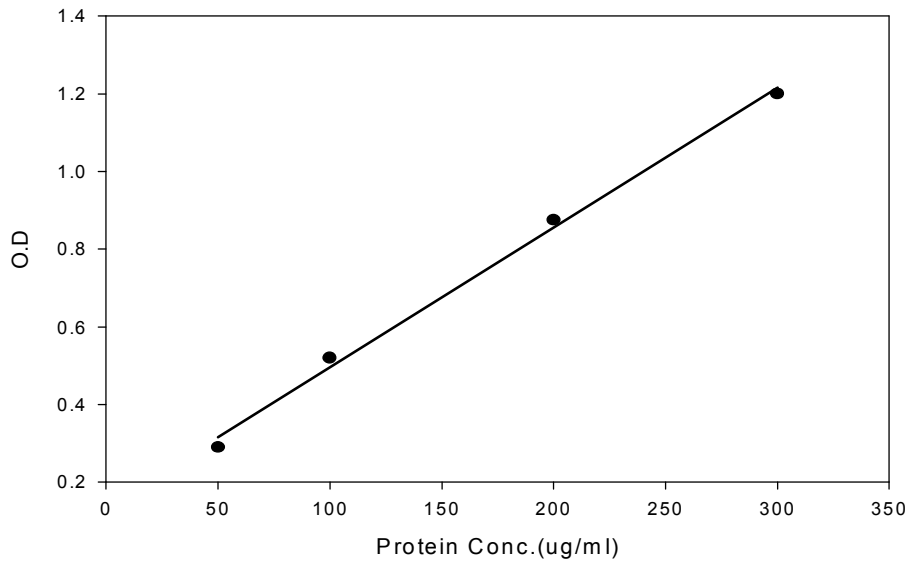


Fig. 1-3. Standard curve for Lowry protein assay.

● 효소반응 후 얻어진 쌀 부산물의 수용성 단백질 함량 계산

2와 3에서 얻어진 상등액의 수용성 단백질 함량은 아래의 식으로 구하였다.

$$\text{Soluble protein content (mg/g)} = \frac{\text{상등액 단백질농도} \times 28.3}{5 \times P \times 10} \times 100$$

(P=수세된 쌀 부산물의 단백질 함량(%))

● 건조 변화량에 따른 수용성 단백질 함량 측정

2와 3에서 얻어진 침전물을 Dry oven(105°C)에서 건조하여 처음 시료의 양과 효소반응 후 남은 침전물과의 무게 차이를 이용하여 수용성 단백질 분해율을 측정하였으며 그 식은 아래와 같다.

$$\text{soluble protein content (mg/g)} = \frac{S-D}{S} \times 1000$$

(S=시료의 무게(g), D=건조 후 무게(g))

● 침전물의 실제 단백질 함량 측정

2와 3에서 얻어진 침전물의 단백질 함량을 Kjeldahl protein assay를 통하여 계산하고 효소처리 전 시료 내에 존재하는 단백질함량과 침전물에 존재하는 단백질함량의 차를 이용하여 수용성 단백질의 분해율을 측정하였으며 그 식은 아래와 같다(12).

$$\text{Soluble protein content (mg/g)} = \frac{(1.4 \times T)}{S} \times 5.95$$

(S=시료의 무게(g), T=0.1 N HCl 적정량(ml) )

● **수분함량**

AOAC 방법에 따라 시료 2 g을 forced convection dry oven(HB-502M, Hanbaek Scientific Co., Korea)을 이용하여 105℃에서 overnight한 후 무게를 측정하여 수분함량을 계산하였다.

● **조회분 함량**

AOAC 방법에 따라 시료 1 g을 Electric muffle furnace(LMF 1200, Carbolite/ Sheffield, England)를 사용하여 550℃에서 overnight한 후 무게를 측정하여 조회분 함량을 계산하였다.

● **조지방 함량**

AOAC 방법에 따라 refrigerated circulator (Isotemp 1006p, Fisher Scientific, USA)를 사용하여 ether 추출을 하는 Soxhelt extraction을 하여 조지방 함량을 계산하였다.

● **SDS PAGE**

단백질 시료는 SDS를 포함하는 polyacrylamide gel을 이용한 Laemmli(1970)의 방법에 따라서 전기영동을 하였다. Separating gel은 10% acrylamide gel을 준비하였고 running gel은 H<sub>2</sub>O 1.9 ml, 30% acrylamide mix 1.7 ml, 1.5 M Tris (pH 8.8) 1.3 ml, 10% SDS 0.05 ml, 10% ammonium persulfate 0.05 ml, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED) 0.002 ml의 조성으로 제조하였으며 stacking gel은 H<sub>2</sub>O 0.68 ml, 30% acrylamide mix 0.17 ml, 1.0 M Tris(pH 6.8) 0.13 ml, 10% SDS 0.01 ml, 10% ammonium persulfate 0.01 ml, TEMED 0.001 ml의 조성으로 제조하였다. Sample은 5× sample buffer(60 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8), 14.4 mM β-mercaptoethanol, 2%(w/v) SDS, 25%(v/v) glycerol, 0.1% (w/v) bromophenol blue)와 섞어서 10분간 끓인 다음 침전물은 12,000 rpm으로 1분간 원심분리시킨 후 gel에 loading하였다. 전기영동은 150mA로 분리했으며, staining buffer(Coomassie blue R-250 1.0 g, methanol 450 ml, H<sub>2</sub>O 450 ml, glacial acetic acid 100 ml)와 destaining buffer(methyl alcohol 100 ml, acetic acid 100 ml, H<sub>2</sub>O 800 ml)를 사용해서 염색과 탈색을 하였다.

● **Amino acid 분석**

시료 30 mg를 300 μl의 dd-H<sub>2</sub>O에 녹인 후 10% TCA solution을 1:1의 비율로 첨가하고 10분간 원심분리(12,000×g)하여 단백질을 침전시켰다. 지방을 제거하기 위해 hexane을 1:1의 비율로 첨가하여 지방을 녹인 후 5분간 원심분리(12,000×g)를 하고 침전된 침전물을 sample로 사

용하였다. Sample은 0.4  $\mu\text{m}$ 의 filter로 여과한 후 Amino Acid Analyzer(Hitachi L-8900)를 이용하여 분석하였다.

● 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복 측정한 다음, 통계처리 프로그램인 SAS(statistical analysis program)을 이용하여 5% 유의수준에서 평균값과 표준편차 그리고 Duncan's multiple range test로 평균간의 다중비교를 실시하였다(13).

(2) 불용성 단백질 및 식이섬유의 분리 및 분석

● 쌀 부산물로부터 불용성 단백질 및 식이섬유의 분리 및 분석

본 실험에서는 Celluclast, Fungamyl, Liquozyme, Promozyme, Termamyl, Viscozyme의 효소를 이용하여 시료를 수용화한 후 이때 분해된 양을 건조 후 무게차이로 확인하고, 효소처리 후 남은 침전물의 Kjeldahl protein assay를 통하여 효소처리 후의 단백질 함량을 비교 분석하였다. 또한 TDF(Total Dietary Fiber) assay kit을 이용하여 침전물의 식이섬유 분획을 정량하였다.

● Enzyme

본 연구에서는 총 6가지의 상업적으로 이용되는 가수분해 효소가 사용되었다. 실험에 사용된 효소의 성상과 조성, 활성, 밀도, 최적 pH, 최적 온도는 Table 1-3과 같다. 실제 실험에 사용된 조건은 괄호 안에 표기하였다.

Table 1-3. Optimum conditions for 6 commercial enzymes used in this experiment

Enzyme	Condition	component	Declared activity	Density	Optimum pH	Optimum temp.( $^{\circ}\text{C}$ )
Celluclast	Brown liquid	Cellulase	700 EGU/g	1.22 g/mL	4.5~6.0 (4.5)	50~60 (60)
Fungamyl 800L	Brown liquid	$\alpha$ -Amylase	800 FAU/g	1.25 g/ml	5 (5)	55~60 (60)
Liquozyme supra	Amber liquid	$\alpha$ -Amylase	135 KNU/g	1.26 g/ml	5.5~7.0 (6.5)	50 (50)
Promozyme D2	Brown liquid	Pullulanase	400 PUN/ml	1.25g/ml	5 (5)	60 (60)
Termamyl type L	Brown liquid	$\alpha$ -Amylase	120 KNU/g	1.20~1.25 g/ml	6.5 (6.5)	93 (90)
Viscozyme L	Brown liquid	$\beta$ -Glucanase, Arabanase, Cellulase, Hemicellulase, Xylanase	120 FBG/ml	1.2 g/ml	4.6 (4.6)	44 (44)

● 효소별 최적 반응 시간 확립

탁주박을 대상으로 각 효소에 의한 최적 반응 시간을 확립하기 위해 탁주박 시료 5 g에 증류수(28.3 ml)를 첨가하여 15% 현탁액 형태로 제조하고, 각 효소의 최적 pH와 최적 온도에 맞게 환경을 조절한 후, 효소별로 각각 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5, 12, 24시간을 반응시켰다. 그 후 그 무게손실 양을 이용하여 효소별 최적 반응시간을 결정하였다.

● 시료의 효소 처리(단일)

수용성 성분이 완전히 제거된 시료 5 g에 증류수(28.3 ml)를 첨가하여 15% 현탁액 형태로 제조하고, 1 N HCl 혹은 1 N NaOH를 사용하여 기존에 알려진 효소들의 최적 pH를 조절하고, 최적 온도에서 과량의 효소를 첨가하여 최적시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 현탁액을 20분간 원심분리(3,000×g)를 하고 이때 얻어진 침전물의 무게와 침전물을 분석하여 단백질 함량의 변화와 총식이섬유의 변화를 비교분석하였다.

● 시료의 효소 처리 (순차적 혼합)

연구 결과 주박 시료는 Amylolytic enzymes(Termamyl, Fungamyl, Liquozyme)와의 반응에서 무게 손실량이 높게 나타났다. 따라서, amylolytic enzyme 중 가장 수율이 높은 Termamyl과  $\beta$ -glucanase, arabanase, cellulase, hemicellulase, xylanase의 혼합효소인 Viscozyme 그리고 cellulase인 Celluclast를 순차적으로 혼합처리하여 이때 얻어진 침전물을 비교, 분석하였다. 순차적 효소 처리 순서는 최적 온도가 높은 효소에서 최적 온도가 낮은 효소 순서로(Termamyl, Celluclast, Viscozyme 순서) 처리하였다.

● 수분함량

AOAC 방법에 따라 시료 2 g을 Forced convection dry oven(HB-502M, Hanbaek Scientific Co., Korea)을 이용하여 105°C에서 overnight한 후 무게를 측정하여 수분함량을 계산하였다.

● 조회분 함량

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

● 조지방 함량

AOAC 방법에 따라 refrigerated circulator(Isotemp 1006p, Fisher Scientific, USA)를 사용하여 ether 추출을 하는 Soxhelt extraction을 하여 조지방 함량을 계산하였다.

● 건조 무게 변화에 따른 분해량추정

②와 ③에서 얻어진 침전물을 Dry oven(105°C)에서 건조하여 처음 시료의 양과 효소반응 후

남은 침전물과의 무게 차이를 이용하여 탄수화물 분획의 수용화로 인한 분해량을 측정하였으며 그 식은 아래와 같다.

$$\text{Weight loss} = \frac{S-D}{S} \times 1000 \text{ (mg/g)}$$

(S=시료의 무게(g), D=건조 후 무게(g) )

● 침전물의 단백질 함량 측정

②와 ③에서 얻어진 침전물의 단백질을 Kjeldahl protein assay를 통하여 계산하였다.

● 침전물의 총 식이섬유 함량 측정

②와 ③에서 얻어진 침전물의 총 식이섬유 함량을 AACC total dietary fiber(TDF) method 32-05를 이용하여 측정하였으며 그 식은 다음과 같다.

$$\text{Total dietary fiber(\%)} = \frac{\frac{R_1+R_2}{2} - P - A - B}{\frac{m_1+m_2}{2}} \times 100$$

(R<sub>1</sub> = m<sub>1</sub> 반응 후 남은 무게, R<sub>2</sub> = m<sub>2</sub> 반응 후 남은 무게, m<sub>1</sub> = 시료의 무게 1, m<sub>2</sub> = 시료의 무게 2, A = R<sub>1</sub>의 회분량, P = R<sub>2</sub>의 단백질량, B = 공시험값)

● 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복 측정된 다음, 통계처리 프로그램인 SAS(statistical analysis program)을 이용하여 5% 유의수준에서 평균값과 표준편차 그리고 Duncan's multiple range test로 평균간의 다중비교를 실시하였다.

나. 실험결과

(1) 효소 최적조건에서의 각 시료별 실험방법에 따른 수용성 단백질 함량 비교

(가) 탁주박

● Fig. 1-4에서 알 수 있듯이 전체적인 그래프 패턴이 비슷한 형태를 나타내어 수용성 단백질 생성량을 비교 분석함에 있어서 3가지 방법이 모두 적절함을 알 수 있었다. 특히 Lowry

protein assay와 Kjeldahl protein assay의 값은 거의 유사한 반면 건조방법의 경우 비슷한 경향을 나타내었지만 그 양은 다른 두 가지 방법에 비하여 훨씬 크게 나타났다. Table 1-4에서 볼 수 있듯이 Lowry 방법의 경우 Alcalase가 가장 큰 분해정도를 나타내었고 Protease N과 Protamex의 순으로 분해 정도가 큰 것으로 나타났다.

- 건조방법의 경우 Alcalase가 가장 큰 분해정도를 나타내었고, 그 다음 Protease N, Protease M, Protamex의 순으로 분해정도가 크게 나타났으며, 이 중 Protease M과 Protamex의 경우 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. Kjeldahl의 경우 Alcalase가 가장 큰 분해정도를 나타내었고, Protamex가 두 번째로 큰 분해 정도를 나타내었으며, 나머지 다섯 개의 효소의 경우 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. 특히 실제 침전물을 비교해서 전체의 양과의 차이를 계산한 Kjeldahl의 경우 Alcalase가 전체 단백질의 37.56%의 분해율 ( $122.01/324.8 \times 100$ )을 나타내었다.
- 따라서 세가지 방법 모두에서 유의적으로 분해 정도의 차이가 큰 Protamex, Alcalase, Protease N 등 3가지 단백질 분해 효소가 가장 효과가 좋음을 알 수 있었고, 이것을 바탕으로 탁주박의 혼합 효소처리 부분에서는 이 세가지 효소를 혼합하여 각 효소들의 상승효과를 비교 분석하였다.

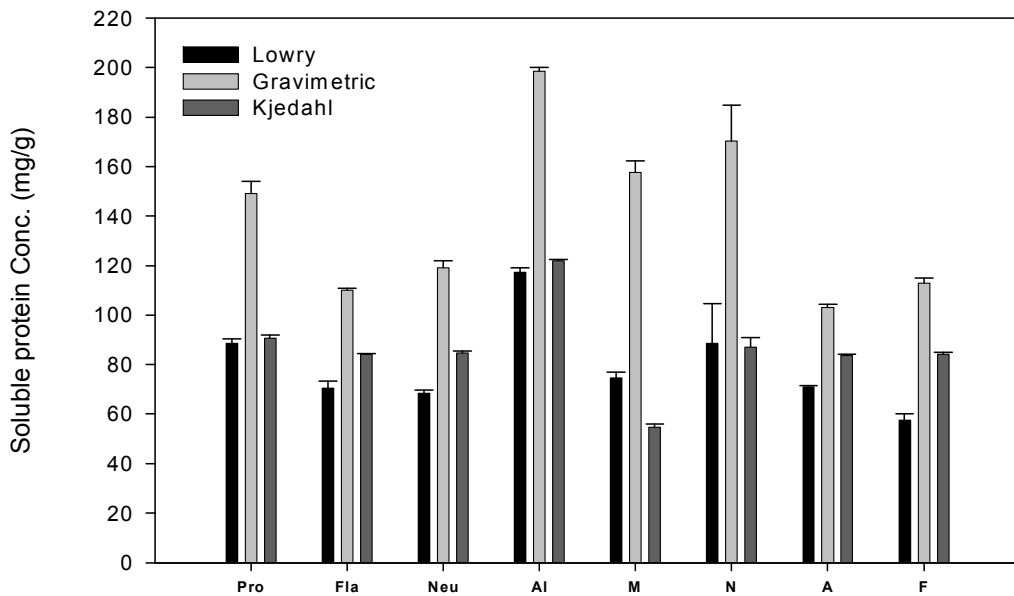


Fig. 1-4. Soluble protein contents of rice wine meal after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases.



Table 1-4. Soluble protein contents of rice wine meal after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases

	Lowry (mg/g)	Dry (mg/g)	Kjedahl (mg/g)
Protamex	88.44±2.08 <sup>B*</sup>	149.11±4.89 <sup>C</sup>	90.70±1.27 <sup>B</sup>
Flavourzyme	70.49±2.82 <sup>C</sup>	109.93±1.00 <sup>DE</sup>	84.28±0.26 <sup>C</sup>
Neutrase	68.52±1.14 <sup>C</sup>	119.19±2.64 <sup>D</sup>	84.79±0.68 <sup>C</sup>
Alcalase	117.41±1.71 <sup>A</sup>	198.50±1.53 <sup>A</sup>	122.01±0.36 <sup>A</sup>
Protease M	74.69±2.20 <sup>C</sup>	157.67±4.66 <sup>C</sup>	54.67±1.42 <sup>D</sup>
Protease N	88.49±16.20 <sup>B</sup>	170.31±14.41 <sup>B</sup>	86.94±3.91 <sup>C</sup>
Protease A	71.03±0.44 <sup>C</sup>	103.10±1.37 <sup>E</sup>	83.80±0.35 <sup>C</sup>
Protease F	57.59±2.50 <sup>D</sup>	112.84±2.25 <sup>DE</sup>	84.30±0.58 <sup>C</sup>

\* Means with the same letters in the same column are not significantly different (P<0.05)

#### (나) 탈지미강

- 탈지미강의 경우에도 탁주박과 마찬가지로 전체적인 패턴이 비슷한 형태를 나타냄으로써 수용성 단백질 생성량을 비교 분석함에 있어서 3가지 방법이 모두 적합함을 알 수 있었다 (Fig 1-5). 탈지박과 마찬가지로 Lowry protein assay와 Kjeldahl protein assay의 값이 유사한 값을 나타내었고, 건조 방법은 상대적으로 높은 값을 나타내었으나 그 경향은 모두 비슷하였다. Table 1-5에서 볼 수 있듯이 Lowry 방법의 경우 Protease N이 가장 큰 분해정도를 나타내었고 Alcalase, Protamex의 순으로 분해 정도가 큰 것으로 나타났다.
- 건조방법의 경우 Alcalase가 가장 큰 분해정도를 나타내었고, 그 다음 Protease N, Protease M, Protease A, Protamex의 순으로 분해정도가 크게 나타났으며, 이 중 Protease M, Protease A 및 Protamex의 경우 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. Kjeldahl의 경우 Protease N이 가장 큰 분해정도를 나타내었고, Alcalase, Protease M, Protease A, Neutrase, Protamex의 순으로 분해 정도가 큰 것으로 나타났다. 특히 실제 침전물을 비교해서 전체의 양과의 차이를 계산한 Kjeldahl의 경우 그 값을 분해율로서 계산을 하면 Protease N이 전체 단백질의 21.21%의 분해율(37.94/178.9\*100)을 나타내었다.
- 따라서 탁주박과 마찬가지로 세가지 방법 모두에서 유의적으로 분해 정도의 차이가 큰 Protease N, Alcalase를 선택하였고 상대적으로 분해 정도가 큰 것으로 나타난 Protamex를 선택하여 탈지미강의 혼합 효소처리 부분에서는 이 세 가지 효소를 혼합하여 각 효소들의 상승효과를 비교 분석하였다.

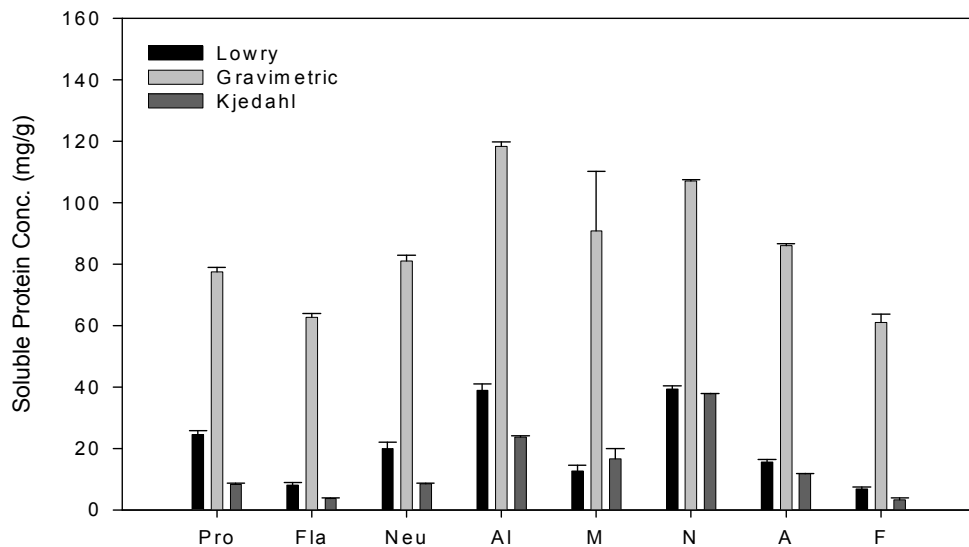


Fig. 1-5. Soluble protein contents of defatted rice bran after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases.

Table 1-5. Soluble protein contents of defatted rice bran after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases

	Lowry (mg/g)	Dry (mg/g)	Kjedahl (mg/g)
Protamex	24.57±1.21 <sup>B*</sup>	77.61±1.29 <sup>B</sup>	8.39±0.24 <sup>E</sup>
Flavourzyme	8.07±0.78 <sup>F</sup>	62.71±1.34 <sup>C</sup>	3.63±0.25 <sup>F</sup>
Neutrase	19.94±2.01 <sup>C</sup>	81.00±1.83 <sup>B</sup>	8.46±0.34 <sup>E</sup>
Alcalase	39.05±2.06 <sup>A</sup>	118.33±1.61 <sup>A</sup>	23.80±0.28 <sup>B</sup>
Protease M	12.64±1.87 <sup>E</sup>	90.78±19.54 <sup>B</sup>	16.55±3.49 <sup>C</sup>
Protease N	39.38±1.00 <sup>A</sup>	107.14±0.37 <sup>A</sup>	37.94±0.06 <sup>A</sup>
Protease A	15.58±0.83 <sup>D</sup>	86.01±0.68 <sup>B</sup>	11.78±0.12 <sup>D</sup>
Protease F	6.88±0.62 <sup>F</sup>	61.03±2.61 <sup>C</sup>	3.34±0.49 <sup>F</sup>

\* Means with the same letters in the same column are not significantly different (P<0.05).

#### (다) 쌀시럽박

- 쌀 시럽박의 경우 탁주박과 탈지미강과 마찬가지로 전체적인 그래프 패턴이 비슷한 형태를 나타내어 수용성 단백질 생성량을 비교 분석함에 있어서 3가지 방법이 모두 적합함을 알 수 있었다(Fig 1-6). 다른 시료들과 마찬가지로 Lowry protein assay와 Kjeldahl protein assay의 값이 유사하고 건조방법이 상대적으로 큰 값을 나타내었다. Table 1-6에서 볼 수

있듯이 Lowry 방법의 경우 Protease N과 Protease M이 가장 큰 분해정도를 나타내었고 Protease A, Neutralse, Alcalase의 순으로 분해 정도가 큰 것으로 나타났으며, Protease A, Neutralse 및 Alcalase의 경우 유의차가 없는 것으로 나타났다.

- 건조방법의 경우 Protease N이 가장 큰 분해정도를 나타내었고, Protease M, Protease A의 순으로 분해정도가 큰 것으로 나타났다. Kjeldahl의 경우 Protease N이 가장 큰 분해정도를 나타내었고 Protamex, Protease A, Protease M의 순으로 분해 정도가 큰 것으로 나타났다. 특히 세가지 비교분석 방법 중 실제 침전물을 비교해서 전체의 양과의 차이를 계산한 Kjeldahl의 경우 분해율로서 계산을 하면 Protease N이 전체 단백질의 9.9%의 분해율 ( $70.43/711.16 \times 100$ )을 나타내었다.
- 따라서 세 가지 방법 모두에서 유의적으로 분해 정도의 차이가 큰 Protease N, Protease M 및 Protease A 등 세 가지 효소를 선택하여 쌀 시럽박의 혼합 효소처리 부분에서는 이 세 가지 효소를 혼합하여 각 효소들의 상승효과를 비교 분석하였다. 주목할 만한 사실은 탁주박과 탈지미강 등 상대적으로 단백질 함량이 낮은 시료의 경우에는 Alcalase, Protease N 및 Protamex 등 세 가지 단백질 분해효소가 효과적인 것으로 나타난 반면 상대적으로 단백질 함량이 높은 쌀 시럽박의 경우에는 Protease N, Protease M 및 Protease A 등 세 가지 효소가 더 효과적인 것을 확인 할 수 있었다. 또한 탁주박, 탈지미강 및 쌀 시럽박의 경우 각각 다른 종류의 쌀을 사용하였기 때문에 쌀 품종에 따라 이러한 차이가 나타날 수도 있음을 확인할 수 있었다.

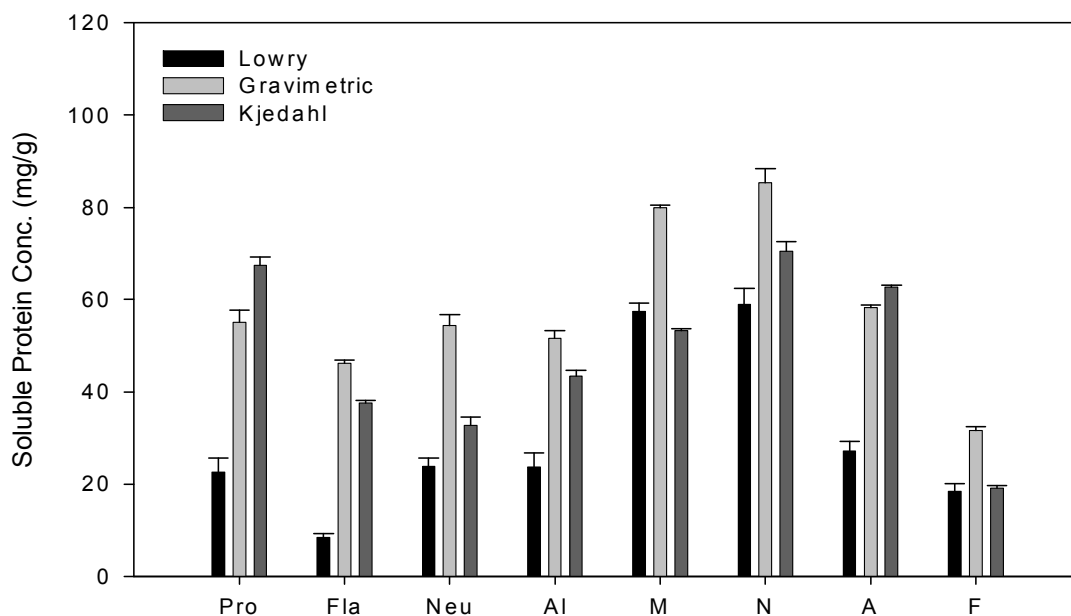


Fig. 1-6. Soluble protein contents of rice syrup meal after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases.

Table 1-6. Soluble protein contents of rice syrup meal after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases

	Lowry (mg/g)	Dry (mg/g)	Kjedahl (mg/g)
Protamex	22.65±3.01 <sup>BC*</sup>	55.04±2.65 <sup>D</sup>	67.43±1.81 <sup>B</sup>
Flavourzyme	8.39±0.83 <sup>D</sup>	46.14±0.79 <sup>F</sup>	37.60±0.56 <sup>F</sup>
Neutrase	23.82±1.85 <sup>B</sup>	54.33±2.44 <sup>DE</sup>	32.73±1.75 <sup>G</sup>
Alcalase	23.69±3.08 <sup>B</sup>	51.59±1.75 <sup>E</sup>	43.46±1.24 <sup>E</sup>
Protease M	57.46±1.76 <sup>A</sup>	79.97±0.47 <sup>B</sup>	53.32±0.33 <sup>D</sup>
Protease N	59.02±3.35 <sup>A</sup>	85.36±3.02 <sup>A</sup>	70.43±2.12 <sup>A</sup>
Protease A	27.17±2.13 <sup>B</sup>	58.31±0.51 <sup>C</sup>	62.73±0.35 <sup>C</sup>
Protease F	18.37±1.77 <sup>C</sup>	31.63±0.78 <sup>G</sup>	19.07±0.56 <sup>H</sup>

\* Means with the same letters in the same column are not significantly different (P<0.05).

## (2) 혼합 효소를 혼합하였을 때와 단일 사용 시 수용성 단백질 함량 비교

### (가) 탁주박

- 세 가지 효소를 두 개씩 또는 세 가지 모두를 혼합하여 탁주박의 단백질을 분해 한 결과 이들 효소들의 상승효과는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-7). 탁주박의 경우 가장 분해능력이 큰 Alcalase 단독으로 처리한 것에 비하여 Alcalase와 다른 두 가지 효소들을 각각 하나씩 또는 두 개 모두를 혼합하여 단백질을 분해하여도 이들간의 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인 할 수 있었다(Table 1-7). 이는 탁주박의 불용성 단백질 중 분해가 가능한 부분이 Alcalase에 의해 완전히 분해가 되어 더 이상 다른 효소들에 의해 분해가 일어나지 않는 것이기 때문으로 생각된다.

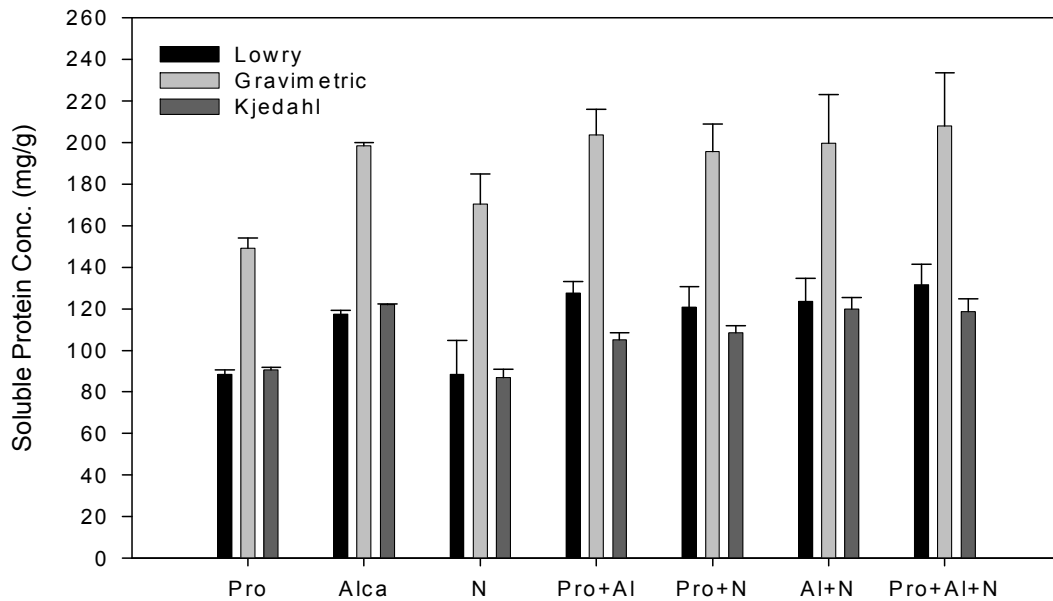


Fig. 1-7. Soluble protein contents of rice wine meal after enzymatic hydrolysis with mixed proteases.

Table 1-7. Soluble protein contents of rice wine meal after enzymatic hydrolysis with mixed proteases

	Lowry (mg/g)	Dry (mg/g)	Kjedahl (mg/g)
Protamex	88.44±2.08 <sup>B*</sup>	149.11±4.89 <sup>B</sup>	90.70±1.27 <sup>C</sup>
Alcalase	117.41±1.71 <sup>A</sup>	198.50±1.53 <sup>A</sup>	122.01±0.36 <sup>A</sup>
Protease N	88.49±16.20 <sup>B</sup>	170.31±14.41 <sup>B</sup>	86.94±3.91 <sup>C</sup>
Pro+Al	127.75±5.35 <sup>A</sup>	203.69±12.38 <sup>A</sup>	105.13±3.21 <sup>B</sup>
Pro+N	120.76±9.84 <sup>A</sup>	195.57±13.41 <sup>A</sup>	108.52±3.39 <sup>B</sup>
Al+N	123.69±11.08 <sup>A</sup>	199.55±23.52 <sup>A</sup>	119.91±5.65 <sup>A</sup>
Pro+Al+N	131.72±9.55 <sup>A</sup>	207.85±25.59 <sup>A</sup>	118.65±6.25 <sup>A</sup>

\* Means with the same letters in the same column are not significantly different (P<0.05).

#### (나) 탈지미강

- 탁주박과는 달리 탈지 미강의 경우 세가지 효소를 혼합하여 사용하였을 경우 그 분해효과가 더 커지는 것으로 나타났다(Fig. 1-8). 각각의 방법으로 분석한 결과가 상이하지만 Lowry의 경우 한 가지 효소를 사용한 경우 Protease N 이 39.38 mg/g의 수용성 단백질을 생산한 반면 Protease N, Alcalase 및 Protease M 등 세 가지 효소를 모두 사용한 경우

55.34 mg/g 의 수용성 단백질을 생산하여 전체적으로 약 41%의 상승을 나타내었다.

- 건조방법의 경우 Alcalase가 118.33 mg/g의 수용성 단백질을 생산하였고 Protease N, Alcalase 및 Protease M 등 세 가지 효소를 모두 사용한 경우 198.45 mg/g의 수용성 단백질을 생산하여 전체적으로 약 68%의 상승을 나타내었으며, Kjeldahl의 경우 Protease N 단독으로 단백질을 분해한 경우 37.94 mg/g의 수용성 단백질을 생산하였고 Protease N, Alcalase 및 Protease M 등 세 가지 효소를 모두 사용한 경우 42.92 mg/g의 수용성 단백질을 생산하여 전체적으로 약 13%의 상승을 나타내었다(Table 1-8).
- 특히 실제 침전물을 비교해서 전체의 양과의 차이를 계산한 Kjeldahl의 경우 효소를 단일로 사용하였을 때는 Protease N이 21.21%의 단백질 분해율을 나타내었으나 효소를 혼합하였을 경우 23.99% ( $42.92/178.9 \times 100$ )의 분해율을 나타내었다. 비록 세 가지 방법으로 분석한 결과가 상이하였으나 세 가지 방법 모두 혼합효소를 사용한 경우 상승효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 탈지미강에 존재하는 불용성 단백질의 특성이 한 가지 효소만으로 분해되기보다는 세 가지 효소의 기질 특이성에 따른 분해 패턴이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

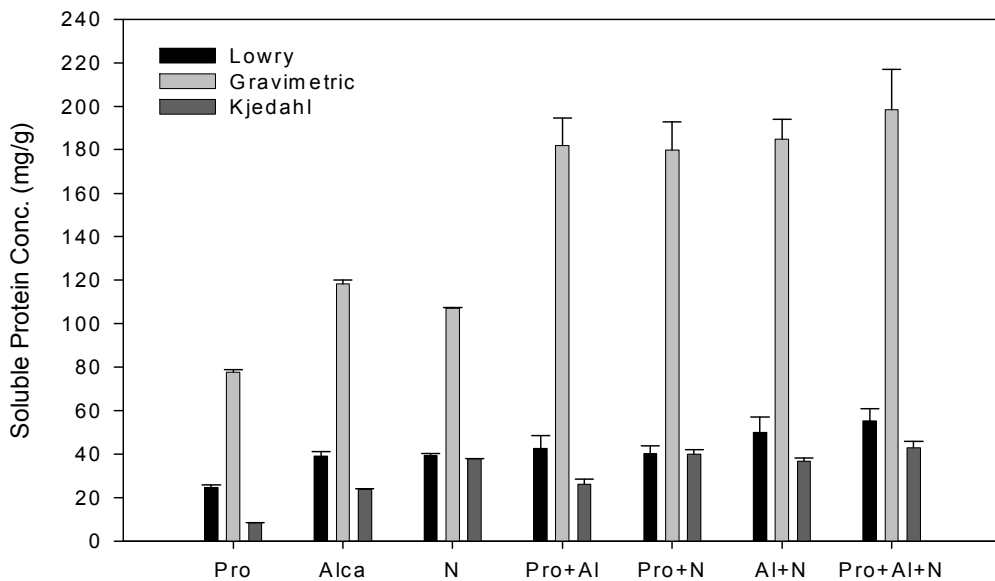


Fig. 1-8. Soluble protein contents of defatted rice bran after enzymatic hydrolysis with mixed proteases.

Table 1-8. Soluble protein contents of defatted rice bran after enzymatic hydrolysis with mixed proteases

	Lowry (mg/g)	Dry (mg/g)	Kjedahl (mg/g)
Protamex	4.57±1.21 <sup>D*</sup>	77.61±1.29 <sup>C</sup>	8.39±0.24 <sup>D</sup>
Alcalase	39.05±2.06 <sup>c</sup>	118.33±1.61 <sup>B</sup>	23.80±0.28 <sup>C</sup>
Protease N	39.38±1.00 <sup>c</sup>	107.14±0.37 <sup>B</sup>	37.94±0.06 <sup>B</sup>
Pro+Al	42.67±5.79 <sup>C</sup>	182.03±12.59 <sup>A</sup>	26.26±2.35 <sup>C</sup>
Pro+N	40.24±3.47 <sup>C</sup>	179.73±12.99 <sup>A</sup>	39.96±2.20 <sup>AB</sup>
Al+N	50.02±7.16 <sup>B</sup>	184.83±8.99 <sup>A</sup>	36.73±1.57 <sup>B</sup>
Pro+Al+N	55.34±5.43 <sup>A</sup>	198.45±18.48 <sup>A</sup>	42.92±3.14 <sup>A</sup>

\* Means with the same letters in the same column are not significantly different(P<0.05).

#### (다) 쌀시럽박

- 쌀 시럽박의 경우 앞에서 실험한 탁주박 및 탈지미강과 다른 결과를 나타내었다. 쌀 시럽박의 경우에도 탈지미강과 마찬가지로 혼합효소를 사용한 경우 단백질의 분해정도가 큰 것으로 나타났으나 Kjehahl로 분석한 결과에서는 오히려 Protease N 과 Protease M 두 가지 효소를 사용한 경우 가장 높은 단백질 분해정도를 나타내었다(Fig. 1-9).
- 쌀 시럽박의 경우 Lowry의 경우 한 가지 효소를 사용한 경우 Protease N 이 59.02 mg/g의 수용성 단백질을 생산한 반면 Protease N, Protease A 및 Protease M 등 세 가지 효소를 모두 사용한 경우 75.96 mg/g의 수용성 단백질을 생산하여 전체적으로 약 29%의 상승을 나타내었다.
- 건조방법의 경우 Protease N이 85.36 mg/g의 수용성 단백질을 생산하였고 Protease N, Protease A 및 Protease M 등 세 가지 효소를 모두 사용한 경우 147.51 mg/g의 수용성 단백질을 생산하여 전체적으로 약 73%의 상승을 나타내었으며, Kjehahl의 경우 Protease N 홀로 단백질을 분해한 경우 70.43 mg/g의 수용성 단백질을 생산하였고 Protease N 및 Protease M 두 가지 효소를 사용한 경우 104.03 mg/g의 수용성 단백질을 생산하여 전체적으로 약 48%의 상승을 나타내었다(Table 1-9).
- 이 결과를 앞의 두 시료와 마찬가지로 분해율로서 계산을 하면 효소를 단일로 처리하였을 경우 Protease N이 가장 높은 9.9%의 분해율을 나타내었지만 Protease N과 Protease M을 혼합하여 사용하였을 경우 14.62% (104.03/711.16\*100)의 분해율을 나타냄으로써 효소를 혼합하면 상승효과가 상당히 큼을 알 수 있었다. 탈지미강과 마찬가지로 세 가지 방법으로 분석한 결과가 상이하였으나 세 가지 방법 모두 혼합효소를 사용한 경우 상승효과가 있음을

확인 할 수 있었다. 이는 쌀 시럽박에 존재하는 불용성 단백질의 특성이 한 가지 효소만으로 분해되기보다는 세 가지 효소의 기질 특이성에 따른 분해 패턴이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

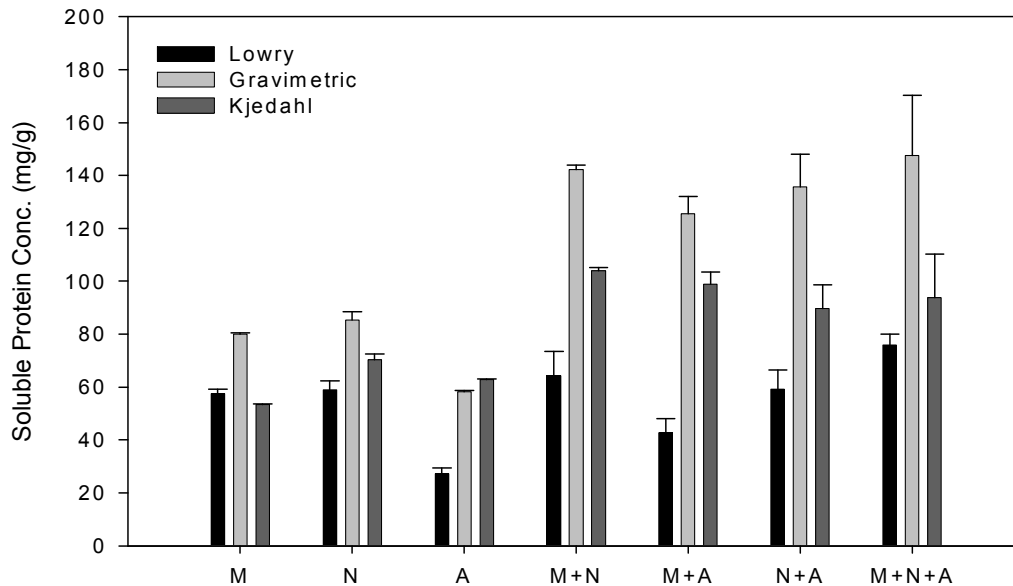


Fig. 1-9. Soluble protein contents of rice syrup meal after enzymatic hydrolysis with mixed proteases.

Table 1-9. Soluble protein contents of rice syrup meal after enzymatic hydrolysis with mixed proteases

	Lowry(mg/g)	Dry(mg/g)	Kjedahl(mg/g)
Protease M	57.46±1.76 <sup>B*</sup>	79.97±0.47 <sup>C</sup>	53.32±0.33 <sup>D</sup>
Protease N	59.02±3.35 <sup>B</sup>	85.36±3.02 <sup>C</sup>	70.43±2.12 <sup>C</sup>
Protease A	27.17±2.13 <sup>D</sup>	58.31±0.51 <sup>D</sup>	62.73±0.35 <sup>CD</sup>
M+N	64.22±9.13 <sup>B</sup>	142.22±1.67 <sup>A</sup>	104.03±1.18 <sup>A</sup>
M+A	42.81±5.18 <sup>C</sup>	125.41±6.53 <sup>B</sup>	98.99±4.58 <sup>AB</sup>
N+A	59.18±7.31 <sup>B</sup>	135.71±12.21 <sup>AB</sup>	89.72±8.79 <sup>B</sup>
M+N+A	75.96±4.03 <sup>A</sup>	147.51±22.85 <sup>A</sup>	93.79±16.57 <sup>AB</sup>

\* Means with the same letters in the same column are not significantly different (P<0.05).



### (3) SDS-PAGE

#### (가) 탁주박

- 탁주박으로부터 분리한 단백질 샘플 중 효소를 혼합하는데 사용했던 단일효소 3개(Pro, Al, N)와 3개의 효소 모두를 혼합한 것(Pro+Al+N)을 대표적으로 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 크기를 측정하였다(Fig. 1-10). 그림에서 알 수 있듯이 마커를 제외하고는 어느 밴드도 형성되지 않는 것을 알 수 있었다. 이것은 탁주박에 존재하던 불용성 단백질이 효소에 의해 15 kDa 미만의 크기로 분해가 된 것을 의미하며 이는 일반적인 peptide 혹은 아미노산의 크기로 분해가 되었다고 말할 수 있다.

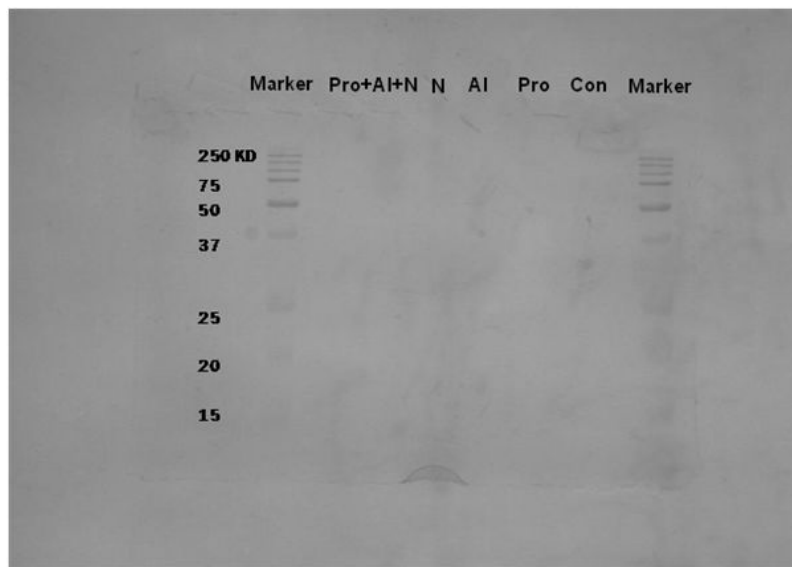


Fig. 1-10. SDS-PAGE of rice protein concentrates of rice wine meal.

#### (나) 탈지미강

- 탈지미강으로부터 분리한 단백질 샘플 중 효소를 혼합하는데 사용했던 단일효소 3개(Pro, Al, N)와 3개의 효소 모두를 혼합한 것(Pro+AL+N)을 대표적으로 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 크기를 측정하였다(Fig 1-11). 그림에서 알 수 있듯이 250 kDa 위쪽에 일부분 밴드가 형성되었고 15~250 kDa 사이에는 어떠한 밴드도 형성되지 않는 것을 알 수 있었다. 이것은 탈지미강에 존재하던 불용성 단백질이 효소에 의해 15 kDa미만의 크기로 분해가 된 것을 의미하며 이는 일반적인 peptide 혹은 아미노산의 크기로 분해가 되었다고 말할 수 있다. 또한 이 정도의 크기는 인체에서 생성되는 단백질 분해효소인 trypsin 이나 chymotrypsin의 역할 없이도 흡수될 수 있을 정도의 작은 크기로 분해된 것이다.

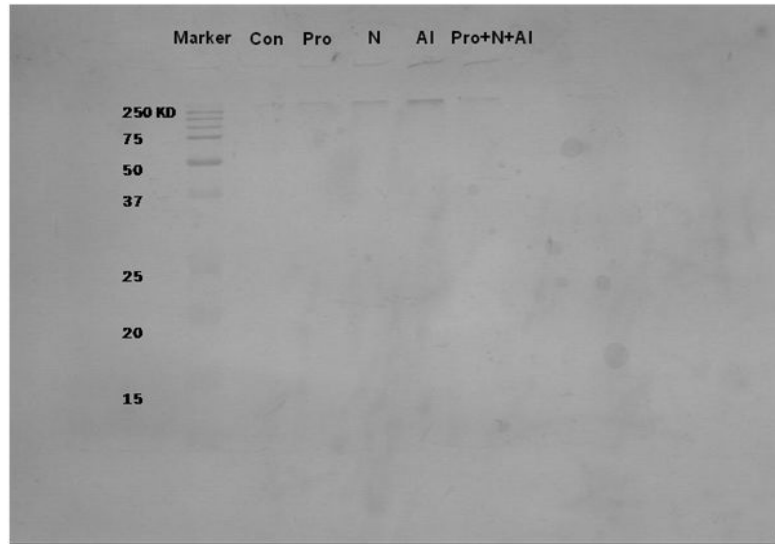


Fig. 1-11. SDS-PAGE of rice protein concentrates of defatted rice bran.

#### (다) 쌀시럽박

- 쌀시럽박으로부터 분리한 단백질 샘플 중 효소를 혼합하는데 사용했던 단일효소 3개(M, N, A)와 3개의 효소 모두를 혼합한 것(M+N+A)을 대표적으로 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 크기를 측정하였다(Fig. 1-12). 그림에서 알 수 있듯이 마커를 제외하고는 어느 밴드도 형성되지 않는 것을 알 수 있었다. 이것은 쌀시럽박에 존재하던 불용성 단백질이 효소에 의해 15 kDa 미만의 크기로 분해가 된 것을 의미하며 이는 일반적인 peptide 혹은 아미노산의 크기로 분해가 되었다고 말할 수 있다.

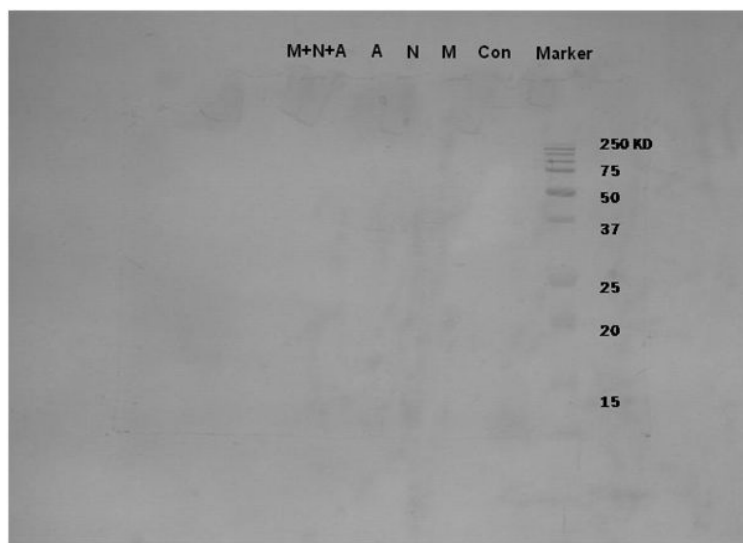


Fig. 1-12. SDS-PAGE of rice protein concentrates of rice syrup meal.

#### (4) Amino acid 분석(탁주박)

- 탁주박으로부터 분리한 단백질 샘플 중 효소를 혼합하는데 사용했던 단일효소 3개(Pro, Al, N)와 3개의 효소 모두를 혼합한 것(Pro+Al+N)을 대표적으로 아미노산분석을 하여 표로 나타내었다(Table 1-10). 전체적으로 3가지 효소를 혼합한 시료가 단일 시료에 비해 아미노산이 풍부한 것으로 나타났으며 특히 붉은색으로 나타낸 일반적인 아미노산 중에서는 phenylalanine, leucine, isoleucine, arginine의 함량이 높은 것을 알 수 있었다. 일반적으로 쌀의 경우 glutamic acid, arginine, leucine의 함량이 높고 상대적으로 tryptophan, cysteine 등의 함량이 낮은 것을 견주어 보면 탁주박으로부터 분리한 단백질의 대부분은 쌀로부터 유래함을 알 수 있었다.

Table 1-10. Amino acid distribution of protein concentrates of rice wine meal(mg/L).

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

### (5) 탄수화물 분해 효소의 효소별 최적 반응 시간 확립

- 효소별 최적 반응 시간을 알아보기 위해 탁주박을 ‘효소별 최적 반응 시간 확립’ 방법으로 반응시켜 시간에 따른 무게손실 양을 측정하였다. 실험 결과 amylolytic enzyme 중에서는 Termamyl과 Liquozyme의 무게손실 양이 큰 것으로 나타났다(Fig 1-13). 특히, Termamyl의 경우 1.5시간 이내에 최적의 무게 손실양(341.21 mg/g)을 보이는 것으로 나타났다. Liquozyme의 경우 최적 시간에서의 무게손실 양은 Termamyl과 비슷하지만 최적 반응시간이 4.5시간으로 Termamyl에 비해 반응 시간이 긴 것으로 나타났다. Fungamyl의 경우 무게 손실 양이 다른 amylolytic enzyme에 비해 상대적으로 적었다.
- Celluclast, Promozyme, Viscozyme의 시간에 따른 무게손실 양에 대한 결과는 Fig. 1-14에 나타내었다. Celluclast와 Viscozyme의 경우 시간에 따른 무게손실 양이 비슷한 수치로 확인되었다. 이 두 가지 효소는 24시간 처리 이후에도 분해되는 양이 꾸준히 증가하는 것을 알 수 있었다. 그러나 시료대비 늘어나는 양의 비율이 미량이었기 때문에 24시간을 최대로 잡고 반응 시간을 더 연장하지 않았다. 이렇게 얻어진 효소별 최적 반응 시간은 Table 1-11에 정리하였다.
- 이후 실험에서는 효소의 효율성에 따라 amylolytic enzyme중 효율이 가장 좋은 Termamyl과 cellulose를 분해하는 Celluclast, 그리고 혼합효소로 시너지 효과가 기대되는 Viscozyme의 세 가지 효소를 가지고 실험을 진행하였다.

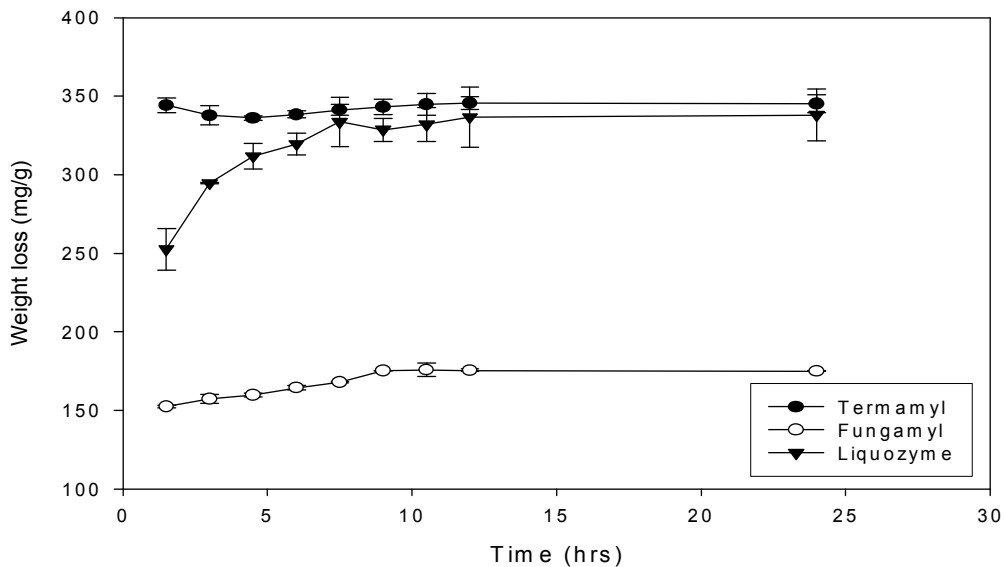


Fig. 1-13. Weight loss of rice wine meal using amylolytic enzymes over time.

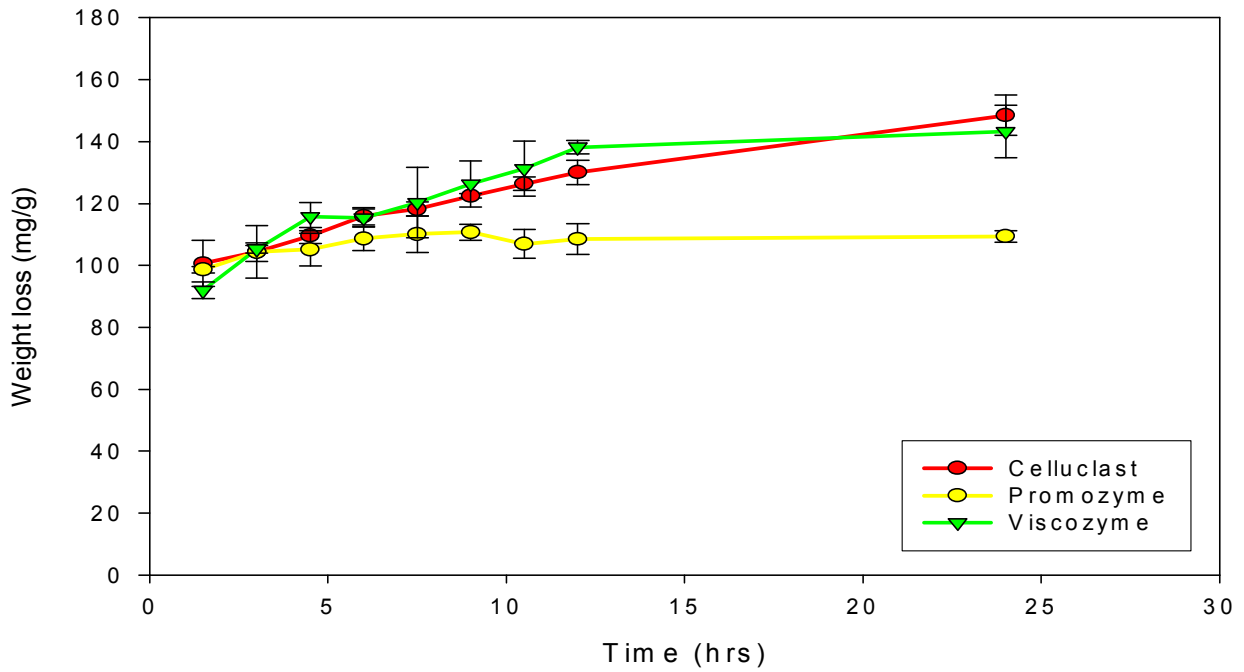


Fig 1-14. Weight loss of rice wine meal using Celluclast, Promozyme and Viscozyme over time.

Table 1-11. Optimum latent period of commercial enzymes

Enzyme	Celluclast	Fungamyl 800L	Liquozyme supra	Promozyme D2	Termamyl type L	Viscozyme L
Optimum time (hr)	24	9	4.5	9	1.5	24

## (6) 효소 최적조건에서의 각 시료별 실험방법에 따른 불용성 단백질 함량과 TDF 함량 비교

### (가) 탁주박

- Fig. 1-15를 보면 수세한 주박에  $\alpha$ -amylase인 Termamyl을 처리했을 때( $254.50 \pm 24.20$  mg/g) 무게 변화에 가장 큰 영향을 주는 것을 알 수 있다. 또한 Termamyl은 Viscozyme이나 Celluclast 와 2-step treatment했을 때 시너지 효과가 있다는 것을 알 수 있다. 특히, 세 가지 효소를 모두 사용하였을 때  $347.32 \pm 1.81$  mg/g의 무게 변화를 보였다(Fig. 1-16).
- 주박의 단백질 함량을 보면 단일효소로는 Termamyl을 처리했을 때  $25.26 \pm 0.57$ 에서  $28.14 \pm 0.80$  mg/g으로 가장 많이 증가한 것을 확인할 수 있었다. Viscozyme이나 Celluclast 와 2-step treatment했을 때 역시 주박의 단백질 함량이 늘어난 것을 볼 수 있었다. 이는 세포벽의 구성 성분인 cellulose와 hemicellulose, lignin이 효소에 의해 수용화되면서 상대적으로 단백질 함량이 높아지는 것으로 볼 수 있다(Table 1-12).
- 효소처리 후에 본래의 시료에 비해 단백질 함량이 크게 증가하지 않은 이유는 세포벽 내에 섬유소가 수용화되면서 세포벽 안에 갇혀있던 단백질이 함께 용출되어 결과적으로 단백질 함량이 낮아진 것으로 보인다. 무게 변화와 단백질 함량의 변화를 보면 그 패턴이 같은 것을 확인할 수 있다. Fig. 1-17의 total dietary fiber(TDF) 결과를 보면 Termamyl 단일효소를 처리했을 때 총 식이섬유 함량이 30.26%에서 53.62%로 가장 크게 증가한 것을 확인할 수 있다.
- 이는 주박 내에 존재하던 전분이  $\alpha$ -amylase인 Termamyl에 의해 수용화되면서 상대적으로 TDF 값이 증가한 것으로 보인다. 그러나 Viscozyme과 Celluclast를 함께 처리하였을 때는 값이 크게 증가하지 않았다. 식이섬유를 분해하는 이 두 가지 효소로 인해 전분을 비롯한 세포벽 성분이 함께 분해되었기 때문이라고 볼 수 있다.

Table 1-12. Insoluble protein contents of rice wine meal after enzymatic hydrolysis with mixed enzymes

	Weight loss (mg/g)	Crude protein (%)	Total dietary fiber (%)
Rice wine meal	-	25.26±0.57	30.26
Termamyl	254.50±24.20 <sup>C</sup>	28.14±0.80	53.62
Viscozyme	144.59±1.53 <sup>E</sup>	26.58±0.42	36.23
Celluclast	127.12±31.47 <sup>E</sup>	25.65±0.38	34.86
T+V	291.49±24.04 <sup>B</sup>	30.82±0.41	45.95
V+C	174.22±7.88 <sup>D</sup>	26.69±1.03	33.81
T+C	279.12±9.21 <sup>BC</sup>	31.45±0.19	43.72
T+V+C	347.32±1.81 <sup>A</sup>	34.21±0.68	35.84

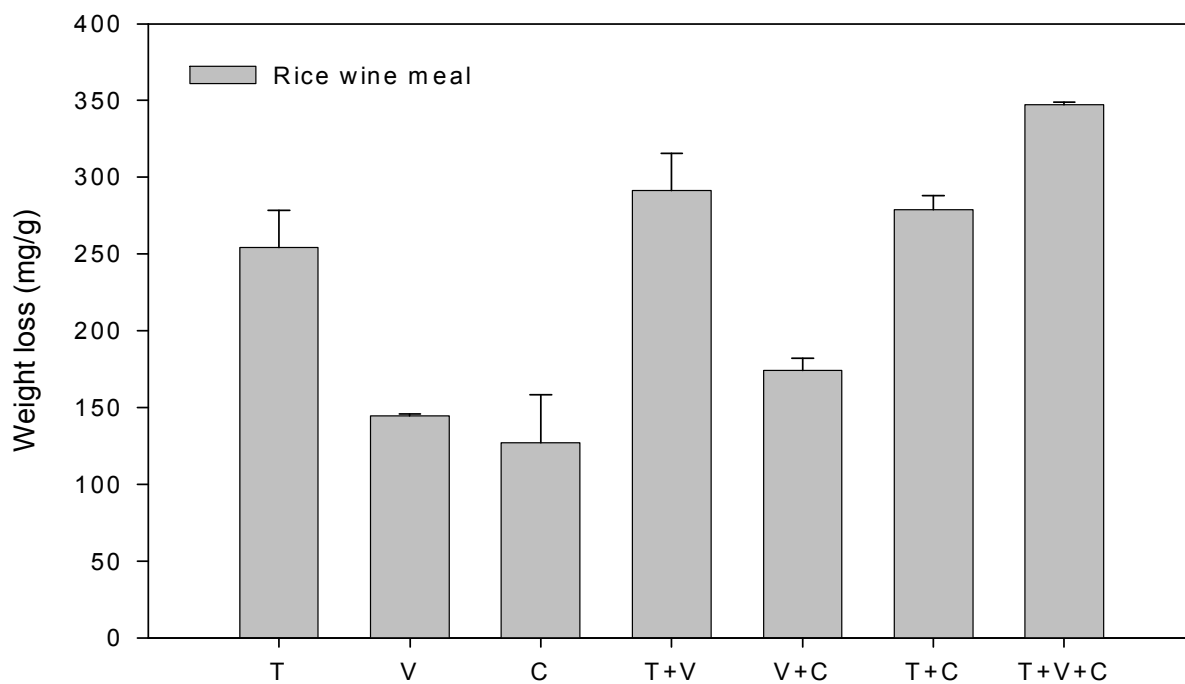


Fig. 1-15. Weight loss of rice wine meal after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast (C) and mixture of T,V,C treatment.



Fig. 1-16. Crude protein of rice wine meal after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast (C) and mixture of T,V,C treatment.

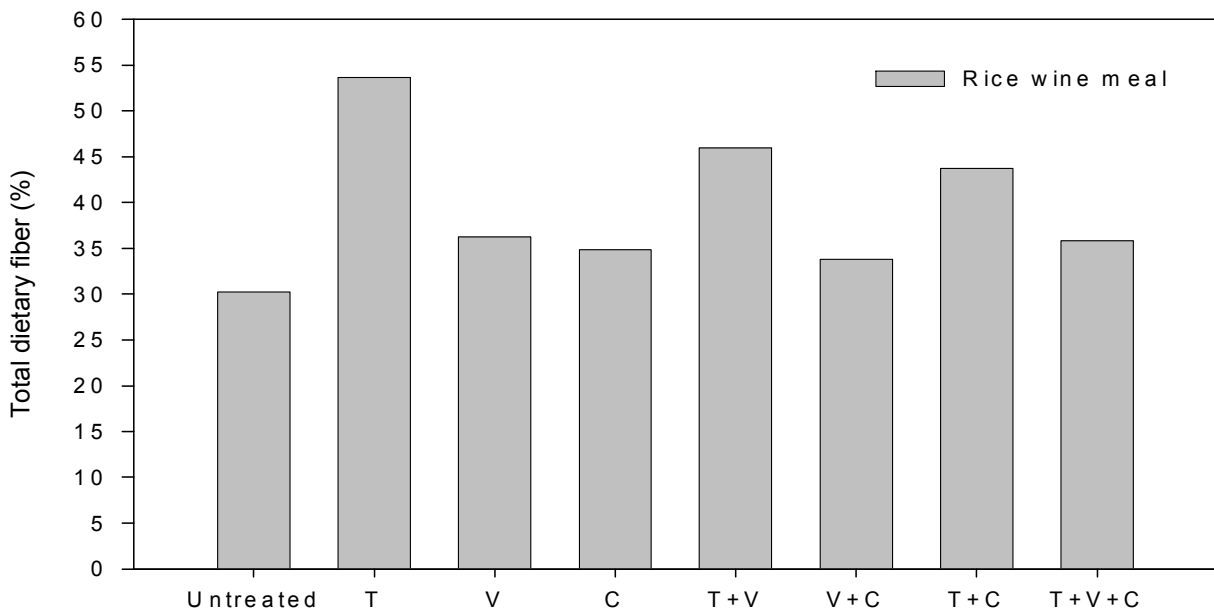


Fig. 1-17. Total dietary fiber of rice wine meal after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast(C) and mixture of T,V,C treatment.



(나) 탈지미강

- 탈지미강의 무게변화는 Termamyl(148.76±18.45 mg/g)이 단일효소로는 무게변화에 가장 큰 영향을 주는 것으로 나타났다(Fig. 18). 탈지미강에서는 특히 효소 혼합에 의한 시너지 효과가 크게 나타났는데 Termamyl과 Viscozyme, Celluclast를 모두 처리한 결과 265.24 mg/g의 성분이 수용화되는 것을 확인할 수 있었다. 단백질 분석의 경우 세포벽 구성성분의 수용화로 단백질 함량이 증가하는 것으로 나타났다.
- 탈지미강 역시 단일효소로는 Termamyl에서 18.71±0.08에서 19.36±0.22%로 가장 큰 단백질량 증가를 보였다(Fig. 1-19). 세 가지 효소의 혼합으로 인한 시너지 효과를 보았을 때 세 가지 효소를 모두 사용 한 경우에서 23.25±0.26%의 단백질 함량을 나타냈다. 식이섬유 분획이 상대적으로 많은 탈지미강의 경우 세포벽이 단단하기 때문에 효소 반응으로도 단단한 조직을 깨뜨리지 못한 것으로 보인다(Table 1-13).
- 탈지미강의 총 식이섬유는 처음 시료 39.52%로 상대적으로 높은 편이었다. 효소 처리로 탄수화물 분획을 제거한 결과 전체적으로 TDF 값이 증가하는 경향을 보였다. 특히 Termamyl과 Viscozyme의 혼합하였을 때 53.04%로 증가하였고 세 가지 효소의 혼합으로 53.10%까지 증가하였다(Fig. 1-20).
- 더욱 높은 순도의 식이섬유 분획을 얻기 위하여 Termamyl 및 Viscozyme 복합처리를 통한 전분제거 공정 이후 Neutrase를 이용하여 단백질 분획을 제거 공정을 수행하였다. 90℃에서 Termamyl 처리를 수행한 뒤 상등액을 제거한 뒤 60℃에서 Viscozyme 및 Neutrase의 복합처리를 실시 한 결과 총 식이섬유함량 62.3%까지 증가하였다(Fig. 1-21).

Table 1-13. Insoluble protein contents of defatted rice bran after enzymatic hydrolysis with mixed enzymes

	Weight loss (mg/g)	Crude protein (%)	Total dietary fiber (%)
Defatted rice bran	-	18.71±0.08	39.52
Termamyl	148.76±18.45 <sup>D</sup>	19.36±0.22	46.24
Viscozyme	94.85±5.66 <sup>E</sup>	18.80±0.14	45.31
Celluclast	85.88±2.43 <sup>E</sup>	18.71±0.08	45.26
T+V	204.90±4.49 <sup>B</sup>	21.39±0.42	53.04
V+C	178.48±13.67 <sup>C</sup>	20.51±0.24	44.95
T+C	200.27±13.45 <sup>B</sup>	21.08±0.03	47.15
T+V+C	265.24±3.59 <sup>A</sup>	23.25±0.26	53.10
T+V+N(Neutrase)	263.52±3.59	9.57±0.44	62.30

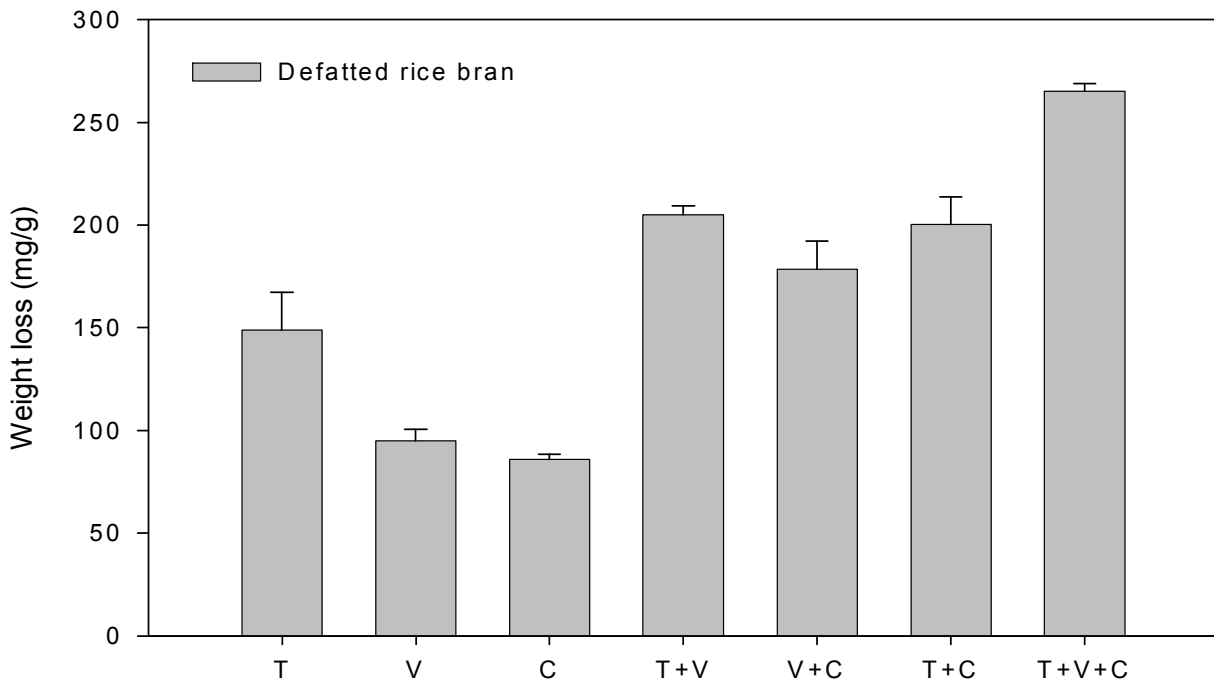


Fig. 1-18. Weight loss of defatted rice bran after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast (C) and mixture of T,V,C treatment.

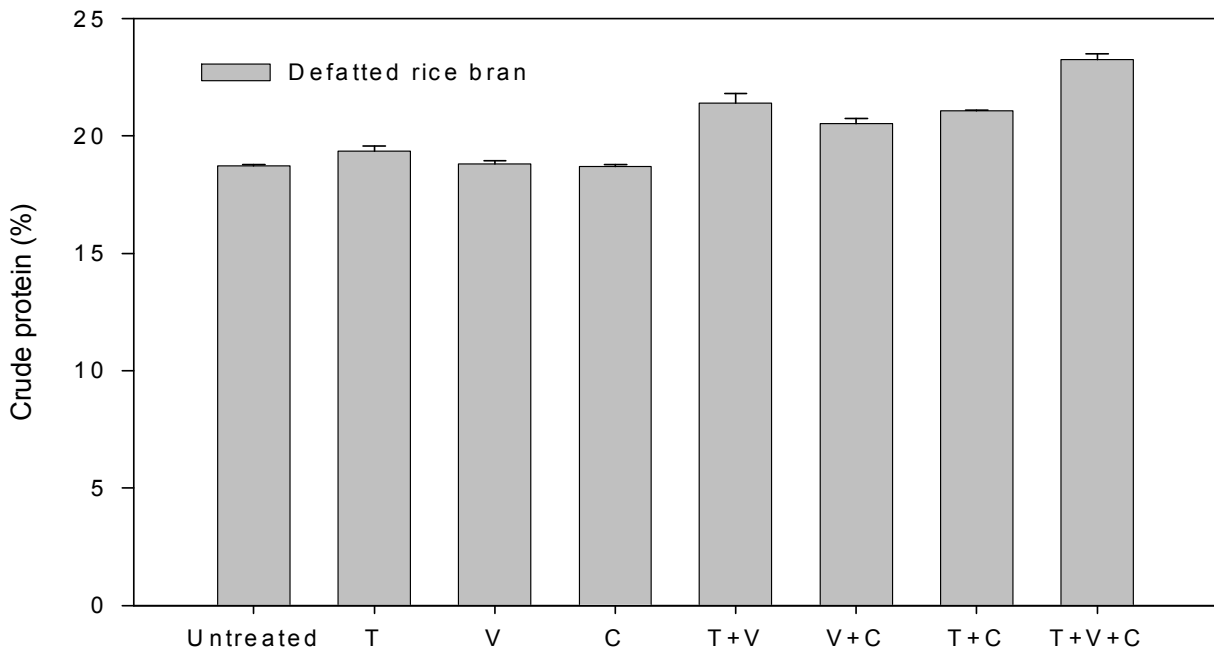


Fig. 1-19. Crude protein of defatted rice bran after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast (C) and mixture of T,V,C treatment.



Fig. 1-20. Total dietary fiber of defatted rice bran after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast (C) and mixture of T,V,C treatment.

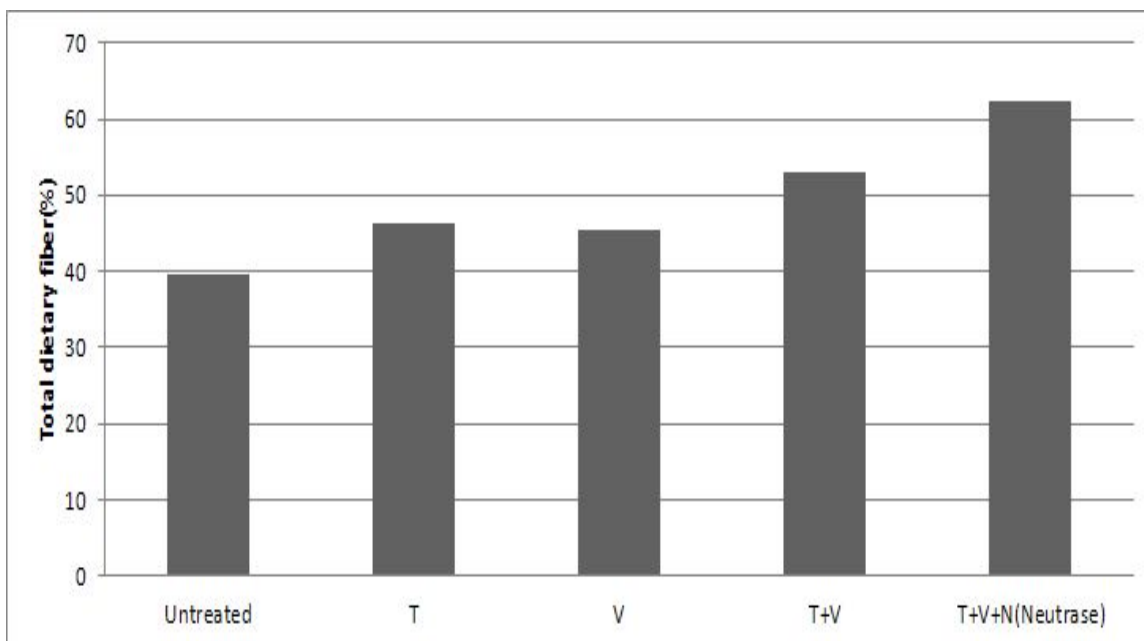


Fig. 1-21. Total dietary fiber of defatted rice bran after Termamyl (T), Viscozyme (V) and mixture of T, V, Neutralse(N) treatment.

(다) 쌀시럽박

- 쌀 시럽박에서 역시 단일효소로 무게변화에 가장 큰 영향을 주는 것은 Termamyl (85.69±0.60 mg/g)인 것으로 나타났다(Fig. 1-22). 이는 이번 실험에 사용된 세 가지 효소를 모두 처리했을 경우(72.04±4.75 mg/g)보다 무게 변화가 더 큰 것이다. 그러나 무게변화의 양적인 면에서는 주박(최대 347.32 mg/g)이나 탈지미강(최대 265.24 mg/g)에 비해 그 변화가 미미한 것으로 나타났다. 이는 쌀로부터 시럽박을 만드는 가공처리 과정에서 이미 amylase 등의 효소를 사용하여 불용성 부분의 상당부분을 수용화하였기 때문에 주박이나 탈지미강 만큼 수용화되는 양이 많지 않기 때문인 것으로 보인다.
- 따라서 초기 단백질 함량이 43.06±0.84 %로 매우 높았던 시럽박의 경우에는 Celluclast 처리로 최대 74.63%까지 단백질 함량을 높일 수 있었다(Fig. 1-23). 총 식이섬유의 경우 단일 효소로는 Viscozyme을 사용하였을 때 16.19에서 34.14%로 함량이 증가하였다(Fig. 1-24). 그리고 세 가지 효소를 모두 처리하였을 때 TDF값은 35.35%로 증가하였다.

Table 1-14. Insoluble protein contents of rice syrup meal after enzymatic hydrolysis with mixed enzymes.

	Weight loss (mg/g)	Crude protein (%)	Total dietary fiber (%)
Rice syrup meal	-	43.06±0.84	16.19
Termamyl	85.69±0.60 <sup>A</sup>	70.68±2.47	23.52
Viscozyme	61.74±7.12 <sup>C</sup>	74.01±0.79	34.14
Celluclast	68.43±5.13 <sup>BC</sup>	75.00±0.64	29.33
T+V	68.03±1.54 <sup>BC</sup>	73.69±0.52	33.98
V+C	64.03±2.40 <sup>BC</sup>	74.62±0.47	34.48
T+C	69.70±0.90 <sup>BC</sup>	72.40±1.99	25.29
T+V+C	72.04±4.75 <sup>B</sup>	72.11±2.81	35.35

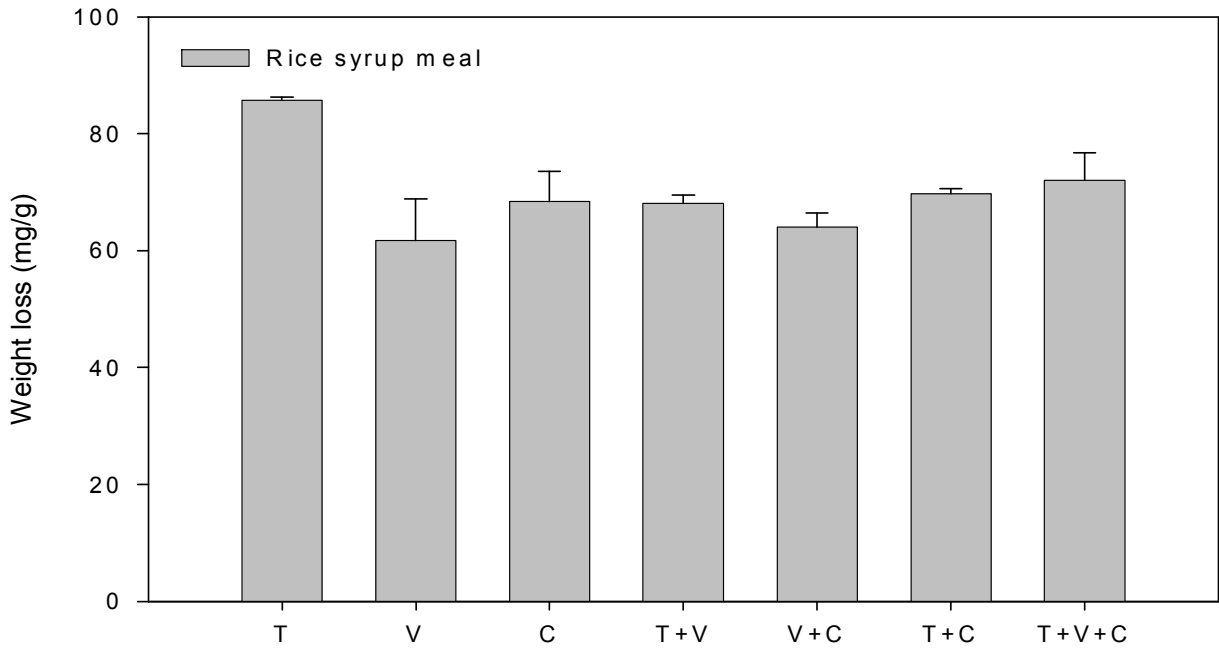


Fig. 1-22. Weight loss of rice syrup meal after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast (C) and mixture of T,V,C treatment.

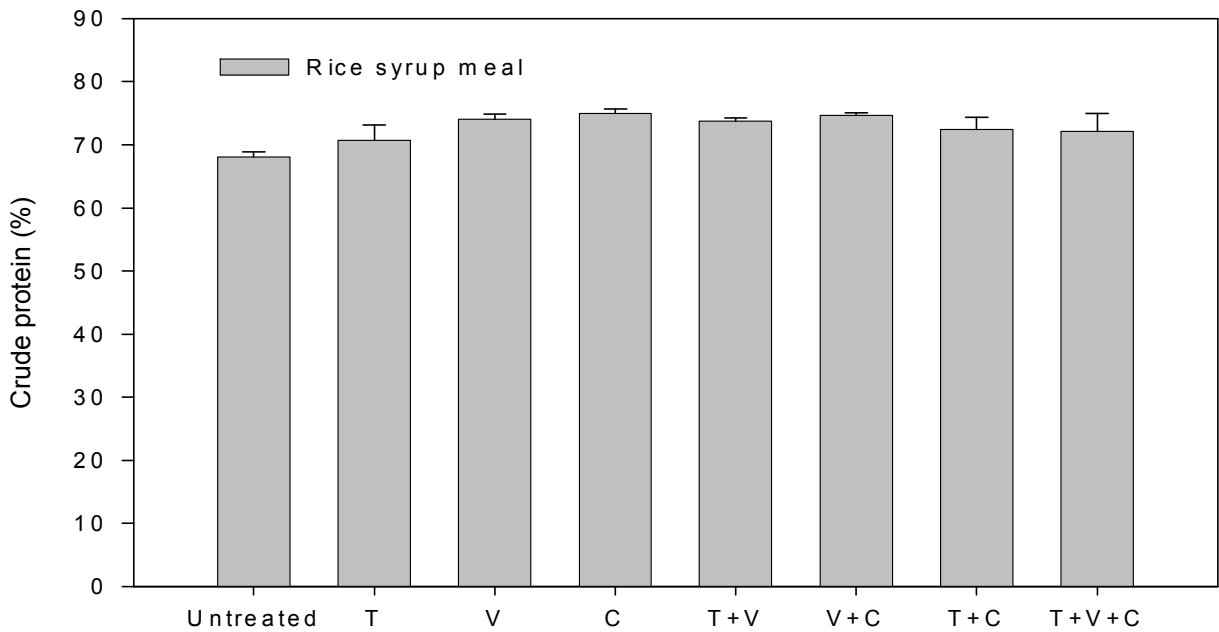


Fig. 1-23. Crude protein of rice syrup meal after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast (C) and mixture of T,V,C treatment.

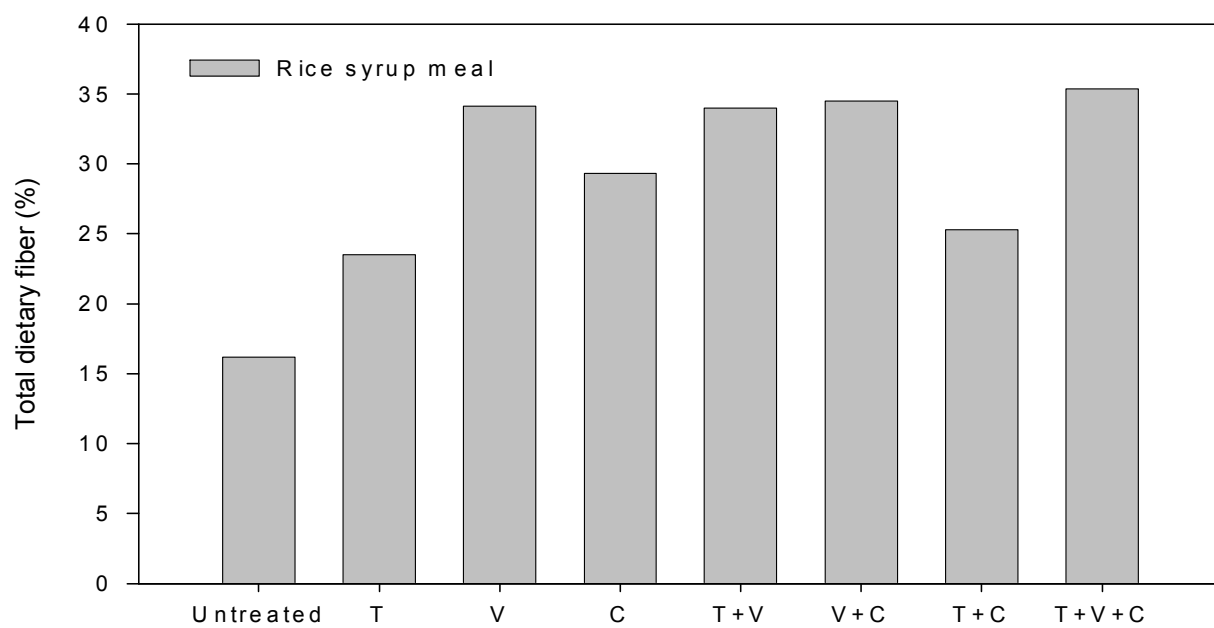


Fig. 1-24. Total dietary fiber of rice syrup meal after Termamyl (T), Viscozyme (V), Celluclast (C) and mixture of T,V,C treatment.

#### 4. 단백질 및 식이섬유 분리공정의 확립

##### 가. 불용성 단백질

##### (1) 불용성 단백질의 제조공정 확립

- 탁주박, 탈지미강 및 시럽박 원료의 단백질 분석 결과 탁주박 20~25%, 탈지미강 15~20%, 시럽박 40~45% 정도로 시럽박 원료의 단백질 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 불용성 쌀단백질 제조에 필요한 전처리 공정을 최소화할 수 있다는 것을 의미하는 것으로서, 따라서 시럽박을 불용성 쌀 단백질 제조 원료로 선택하였다. 일반적인 시럽박 제조공정은 Fig. 1-25와 같다.

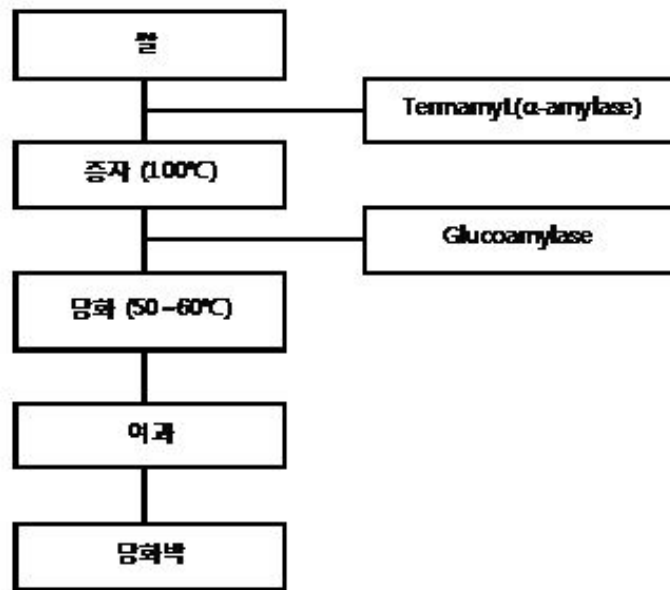


Fig. 1-25. Flow chart of rice syrup meal.

- 물엿 생산 공장에서 제공받은 시럽박은 원료의 저장성을 높이기 위하여 70°C, overnight 하여 건조한 뒤 분쇄하여 수분함량 10% 미만의 분말상태로 저장해 둔 다음 실험 원료로 사용하였다.

- 불용성 쌀 단백질의 단백질 순도를 높이기 위하여 원료에 남아있는 잔여 전분을 제거하는 것이 바람직하다고 판단, 시럽박 원료에 10배의 증류수를 넣은 뒤 수세과정을 통하여 잔여 전분을 제거하였다.
- 실험 결과 시럽박 원료에 10배의 증류수를 넣은 뒤 세척횟수에 따른 원료의 단백질 함량은 1회 수세 시 49.84%, 2회 수세 시 62.74%, 3회 수세 시 67.16% 로 수세 회수에 따라 점차 상승됨을 확인할 수 있었고, 4회 수세 시에는 66.96%, 5회 수세 시 70.81%, 6회 수세 시 70.10%로 5회 이상부터는 잔여 전분이 모두 제거되어 더 이상의 상승 효과는 나타나지 않았다. 따라서 시럽박을 원료로 하는 불용성 쌀 단백질의 수세 회수는 5회로 설정하였다. (Fig. 1-26).

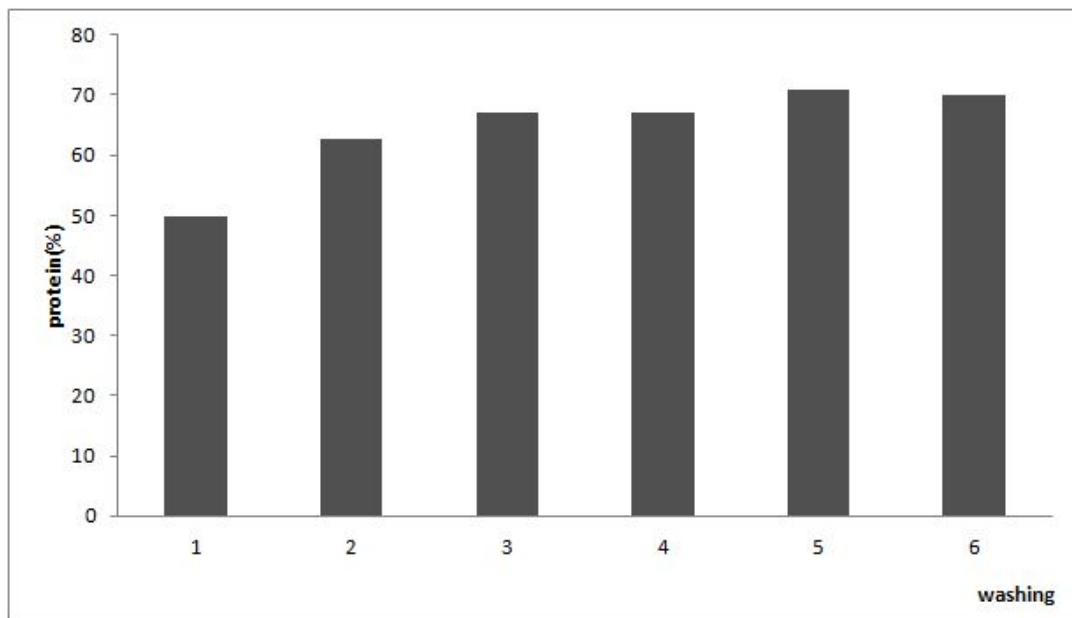


Fig. 1-26. Crude protein percentage of rice syrup meal as washing counts.

- 수세 공정 후 7,000 rpm, 15 min 원심분리를 통해 상등액을 제거한 뒤 -70℃에서 동결건조하였고 분쇄를 통하여 불용성 쌀 단백질을 제조하였다.
- 위의 공정을 통하여 제조된 불용성 단백질 분석 결과 조단백질 함량 71%, 탄수화물 25%, 지질 2.2%로 나타나 고순도 단백질 원료로서 사용하기에 매우 적합한 것으로 결론지었다.





Fig. 1-27. Insoluble rice protein.

## (2) Mass balance

- 쌀 시럽박 원료는 약 45~55%의 수분을 함유하고 있다. 건조 후 분쇄공정을 거친 원료를 투입하여 전분 제거 공정을 실시한 뒤 생산된 불용성 쌀 단백질은 수분함량 10% 미만의 분말로서, 수세공정을 통하여 잔여 전분이 점차 제거되면서 점차 무게가 감소하였다. 원료 100 g 투입대비 수세 회수에 따라 무게가 각각 72.24 g, 62.66 g, 64.2 g, 64.1 g, 63.5 g으로 감소되는 경향을 나타내었다. 결과적으로 최적 수세 공정 회수 3회 및 원료의 수분함량 45~55%을 고려하였을 때 불용성 쌀 단백질의 수율은 약 30~35% 내외임을 확인할 수 있었다(Fig. 1-28.)

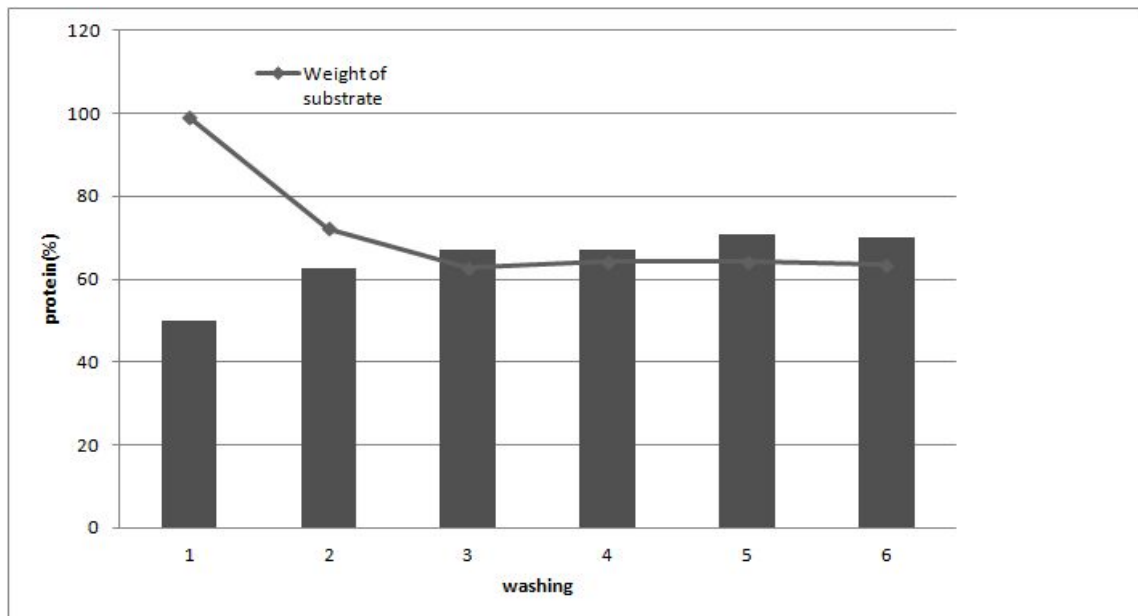


Fig. 1-28. Weight of substrate and protein percentage as washing counts.

## 나. 수용성 단백질

### (1) 효소의 선정

- 수용성 단백질의 경우 위의 제조공정을 통하여 만들어진 불용성 단백질을 바탕으로 하여 효소반응을 통해 제조하였다. 위의 효소반응 실험 결과, Protease N 및 Protease M의 단백질 분해 효과가 가장 높았으나 상업적으로 활용할 경우 Protease N 및 Protease M의 경우 고가 효소로서 제조 단가가 매우 높아지는 단점이 있다. 반면 Alcalase 및 Neutrase는 상업적으로 많이 사용되어 지고 있는 효소로서 효소 단가가 비교적 저렴하고 높은 단백질 분해 활성을 가지고 있는 것으로 위의 실험 결과 확인되었다.
- 또한 위의 4가지 효소를 이용하여 반응 추출물을 제조한 뒤 쓴맛 및 기호도에 관한 관능검사를 실시하였다. 패널 17명을 대상으로 9점법을 이용하여 실시하였으며 평가 결과는 Protease N 및 protease M에서 높은 쓴맛을 나타냄과 동시에 기호도에서 또한 낮은 점수를 얻었고, Alcalase 및 Neutrase에서는 쓴맛 및 기호도에서 유의적 차이를 나타내지는 않았으나 Alcalase 효소에서 좀더 높은 관능 점수를 부여받았다(Fig. 1-29).

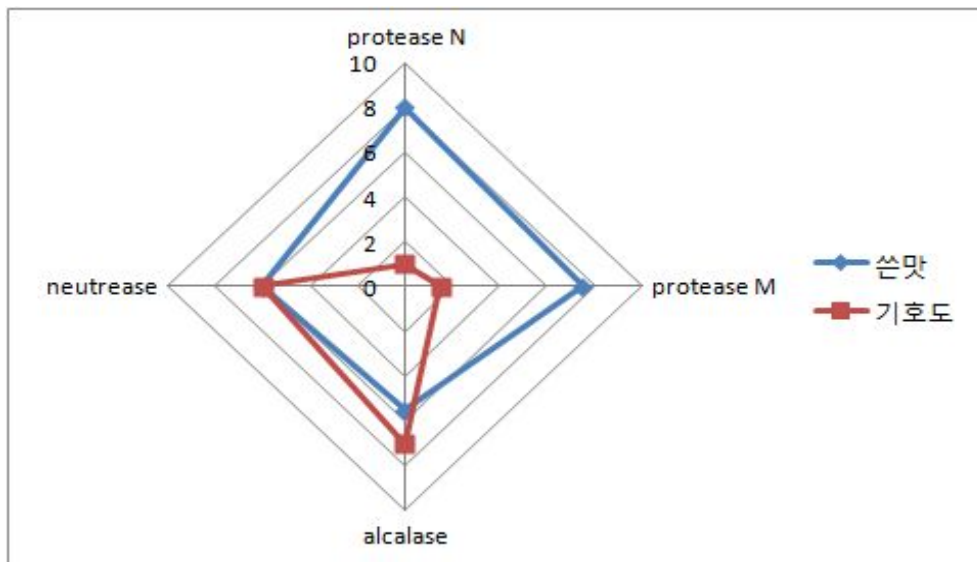


Fig. 1-29. Sensory test of bitterness and customer interest as enzyme type.

## (2) 반응시간

- 효소의 최적 반응 시간을 결정하기 위한 실험을 실시하였다. 기질 대비 Alcalase 효소 1%(v/w)를 포함하였고 0.1 N-NaOH 및 0.1 N-HCl을 이용하여 효소의 최적 pH를 조절하였다. 1, 2, 3 시간 및 5, 24시간 동안 각 반응 시간에 따른 단백질 분해율 및 pH를 측정하여 그 결과를 확인하였다(Table 1-15).
- 그 결과 1, 2, 3, 5, 24시간 반응 시 단백질 분해율이 각각 61.5, 67.3, 71.5, 75.2, 85.3%로 반응 시간에 따라 점차 단백질 분해율이 증가되는 현상을 보였다. 그러나 3시간 이후 반응 시간이 증가됨에 pH 저하 현상이 많이 발생하고 변패취를 나타내어 품질상 문제가 있다고 판단, 최적 반응 시간을 3시간으로 결정하였다(Fig. 1-30).

Table 1-15. Protein percentage and pH as time of enzyme reaction using Alcalase

Reaction time (h)	Protein (%)	pH
1	61.5±34	6.5±45
2	67.3±56	6.3±95
3	71.52±19	6.1±42
5	75.2±72	5.4±36
24	85.3±01	4.5±77

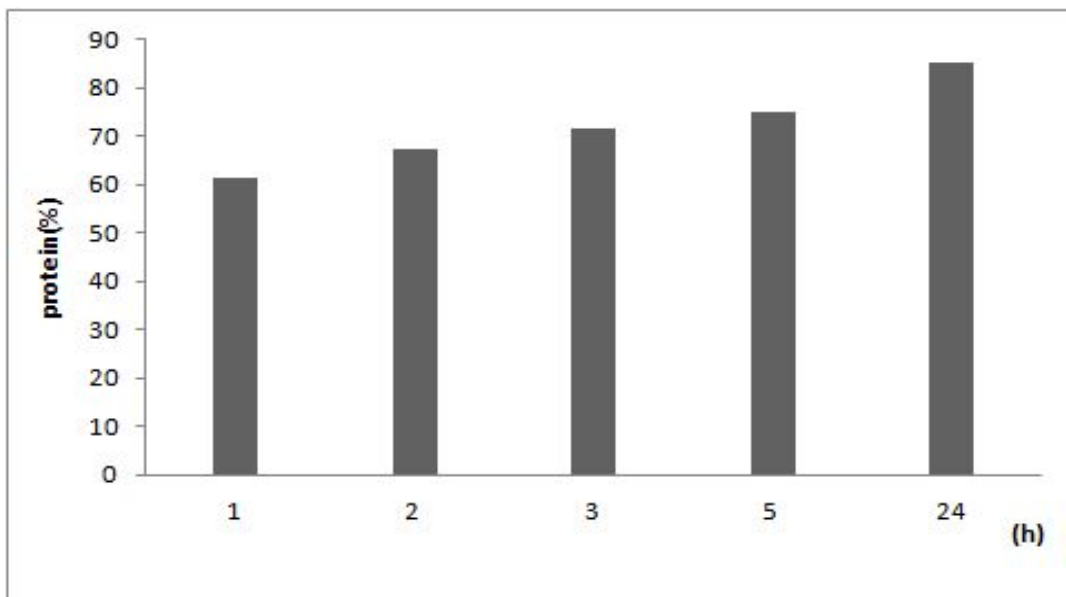


Fig. 1-30. Protein percentage as time of enzyme reaction using Alcalase.

### (3) 효소량

- 효소의 최적 반응량을 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 비용 및 관능에서 가장 적합한 것으로 판단된 alcalase 효소를 이용하여 실시하였으며 효소의 농도는 기질대비 0.05, 0.1, 0.2, 1%(v/w)로 정하여 실시하였다. 단백질 함량은 반응 후 반응 추출물을 Lowry method를 실시하여 정량하였으며 반응시간은 3시간으로 하였다.
- 실험 결과, 0.05%에서는 조단백질 함량 62.3%, 0.1% 반응 시에는 70.5%로 단백질 분해율이 증가되는 현상을 나타냈고 0.2% 반응 시 71.1%, 0.5% 반응 시에는 71.3%, 1% 반응 시에는 71.2%로 0.1% 이상부터는 효소량이 증가하여도 더 이상 단백질 분해율에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1-31).

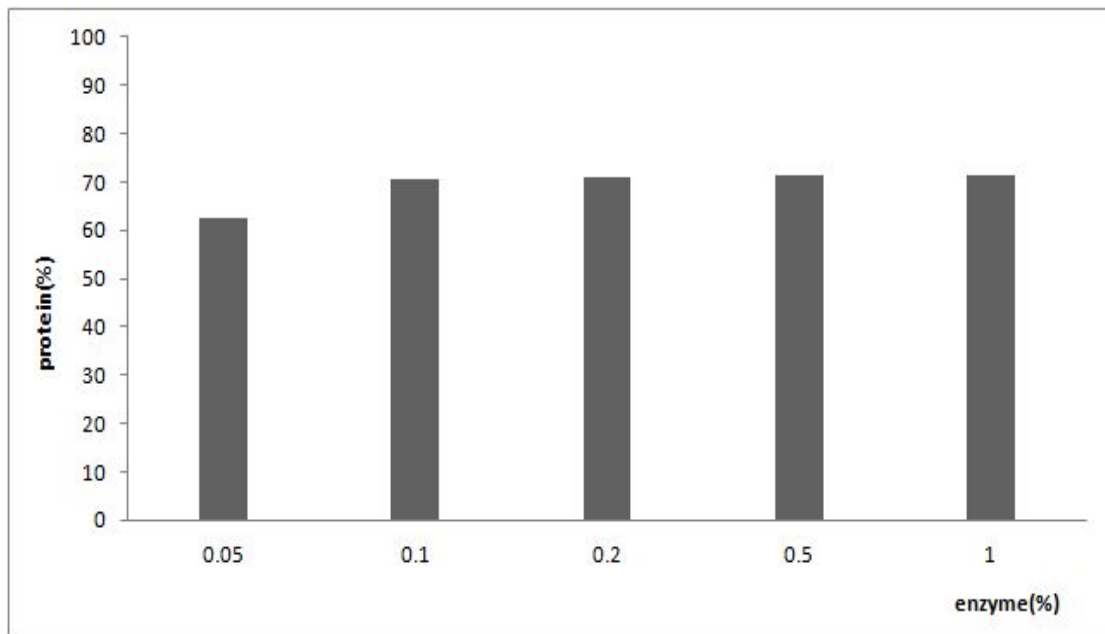


Fig. 1-31. Protein percentage as volume of enzyme reaction using Alcalase.

### (4) Mass balance

- 불용성 쌀 단백질의 제조공정을 거친 후 단백질 분해효소를 이용, 효소반응 공정을 통하여 제조된 수용성 쌀 단백질은 반응 완료 후 농축 및 건조공정을 통하여 수분함량 10% 미만의 분말상으로 제조하였다. 건조된 불용성 쌀 단백질 100 g 투입 후 효소반응 시 제조된 수용성 쌀 단백질은 20~30 g 으로 불용성 쌀 단백질 대비 약 20~30%의 수율을 나타냈다. 반면 수분함량 45~55%인 시럽박 원료대비 mass balance를 계산하였을 시 6~10%의 수율을 나타내었다.

## 다. 불용성 식이섬유

### (1) 원료의 선정

- 불용성 식이섬유 제조를 위하여 탁주박, 탈지미강 및 시럽박 원료를 검토한 결과 탁주박 20~25%, 탈지미강 30~40%, 시럽박 20~30%의 식이섬유 분획을 포함하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 불용성 식이섬유 제조를 위한 원료로서는 탈지미강이 가장 적합한 것으로 판단, 식이섬유 소재 원료로서 선정하였다.

### (2) 효소를 이용한 반응 공정

- 불용성 식이섬유 분획 제조를 위한 효소는 위의 실험을 통하여 선정된 전분분해효소 Termamyl, 복합 식이섬유 효소 Viscozyme 그리고 단백질 분해 효소 Neutrase를 복합 반응하여 제조하는 것으로 하였다. 효소량은 Termamyl, Viscozyme, Neutrase 각각 원료대비 0.1%(v/w)씩 함유하는 것으로 하였다.
- 반응 공정은 탈지미강에 10배의 증류수(v/w)를 포함시킨 뒤 0.1% Termamyl 효소를 넣은 뒤 90℃, 1.5시간 반응시킨 뒤 7,000 rpm, 15 min 원심분리를 하여 전분을 제거하는 공정을 수행한다. 그 다음 다시 원료 대비 10배의 증류수(v/w)를 포함시킨 뒤 Viscozyme, Neutrase 각각 0.1%씩 넣고 55℃에서 2시간 반응시킨 뒤 7,000 rpm, 15 min 원심분리하여 상등액을 제거한다. 상등액이 제거된 식이섬유 분획은 -70℃에서 동결건조한 뒤 분쇄하여 보관한다.
- 제조된 식이섬유 분획은 TDF 함량 시험 결과 60~65% 식이섬유를 함유하는 것으로 나타났다. 건강기능식품 규격 상 원료의 식이섬유 함량 6,000 mg/g 을 함유할 경우 콜레스테롤 개선, 식후혈당상승 억제 및 배변활동 원활 기능을 지니는 식이섬유 원료로 사용 가능함에 따라 쌀 부산물인 탈지미강을 원료로 하여 제조된 불용성 식이섬유 분획은 다이어트 및 정장작용, 콜레스테롤 개선 등 식이섬유 분획의 건강기능성에 관한 별도의 *in vitro* 및 *in vivo* test를 필요로 하지 않고 그 자체로 식이섬유로서의 기능성을 지니는 원료임을 확인할 수 있었다.

### (3) Mass balance

- 탈지미강 원료로부터 3가지 효소를 복합 처리하여 얻어진 불용성 식이섬유 분획은 건조 및 분쇄 후 수분함량 10% 미만의 파우더 형태로 제조되었다. 제공 받은 탈지미강 원료는 수분

함량 10% 미만의 파우더 상태이며 100 g 투여 시 공정 완료 후 불용성 식이섬유 40~50 g의 생산량을 나타내었다. 따라서 불용성 식이섬유 분획의 수율은 40~50%인 것으로 확인되었다.

## 5. 각 분획의 shelf life 평가

### 가. 수용성 단백질

- 수용성 단백질의 경우 액상 상태에서는 제품의 보존성이 높지 않아 분무건조 및 동결건조를 통하여 수분함량을 10% 이하의 조건으로 설정하였다. 제조된 제품의 경우 색상은 미황색을 띄었으며 품질검사 결과 일반적인 건조분말 제품의 품질규격인 대장균, 대장균 군의 불검출 및 일반세균수 5,000 CFU/g 이하의 조건을 만족하여 하였다.
- 따라서, 상기의 기준을 1차적인 내부 품질관리기준으로 하여, 50℃ 정치식 인큐베이터에 보관하여 가속시험을 통해 품질의 변화를 조사하였다. 제품의 형태는 분말상을 기준으로 하였으며, 포장형태는 알루미늄파우치에 열압착하여 밀봉하는 것으로 하였다. 제품의 산화에 의한 변질 등을 방지하기 위하여 질소 충전하는 것까지를 고려의 대상으로 하였다.
- 제품의 품질 상태는 육안으로서 색도의 변색 정도와 냄새를 통한 변패취의 생을 여부를 관찰하였고 결과는 Table 16에 나타내었다. 결과는 초기 저장시의 색이었던 미황색이 2개월, 4개월, 6개월까지 변화 없이 지속됨을 관찰할 수 있었고 냄새 역시 초기와 변화 없이, 변패취가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었고, 이를 통해 밀봉상태에서 2년의 유통기한 설정을 결정할 수 있었다.

Table 1-16. Appearance and off-flavor of powdered soluble protein as treatment day at 50℃

저장 기간(달)	2개월	4개월	6개월
외관(색)	미황색	미황색	미황색
변패취	없음	없음	없음
단백질(%)	73	73	73

## 나. 불용성 단백질 및 식이섬유

- 제품의 보존성은 유통기한의 설정과 관련되어 있다. 유통기한은 일반적으로 분말의 경우 2년으로 설정한다. 이는 이 기간이 경과 후까지 기준으로 제시한 품질특성이 유지되어야 함을 의미한다. 따라서 이를 확보하기 위해서는 품질기준의 항목의 설정은 법적인 기준에서 적절하게 설정하여야 하며, 지나치게 엄격하거나, 과도하게 세분화된 설정은 지향하여야 한다. 그 이유는 지나치게 엄격할 경우 제품의 품질이 유지되고 있다고 할 수 있는 상황에서도 제품의 판매가 불가능해지는 상황을 초래할 수 있기 때문이다.
- 효소공정을 마친 뒤 수세 및 건조공정을 마친 불용성 단백질 및 식이섬유 제품 또한 수분 함량 5% 미만으로 품질검사 결과 대장균, 대장균군의 불검출 및 일반세균수 5,000 CFU/g 이하의 품질규격을 만족하였다.
- 따라서, 상기의 기준을 1차적인 내부 품질관리기준으로 하여, 50℃의 온도에서 품질의 변화를 조사하였다. 제품의 형태는 분말상을 기준으로 하였으며, 포장형태는 알루미늄파우치에 열압착하여 밀봉하는 것으로 하였다. 제품의 산화에 의한 변질 등을 방지하기 위하여 질소 충전하는 것까지를 고려의 대상으로 하였다. 품질의 평가는 저장 기간 별 제품의 외관(색)의 관찰 및 변패취의 생성, 식이섬유 및 조단백질의 함량을 측정하였고 그 결과는 Table 17에 보였다.
- 표에서 알 수 있는 바와 같이 50℃에서의 처리 결과에서도 6개월간의 처리에도 불구하고 제품의 특성에 변화가 거의 없다는 것을 알 수 있었다. 특히, 정량화가 용이하지 못한 냄새에 있어서도 거의 변화가 없어 제품의 유통기한을 2년으로 설정하였다.

Table 1-17. Comparisons of property change under different temperatures

항목	저장기간	외관(색)	변패취	식이섬유함량 (%)	조단백(%)
불용성식이 섬유	1개월	연황색	없음	63	10.2
	2개월	연황색	없음	62	11.1
	4개월	연황색	없음	63	12
	6개월	연황색	없음	62	11.3
불용성 단백질	1개월	연갈색	없음	13	71
	2개월	연갈색	없음	15	71
	4개월	연갈색	없음	14.2	72
	6개월	연갈색	없음	15	71.5

## 제 2 절. 2 협동과제: 쌀 미강으로부터 천연보존제(피틴산) 및 이노시톨 제조 기술 개발 그리고 쌀단백질의 효능평가

### 1. 미강 원료의 획득 체계 및 보존법 확립

- 미강은 생 미강을 용매를 이용하여 지용성 성분을 추출, 제거한 것으로서 탈지미강을 사용하였다. 탈지미강은 일반적으로 미강유를 생산하는 업체를 통하여 공급받았다. 이는 미강유 생산업체의 경우 부산물에 해당하므로 탈지미강 유래 제품의 개발 시 원가를 최소화할 수 있기 때문이다. 탈지미강의 경우 일반적인 성분조성은 다음의 Table 2-1과 같다.

Table 2-1. Nutritional composition of defatted rice bran

항목	수분	조지방	조단백	조섬유	회분	피틴	기타
함량	5~15%	< 1%	15~25%	8~15%	8~15%	10~15%	10~45%



## 2. 미강으로부터 피틴산 및 이노시톨 분리 및 최적 분리조건 확립

### 가. 실험방법

- 피틴산 표준용액의 검량선 작성

표준용액의 조제를 위해 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1,000 ppm) 농도의 피틴산 용액을 제조하였다. 제조한 표준용액을 증류수로 희석하여 각각 0, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 검량선용 표준용액을 제조하였다. 검량선용 표준용액 800  $\mu\text{L}$ 를 취하여 Wade reagent(0.03% 염화제이철( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ))와 0.3% 설포살리실릭산(sulfosalicylic acid)) 200  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 vortex mixer를 이용하여 5초 동안 혼합하였다. 이 혼합액을 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다(식품의약품안전청연보 제8-2권 2197(2004)).

- 피틴산 추출액 제조

미강 200 g으로부터 0.5% 또는 1% 황산( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 용액 1 L를 이용하여 2 L 삼각플라스크에서 2시간 동안 피틴산을 추출하였다. 각 시료는 추출 전과 추출 후에 매 시간마다 추출액을 취하여 피틴산의 추출정도를 확인하였다.

- 피틴산 정제용 수지 선정

미강에서 추출한 피틴산 추출액의 정제에 적합한 수지를 선택하기 위하여 IRA-416, Dowex HCR-W2, DIAION PK208H, DIAION WK100, DIAION CR10, HP20 수지에 미강 추출액을 통과시키고, 5% NaOH와 5% HCl로 용출시킨 후 각각의 분획을 정량하여 피틴산의 정제에 적합한 수지를 선택하였다.

- 저장성 실험용 시료 제조

쌀 300 g을 수돗물로 4회, 증류수로 1회 수세 후, 총중량이 750 g이 되도록 증류수를 첨가하여 (쌀중량의 1.5배의 가수량) 30분간 수침한 다음 취반하여 대조군으로 하였다. 시료군은 수침한 쌀에 sodium phytate 또는 inositol을 각각 쌀 중량 대비 0.01, 0.1, 1%(w/w)로 첨가하여 취반하였다.

- Sodium phytate 또는 inositol을 첨가한 밥의 저장성

Sodium phytate 또는 inositol의 농도를 각각 달리 첨가하여 제조한 밥을 만들어 저장온도 4, 20 및 37°C에서 3일의 저장기간(제조 직후, 24, 48, 72시간)동안 색도, pH 및 총균수 변화를 관찰하였다.

- pH 측정

시료 10 g에 증류수 20 mL를 가한 후 homogenizer를 이용하여 균질화한 후 pH meter로 시료의 pH를 측정하였다.

- 표면색도

Color Difference Meter를 사용하여 Hunter scale에 의해 시료 표면의 L, a, 및 b값을 측정하였다.

- 총균수 측정

시료의 총균수는 표준한천평판법에 의해 측정하였으며, 시료 10 g에 증류수 20 mL를 가한 후 homogenizer를 이용하여 균질화한 다음 십진 희석하여 plate count agar에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

- 통계분석

모든 실험은 최소 3번 반복하여 평균과 표준편차를 구하였으며, 얻은 실험값의 통계분석은 Windows 용(ver. 16.0) SPSS(statistical package for the social science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 package를 이용하였으며 Duncan의 중범위검정( $\alpha=0.05$ )을 실시하여 유의차를 분석하였다.

- 미강은 위에 나타난 바와 같이 수분의 함량이 5~15%에 이르며 단백질 등을 함유하고 있어 건조상의 문제가 발생할 수 있다. 실제 미강유 제조사로부터 탈지미강을 공급받은 후 보관을 위한 각각의 조건에서 오염균 발생 여부를 비교한 결과 일반적인 조건에서는 3주 이상 보관이 불가능하였다(Table 2-2).

- 따라서 이를 해결하기 위하여 수분을 제거하는 과정을 거쳤으며 그 결과 수분함량이 5% (w/w) 이하일 경우 오염균의 발생 없이 장기 보관이 가능하였다. 수분의 분석은 수분분석계를 사용하였으며, 오염균의 발생은 주로 발생하는 오염균이 곰팡이로서 육안식별이 가능하여 이를 기준으로 하였다.

Table 2-2. Contamination of rice bran under various storage conditions

조건	수분함량 15%			수분함량 10%			수분함량 5%		
	10℃	20℃	30℃	10℃	20℃	30℃	10℃	20℃	30℃
오염균발생까지의 기간(day)	21	14	8	-	-	30	-	-	-

## 나. 실험 결과

### (1) 미강으로부터 피틴산 및 이노시톨 분리 및 최적 분리조건 확립

- 피틴산 분리를 위한 일반적인 공정은 산 추출 후 여과 분리과정을 거쳐 침전물을 회수한 다음 재용해하여 이온교환수지를 이용하여 정제를 하는 과정이 일반적인 방법이지만 여과 후 분리 과정에서 대량의 원심분리과정에 의한 침전물 회수는 산업적인 방법으로는 적절하지 않는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 일차적으로 여과한 시료를 흡착 수지를 이용하여 불순물을 제거하고 용출된 용출액을 이온교환수지에 적용함으로써 산업적으로 피틴산 분리 정제에 보다 효율적인 방법을 확립하였다.

### (2) 피틴산 검량

- 피틴산 표준용액은 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1,000 ppm) 농도로 제조하였으며, 제조한 표준용액을 증류수로 희석하여 각각 0, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 제조한 검량선용 표준용액을 이용하여 표준 검량곡선을 작성하여 이후의 실험에 사용하였다(Fig. 2-1).

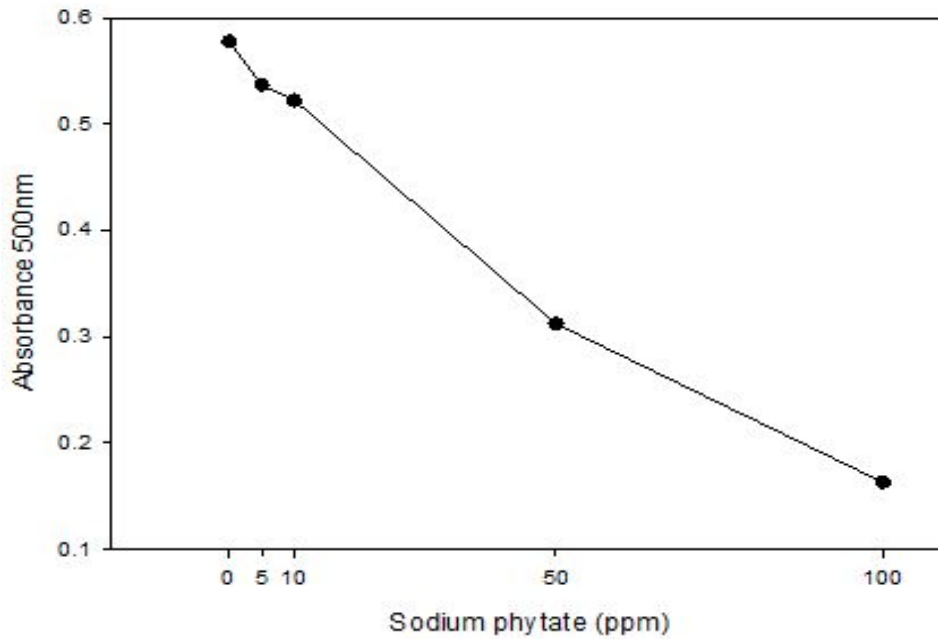


Fig. 2-1. Standard curve for the determination of phytic acid concentration.

### (3) 피틴산 추출 조건

- 피틴산 추출의 최적조건을 확립하기 위하여 0.5% 또는 1% 황산( $H_2SO_4$ ) 용액을 사용하여 추출실험을 수행한 결과 0.5% 황산을 이용하여 1시간 추출하는 것이 가장 효율적이었으며 추출시간을 증가하였을 경우 피틴산이 추출되는 양에 비하여 색소 물질 등 다른 불순물의 추출이 더 많이 진행되는 것으로 확인되었다. 따라서 미강으로부터 피틴산을 효율적으로 추출하기 위해서는 추출시간을 1시간으로 하는 것이 가장 좋은 것으로 확인되었다(Table 2-3).

Table 2-3. Extraction condition for the phytic acid from rice bran

Concentration of extraction solvent	Extraction time (hr)	Concentration of phytic acid ( $\mu g/mL$ )
0.5% $H_2SO_4$	0	98.36
	1	122.09
	2	120.87
1% $H_2SO_4$	0	94.30
	1	104.44
	2	100.79

#### (4) 피틴산 정제를 위한 수지 선정

- 0.5% 황산용액으로 미강에서 추출한 피틴산 추출액의 정제를 위한 수지를 선정하기 위하여 흡착수지인 HP20 수지와 이온교환 수지인 IRA-416, Dowex HCR-W2, DIAION PK208H, DIAION WK100, DIAION CR10을 이용하여 미강으로부터 추출한 추출액을 통과시키고, 5% NaOH와 5% HCl로 용출시킨 후 각각의 분획을 정량하여 최적 정제용 수지를 선정하였다(Table 2-4).
- HP20 흡착수지의 경우 0.5% 황산 추출액을 수지에 통과시킨 후 증류수로 세척한 다음 에탄올로 흡착된 피틴산을 용출시키고 잔존하는 피틴산을 증류수로 용출시켰다. 이온교환수지의 경우 0.5% 황산 추출액을 수지에 통과시켜 피틴산을 흡착시킨 후 증류수로 세척한 다음 5% NaOH 용액으로 흡착된 피틴산을 용출시키고 증류수로 세척하였다. 수지 내에 5% NaOH 용액에 의해 용출되지 않은 피틴산이 잔존할 경우 이를 용출하기 위하여 5% HCl로 용출한 다음 증류수로 세척하였다. 이온교환수지의 피틴산 교환 능력을 상호 비교하기 위하여 컬럼의 크기와 피틴산 추출액, 용출을 위한 용매 및 세척용액의 양은 동일하게 사용하였다.
- 그 결과 Table 4에서와 같이 0.5% 황산 추출에 의하여 제조된 피틴산 추출액을 HP20 흡착수지에 통과시켰을 경우 피틴산은 HP20에 흡착되지 않고 수지를 통과하였고( $100.99 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 증류수로 세척할 경우 컬럼 내에 흡착되지 않고 잔존하였던 피틴산이 세척되어 컬럼을 통과하였다( $103.83 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). 이 결과로부터 피틴산은 흡착수지에 거의 흡착되지 않고 불순물만이 흡착되는 것으로 나타나 HP20 흡착 수지가 피틴산 추출액에 존재하는 불순물 제거에 유용한 것으로 확인되었다.
- HP20 흡착 수지를 통과한 추출액을 여러 가지 이온교환수지를 이용하여 정제한 결과 IRA-416 이온교환 수지를 이용하였을 때 가장 우수하게 이온교환되는 것으로 확인되었으며 5% NaOH용액으로 용출되는 것으로 확인되었다.
- IRA-416 이온교환 수지의 경우 0.5% 황산으로 추출한 피틴산 추출액을 수지에 통과시킨 후 증류수로 세척하였을 때 수지의 이온교환능력을 초과하여 수지에 결합하지 못하고 컬럼을 통과한 피틴산이 일부 검출되었다( $56.38 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $42.58 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). 이온교환 후 5% NaOH로 수지에 결합되어 있는 피틴산을 용출시키고 증류수로 세척한 결과 수지에 결합되어 있던 피틴산이 용출됨을 확인하였다( $114.99 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $113.16 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). 한편 5% NaOH에 의해 용출되지 않은 피틴산이 잔존할 경우 이를 용출시키기 위하여 5% HCl을 사용하고 증류수로 세척한 결과 소량의 피틴산이 용출되었다( $33.04 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $31.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Table 2-4. Purification of phytic acid using various resins

Resin	Purification step	Concentration of phytic acid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
HP20	Extraction with 0.5% $\text{H}_2\text{SO}_4$	100.99
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	103.83
	Elution with EtOH	75.44
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	33.85
IRA-416	Extraction with 0.5% $\text{H}_2\text{SO}_4$	57.38
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	42.58
	Elution with 5% NaOH	114.99
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	113.16
	Elution with 5% HCl	33.04
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	31.01
DOWEX HCR-W2	Extraction with 0.5% $\text{H}_2\text{SO}_4$	108.50
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	105.05
	Elution with 5% NaOH	102.41
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	102.41
	Elution with 5% HCl	25.74
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	25.34
DIAION PK208H	Extraction with 0.5% $\text{H}_2\text{SO}_4$	89.43
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	87.00
	Elution with 5% NaOH	40.55
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	19.05
	Elution with 5% HCl	10.12
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	12.96
DIAION WK100	Extraction with 0.5% $\text{H}_2\text{SO}_4$	83.55
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	67.93
	Elution with 5% NaOH	54.75
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	14.99
	Elution with 5% HCl	0.00
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	10.73
DIAION CR10	Extraction with 0.5% $\text{H}_2\text{SO}_4$	121.48
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	114.38
	Elution with 5% NaOH	99.37
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	108.91
	Elution with 5% HCl	41.36
	Washing with d- $\text{H}_2\text{O}$	33.45

### (5) 피틴산 추출 정제 조건 확립

- 상기 실험 결과에 따라 미강으로부터 피틴산 추출을 위한 최적 조건은 0.5% 황산을 이용하여 미강으로부터 피틴산을 추출한 후 거즈로 고형 불순물을 제거하고 흡착 수지인 HP20 컬럼을 통과한 다음 IRA-416 이온교환 수지를 이용하여 용출되는 피틴산을 농축하는 과정으로 확립하여 본 연구에 사용하였다(Fig. 2-2).

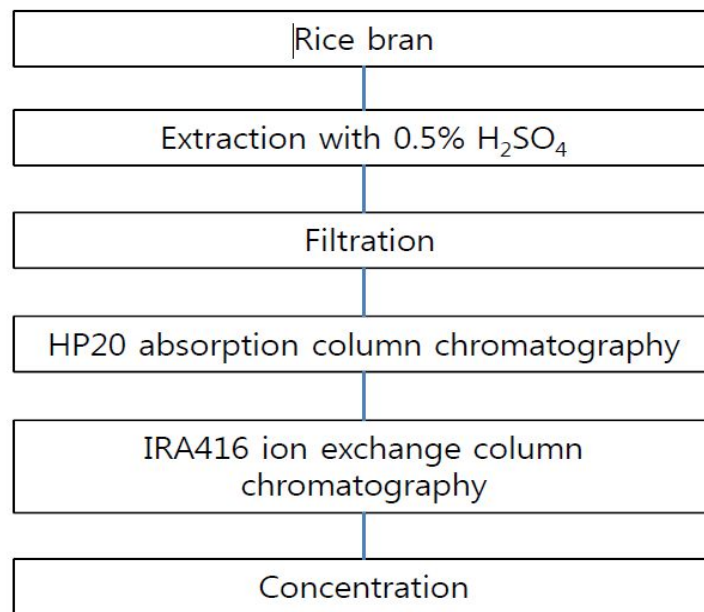


Fig. 2-2. Extraction and purification step for the phytic acid from rice bran.

### (6) 이노시톨 분리 및 최적 분리조건 확립

- 이노시톨은 피틴산을 가수분해하여 얻는 것으로 1차년도 연구결과를 바탕으로 최적조건을 설정하여 피틴산으로부터 제조하였다. 즉 160℃에서 6시간동안 가수분해한 후 가수분해 결과 생성된 인산기를 Ca(OH)<sub>2</sub>를 첨가하여 pH 6.5로 조정함으로써 침전시켜 제거하였다. 이로부터 얻어진 이노시톨은 농축과정을 통하여 결정화시켰다(Fig. 2-3).



Fig. 2-3. Production process of inositol extraction from phytic acid.

### 3. 피틴산과 이노시톨의 안정성 확인

- 피틴산과 이노시톨을 식품 보존제로 사용하기 위해서는 이들을 식품 내에 첨가하였을 경우 식품이 유통되는 일정 기간 동안 성상이 파괴되지 않고 안정하게 유지되어야 한다. 따라서 본 연구과제를 통하여 분리 정제된 피틴산과 이노시톨의 안정성을 pH와 온도를 달리하면서 조사하였다. 피틴산과 이노시톨을 각각 1% 용액으로 제조한 후 이 용액의 pH를 2에서 12까지 1단위로 조정하여 각각 4, 20, 40, 60, 80, 100°C에서 7일간 저장한 후 피틴산과 이노시톨을 정량한 결과 피틴산과 이노시톨 모두 통계적인 유의차 내에서 안정하게 유지됨을 확인하였다.

### 4. 피틴산과 이노시톨을 이용한 쌀밥의 저장성 향상

- 피틴산 및 이노시톨의 첨가가 식품의 저장성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 쌀밥에 여러 농도의 피틴산 또는 이노시톨을 처리한 후 일정시간동안 저장하면서 저장 기간별 pH 및 색도의 변화와 총균수의 변화를 측정하였다.

#### 가. 피틴산 첨가 쌀밥의 저장 온도별 pH의 변화

- 쌀밥에 피틴산을 0.01, 0.1, 1%의 농도로 첨가하여 4, 20, 37°C에서 72시간동안 저장할 경우



저장 중 쌀밥의 pH 변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2-3에 나타낸 바와 같이 피틴산을 첨가하지 않은 쌀밥은 저장초기 pH가 6.74였고 피틴산의 첨가농도가 증가할수록 pH가 감소됨을 알 수 있었는데 0.01% 피틴산 첨가 시 6.48, 0.1% 피틴산 첨가 시 5.66, 1% 피틴산 첨가 시 2.34의 값을 나타내었다.

- 쌀밥을 4℃ 또는 20℃에서 저장하였을 경우 피틴산의 첨가 농도에 관계없이 72시간 후에도 초기 pH와 동일한 pH를 나타내었다. 그러나 37℃에 저장한 쌀밥의 경우 피틴산을 첨가하지 않은 시료는 pH 값이 6.15로 감소하였고, 피틴산을 0.01% 첨가한 시료에서도 pH 6.48에서 6.25로 감소하였다. 한편 피틴산을 0.1% 또는 1% 첨가한 시료는 pH가 초기값을 유지하였다.

#### 나. 이노시톨 첨가 쌀밥의 저장 온도별 pH의 변화

- 쌀밥에 이노시톨을 0.01, 0.1, 1%의 농도로 첨가하여 4, 20, 37℃에서 72시간동안 저장할 경우 저장 중 쌀밥의 pH 변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2-4에 나타낸 바와 같이 이노시톨을 첨가하지 않은 쌀밥의 저장초기 pH는 6.74였고 0.01% 이노시톨 첨가 시에도 6.72값을 나타내어 이노시톨 무첨가 시료와 동일하였다. 그러나 0.1% 이노시톨 첨가 시에는 pH 6.68, 1% 이노시톨 첨가 시 pH 6.15의 값을 나타내어 이노시톨 무첨가 시료보다 낮은 값을 나타내었다.
- 쌀밥을 4℃에서 저장하였을 경우 이노시톨의 첨가 농도에 관계없이 72시간 후에도 초기 pH와 동일한 pH를 나타내었으나, 20℃에 저장한 쌀밥의 경우 이노시톨을 첨가하지 않은 시료는 pH가 6.62로 감소하였고, 이노시톨을 0.01% 또는 0.1% 첨가한 시료에서도 pH가 각각 6.72에서 6.44, 6.68에서 6.59로 감소하였다. 이노시톨을 1% 첨가한 시료는 72시간 저장 시에도 pH가 초기 값과 동일하였다.
- 37℃에 저장한 쌀밥의 경우에는 pH의 변화가 보다 높았는데, 이노시톨을 첨가하지 않은 시료는 pH가 6.15로, 이노시톨을 0.01% 또는 0.1% 첨가한 시료에서도 pH가 각각 6.72에서 6.33, 6.68에서 6.54로 감소하였다. 이노시톨을 1% 첨가한 시료에서도 72시간 저장 시에 pH가 6.15에서 6.04로 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

#### 다. 피틴산 첨가 쌀밥의 저장 온도별 총균수의 변화

- 쌀밥에 피틴산을 0.01, 0.1, 1%의 농도로 첨가하여 4, 20, 37℃에서 72시간동안 저장할 경우

저장 중 쌀밥의 저장 온도별 총균수의 변화를 조사하였다. 그 결과 Fig. 2-5와 같이 4℃에서 저장할 경우 저장 24시간까지는 모든 시료에서 총균이 관찰되지 않았으나, 피틴산을 첨가하지 않은 시료에서는 저장 48시간에서 1.91 log CFU/g의 총균이 검출되었고, 72시간에는 2.58 log CFU/g 수준으로 증가하였다.

- 0.01% 피틴산을 첨가한 시료에서는 저장 48시간까지는 총균이 관찰되지 않았으나 72시간에서 2.56 log CFU/g의 총균이 검출되었다. 한편 0.1% 또는 1% 피틴산을 첨가한 시료에서는 저장 72시간까지도 총균이 검출되지 않았다.
- 쌀밥을 20℃에서 저장할 경우 피틴산을 첨가하지 않은 시료와 0.01%, 0.1% 피틴산을 첨가한 시료에서는 저장 24시간부터 총균이 검출되기 시작하여 피틴산을 첨가하지 않은 시료와 0.01% 피틴산을 첨가한 시료는 2.83 log CFU/g, 0.01% 피틴산을 첨가한 시료에서는 2.36 log CFU/g의 총균이 검출되었다.
- 피틴산을 첨가하지 않은 시료와 0.01% 피틴산을 첨가한 시료는 저장기간이 경과함에 따라 총균이 지속적으로 증가하여 저장 72시간에는 각각 6.53 log CFU/g와 5.96 log CFU/g의 총균수를 나타내었다. 0.01% 피틴산을 첨가한 시료에서는 저장 48시간까지는 저장 24시간의 총균수를 유지하다가 72시간 경과 시 4.94 log CFU/g로 증가하였다. 한편 1% 피틴산을 첨가한 시료는 저장 72시간까지도 총균이 검출되지 않음이 확인되었다.
- 쌀밥을 37℃에서 저장할 경우에는 피틴산을 첨가하지 않은 시료와 0.01%, 0.1% 피틴산을 첨가한 시료에서는 저장 24시간부터 총균이 검출되기 시작한 후 지속적으로 증가하여 저장 72시간에는 각각 8.00, 7.20, 7.06 log CFU/g의 총균이 검출되었다.
- 그러나 1% 피틴산을 첨가한 시료는 저장 72시간에도 총균이 검출되지 않아 매우 높은 저장효과를 지니는 것을 확인하였다.

#### 라. 이노시톨 첨가 쌀밥의 저장 온도별 총균수의 변화

- 쌀밥에 이노시톨을 0.01, 0.1, 1%의 농도로 첨가하여 4, 20, 37℃에서 72시간동안 저장할 경우 저장 중 쌀밥의 저장 온도별 총균수의 변화를 조사하였다. 그 결과 4℃에서 저장할 경우 저장 24시간까지는 모든 시료에서 총균이 관찰되지 않았으나, 이노시톨을 첨가하지 않은 시료와 0.01% 이노시톨을 첨가한 시료에서는 저장 48시간에서 각각 1.91 log CFU/g, 1.78 log CFU/g의 총균이 검출되었고, 72시간에는 각각 2.58 log CFU/g, 2.34 log CFU/g 수준으로 증가하였다. 0.1%와 1% 이노시톨을 첨가한 시료에서는 저장 48시간까지 총균이 검출되지

않았으나 72시간 저장시 각각 2.15 log CFU/g와 2.03 log CFU/g의 총균이 검출되었다(Fig. 4, 5, 6, 7).

- 쌀밥을 20℃에서 저장할 경우 이노시톨을 첨가하지 않은 시료와 0.01%, 0.1% 이노시톨을 첨가한 시료에서는 저장 24시간부터 총균이 검출되기 시작하여 저장 72시간까지 지속적으로 증가하였으며, 1%의 이노시톨을 첨가한 시료에서는 48시간부터 총균이 증식하기 시작하여 72시간에서 4.26 log CFU/g 수준을 유지하였다.
- 쌀밥을 37℃에서 저장할 경우에는 이노시톨 무첨가 시료와 첨가 시료 모두 저장 초기부터 총균이 증식하기 시작하여 72시간까지 지속적으로 증가하여 7 log CFU/g 이상의 총균수를 나타내었다.

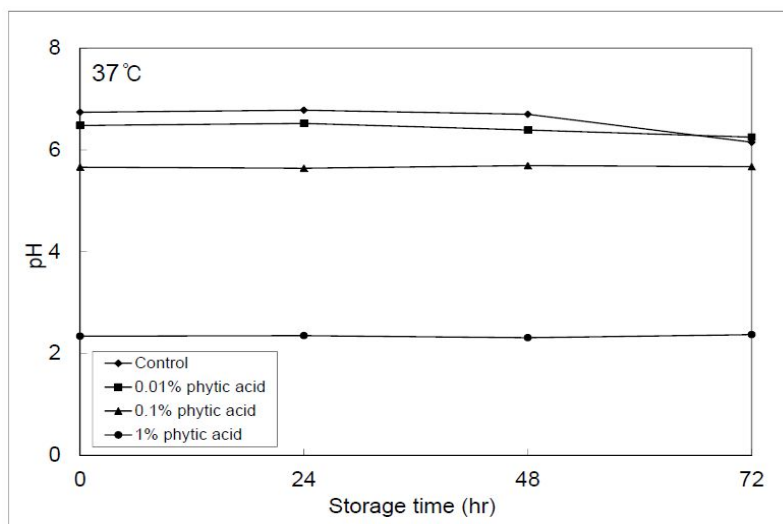
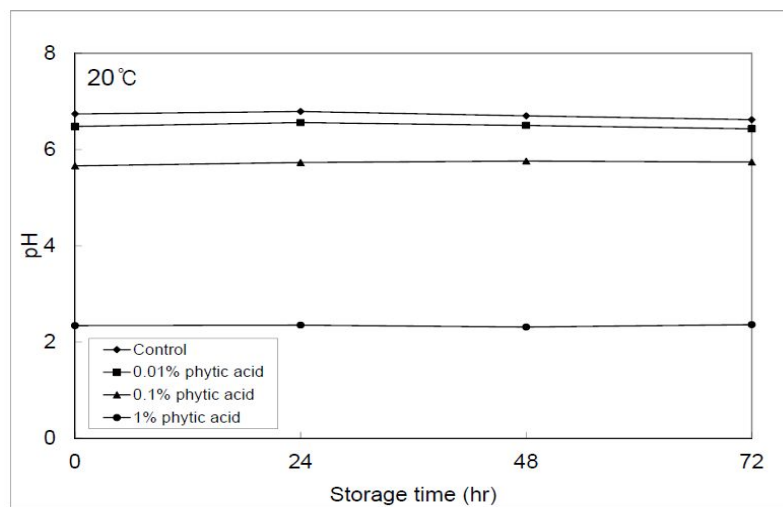
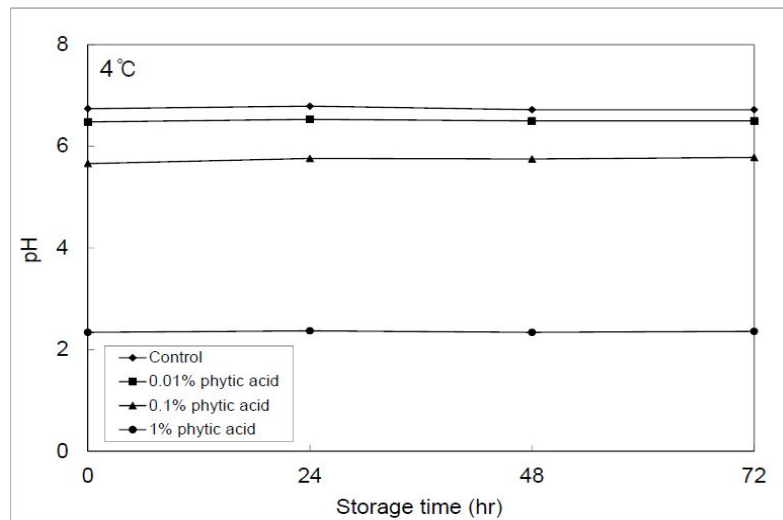


Fig. 2-4. pH of cooked rice supplemented with various concentrations of phytic acid when stored at different temperatures.

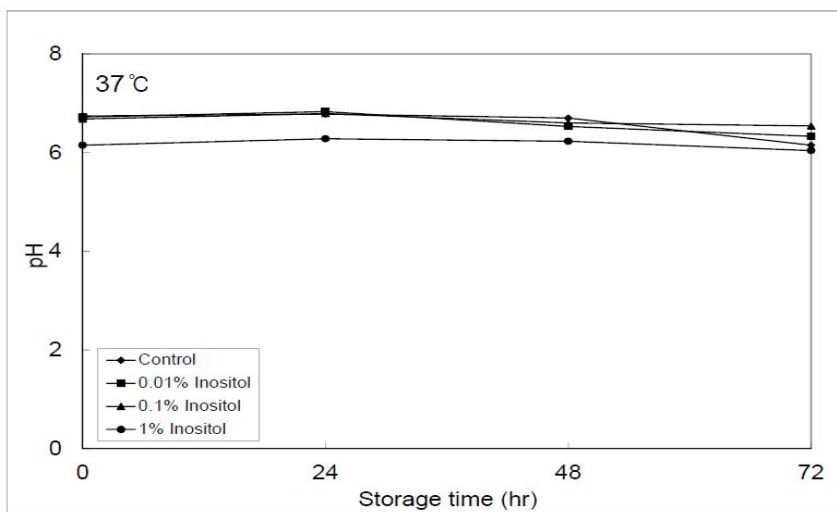
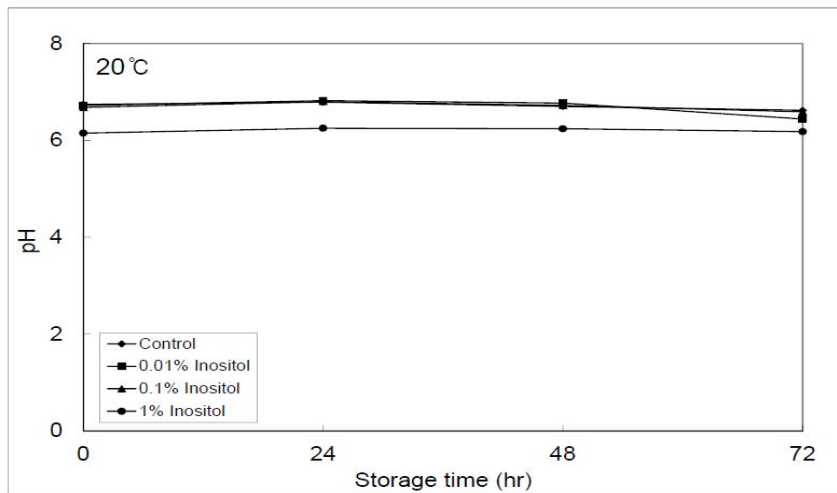
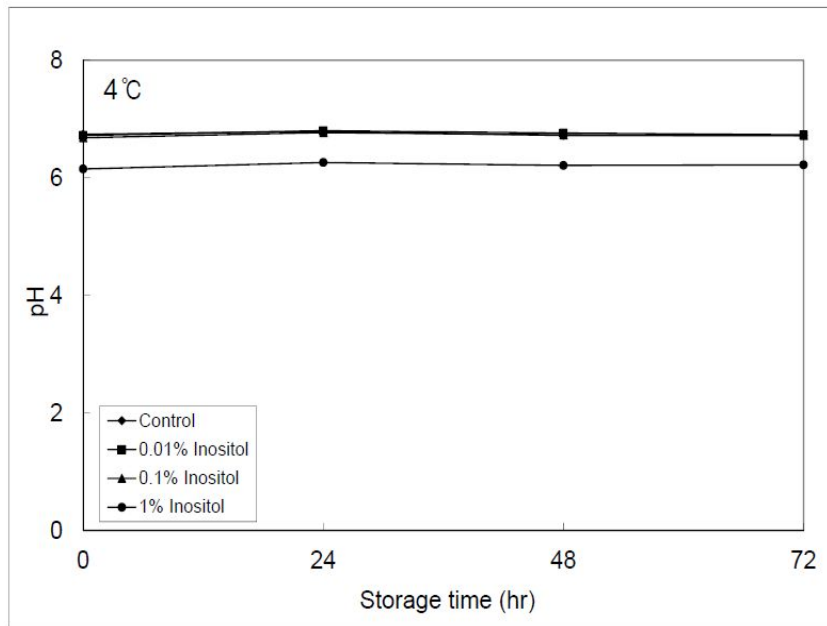


Fig. 2-5. pH of cooked rice supplemented with various concentrations of inositol when stored at different temperatures.

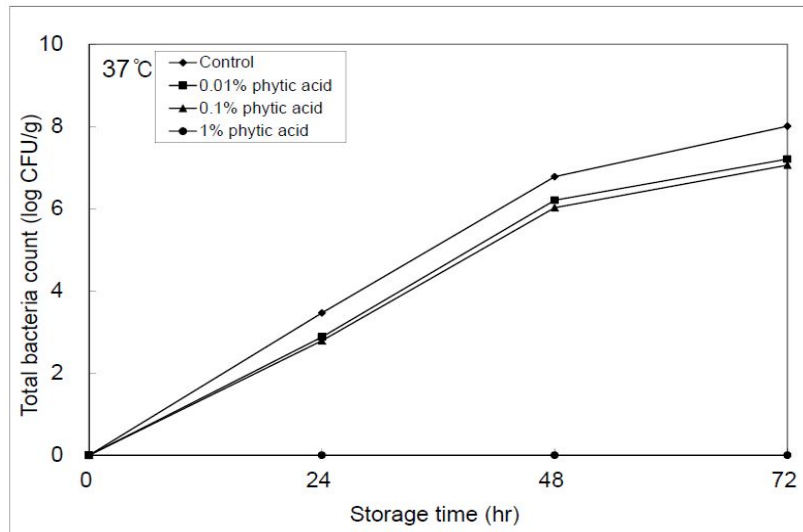
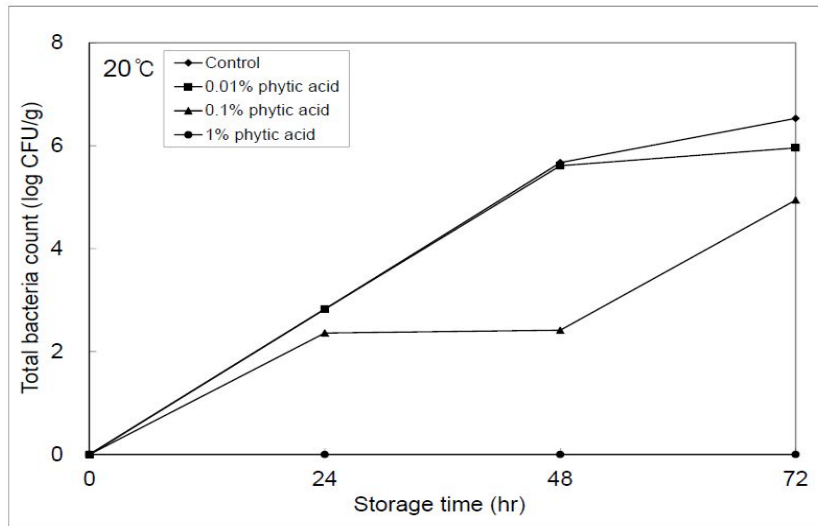
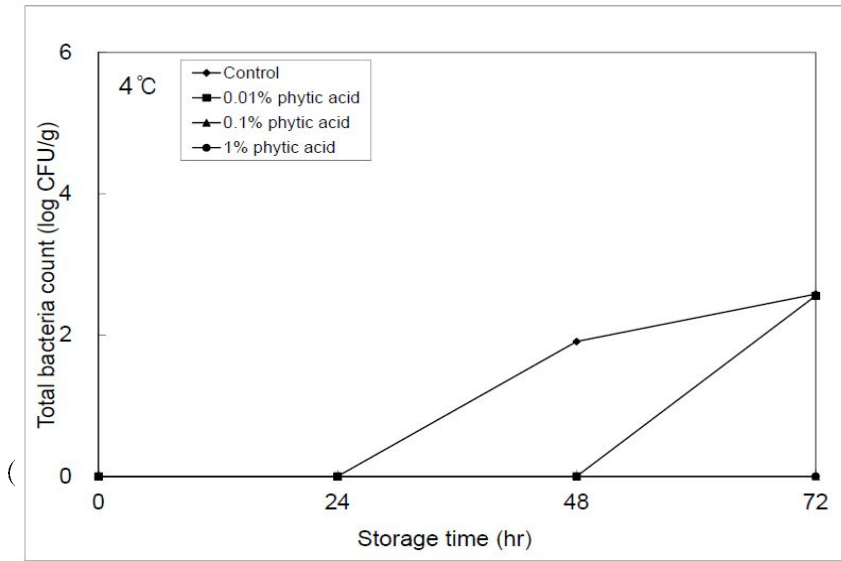


Fig. 2-6. Viable cell number of total bacteria in cooked rice supplemented with various concentrations of phytic acid when stored at different temperatures.

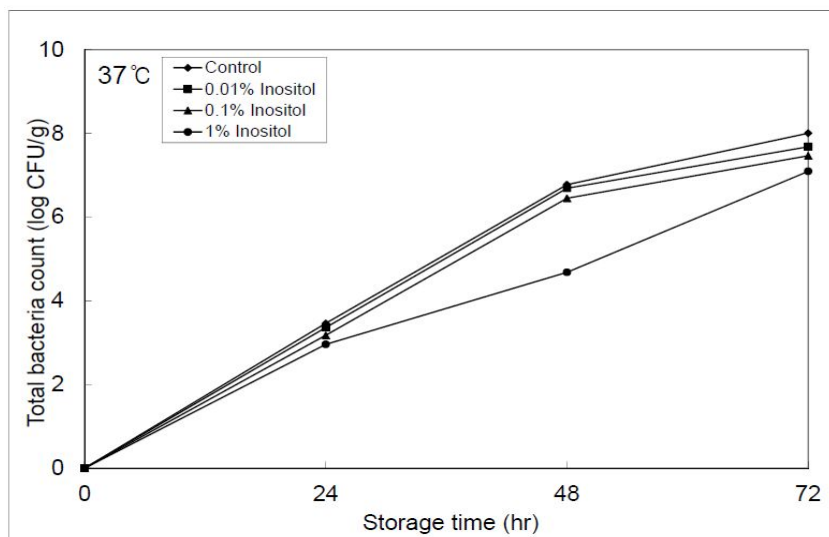
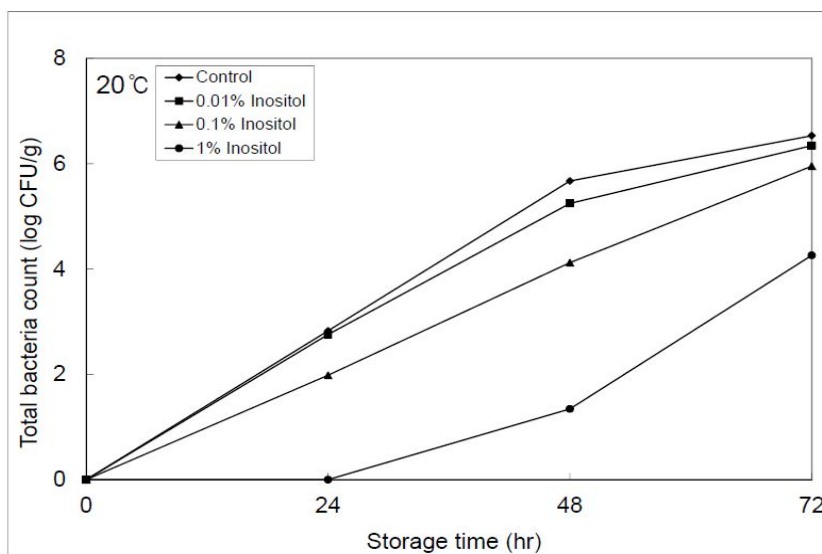
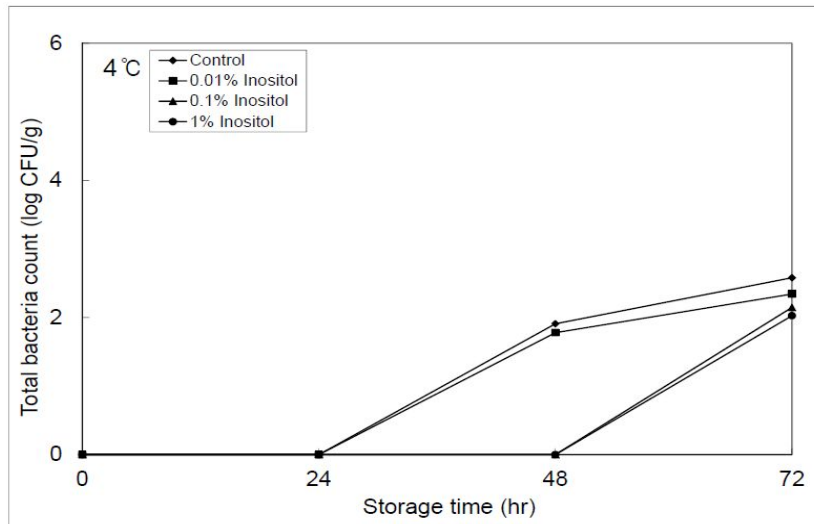


Fig. 2-7. Viable cell number of total bacteria in cooked rice supplemented with various concentrations of inositol when stored at different temperatures.

바. 피틴산 첨가 쌀밥의 저장 온도별 색도 변화

- 쌀밥에 피틴산을 0.01, 0.1, 1%의 농도로 첨가하여 4, 20, 37℃에서 72시간동안 저장할 경우 저장 중 쌀밥의 저장 온도별 색도의 변화를 조사한 결과 Table 2-5와 같이 피틴산의 첨가 농도와 저장 온도 및 시간에 따른 쌀밥의 L, a, b 값 등의 색도는 통계적으로 유의적인 변화를 나타내지 않아 피틴산의 첨가가 쌀밥의 색도에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다.

Table 2-5. Hunter's value for cooked rice supplemented with various concentrations of phytic acid when stored at different temperatures

Storage temperature (℃)	Concentration of phytic acid (%)	Color value	Storage time (hr)			
			0	24	48	72
4	0	L	68.46	69.48	68.17	71.70
		a	-12.67	-12.93	-12.87	-13.25
		b	32.93	34.79	33.80	35.09
	0.01	L	70.91	70.94	67.83	69.04
		a	-13.08	-12.99	-12.76	-13.16
		b	35.09	34.74	33.44	33.60
	0.1	L	68.31	70.38	77.29	74.44
		a	-12.38	-12.85	-14.09	-13.51
		b	35.94	34.81	36.53	35.88
	1	L	72.10	77.33	65.79	71.76
		a	-12.38	-13.82	-11.44	-12.63
		b	35.94	36.46	33.72	36.17
20	0	L	68.46	73.41	66.88	71.64
		a	-12.67	-13.41	-12.42	-13.41
		b	32.93	35.63	33.53	34.91
	0.01	L	70.91	71.70	66.15	68.72
		a	-13.08	-13.31	-12.28	-12.64
		b	35.09	34.87	33.30	33.96
	0.1	L	68.31	75.34	68.15	69.25
		a	-12.38	-13.52	-12.63	-13.66
		b	35.94	36.64	33.81	32.98
	1	L	72.10	74.45	68.10	72.76
		a	-12.38	-13.11	-11.91	-13.01
		b	35.94	36.24	34.61	35.29
37	0	L	68.46	75.55	64.76	70.73
		a	-12.67	-13.80	-12.18	-13.96
		b	32.93	36.37	32.81	34.33
	0.01	L	70.91	76.86	69.21	73.23
		a	-13.08	-13.91	-12.67	-13.41
		b	35.09	36.69	34.59	35.87
	0.1	L	68.31	77.39	70.36	74.78
		a	-12.38	-14.13	-13.22	-13.71
		b	35.94	37.03	34.14	35.86
	1	L	72.10	70.80	74.45	72.65
		a	-12.38	-13.44	-12.91	-12.45
		b	35.94	34.69	36.94	36.22



마. 이노시톨 첨가 쌀밥의 저장 온도별 색도 변화

- 쌀밥에 이노시톨을 0.01, 0.1, 1%의 농도로 첨가하여 4, 20, 37℃에서 72시간동안 저장할 경우 저장 중 쌀밥의 저장 온도별 색도의 변화를 조사한 결과 Table 2-6과 같이 이노시톨의 첨가 농도와 저장 온도 및 시간에 따른 쌀밥의 L, a, b 값 등의 색도는 통계적으로 유의적인 변화를 나타내지 않아 이노시톨의 첨가가 쌀밥의 색도에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다.

Table 2-6. Hunter's value for cooked rice supplemented with various concentrations of inositol when stored at different temperatures

Storage temperature (℃)	Concentration of inositol (%)	Color value	Storage time (hr)			
			0	24	48	72
4	0	L	68.46	69.48	68.17	71.70
		a	-12.67	-12.93	-12.87	-13.25
		b	32.93	34.79	33.80	35.09
	0.01	L	74.58	74.74	65.24	69.81
		a	-13.75	-13.84	-12.13	-12.96
		b	36.13	35.78	33.36	34.47
	0.1	L	76.95	73.91	63.44	61.43
		a	-13.79	-13.62	-12.11	-11.57
		b	37.17	35.52	32.12	31.95
	1	L	76.32	66.32	70.65	74.73
		a	-13.11	-12.14	-12.73	-13.21
		b	38.72	33.84	35.78	37.29
20	0	L	68.46	73.41	66.88	71.64
		a	-12.67	-13.41	-12.42	-13.41
		b	32.93	35.63	33.53	34.91
	0.01	L	70.91	74.26	68.71	70.64
		a	-13.08	-13.99	-12.85	-13.16
		b	35.09	35.17	33.61	34.49
	0.1	L	68.31	73.92	72.09	73.86
		a	-12.38	-13.52	-13.27	-13.57
		b	35.94	35.51	35.14	35.30
	1	L	72.10	69.76	73.31	75.85
		a	-12.38	-12.27	-12.79	-13.68
		b	35.94	35.71	37.55	36.62
37	0	L	68.46	75.55	64.76	70.73
		a	-12.67	-13.80	-12.18	-13.96
		b	32.93	36.37	32.81	34.33
	0.01	L	70.91	72.12	75.23	76.98
		a	-13.08	-13.80	-14.01	-14.39
		b	35.09	34.21	35.45	37.09
	0.1	L	68.31	72.99	74.45	66.57
		a	-12.38	-13.28	-13.94	-12.96
		b	35.94	37.04	35.45	31.76
	1	L	72.10	76.61	68.95	65.63
		a	-12.38	-14.59	-12.81	-12.67
		b	35.94	35.91	34.50	32.93

## 바. 피틴산과 이노시톨을 이용한 식육의 저장성 향상

- 본 연구결과 피틴산과 이노시톨의 항균활성 등을 비교할 경우 이노시톨보다는 피틴산이 식품의 저장성 향상에 우수한 것으로 확인되었다. 따라서 피틴산의 첨가가 식육의 저장성 향상에 미치는 영향을 조사하였다.

### (1) 배지의 pH에 따른 피틴산의 *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균효과

- 배지의 pH에 따른 피틴산의 항균효과를 조사하기 위하여 Tryptic soy broth(TSB)에 피틴산을 최종농도가 0.1, 0.5, 1.0%가 되게 첨가한 후 배지의 pH를 식육의 일반적 pH 범위인 5.5, 6.0, 6.5, 7.0로 조정하여 *Salmonella* Typhimurium KCCM 11806에 대한 생육저해도를 관찰하였다.
- 그 결과 Fig 2-8에 나타낸 바와 같이 1% 피틴산이 함유된 경우 pH 5.5~7.0의 모든 pH 범위에서 *S. Typhimurium*의 생육을 완전히 저해시켜 증식억제 효과가 높게 나타났으며, 0.5% 피틴산을 첨가한 경우에는 약 50%의 생육저해효과를 나타내었다. *S. Typhimurium*은 중성에 가까울수록 잘 증식하였으며, phytic acid의 항균효과 역시 pH가 중성에 가까울수록 높게 나타났다.

### (2) 닭고기, 돼지고기, 소고기에서의 피틴산의 *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균효과

- 신선한 닭고기, 돼지고기, 소고기를 0.1% peptone water 0.5 mL과 0.1 mL의 피틴산을 0.1, 0.5, 1% 농도별로 혼합하여 homogenizer로 마쇄한 후 *S. Typhimurium*을 0.1 mL( $1 \times 10^8$  CFU/mL) 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 원심분리하여 상층액의 세균수를 측정하여 피틴산의 항균효과를 조사하였다.
- 그 결과 닭고기에서는 항균효과가 피틴산 농도에 의존적으로 나타났는데, 0.5%의 피틴산 첨가 시 약 1.2 log 단위의 생육 감소 효과를 나타냈으며, 1%일 경우에는 2.2 log 단위의 항균효과를 나타내었다(Fig. 2-9). 돼지고기의 경우에도 *S. Typhimurium* 증식 억제효과가 피틴산 농도에 의존적으로 나타났는데, 0.5% 피틴산 첨가 시 약 1.0 log 단위의 생육 감소 효과를 나타냈으며, 1%일 경우 1.9 log 단위의 항균효과를 나타내었다(Fig. 2-10). 또한 소고기의 경우에도 *S. Typhimurium* 증식 억제효과가 피틴산의 농도에 의존적으로 나타났으며, 0.1, 0.5, 1%의 피틴산 농도에 대하여 유의적으로 *S. Typhimurium*의 증식을 억제시켰다(Fig. 2-11).

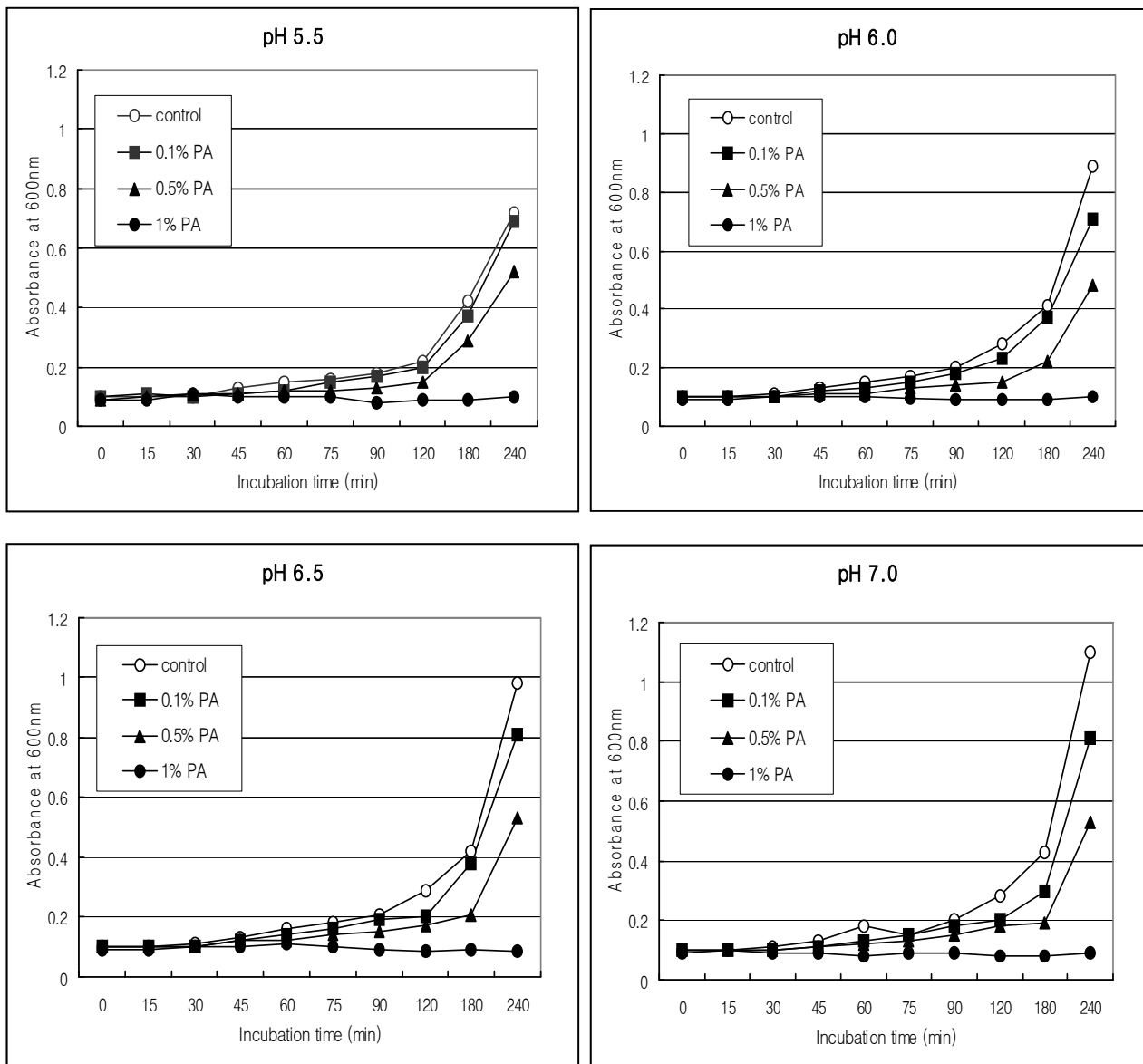


Fig. 2-8. Antibacterial effect of phytic acid(PA) at the final concentrations of 0.1, 0.5, and 1% against *Salmonella* Typhimurium KCCM 11806 in Tryptic soy broth.

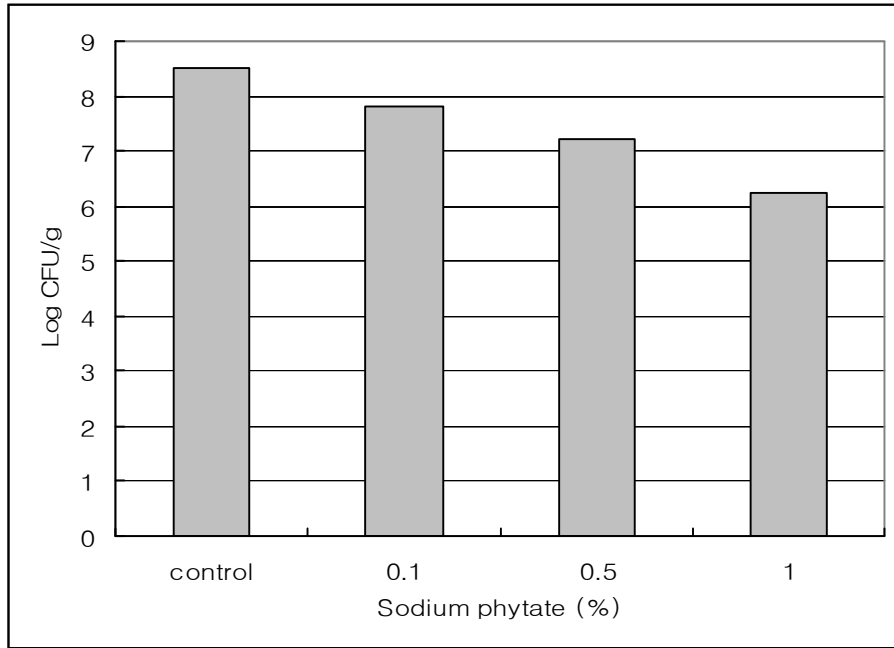


Fig. 2-9. Antibacterial effect of sodium phytate at the final concentrations of 0.1, 0.5, and 1.0% against *Salmonella Typhimurium* in chicken breast.

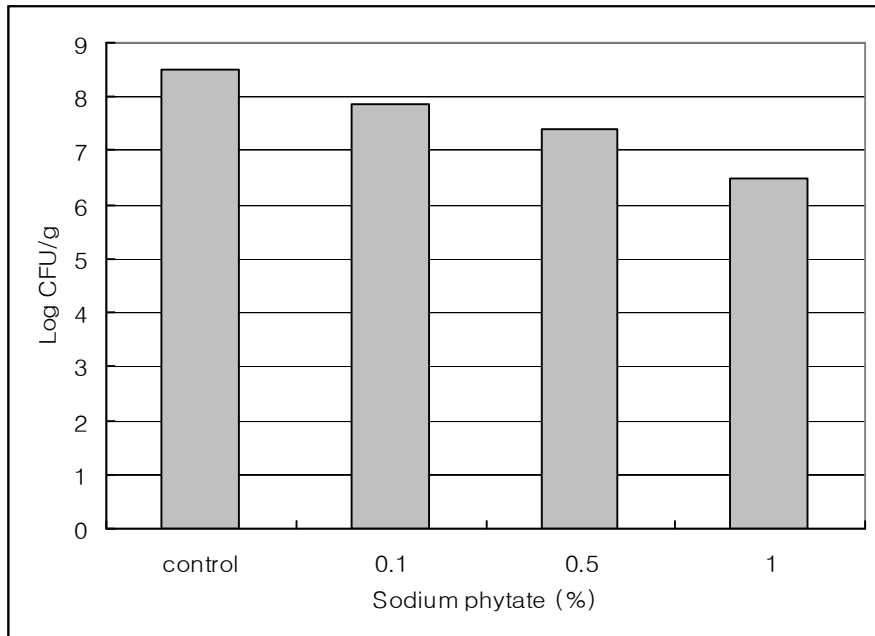


Fig. 2-10. Antibacterial effect of sodium phytate at the final concentrations of 0.1, 0.5. and 1.0% against *Salmonella Typhimurium* in pork.

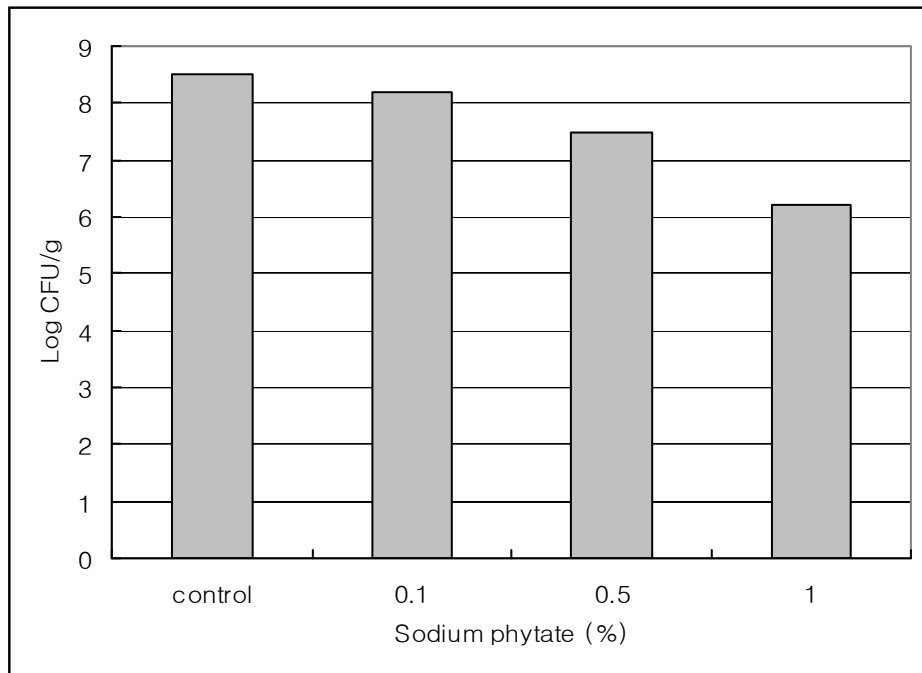


Fig. 2-11. Antibacterial effect of sodium phytate at the final concentrations of 0.1, 0.5, and 1.0% against *Salmonella Typhimurium* in beef.

### (3) 피틴산 첨가에 따른 식육의 pH 변화

- 보존제로서 피틴산을 식육에 첨가하였을 경우 피틴산 첨가에 따른 식육 pH의 변화를 관찰하기 위하여 피틴산이 1% 첨가된 식육을 4°C에서 24시간 저장한 후, 검체 1 g을 9 mL의 증류수에 넣고 균질기로 마쇄한 다음 원심분리하여 상등액의 pH를 측정하였다.
- 닭고기, 돼지고기, 소고기의 pH는 각각 5.69, 5.58, 5.61이었으며, 피틴산을 식육에 1% 첨가하였을 경우, 식육의 pH는 약 0.2-0.3 감소하였다(Table 2-7).

Table 2-7. Levels of pH in meats

Treatments	Meats		
	Chicken	Pork	Beef
Control	5.43±0.03	5.46±0.05	5.81±0.03
Sodium phytate	5.21±0.02*	5.10±0.05*	5.55±0.04*

Data represent mean±SD.

\*Significantly different from the control at  $p < 0.01$ .

#### (4) 선택배지에서 피틴산의 *Escherichia coli* O157:H7에 대한 항균효과

- 배지에 피틴산을 첨가할 경우 농도에 따른 *E. coli* O157:H7에 대한 생육저해효과를 관찰하기 위하여 TSB 2.7 mL와 0.3 mL의 피틴산을 0.05, 0.1, 0.5, 1% 농도별로 혼합한 후 *E. coli* O157:H7 KCCM 40406을 0.1 mL( $1 \times 10^8$  CFU/mL) 접종한 다음 37°C에서 8시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.
- 그 결과 Fig 2-11과 같이 피틴산의 *E. coli* O157:H7에 대한 항균 효과는 농도 의존적인 것으로 나타났으며, 0.5% 피틴산 첨가 시 약 1.3 log 단위의 생육저해효과를 확인하였다.(Fig 2-12.)

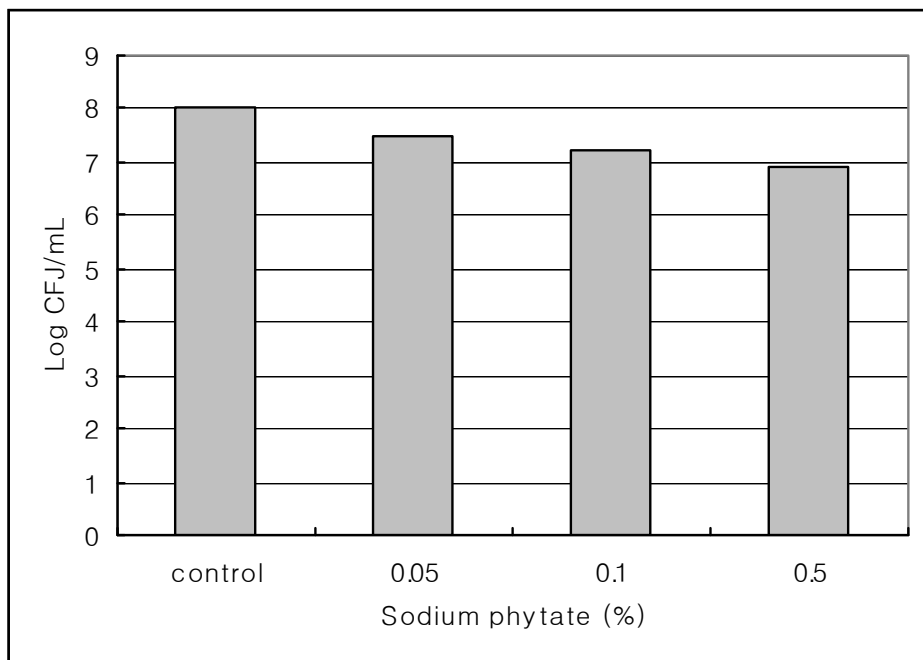


Fig. 2-12. Antibacterial effect of sodium phytate at the final concentrations of 0.05, 0.1, and 0.5% on *E. coli* O157:H7.

#### (5) 생육과 가열 처리된 식육에서 피틴산의 항균효과

- 생육과 가열 처리한 식육에 피틴산을 첨가하였을 경우의 항균효과를 조사하기 위하여 신선한 생육인 닭고기, 돼지고기, 소고기에 피틴산을 여러 농도로 첨가한 결과 *E. coli* O157:H7에 대한 항균효과는 피틴산의 농도에 의존적인 것으로 나타났으며, 모든 생육에서 0.5% 피틴산 첨가 시 약 1.0 log 단위의 생육감소 현상을 나타내었다(Fig. 2-13).
- 가열 처리된 식육에서도 첨가된 피틴산 농도에 의존적으로 유의성 있게 증식을 억제하였는데, 돼지고기에서 0.5% 피틴산 첨가 시 가장 강한 항균효과를 나타내었다(Fig. 2-14).



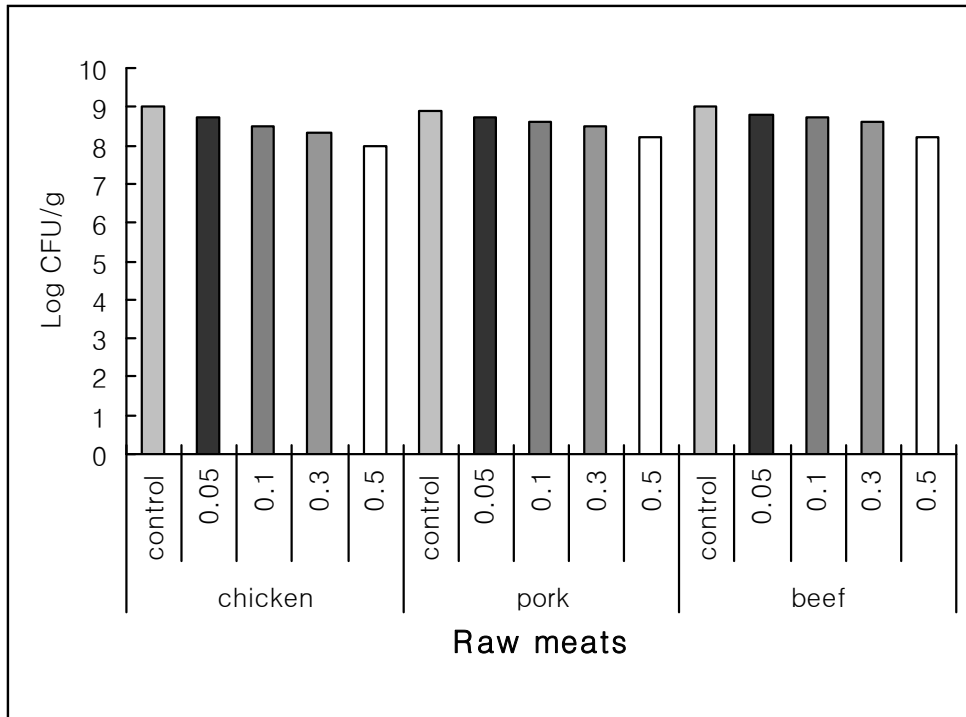


Fig. 2-13. Antibacterial effect of sodium phytate at the final concentrations of 0.05, 0.1, 0.3 and 0.5% on *E. coli* O157:H7 in fresh raw meats.

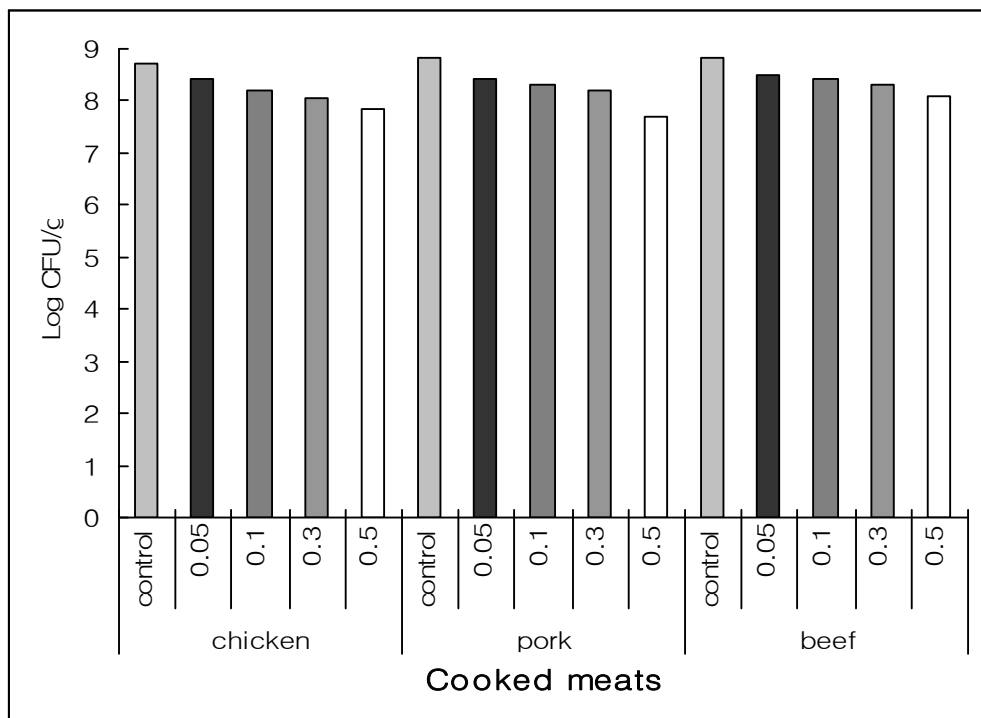


Fig. 2-14. Antibacterial effect of sodium phytate at the final concentrations of 0.05, 0.1, 0.3 and 0.5% on *E. coli* O157:H7 in cooked meats.

(6) 식육을 이용한 피틴산의 항산화능

- 피틴산이 식품 보존제로서의 유용성을 확인하기 위하여 식육에 여러 가지 농도로 피틴산을 첨가한 후 저장기간에 따른 피틴산의 항산화능을 측정하였다. 소고기 생육에 0.1, 1, 5 mM의 피틴산을 첨가하여 homogenization시킨 후 4°C에서 3일간 저장한 다음 생육의 TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) 값을 측정하였다.
- 그 결과 Table 8.에서와 같이 저장기간이 증가함에 따라 TBARS 값이 증가하였으며 피틴산을 5 mM 첨가하였을 때 TBARS 값이 유의적으로 감소함을 알 수 있었다. 돼지고기의 경우에도 피틴산을 5 mM 첨가하였을 때 TBARS 값이 유의적으로 감소하였다(Table 2-9).
- 가열 처리한 소고기와 돼지고기를 이용하여 동일한 실험을 수행하였을 경우 Table 2-10.과 11.에 나타난 바와 같이 피틴산의 첨가량이 증가함에 따라 TBARS 값이 감소하는 것으로 나타나 phytic acid가 항산화능이 우수한 것으로 확인되어 식품 보존제로서 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 2-8. Changes in TBARS value ( $\mu\text{mole MDA/kg}$ ) in raw beef homogenate stored for 3 days at 4°C

Treatment	Storage time (hr)			Mean
	0	24	72	
Control	0.0	26.2	63.1	29.8 <sup>b1)</sup>
0.1 mM phytic acid	0.0	25.4	68.4	31.3 <sup>b</sup>
1 mM phytic acid	0.0	24.2	74.9	33.0 <sup>b</sup>
5 mM phytic acid	0.0	12.5	29.0	13.8 <sup>a</sup>
Mean	0.0 <sup>A1)</sup>	22.1 <sup>B</sup>	58.9 <sup>C</sup>	

<sup>1)</sup>Values with different superscripts within a column (a-c) and within a row (A-C) differ significantly ( $p < 0.05$ ).

MDA: malondialdehyde

Table 2-9. Changes in TBARS value ( $\mu\text{mole MDA/kg}$ ) in raw pork homogenate stored for 3 days at 4°C

Treatment	Storage time (hr)			Mean
	0	24	72	
Control	1.85	2.47	5.04	3.12 <sup>c1)</sup>
0.1 mM phytic acid	1.85	2.38	4.33	2.85 <sup>ab</sup>
1 mM phytic acid	1.85	2.36	4.78	3.00 <sup>bc</sup>
5 mM phytic acid	1.85	2.11	4.19	2.72 <sup>a</sup>
Mean	1.85 <sup>A1)</sup>	2.33 <sup>B</sup>	4.59 <sup>C</sup>	

<sup>1)</sup>Values with different letters(a-c) within a column and (A-C) within a row differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 2-10. Changes in TBARS value ( $\mu\text{mole MDA/kg}$ ) in cooked beef homogenate stored for 3 days at 4°C

Treatment	Storage time (hr)			Mean
	0	24	72	
Control	10.9	23.4	62.4	32.2 <sup>b1)</sup>
0.1 mM phytic acid	8.22	13.9	69.2	30.4 <sup>b</sup>
1 mM phytic acid	9.51	13.1	47.6	23.4 <sup>b</sup>
5 mM phytic acid	6.05	5.5	11.4	7.7 <sup>a</sup>
Mean	8.67 <sup>A1)</sup>	13.98 <sup>B</sup>	47.65 <sup>C</sup>	

<sup>1)</sup>Values with different letters(a-c) within a column and (A-C) within a row differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 2-11. Changes in TBARS value ( $\mu\text{mole MDA/kg}$ ) in cooked pork homogenate stored for 3 days at 4°C

Treatment	Storage time (hr)			Mean
	0	24	72	
Control	6.20	23.5	53.2	27.6 <sup>c1)</sup>
0.1 mM phytic acid	4.68	24.8	53.9	27.8 <sup>c</sup>
1 mM phytic acid	4.15	14.1	43.7	20.7 <sup>b</sup>
5 mM phytic acid	2.51	6.55	22.1	10.4 <sup>a</sup>
Mean	4.4 <sup>A1)</sup>	17.2 <sup>B</sup>	43.2 <sup>C</sup>	

<sup>1)</sup>Values with different letters(a-c) within a column and (A-C) within a row differ significantly ( $p < 0.05$ ).

(7) 피틴산과 이노시톨의 혼합 첨가에 의한 항산화능

- 생 소고기와 가열처리한 소고기에 5 mM 피틴산을 첨가하여 식육의 산화를 저하시킬 수 있는데, inositol을 추가로 첨가 시 이노시톨이 피틴산의 항산화능을 상승시키는지 확인하고자 5 mM 피틴산과 5 mM 이노시톨을 혼합 첨가하여 소고기를 4°C에서 3일간 저장한 후 TBARS 값을 측정하였다. 그 결과 Table 2-12에서와 같이 이노시톨의 첨가가 피틴산의 항산화능을 상승시키지는 않는 것으로 확인되었다.

Table 2-12 Effect of inositol, phytic acid and mixture of both on changes in raw and cooked beef homogenates stored for 3 days at 4°C

TBARS	Storage time			Treatment			
	0 hr	24 hr	3 day	Control	5 mM inositol	5 mM inositol + 5 mM phytic acid	5 mM phytic acid
Raw meat	2.50 <sup>A1)</sup>	16.4 <sup>B</sup>	51.5 <sup>C</sup>	37.1 <sup>b</sup>	36.2 <sup>b</sup>	9.7 <sup>a</sup>	8.4 <sup>a</sup>
Cooked meat	11.9 <sup>A</sup>	24.1 <sup>A</sup>	85.7 <sup>B</sup>	86.3 <sup>c</sup>	44.4 <sup>b</sup>	22.4 <sup>ab</sup>	8.6 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Values with different letters within a row differ significantly ( $p < 0.05$ ).

## 5. 각 분획의 shelf life 평가

### 가. 피틴산

- 피틴산의 경우 현재 경쟁사로 보고 있는 일본의 쓰노사에서 생산 중이며 일부 국내에 수입되어 판매되고 있는 실정이다. 따라서 이러한 기존 제품과의 경쟁을 고려하여 기존 제품을 대상으로 품질기준을 비교 확립하고자 하였다. Table 2-13에 시험분석항목 및 기준을 보였다.
- 성상의 경우 피틴산은 일반적으로 45% 이상의 순도로 유통되고 있다. 그 이유는 50% 이상이 될 경우 쉽게 자가반응에 의한 폴리머가 생성되어 침전을 형성하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 통상의 유통 조성에서는 다소 담황색을 띄면서 유동성은 있으나, 미세한 점성을 가지고 있으며 45% 순도의 경우 비중이 1.2 정도에 달한다. Fig. 2-15에 각각의 온도에서 저장 시간에 따른 피틴산의 색의 변화를 600 nm에서의 흡광도의 변화로 조사한 결과를 보였다.
- 또한 피틴산의 저장성 실험을 위해서 피틴산을 비이커에 담아 실온의 빛이 드는 곳에 노출시켜 외관(색)의 변화를 관찰하였다. 그 결과 초기 투명한 미황색이었던 피틴산이 2일째부터 조금씩 갈변하기 시작하였고, 갈변화가 지속되어 1주일간 빛에 노출되었을 때는 검은색으로 변하는 현상을 관찰 할 수 있었다(Table 2-14).
- 피틴산 소재는 위와 같은 결과에서 볼 수 있듯이 상온에서도 빛에 의한 갈변반응이 빠르게 일어나므로 포장 시 빛을 차단하여야 하며, 금속과 반응하므로 플라스틱 용기에 포장하여 냉장보관 및 유통시켜야 한다. 다량 보관할 경우에는 통상적으로 polypropylene bottle 등을 사용하여 빛의 접촉을 완전히 차단한다. 위와 같은 시험 결과를 바탕으로 빛의 차단 및 플라스틱 용기에의 포장, 냉장보관 등의 조건을 만족시켰을 때, 피틴산 제품의 유통기한을 6개월로 설정할 수 있었다.
- 피틴산은 45% 이상의 농도에서 장시간 빛에 노출되거나 고온에 방치될 경우 색이 진해지면서 동시에 미세한 침전이 형성된다. 이들 침전은 검은색을 띄면서 용액의 투명도를 낮추며, 0.45um 필터로 여과할 경우 깨끗하게 제거할 수 있다. 그러나 색깔은 돌아오지 않으며 진해진 색을 원래대로 돌리기 위해서는 이온교환수지탑을 거쳐서 탈색하여야 한다.

Table 2-13. Certificate of analysis for phytic acid

Item : Phytic acid	Lot. No. :	Exp. Date :
성상	미황색의 액체로 점성이 있음.	
순도	45% 이상	
중금속	< 20ppm	
비소	< 2ppm	
총인(%)		실측치
무기인(%)		실측치
일반세균	< 5,000	
대장균군	불검출	

Table 2-14. Appearance(color) of phytic acid as treatment day at room temperature

저장 기간(day)	1	2	3	4	5	6	7
외관(색)	미황색	진한 미황색	황색	진한 황색	갈색	진한 갈색	검정색

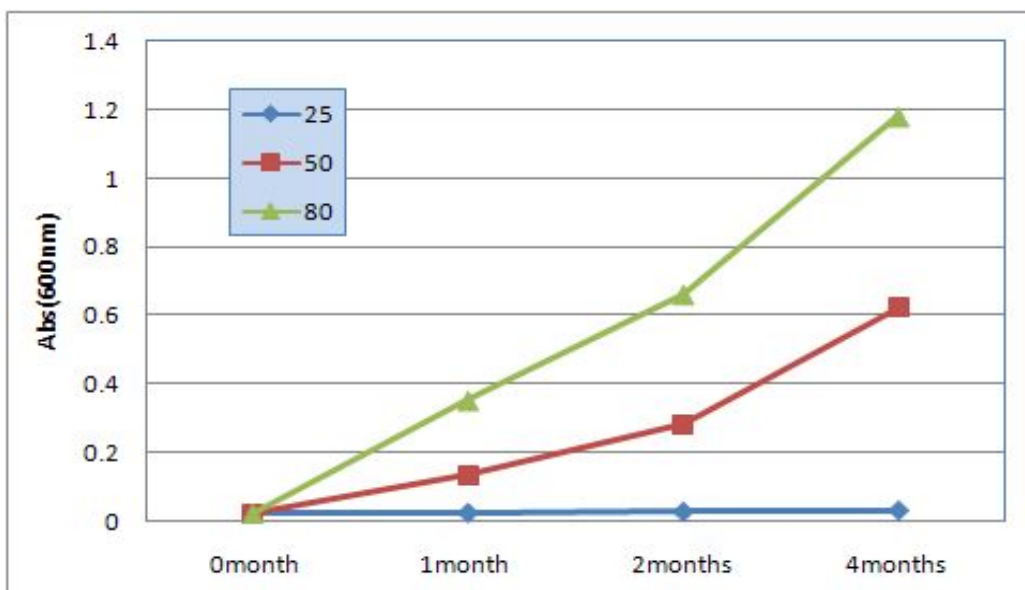


Fig. 2-15. Color change during storage at different temperatures.

## 나. 이노시톨

- 이노시톨은 Fig. 2-16에 나타낸 바와 같이 피틴 또는 피틴산을 가수분해 하여 인산기를 모두 제거하면 얻어지는 것으로 분자량은 180이며 백색의 결정을 이루고 있다. 이노시톨의 품질기준을 Table 2-15에 나타내었다. 이노시톨은 당알콜의 일종으로 재결정에 의하여 얻어지며 순도는 97% 이상을 유지하고 있다. 이노시톨의 경우 품질기준은 일반적인 당의 품질기준과 유사하며, 쉽게 흡습성이 낮으며, 분해되지 않는다.
- 이노시톨의 경우 보존성은 매우 용이한 것으로 나타났다. 그 이유는 쉽게 흡습하지 않으며 또한, 갈변하지도 않기 때문이다. 따라서, 가혹시험 및 가속시험을 통하여 이노시톨의 유통기한은 2년으로 설정하였으며, 이노시톨의 유통을 위한 포장 및 유통방법은 포장용기로는 과도한 공기 또는 습기와 접촉을 방지할 수 있는 밀폐된 형태의 것으로 폴리프로필렌, 폴리에틸렌 등의 플라스틱비닐 또는 알루미늄 파우치 등이 가능하며 알루미늄 파우치의 경우 가장 뛰어난 차단효과가 있으나 가격적인 면에서 상대적으로 비싸다는 단점이 있다.
- 피틴산의 경우 액상이므로 포장용기가 빛을 차단할 수 있는 불투명의 더욱 좋게는 갈색의 통이 좋으며, 피틴산의 산도가 0.7 수준으로 매우 강산이므로 이를 감안하여 플라스틱통을 사용하는 것이 안전하다. 유통은 고온에 장시간 노출될 경우 갈변하여 색이 진해지게 되므로 고온을 방지하고, 빛의 접촉을 차단하여야 한다.
- 이노시톨의 경우 일반적인 포장 및 유통방법 하에서 제품의 품질에 영향을 미칠 가능성은 없는 것으로 나타나 상대적으로 용이하게 유통하여도 무방하다고 할 수 있다.

Table 2-15. Certificate of analysis for inositol

항목	기준	결과
성상	백색의 미세결정상, 단맛	
수분함량	< 5%	
순도	> 97%	
일반세균	< 10,000	pass
대장균군	불검출	pass
입도	30 mesh 통과율 85%	개별기준

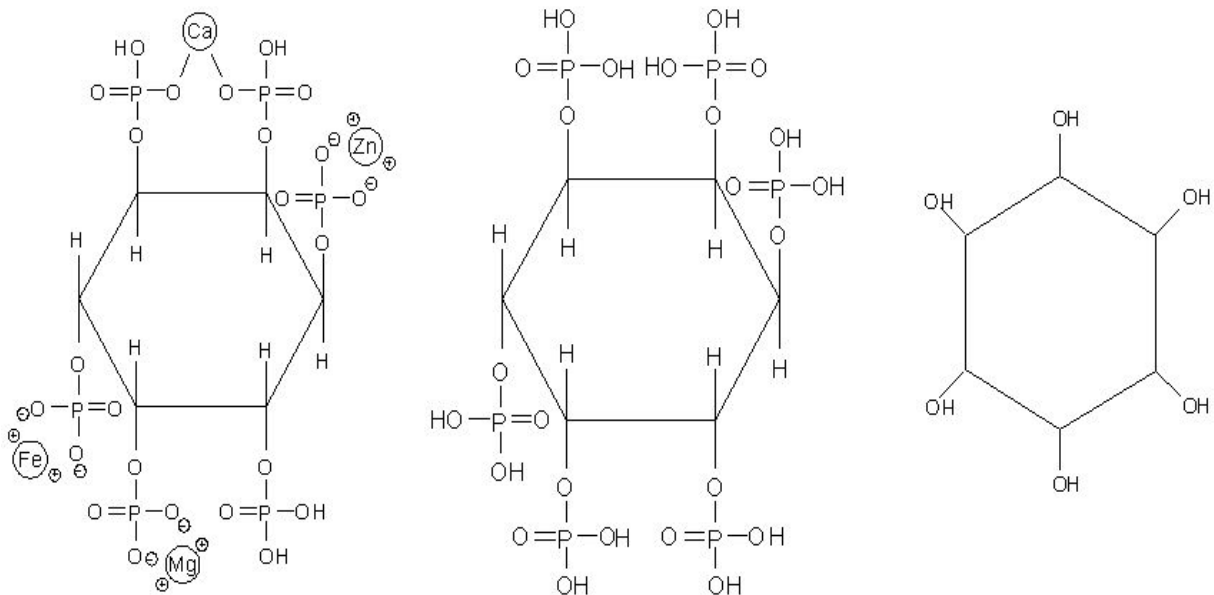


Fig. 2-16. Chemical structures of phytin, phytic acid and inositol.



## 6. 수용성 쌀단백질 SRP70의 안전성 평가

- 수용성 쌀단백질의 효능평가를 실시하였다. 주요 평가로 수용성 쌀단백질의 안전성 평가, *in vivo* 및 *in vitro* 실험이 진행되었다.
- 수용성 쌀단백질 SRP70 335 mg/kg/day을 랫트(체중 220 g 전후)에게 4주간 경구투여하였다. 그 결과, 사망 또는 체중변동 등의 이상(대조군과 비교)이 관찰되지 않았고, 시험완료 후 실시한 부검에 있어서도 내장의 육안적 이상이 관찰되지 않았다. 따라서 SRP70의 랫트에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 335 mg/kg 이상임이 확인되었다.
- 수용성 쌀단백질 SRP70 670 mg/kg/day을 랫트(체중 220 g 전후)에게 4주간 경구투여하였다. 그 결과, 사망 또는 체중변동 등의 이상(대조군과 비교)이 관찰되지 않았고, 시험완료 후 실시한 부검에 있어서도 내장의 육안적 이상이 관찰되지 않았다. 따라서 SRP70의 랫트에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 670 mg/kg 이상임이 확인되었다.
- 수용성 쌀단백질 SRP70 2,000 mg/kg/day을 랫트(체중 220 g 전후)에게 5일간 경구투여하였다. 그 결과, 사망 또는 체중변동 등의 이상(대조군과 비교)이 관찰되지 않았고, 시험완료 후 실시한 부검에 있어서도 내장의 육안적 이상이 관찰되지 않았다. 따라서 SRP70의 랫트에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 2,000 mg/kg 이상임이 확인되었다.

## 7. 수용성 쌀단백질 SRP70의 간보호 효과

### 가. 실험방법

#### (1) Hepatocyte primary cultured cell을 이용한 간세포 보호 활성 측정

##### (가) 실험동물 및 전처리

- 본 실험에서는 대한 바이오링크(주)로부터 구입한 7주령의 Sprague-Dawley 흰쥐(Rat)를 사용하였다. 1주일간 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것 중 220±5 g의 것을 시험에 공시하였다. 실험동물은 사육케이지(42×28 cm)을 이용해 실험실 온도 22-24℃, 습도 60±5%가 유지되며 밤낮 주기(12시간 light/12시간 dark)가 자동 조절 장치에 의해 조절되는 동물실에서 사육하였으며 동물실험 윤리위원회 승인을 받은 후(승인번호 KUACUC KUIACUC-2010-141) '실험동물 관리 및 이용에 관한 지침(Guide for the care and use of

Laboratory Animals, NRC)'에 맞추어 관리하면서 실시하였다.

#### (나) Tissue culture well plate의 표면처리

- 간세포를 배양하기 위하여 collagen을 glacial acetic acid : 3차 증류수 = 1 : 1000의 용액에 10 mg/100 mL의 농도로 용해시켜 tissue culture well plate에 고루 분주하여 clean bench에 UV lamp와 fan을 켜 놓고 tissue culture well plate의 뚜껑을 열어둔 채 12시간 건조시킨다. 사용하기 전에 멸균된 PBS로 세척하여 사용한다.

#### (다) 간세포 분리

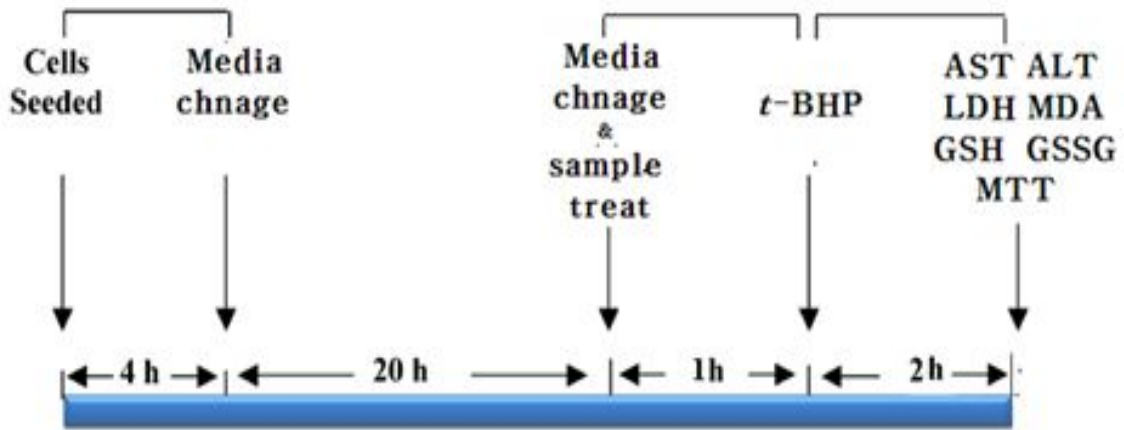
- 7주된 수컷 Sprague-Dawley rats, 220±5 g을 사용하여 two-step collagenase perfusion을 실시하였다. 먼저 쥐를 마취제(zoletil : rumpun : PBS = 1 : 3 : 6)를 투여하여 마취시켜 복부 중앙을 절개하여 23 gauge 나비바늘을 간문맥에 삽입한 후 Hank's 1 solution을 20 mL/min의 속도로 10분간 관류한 뒤 Hank's 2 solution로 교체하여 간 표면이 터지지 않도록 조심하면서 10 mL/min의 속도로 15분간 관류하였다. 관류액의 온도는 37°C로 유지하였으며, 산소를 지속적으로 공급하였다.
- 관류가 끝나면 간을 떼내어 세척한 후 iron mesh로 여과시킨 후, 500 rpm에서 2분간 원심분리로 2회 세척하였다. 여기서 얻은 간세포에 percol용액(percol 22.5 mL+ Hanks' stock solution 10× 2.5 mL)을 넣어 gently하게 섞어준 후 50×g에서 10분간 원심분리 하여 cell을 분리한 후 700 rpm에서 5분간 원심분리로 세척하였다. 여기에서 얻은 분리 Trypan blue 염색으로 획득 세포 수 및 세포생존율을 산정하였다.

#### (라) 배양조건

- 간세포 배양은 5% FBS 및 1%항생제, 0.2 M insulin, 1% dexamethason이 포함된 Complete William's Medium E배지에 세포농도  $2 \times 10^5$  cell/mL로 만들어, collagen coating된 tissue culture well plate 중에 24 well plate에 1 mL, 35 mm well plate에 3 mL, 60 mm well plate에 5 mL을 분주하여 각각  $2 \times 10^5$  cell,  $6 \times 10^5$  cell,  $1 \times 10^6$  cell이 되게 한 다음 CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air)에서 배양을 시작하였다. 4시간 후 tissue culture well plate를 기울여 배지를 제거하고 다시 새로운 배지를 동량 첨가하였다.

(마) 시료의 처리

- 다음 날 cell의 상태를 관찰한 뒤 다시 새로운 배지를 첨가하고 시료를 1% 첨가하여 잘 섞어 CO<sub>2</sub> incubator에 1시간 방치 후 일부는 50 μM *t*-BHP, 일부는 50 mM galactosamine을 첨가하였다. 24 well plate는 MTT, 35 mm tissue culture well는 AST, ALT, LDH, MDA, 60 mm tissue culture well는 GSH & GSSG 측정에 사용하였다.



<Morphology of hepatocyte in the epatocyte primary cultured cell>

(바) 세포독성도 조사 (MTT)

- *t*-BHP를 처리한지 2시간이 지난 후, galactosamine은 24시간 후에 배지를 제거한 뒤에 MTT시약(5 mg/mL in water)과 William's E 배지를 200 : 40으로 혼합하여 well당 240uL씩 분주하여 37°C incubator에서 암소 하에 방치한다. 3시간 뒤에 20% SDS(in 0.02 M HCl)를 well당 200 μL씩 분주 한 후 37°C incubator에서 암소 하에 20시간 방치한 후에 540 nm에서 측정하였다.

(사) 측정

- 배지는 혈액 자동분석기인 FUJI DRI-CHEM 3500(Fuji Photo Film Co., Osaka, Japan)을 이용하여 AST, ALT, LDH를 측정하였다.

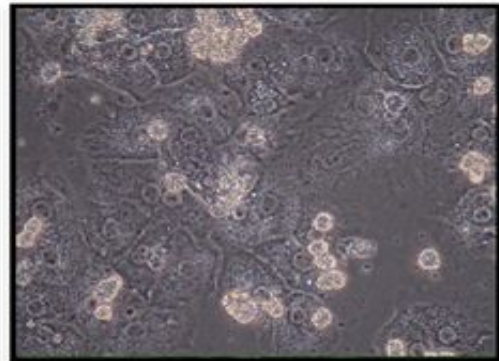
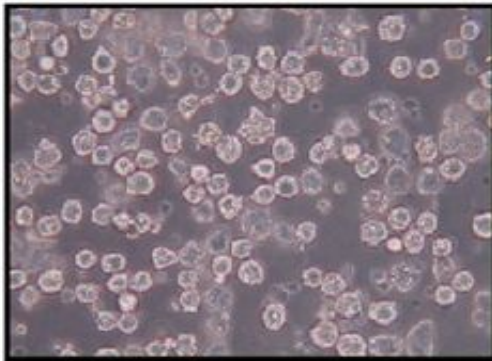
## Setting



## Isolation



## Morphology



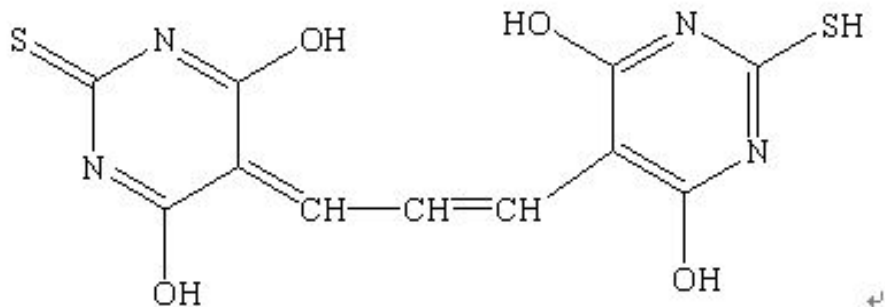
Morphological characteristics of hepatocyte on the primary culture endothelial of 0 hours (A), 24 hours (B) after seeding ( $\times 40$ ).

## (아) Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)

- 이 방법은 지방의 산패가 진행됨에 따라 생성되는 carbonyl 화합물 중 malonaldehyde의 생성에 근거를 둔 것으로서 malonaldehyde는 두 분자의 thiobarbituric acid와 한 분자의 malonaldehyde가 반응하여 적자색의 복합체를 형성한다.

(자) The structure of TBA malonaldehyde complex.

- 2시간 배양 후 상등액은 측정시까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. Cell은 0.2% Triton X-100을 처리하고 TCA(trichloroacetic acid) buffer(0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5 mL을 첨가하여 상등액과 배양액을 합쳐서  $95^{\circ}\text{C}$ 수조에서 30분 동안 반응한 후 상온으로 식혀서 n-butanol을 넣고 격렬히 흔들어 주었다.
- 원심분리(800 rpm, 10 min) 후 상층액은 excitation 515 nm와 emission 552 nm에서 형광분석기를 이용하여 측정하였다. Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)는 1,1,3,3-tetraethoxypropane(TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde(MDA) equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도( $\mu\text{M}$ )로 표기하였다.



(2) 동물실험 1. (Subacute toxicity)

(가) 실험동물

- 본 실험에서는 대한 바이오링크(주)로부터 구입한 7 주령의 Sprague-Dawley 흰쥐(Rat)를 사용하였다. 1 주일간 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것 중  $220 \pm 5$  g의 것을 시험에 공시하였다. 실험동물은 사육케이지(42×28 cm)을 이용해 실험실 온도  $22-24^{\circ}\text{C}$ , 습도  $60 \pm 5\%$ 가 유지되며 밤낮 주기(12 시간 light/12 시간 dark)가 자동 조절 장치에 의해 조절되는 동물실에서 사육하였으며 '실험동물 관리 및 이용에 관한 지침(Guide for the care and use of Laboratory Animals, NRC)'에 맞추어 관리하면서 실시하였다.

#### (나) 시료처리 및 연구 group

- 연구 그룹은 무작위 추출법에 의해 군당 4 마리씩 4개군으로 분류하였다. 실험대조 군은 실험 군과 동일한 스트레스를 주기 위해 생리식염수를 경구 투여한 대조군, 생리식염수 투여 후 시료를 0.5 g/kg, 1.0 g/kg, 2.0 g/kg 농도로 투여한 군으로 분류하였다.

#### (다) 투여방법 및 투여기간

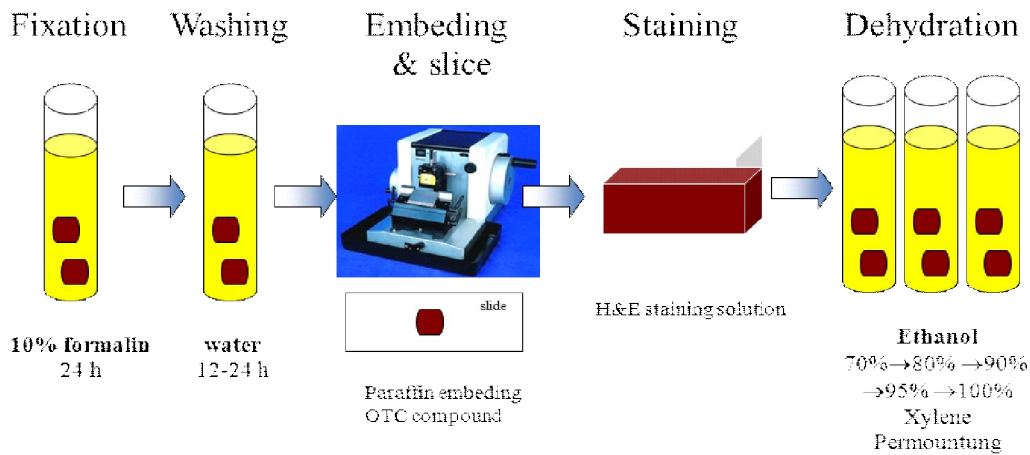
- 시험 물질은 임상적용경로를 따라 경구로 투여하였으며, 투여기간은 1일 1회 5일 동안 반복 투여하였다. 각 개체가 해당하는 군의 평균 체중 기준으로 그 군에 해당하는 용량에 맞게 생리식염수에 시험물질을 용해시켜 마리당 1 ml/day로 경구 투여하였다.

#### (라) 혈액생화학 및 혈액학적 검사

- 1일 1회 5일 동안 생리식염수를 경구 투여한 대조군, 생리식염수 투여 후 시료를 0.5 g/kg, 1.0 g/kg, 2.0 g/kg 농도로 각각 투여한 군의 실험동물을 12 시간 절식시켜 ethyl ether로 마취하여 희생시킨 후 흉강을 열고 대동맥에서 혈액을 채취하여 일부를 EDTA가 처리된 채혈관에 넣고 Mixing하여 혈액응고를 방지한 뒤 녹십자의료재단 임상연구팀에 total protein(T.Protein), albumin, ALP(alkaline phosphatase), AST(aspartate transaminase), ALT(alanine aminotransferase), LDH(Lactate dehydrogenase), total cholesterol(T.Chol), glucose, 적혈구 수(RBC, red blood cell count), 백혈구 수(WBC, white blood cell count), 헤마토크리트치(Hct, hematocrit), 혈색소량(Hb, hemoglobin concentration), 평균적혈구용적(MCV, mean corpuscular volume), mean corpuscular hemoglobin, 평균적혈구혈색소농도(MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), 혈소판(PLT, platelet) 외 16 항목을 측정 의뢰하였다.

#### (마) 조직 병리학적 검사

- 실험 종료 시점에서 12 시간 절식시킨 실험 동물을 ethyl ether로 마취시켜 희생시킨 후 흉강을 열고 혈액 채취 후 간, 신장 적출하여 무게를 측정하였다. 측정이 끝난 간과 신장은 포르말데하이드 용액에 넣어 고정한 뒤 다음날 새로운 포르말데하이드로 교환하여 충분히 고정시킨 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매, 박절하였다. 간의 경우에는 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을 하여 조직을 관찰하였으며 신장의 경우에는 periodic acid 염색(PAS)을 하여 조직을 검사하였다.



<Control process for histological examination>

(3) 동물실험 2. (Hepatoprotective activity)

(가) 실험동물

- 본 실험에서는 대한 바이오링크(주)로부터 구입한 8 주령의 ICR mouse를 사용하였다. 1 주 일간 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것 중  $32 \pm 2$  g의 것을 시험에 공시하였다. 실험동물은 사육케이지(20×26×13 cm)를 이용해 실험실 온도 22-24℃, 습도 60±5%가 유지되며 밤낮 주기(12 시간 light/12 시간 dark)가 자동 조절 장치에 의해 조절되는 동물실에서 사육하였으며 '실험동물 관리 및 이용에 관한 지침(Guide for the care and use of Laboratory Animals, NRC)'에 맞추어 관리하면서 실시하였다.

(나) 시료 및 연구 group

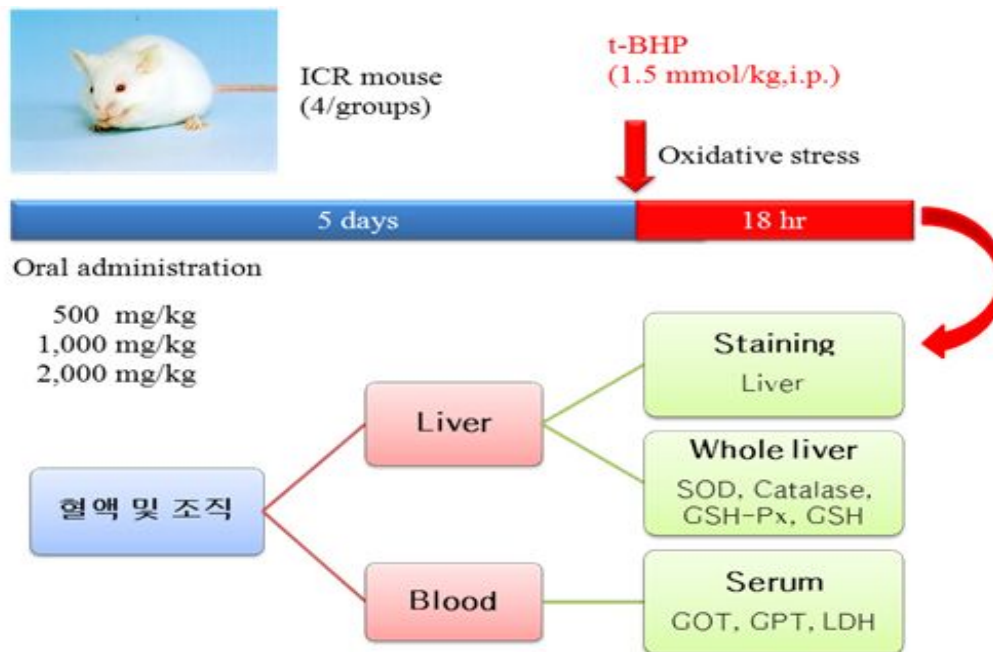
- SRP70 + *tert*-butylhydroperoxide(*t*-BHP)

- 연구 그룹은 무작위 추출법에 의해 군당 4 마리씩 5 개군으로 분류하였다. 실험대조 군은 실험 군과 동일한 스트레스를 주기 위해 생리식염수를 경구 투여한 대조군, 생리식염수 투여 후 *t*-BHP를 투여한 군, 시료를 0.5 g/kg농도로 투여한 뒤 *t*-BHP 를 투여한 군, 시료를 1.0 g/kg농도로 투여한 뒤 *t*-BHP 를 투여한 군, 시료를 2.0 g/kg 농도로 투여한 뒤 *t*-BHP 를 투여한 군으로 분류하였다.

### (다) 투여방법 및 투여기간

- 시험 물질은 임상적용경로를 따라 경구로 투여하였으며, 투여기간은 1일 1회 5일 동안 반복 투여하였다. 각 개체가 해당하는 군의 평균 체중 기준으로 그 군에 해당하는 용량에 맞게 생리식염수에 시험물질을 용해시켜 마리당 1 ml/day로 경구 투여하였다.

### (라) 동물실험의 모식도



### - 혈액채취 및 장기적출

### (마) 혈액생화학적 검사

- t-BHP를 투여한지 18 시간 뒤에 실험을 진행하였다. 실험 종료 시점에서 12 시간 절식시킨 실험 동물을 ethyl ether로 마취시켜 희생시킨 후, 흉강을 열고 대동맥에서 혈액을 채취하여 일부를 시험관에 넣어 30 분 뒤 4°C, 3,000×g에서 10 분간 원심분리하여 상등액인 혈청을 분리하여 FUJI DRI-CHEM 3500i(Fuji Photo Film Co., Osaka, Japan)로AST, ALT, LDH 를 분석하였다.



## (바) 조직 병리학적 검사

- *t*-BHP를 투여한지 18 시간 뒤에 실험을 진행하였다. 실험 종료 시점에서 12 시간 절식시킨 실험 동물을 ethyl ether로 마취시켜 희생시킨 후, 흉강을 열고 혈액 채취 후 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 측정이 끝난 간은 10% 포르말데하이드 용액에 넣어 고정한 뒤 다음날 새로운 포르말데하이드로 교환하여 충분히 고정시킨 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매, 박절하였다. 이러한 과정으로 처리한 간은 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

## - 효소원 조제 및 효소활성도의 분석

### (사) 효소원의 조제

- 실험동물을 ethyl ether로 마취시켜 복부 대동맥으로부터 채혈 직후 생리식염수로 간을 관류한 다음 적출한 간은 간 1 g 당 5 ml의 50 mM potassium phosphate(pH 7.0, containig 1 mM EDTA) 용액으로 마쇄하여 간 균질액을 만들었다. 이 간 균질액을 원심분리(4°C, 10,000×g, 15 min)하여 상등액으로 효소원을 조제하였다.

### (아) Catalase

- 효소원 20  $\mu$ l에 1 M Tris-HCl(pH 8.0) 50  $\mu$ l, 5 mM EDTA 100  $\mu$ l, 3차 증류수 810  $\mu$ l을 가한 뒤 37°C 항온수조에서 1 분간 정치하였다. 반응액에 450 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20  $\mu$ l을 혼합하여 240 nm에서 10 분간 1 분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 효소활성도는 molar extinction coefficient(43.6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)를 사용하여 unit/mg protein(1 unit = 1  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degraded for a minute)으로 표현하였다.

### (자) Glutathione Peroxidase

- 효소원 20  $\mu$ l에 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 50  $\mu$ l, 0.1 M EDTA 20  $\mu$ l, GSH reductase(10 units/ml) 100  $\mu$ l, 1 mM NADPH 150  $\mu$ l, 3차 증류수 640  $\mu$ l을 가한 뒤 37°C 항온수조에서 1분간 정치하였다. 반응액에 3.5 mM cumene hydroperoxide 20  $\mu$ l을 혼합하여 340 nm에서 10 분간 1 분 간격으로 흡광도를 측정하여 NADPH의 산화를 관찰하였다.
- '효소활성도는 molar extinction coefficient 43.6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>(6.22M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)를 사용하여 unit/mg protein(1 unit = 1  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degraded for a minute)으로 표현하였다. Glutathione

peroxidase의 활성이 좋을수록 NADPH의 소비로 인해 340 nm에서의 흡광도 값이 낮아진다.

#### (차) Glutathione

- 효소원 100  $\mu$ l에 0.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 를 800  $\mu$ l를 가한 뒤 0.04% DTNB(in 0.1% sodium citrate)를 100  $\mu$ l를 가하여 5 분 동안 반응 시킨 뒤 412 nm에서 측정하였다.

#### 나. 실험의 결과

##### (1) Hepatocyte primary cultured cell을 이용한 간세포 보호 활성 측정

##### (가) Hepatocyte primary cultured cell을 이용한 시료의 독성 측정

- MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium 염이 살아있는 세포의 미토콘드리아 succinate dehydrogenase에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리를 이용한 실험 방법으로 formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것으로 미토콘드리아 활성의 지표로 사용되고 있다.
- MTT는 세포 독성도 조사로 시험물질에 어느 정도 독성을 나타내는지 미토콘드리아의 활성을 측정하는 실험으로 시험물질이 독성이 있어 미토콘드리아가 파괴되면 흡광도 값이 낮게 나타난다. 일차배양 한 간세포에 시료(10~1000  $\mu$ g/ml) 처리한 경우에는 처리농도 내에서는 시료를 처리하지 않은 세포 비교하였을 때 독성이 없었다(Fig. 2-17).

##### (나) Hepatocyte primary cultured cell을 이용한 시료의 간보호 효능 측정

- 간세포에 1.5 mM의 t-BHP를 처리하였을 경우 세포 생존율이 82.9%로 낮아졌으나 BHP와 시료를 동시에 처리하였을 경우 50  $\mu$ g/ml 부터 간보호 활성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었으며 250  $\mu$ g/ml 의 경우 정상군과 동일한 세포 생존율을 가지고 있었다(Fig. 2-18).

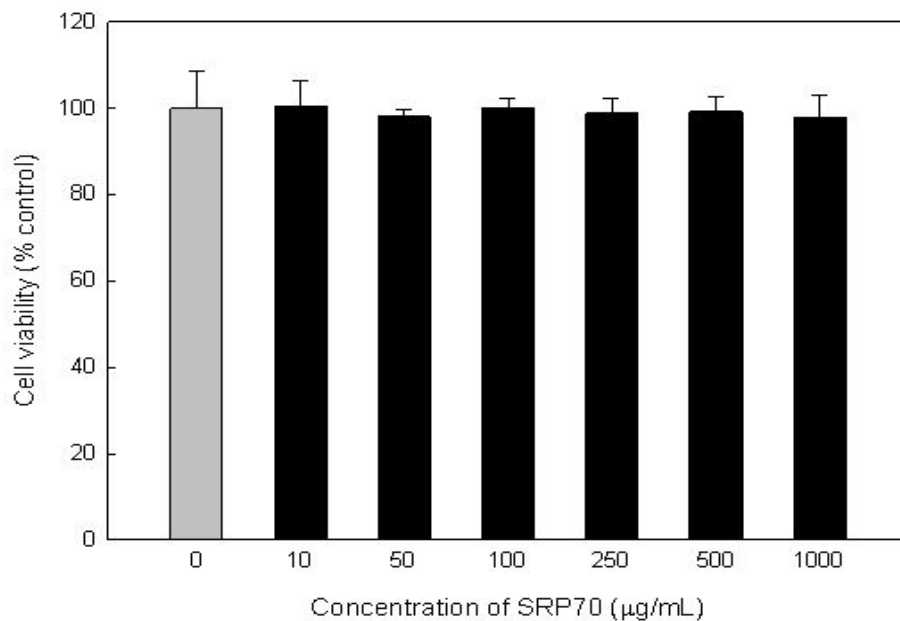


Fig. 2-17. Toxicity of sample.

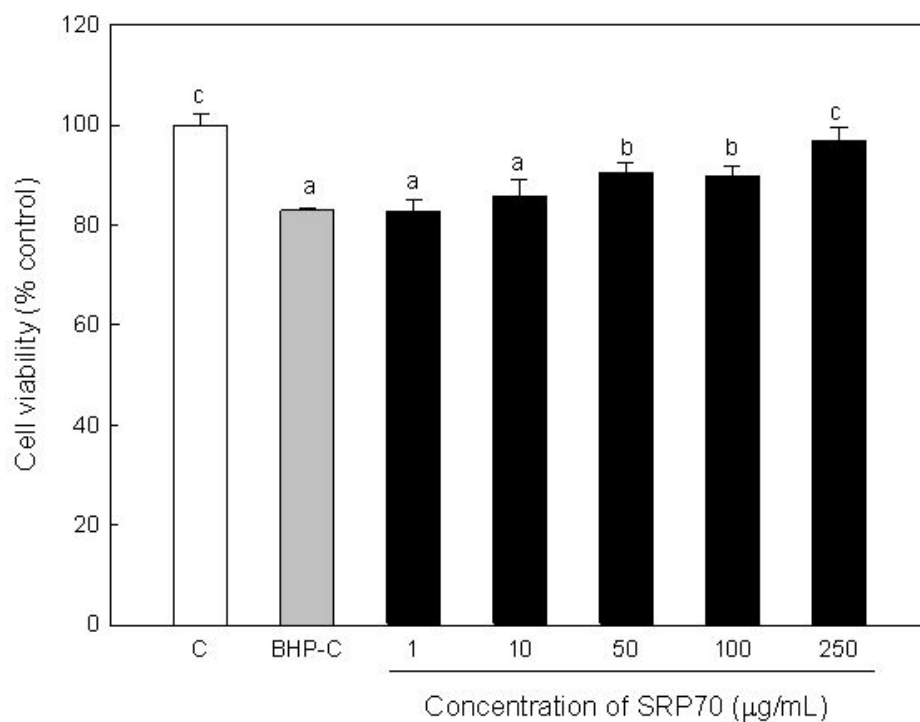


Fig. 2-18. Protection vitality for liver cell which is the damage induced by T-BHP.

(다) AST & APT

- AST는 간세포의 손상이나 피사 시에 증가하는 간세포성 누출효소이며 APT는 세포질과 미토콘드리아 내에 존재하는 효소로 간이나 근육의 중증 세포 손상 시에 증가하게 된다. 간세포에 시료를 처리하고 *t*-BHP를 처리한 배지를 사용하여 측정한 결과 시료는 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 간보호 효과가 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 2-19).

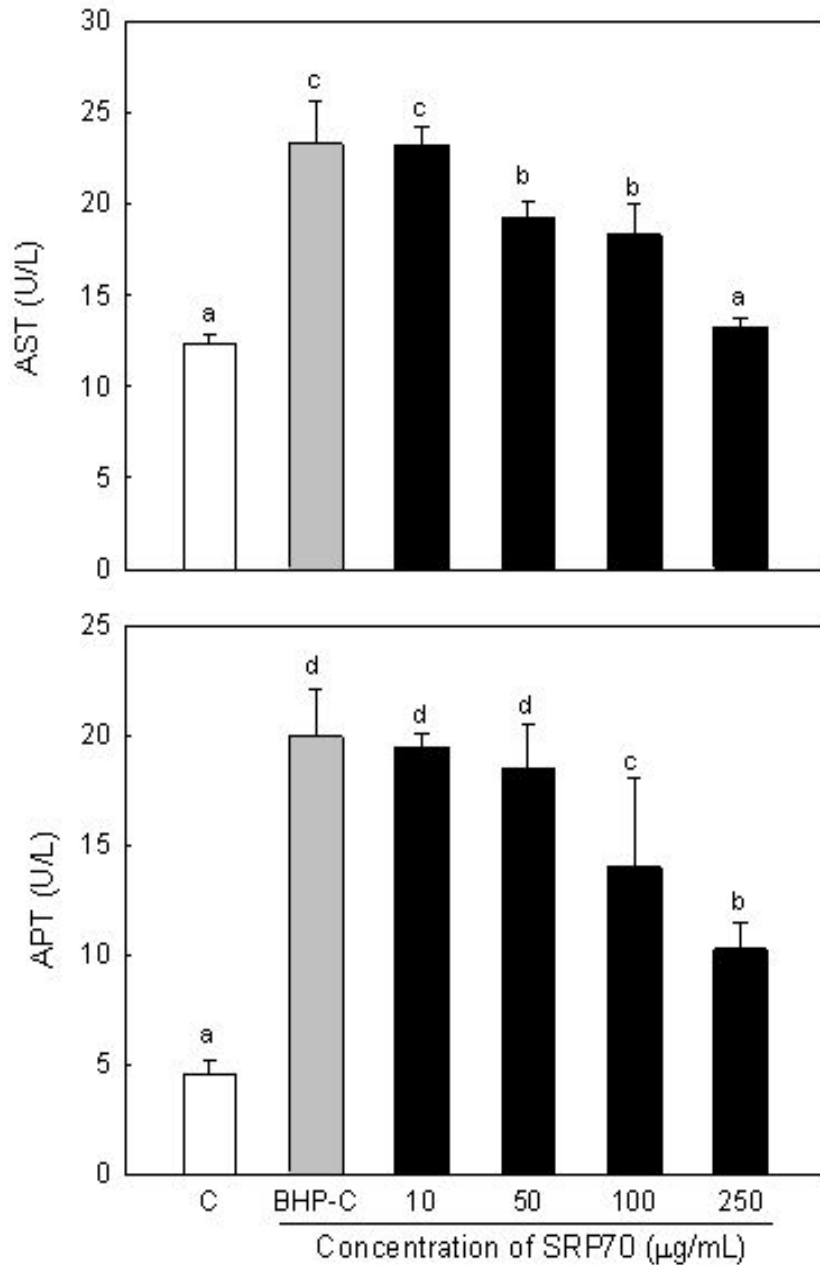


Fig. 2-19. The AST and APT level of the sample for liver cell which is the damage induced by T-BHP.

(라) LDH

- LDH는 해당 계 효소로서 체내의 각 조직에 널리 분포되어있다. 특히, 심장, 간장, 신장 및 근육에 존재하며 혈청 중 LDH는 심 질환, 간질환 악성종양 및 백혈병 등에서 증가하나 특이성이 낮다. 간세포에 SRP70을 처리하고 *t*-BHP를 처리한 배지를 사용하여 측정된 결과 시료는 50  $\mu\text{g/ml}$  의 농도에서부터 간보호 효과가 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 2-20).

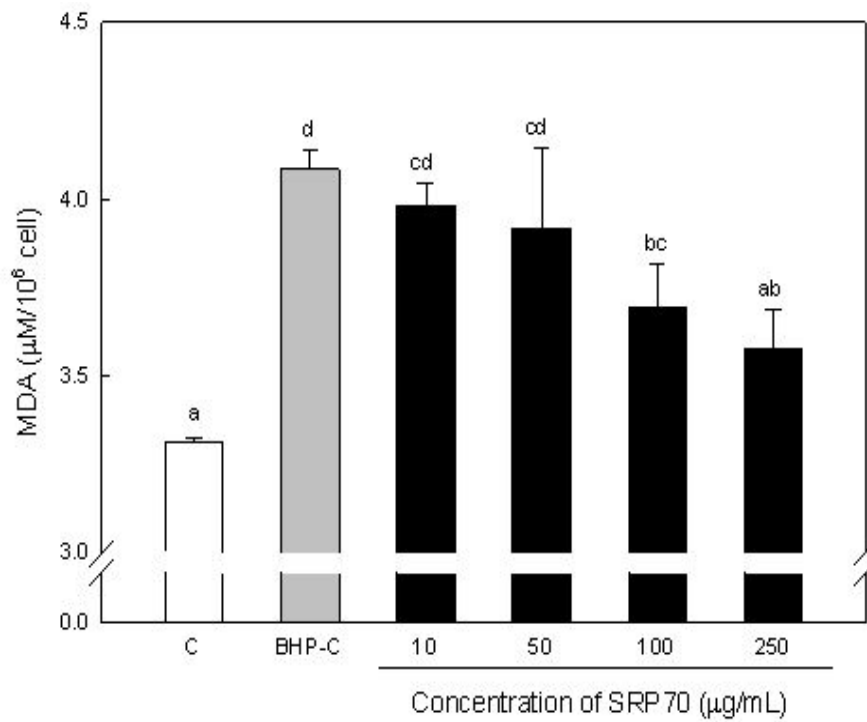


Fig. 2-20. The LDH level of the sample for liver cell which is the damage induced by T-BHP.

(마) MDA

- MDA는 free radical에 의한 세포막의 다중불포화 지방산과 지단백에서 유리기와 연쇄 반응한 부산물로서 과산화지질 반응의 지표로 이용된다. SRP70을 처리한 세포는 *t*-BHP만 처리한 세포와 비교하였을 때 SRP70 농도가 증가함에 따라 MDA 수치가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2-21).

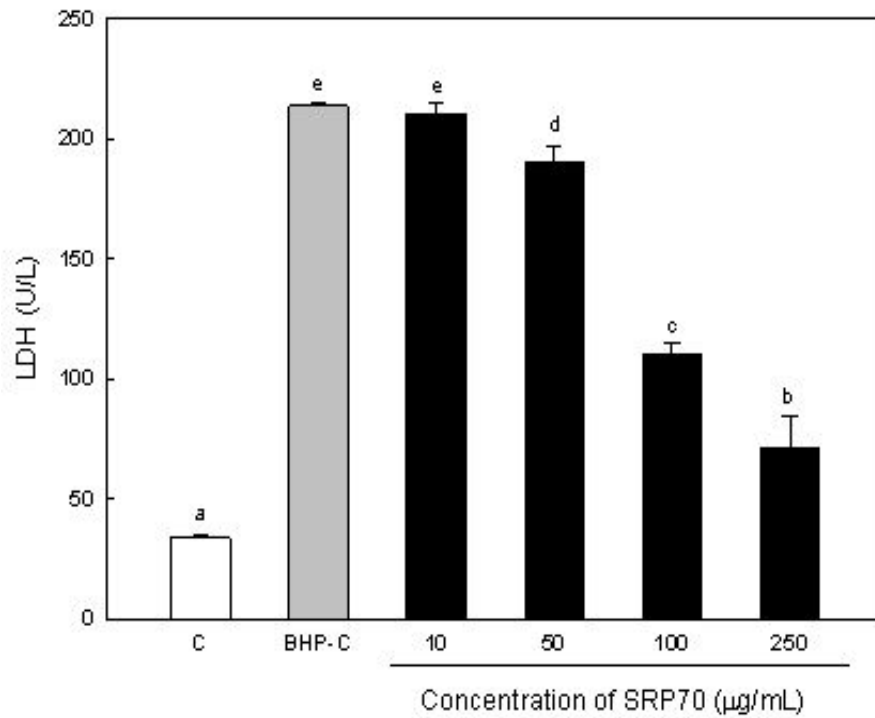


Fig. 2-21. The MDA level of the sample for liver cell which is the damage induced by T-BHP.

(2) 동물실험(Subacute toxicity)

(가) 혈액생화학적 검사

- SRP70 시료를 투여한 군의 혈액 생화학적 검사결과 T. Protein, Albumin, AST, ALT, LDH, T. Chol, Glucose를 측정한 결과 대조군에 비교하였을 때 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났으며, ALP의 경우 SRP70을 투여한 군이 대조군에 비하여 값이 높아 졌으나 농도가 높아질수록 그 수치가 감소하는 것으로 나타났다. 특히 간 장애와 관련이 깊은 AST, ALT, T. Chol 을 보았을 때 대조군과 유의적인 차이가 없었다(Table 2-16).

Table 2-16. Blood-biochemical test results of SRP70 administration group

Item <sup>Ⓢ</sup>	SRP70(g/kg) <sup>Ⓢ</sup>			
	Vehicle <sup>Ⓢ</sup>	0.5 <sup>Ⓢ</sup>	1 <sup>Ⓢ</sup>	2 <sup>Ⓢ</sup>
T. Protein(g/dL) <sup>Ⓢ</sup>	5.8 ± 0.2 <sup>Ⓢ</sup>	5.7 ± 0.2 <sup>Ⓢ</sup>	5.6 ± 0.3 <sup>Ⓢ</sup>	5.7 ± 0.2 <sup>Ⓢ</sup>
Albumin(g/dL) <sup>Ⓢ</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>Ⓢ</sup>	3.9 ± 0.1 <sup>Ⓢ</sup>	3.8 ± 0.2 <sup>Ⓢ</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>Ⓢ</sup>
ALP(U/L) <sup>Ⓢ</sup>	225.5 ± 7.8 <sup>Ⓢ</sup>	252.0 ± 15.7 <sup>Ⓢ</sup>	256.8 ± 47.4 <sup>Ⓢ</sup>	229.8 ± 31.1 <sup>Ⓢ</sup>
AST(U/L) <sup>Ⓢ</sup>	144.7 ± 9.7 <sup>Ⓢ</sup>	130.0 ± 23.3 <sup>Ⓢ</sup>	135.8 ± 24.7 <sup>Ⓢ</sup>	134.0 ± 35.4 <sup>Ⓢ</sup>
ALT(U/L) <sup>Ⓢ</sup>	34.5 ± 1.7 <sup>Ⓢ</sup>	32.8 ± 1.0 <sup>Ⓢ</sup>	32.5 ± 3.3 <sup>Ⓢ</sup>	33.3 ± 5.1 <sup>Ⓢ</sup>
LDH(U/L) <sup>Ⓢ</sup>	2410.0 ± 0.0 <sup>Ⓢ</sup>	2160.3 ± 328.2 <sup>Ⓢ</sup>	2262.0 ± 383.3 <sup>Ⓢ</sup>	2255.3 ± 102.9 <sup>Ⓢ</sup>
T. Chol(mg/dL) <sup>Ⓢ</sup>	83.8 ± 11.5 <sup>Ⓢ</sup>	82.0 ± 7.2 <sup>Ⓢ</sup>	79.8 ± 9.8 <sup>Ⓢ</sup>	79.8 ± 7.1 <sup>Ⓢ</sup>
Glucose(g/dL) <sup>Ⓢ</sup>	181.3 ± 12.7 <sup>Ⓢ</sup>	204.5 ± 19.1 <sup>Ⓢ</sup>	171.0 ± 14.1 <sup>Ⓢ</sup>	174.3 ± 17.1 <sup>Ⓢ</sup>

(나) 혈액학적 검사

- SRP70 시료를 투여한 군의 혈액학적 검사결과 RBC, Hb, Hct, MCV, MCHC 수치에는 생리식염수만 투여한 대조군과 비교하였을 유의적인 차이가 없었고, WBC는 증가하는 경향을 보였으며, PLT 수치의 경우 2.0 g/kg에서 증가하였다(Table. 2-17).

Table 2-17. Blood-biochemical test results of SRP70 administration group

Item <sup>Ⓢ</sup>	SRP70(g/kg) <sup>Ⓢ</sup>			
	Vehicle <sup>Ⓢ</sup>	0.5 <sup>Ⓢ</sup>	1 <sup>Ⓢ</sup>	2 <sup>Ⓢ</sup>
T. Protein(g/dL) <sup>Ⓢ</sup>	5.8 ± 0.2 <sup>Ⓢ</sup>	5.7 ± 0.2 <sup>Ⓢ</sup>	5.6 ± 0.3 <sup>Ⓢ</sup>	5.7 ± 0.2 <sup>Ⓢ</sup>
Albumin(g/dL) <sup>Ⓢ</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>Ⓢ</sup>	3.9 ± 0.1 <sup>Ⓢ</sup>	3.8 ± 0.2 <sup>Ⓢ</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>Ⓢ</sup>
ALP(U/L) <sup>Ⓢ</sup>	225.5 ± 7.8 <sup>Ⓢ</sup>	252.0 ± 15.7 <sup>Ⓢ</sup>	256.8 ± 47.4 <sup>Ⓢ</sup>	229.8 ± 31.1 <sup>Ⓢ</sup>
AST(U/L) <sup>Ⓢ</sup>	144.7 ± 9.7 <sup>Ⓢ</sup>	130.0 ± 23.3 <sup>Ⓢ</sup>	135.8 ± 24.7 <sup>Ⓢ</sup>	134.0 ± 35.4 <sup>Ⓢ</sup>
ALT(U/L) <sup>Ⓢ</sup>	34.5 ± 1.7 <sup>Ⓢ</sup>	32.8 ± 1.0 <sup>Ⓢ</sup>	32.5 ± 3.3 <sup>Ⓢ</sup>	33.3 ± 5.1 <sup>Ⓢ</sup>
LDH(U/L) <sup>Ⓢ</sup>	2410.0 ± 0.0 <sup>Ⓢ</sup>	2160.3 ± 328.2 <sup>Ⓢ</sup>	2262.0 ± 383.3 <sup>Ⓢ</sup>	2255.3 ± 102.9 <sup>Ⓢ</sup>
T. Chol(mg/dL) <sup>Ⓢ</sup>	83.8 ± 11.5 <sup>Ⓢ</sup>	82.0 ± 7.2 <sup>Ⓢ</sup>	79.8 ± 9.8 <sup>Ⓢ</sup>	79.8 ± 7.1 <sup>Ⓢ</sup>
Glucose(g/dL) <sup>Ⓢ</sup>	181.3 ± 12.7 <sup>Ⓢ</sup>	204.5 ± 19.1 <sup>Ⓢ</sup>	171.0 ± 14.1 <sup>Ⓢ</sup>	174.3 ± 17.1 <sup>Ⓢ</sup>



(다) 조직 병리학적 검사

- 세포는 괴사가 일어나게 되면 미토콘드리아의 팽창, 핵의 축소, 세포 소기관 및 팽창에 의한 세포막의 파괴, 리보솜 및 리소좀의 용해 등이 일어난다. 또한 세포 내의 내용물이 세포 외로 유출되어, 염증을 일으켜 H&E 염색을 했을 시에 연분홍색을 띠고 세포간의 경계가 뚜렷하지 않게 관찰되는데 대조군과 SRP70을 투여한 군에서 간과 신장에서 세포질과 원형의 핵이 모두 뚜렷하며 간세포의 괴사나 염증세포의 침윤은 찾아 볼 수 없는 정상적인 간 조직(H&E 염색한 간(A-D)과 Periodic acid 염색한 신장(a-d)에서의 조직학적 검경)을 보였다(Fig. 2-22).

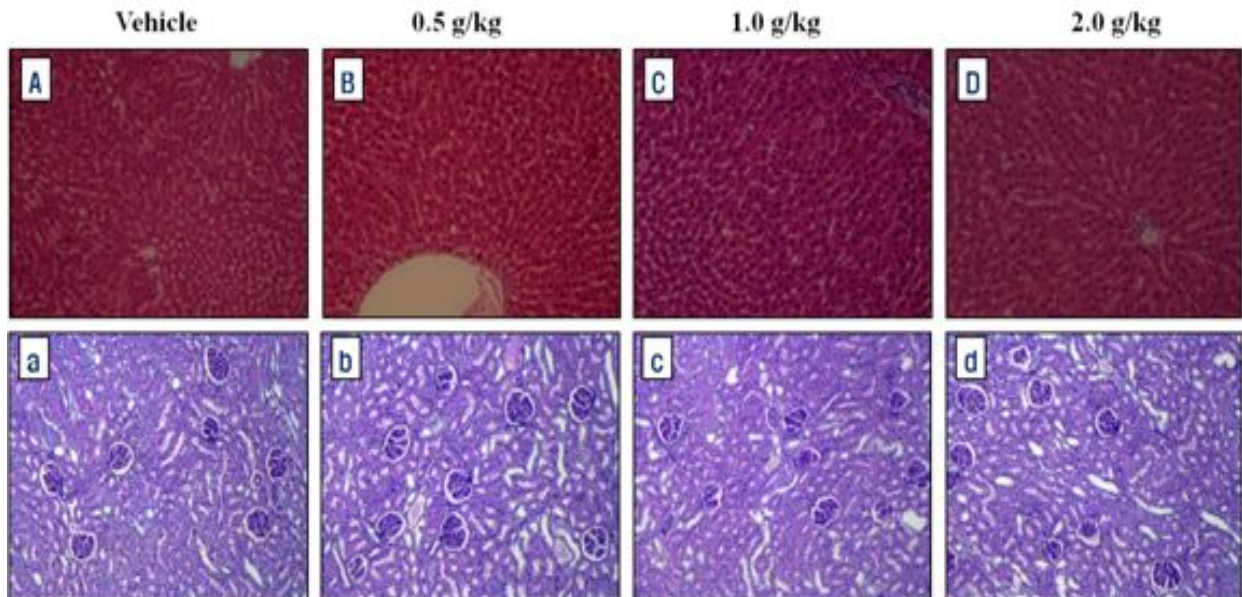


Fig. 2-22. The picture of the tissue speculum in liver and kidney of the SD rats.

### (3) 동물실험(Hepatoprotective activity)

#### (가) 혈액생화학적 검사

SRP70을 투여하고 t-BHP을 투여한 군의 혈액생화학적 검사결과는 아래의 Table에 나타내었다. 간 장애를 나타내는 지표인 ALT, AST, LDH 모두에서 유의적인 차이가 나타났다. ALT는 SRP70의 농도가 1.0 g/kg에서부터 t-BHP를 처리하지 않은 정상수준으로 낮아졌다. AST는 0.5, 1.0, 2.0 g/kg 모든 농도에서 정상수준으로 낮아졌으나 농도에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. LDH의 경우 시료의 농도가 0.5, 1.0, 2.0 g/kg 로 높아짐에 따라 1096.0, 996.5, 822.7(U/L)로 LDH 수치가 감소하였다(Table 2-18).

Table 2-18. Blood-biochemical test results after orally administration the SRP70 + t-BHP(1.5 mM/kg)

군	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)
N-control	32.0 ± 3.7 <sup>a</sup>	69.5 ± 11.5 <sup>a</sup>	705.05 ± 67.3 <sup>a</sup>
B-control	42.0 ± 3.5 <sup>b</sup>	148.0 ± 43.9 <sup>b</sup>	1739.3 ± 27.3 <sup>d</sup>
SRP 70(0.5 g/kg)	32.0 ± 3.7 <sup>b</sup>	69.5 ± 11.5 <sup>a</sup>	1096.0 ± 59.4 <sup>c</sup>
SRP 70(1.0 g/kg)	29.5 ± 3.4 <sup>a</sup>	52.0 ± 3.7 <sup>a</sup>	996.5 ± 148.1 <sup>bc</sup>
SRP 70(2.0 g/kg)	30.0 ± 4.0 <sup>a</sup>	48.0 ± 5.4 <sup>a</sup>	822.7 ± 138.1 <sup>ab</sup>

## (나) 조직 병리학적 검사

세포는 괴사가 일어나게 되면 미토콘드리아의 팽창, 핵의 축소, 세포 소기관의 파괴, 팽창에 의한 세포막의 파괴, 리보솜, 리소솜의 용해 등이 일어나며 세포 내의 내용물이 세포외로 유출되어, 염증을 일으켜 H&E 염색을 했을 시에 연분홍색을 띄고 세포간의 경계가 뚜렷하지 않게 관찰되는데 대조군과 SRP70 투여군에서 간과 신장에서 세포질과 원형의 핵이 모두 뚜렷하며 간세포의 괴사나 염증세포의 침윤은 찾아 볼 수 없는 정상적인 간 조직을 보였다.

생리식염수만 투여한 대조군과 2.0 g/kg 농도의 SRP70을 투여한 군의 간에서 괴사나 병변이 관찰되지 않았으나 *t*-BHP만 투여한 간 조직의 경우에는 혈관 주변으로 지방구 변성과 괴사가 관찰되어 주변과 비교하였을 때 밝은 색을 띄었으며 세포간의 경계가 뚜렷하지 않았다. 시료를 투여하고 *t*-BHP를 투여한 군에서는 시료의 투여 농도가 높아질수록 상태가 호전되어 대조군과 차이가 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 2-23).

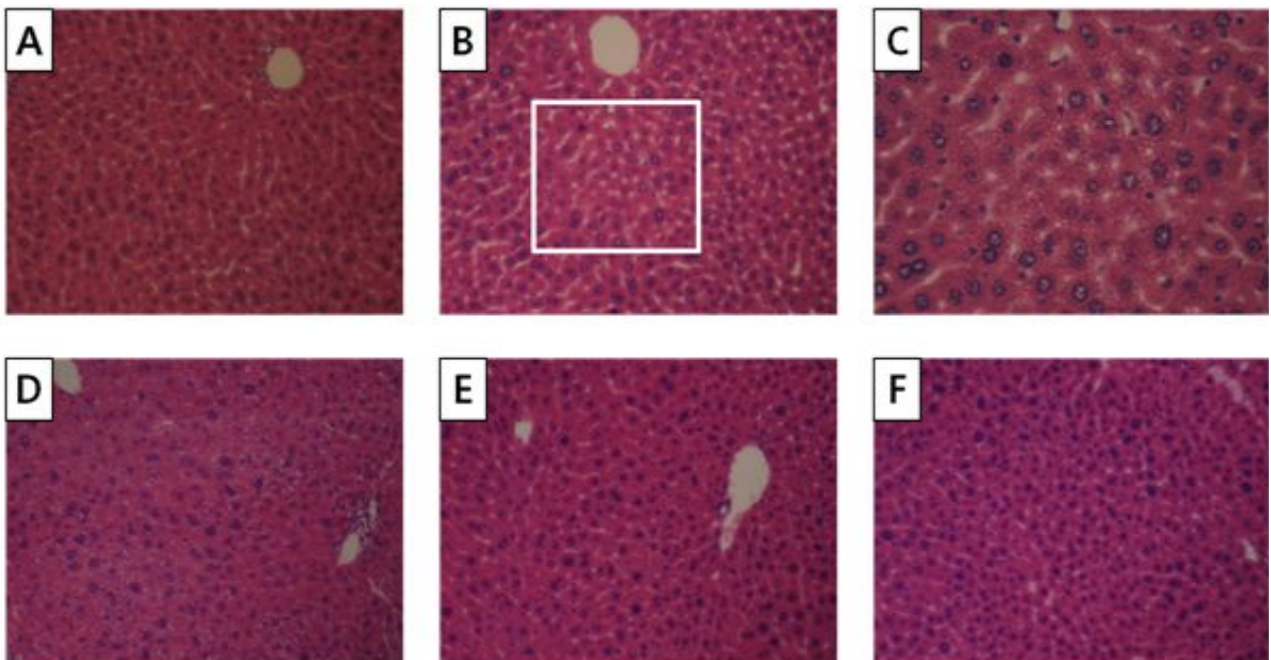


Fig. 2-23. Picture of the tissue speculum in liver of ICR mice orally administered by SRP70(H&E dyed liver(A-F)).

**A;** N-control('200), **B;**BHP-control('200), **C;**BHP-control('400),  
**D;** SRP 70 0.5 g/kg('200), **E;**SRP 701.0 g/kg('200), **F;**SRP 702.0 g/kg('200).

## (다) 효소활성도 측정

### ① Catalase

Catalase는 superoxide dismutase에 의해서 분해되어 생긴 과산화수소를 산소와 물로 분해하는 효소로서 세포를 방어하는 제2항산화제이다. Catalase의 활성은 최적 조건에서 1분당 기질인 과산화수소를 1  $\mu\text{M}$  변환시키는 양을 1단위로 나타내었다. Catalase 측정 결과(Table 2-19), SRP70을 투여한 후 *t*-BHP를 투여한 군이 *t*-BHP만 투여한 군(31.7 U/mg protein)과 비교하였을 때 시료의 투여농도 0.5, 1.0, 2.0 g/kg에서 77.8, 113.9, 118.4 U/mg protein으로 Catalase 활성이 나타났다.

### ② Glutathione peroxidase(GSH-Px)

- Glutathione peroxidase는 catalase와 같이 과산화수소를 산소와 물로 분해하는 효소이며, 또한 과산화지질을 분해하여 해독시키는 glutathione이라는 물질의 활동을 촉진하는 효소다. Glutathione peroxidase는 catalase가 먼저 과산화수소를 제거한 후에 제거하지 못한 나머지 과산화수소를 2차적으로 제거함으로써 항산화활성을 나타낸다. Glutathione peroxidase의 활성은 molar extinction coefficient 43.6  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (6.22  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 사용하여 unit/mg protein(1 unit = 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  degraded for a minute)으로 표현하였다.
- Glutathione peroxidase 활성을 측정한 결과(Table 4), SRP70을 투여한 후 *t*-BHP를 투여한 군이 *t*-BHP만 투여한 군(5.4 U/mg protein)과 비교하였을 때 시료의 투여농도 0.5, 1.0, 2.0 g/kg에서 normal control 수준으로 효소활성이 나타났으나, 농도 증가에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

### ③ Glutathione

- Glutathione(GSH)은 신체의 거의 모든 세포에 존재하고 간의 해독작용뿐만 아니라 많은 신진대사에 관여하는 물질이다. 특히 GSH는 전자친화성 기질을 GSH에 결합시키는 반응을 촉매하는 역할을 한다. GSH 측정 결과, SRP70을 투여한 후 *t*-BHP를 투여한 군이 *t*-BHP만 투여한 군(3.0 mM)과 비교하였을 때 시료의 투여농도 0.5, 1.0, 2.0 g/kg에서 모두 정상적인 간의 수치와 유사하거나 더 높은 수준으로 활성이 증가됨을 보였다(Table 2-19).

Table 2-19. Activity of Catalase, GSH-Px, GSH in liver of ICR mice

	Catalase <sup>Ⓢ</sup> (U/mg protein) <sup>Ⓢ</sup>	GSH-Px <sup>Ⓢ</sup> (U/mg protein) <sup>Ⓢ</sup>	GSH <sup>Ⓢ</sup> (mM/mg protein) <sup>Ⓢ</sup>
N-control <sup>Ⓢ</sup>	126.9 ± 32.0 <sup>aⓈ</sup>	7.8 ± 0.2 <sup>a Ⓢ</sup>	10.9 ± 3.2 <sup>aⓈ</sup>
B-control <sup>Ⓢ</sup>	31.7 ± 2.3 <sup>cⓈ</sup>	5.4 ± 0.4 <sup>bⓈ</sup>	3.0 ± 1.2 <sup>bⓈ</sup>
SRP 70(0.5 g/kg) <sup>Ⓢ</sup>	77.8 ± 27.2 <sup>bⓈ</sup>	7.5 ± 0.1 <sup>aⓈ</sup>	11.9 ± 2.2 <sup>aⓈ</sup>
SRP 70(1.0 g/kg) <sup>Ⓢ</sup>	113.9 ± 11.2 <sup>abⓈ</sup>	7.5 ± 0.1 <sup>aⓈ</sup>	13.4 ± 1.2 <sup>aⓈ</sup>
SRP 70(2.0 g/kg) <sup>Ⓢ</sup>	118.4 ± 26.0 <sup>abⓈ</sup>	7.7 ± 0.1 <sup>aⓈ</sup>	19.8 ± 0.1 <sup>aⓈ</sup>

\* B-control; Group that is the injected *t*-BHP 1.5 mM/kg before 18 hours of sacrifice after orally administration the saline solution for 5 days.

### 제 3 절 위탁 연구과제 : 수용성 쌀단백질의 효능평가

- 수용성 쌀단백질 SRP70의 운동능력 향상 및 운동 후 피로회복에 미치는 영향에 관한 실험을 진행하였다. 쌀단백질의 랫트의 운동능력 향상에 미치는 영향에 관한 시험은 국내 비임상 분야 민간 시험기관으로 GLP(Good Laboratory Practice) 인증기관인 (주)캠온에서 진행되었으며 랫트의 혈액 분석은 (의)녹십자의료재단을 통하여 진행하였다.

#### 1. 수용성 쌀단백질 SRP70의 4 주간 경구투여가 Sprague-Dawley 랫트의 운동능력 향상에 미치는 영향 시험

##### 가. 재료 및 방법

##### (1) 시험물질, 부형제, 양성대조물질 및 참조물질

- 시험물질: SRP70 (수용성 쌀단백질)
- 부형제: 멸균수
- 양성대조물질: BCAA
- 참조물질 I: ISP (분리대두단백)
- 참조물질 II: EYP (난황 펩타이드)
- 참조물질 III: JBP (주박 펩타이드)

##### (2) 투여시험물질 - 조제방법

- 시험물질 고용량투여군은 시험물질을 칭량하여 부형제에 현탁 조제하였다. 시험물질 중간용량 및 저용량투여군은 고용량투여군을 단계희석하여 조제하였다. 양성대조물질 및 참조물질은 칭량하여 부형제에 현탁 조제하였다.

### (3) 시험계 및 사육환경

#### (가) 시험계 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley®TMSD®TM	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)	
선정사유	본 시험에 사용하는 랫드는 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	
동물 수	입수시	96
	투여개시시	80
주령	입수시	7
	투여개시시	8
입수시 체중범위	177.69~204.90 g	
투여개시시 체중범위	228.18~251.57 g	
잔여동물의 처리	안락사 처리하였다.	

#### (나) 검역 및 순화

- 입수 후 8 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시키고, 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰하였다.

#### (다) 식별

- 동물은 순화기간에는 청색 유성 매직을 이용한 미부표식법을, 투여 및 관찰기간에는 피모색소 표식법을 사용하여 식별하였다. 사육상자에는 색으로 구별하는 개체식별카드를 부착하였고, 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

#### (라) 동물실험 윤리규정

- 경기바이오연구센터의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(접수번호: 2011-10-02).

## (마) 사육환경

### ① 환경조건 및 측정

- 동물은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 15\%$ , 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시 점등-오후 8시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 경기바이오센터 동물사육구역 5호실에서 사육하였다. 온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하였고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였다. 실험기간 동안 동물실의 온도 및 상대습도는 시험 결과에 영향을 줄만한 이상은 없었다.

### ② 사료, 물 및 오염물질 검사

- 실험에 공급된 랫드 사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(Harlan Laboratories Inc., USA. TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18% PROTEIN RODENT DIET, 2918C)를 코아텍으로부터(경기도 평택시 진위면 동천리 406) 공급받아 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사료의 성분분석성적서를 검토한 결과, 사료조성 및 오염물질에서 시험에 악영향을 줄만한 요인은 없었다. 물은 상수도수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후, 물병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 시험에 앞서 공인기관(경기도보건환경연구원, 경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에 의뢰하여 수질검사를 실시한 결과, 먹는물수질기준 '적합' 판정을 받았다.

### ③ 사육상자 및 사육밀도

- 스테인레스망 사육상자(W 215 × L 355 × H 200 mm)에서 검역 및 순화기간에는 5 마리 이하/사육상자로, 투여 및 관찰기간에는 2 마리 이하/사육상자로 사육하였다.



#### (4) 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

##### (가) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)	투여물질
G1	M	10	1-10	10	0	부형제
G2	M	10	11-20	10	67	시험물질
G3	M	10	21-30	10	335	시험물질
G4	M	10	31-40	10	670	시험물질
G5	M	10	41-50	10	268	BCAA
G6	M	10	51-60	10	335	ISP
G7	M	10	61-70	10	385.25	EYP
G8	M	10	71-80	10	335	JBP

G1: 부형제대조군

G2-G4: 시험물질투여군

G5: 양성대조군

G6-G8: 참조물질투여군

##### (나) 투여량의 설정

- 투여량은 시판 아미노산 보충제를 바탕으로 산출하였으며(G2) 사람과 랫드의 섭취량을 근거로 하여 각각 5배(G3), 10배(G4)로 정하였다. 또한 SRP70의 단백질 함량을 기준으로 하여 양성대조군 및 참조물질의 섭취량을 산정하였다.

##### (다) 군 분리

- 순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 '시험군 구성'표와 같이 무작위 분배하였다.

## (라) 투여

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 7 일/주, 4 주간 15:00 이전에 경구투여 하였다.
투여액량 산출	계획된 일자에 측정된 체중을 기준으로 10 ml/kg/day로 산출하였다.
투여방법	경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여, 위 내에 직접 투여 하였다.

## (5) 관찰 및 검사

### (가) 일반증상

- 투여 및 관찰기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 관찰하고, 개체별로 기록하였다. 첫 투여일을 Day 1으로 하였다.

### (나) 체중

- 입수일, 군분리 시, 투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 및 부검일에 측정하였다. 부검일은 절식시킨 체중을 측정하였다.

### (다) Forced swim test(FST) 시험방법

- ① 수영환경에 적응하기 위해 FST 실시 3일 전부터 수영상자에서 30분간 강제 수영을 실시하였다.
- ② FST 시험은 투여 2주 및 4주에 실시하며, 전날은 절식을 실시하였다.
- ③ FST 측정 당일, 시험물질 및 양성대조물질 투여 60분 후에 동물의 꼬리에 20 g 무게의 추를 매단 후 수조에 넣고 강제수영을 실시하였다.
- ④ 투여 2주에 실시하는 FST는 동물이 수면에서 바닥으로 가라앉은 후 10초 동안 떠오르지 못할 때 'all-out'으로 판정하며 그때까지의 수영시간을 기록하였다.
- ⑤ 투여 4주에 실시할 때에는 수조에 동물을 넣고 탈진 판정 직후 총 수영시간을 기록하였다.

⑥ 강제수영을 실시하는 동안 동영상 촬영을 실시하였다.

#### (라) 부검

- ① 4 주째 FST 실시 직후에 부검을 실시하여 채혈한 후 혈청을 분리하여 의뢰자 측에 전달하였다.
- ② 부검시 양쪽 뒷다리근육을 적출하여 냉동보관하였다.

#### (마) 통계 분석

- 측정결과는 SPSS (ver. 10.1K)를 사용하여, 부형제대조군과 시험물질투여군간의 비교, 부형제 대조군과 양성대조군간 비교 및 부형제대조군과 참조물질투여군간의 비교를 실시하였다. 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) One-Way ANOVA 혹은 Student's t-test를 통하여,  $P < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다

## 나. 실험결과

### (1) 사망동물

- 사망동물은 관찰되지 않았다.

### (2) 일반증상

- 일반증상 관찰결과, 시험물질에 의한 특이할 만한 일반증상은 관찰되지 않았다.

### (3) 체중

- 체중 측정 결과, 시험기간 동안 모든 시험물질투여군에서 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다. 양성대조군 및 모든 참조물질투여군에서도 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(Figure 1; Table 1; Appendix 1)

### (4) Forced swim test(FST)

- Forced swim test(FST) 측정한 결과, 모든 시험물질투여군은 투여 2 및 4주에 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 양성대조군 및 모든 참조물질투여군도 투여 2 및 4주에 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었다.

Forced swim test(FST) 측정 (Figure 2; Table 2; Appendix 2)

## 다. 고찰 및 결론

- 본 시험은 SD rat에 시험물질 SRP를 4주간 반복 경구투여 하였을 때, 운동능력 향상에 미치는 영향을 평가하기 위해 수행한 것으로 군 구성은 부형제대조군(G1), 시험물질 67 mg/kg/day(G2), 335 mg/kg/day(G3), 670 mg/kg/day(G4), 양성대조물질 BCAA 268 mg/kg/day(G5), 참조물질 I ISP 335 mg/kg/day(G6), 참조물질 II EYP 385.25 mg/kg/day (G7) 및 참조물질 III JBP 335 mg/kg/day 투여군(G8)을 설정하여 부형제, 시험물질, 양성대조물질 및 참조물질은 1회/일, 7일/주로 4주간 투여를 실시하였다. 측정항목으로는 일반증상, 체중 및 강제수영 시간 측정(forced swim test)을 실시하였다.
- 그 결과, 시험물질 투여기간동안 사망동물은 발생하지 않았고 시험물질에 의한 특이할 만한 일반증상은 관찰되지 않았다. 체중 측정 결과, 시험기간 동안 모든 시험물질 투여 군에서 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.
- Forced swim test (FST) 측정한 결과, 모든 시험물질투여군은 투여 2 및 4주에 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 본 시험조건 하에서 결과를 종합해 보면, SD rat에 시험물질 SRP를 1회/일, 7일/주, 4주간 반복 투여하였을 때 운동능력 향상 효과에 미치는 영향에의 유의적인 효과는 관찰되지 않는 것으로 판단하였다.

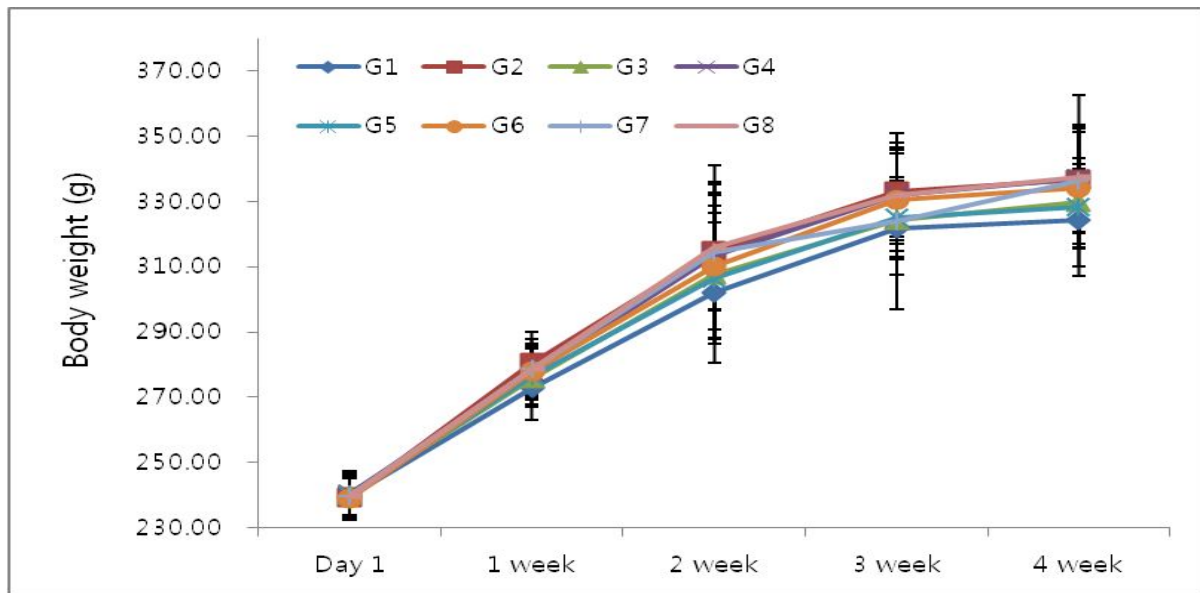


Fig. 1. Changes of body weight in each group.

Data are expressed as Mean±SD The results were statistically analyzed by One-Way ANOVA and Student' t-test.

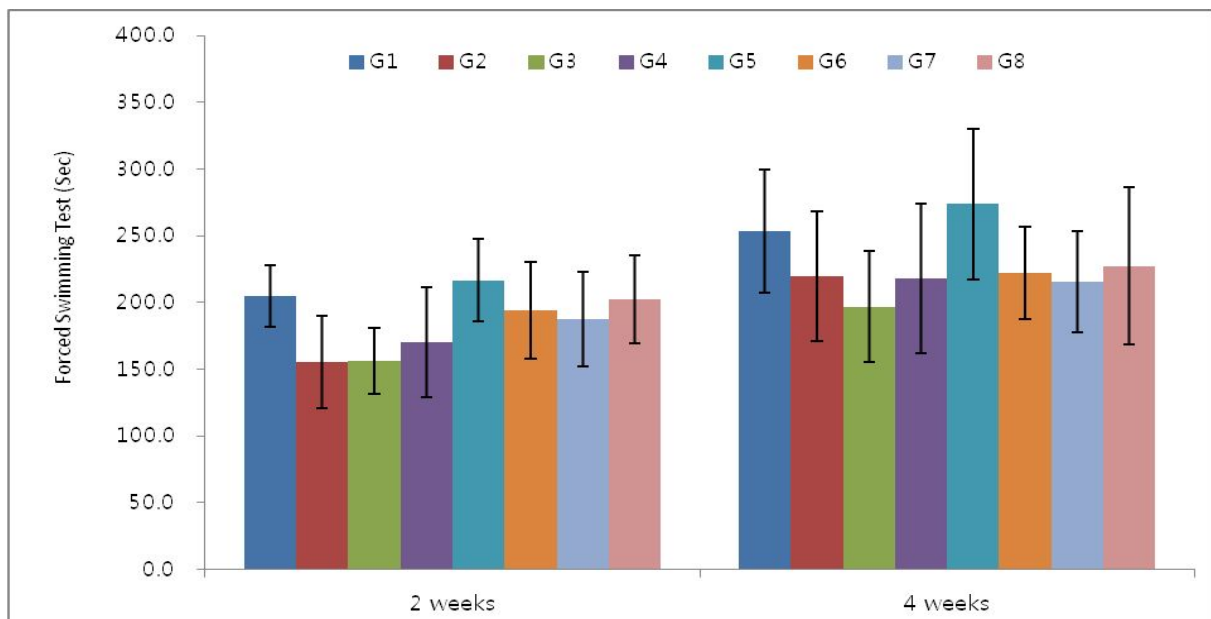


Fig. 2. Changes of forced swim test in each group.

Data are expressed as Mean±SEM The results were statistically analyzed by One-Way ANOVA and Student' t-test.

Table 3-1. Summary of body weight changes

BODY WEIGHT (g)		MALE			
Groups	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
G1	239.73±6.52	272.98±10.11	301.96±21.57	321.77±14.21	324.35±17.28
G2	239.20±6.91	280.49±9.42	314.78±17.75	333.14±14.91	336.89±16.47
G3	240.12±3.47	275.95±9.02	307.51±21.15	324.35±11.99	329.71±13.67
G4	240.35±6.93	277.57±7.44	313.31±22.61	331.80±14.70	336.97±16.17
G5	239.86±7.06	276.58±8.96	306.53±20.06	325.08±12.24	328.40±11.52
G6	238.95±6.29	277.83±8.31	310.13±21.86	330.38±15.40	333.99±18.32
G7	239.81±5.92	278.54±9.28	314.48±26.74	323.88±26.90	336.46±26.27
G8	239.48±7.01	278.69±7.85	315.93±19.51	331.96±12.86	337.57±13.70

Data are expressed as Mean±SD. The results were statistically analyzed by *One-Way ANOVA*.

Table 3-2. Summary of forced swim test in each group

Groups	Forced swim test (sec)		MALE
	2 weeks	4 weeks	
G1	204.6±23.0	253.2±46.3	
G2	155.5±34.5	219.7±48.7	
G3	156.3±24.7	196.9±42.0	
G4	170.4±41.2	218.0±55.8	
G5	216.7±30.8	273.7±56.5	
G6	194.1±36.2	222.3±34.6	
G7	187.5±35.1	215.8±37.8	
G8	202.3±32.9	227.4±59.1	

Data are expressed as Mean±SEM. The results were statistically analyzed by *One-Way ANOVA* and *Student' t-test*.

Appendix 1. Individual body weight changes

Body weight (g)					MALE
G1 (Vehicle control)					
Animal No.	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
1	229.06	266.81	291.83	319.71	317.46
2	234.52	247.81	284.96	316.52	321.49
3	233.54	271.50	306.25	338.25	340.57
4	237.87	276.61	260.21	300.54	303.96
5	238.90	276.15	303.66	327.51	331.70
6	241.03	271.53	301.52	312.46	307.98
7	240.29	277.24	319.77	326.61	327.31
8	244.87	278.45	295.86	304.00	305.98
9	245.95	284.69	340.94	345.96	360.08
10	251.23	278.97	314.57	326.13	327.00
Mean	239.73	272.98	301.96	321.77	324.35
SD	6.52	10.11	21.57	14.21	17.28
G2 (Test article, 67 mg/kg/day)					
Animal No.	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
11	226.45	268.42	287.38	314.55	316.44
12	233.54	273.19	299.66	326.20	327.34
13	233.04	276.54	316.75	347.38	351.12
14	238.00	278.27	306.86	331.12	339.34
15	238.09	277.11	300.73	321.27	325.04
16	240.45	281.85	324.71	330.69	333.84
17	242.09	273.28	308.68	316.71	318.81
18	245.89	290.87	340.68	352.36	358.29
19	244.80	300.08	342.28	357.90	364.79
20	249.63	285.24	320.11	333.22	333.84
Mean	239.20	280.49	314.78	333.14	336.89
SD	6.91	9.42	17.75	14.91	16.47



## Appendix 1. continued

Body weight (g)						MALE
G3 (Test article, 335 mg/kg/day)						
Animal No.	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	
21	228.49	263.75	280.09	304.78	313.68	
22	234.67	273.14	290.85	321.13	327.30	
23	233.39	264.48	292.92	323.52	325.44	
24	240.22	272.70	295.04	324.79	322.08	
25	239.70	274.03	290.78	321.79	321.91	
26	242.51	276.83	317.15	328.22	330.38	
27	242.83	282.20	339.12	339.36	354.94	
28	243.04	274.24	316.19	318.55	326.54	
29	245.52	284.48	311.25	314.24	321.38	
30	250.85	293.68	341.67	347.10	353.47	
Mean	240.12	275.95	307.51	324.35	329.71	
S.D.	6.47	9.02	21.15	11.99	13.67	
G4 (Test article, 670 mg/kg/day)						
Animal No.	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	
31	228.18	264.77	281.60	312.24	317.02	
32	234.62	269.24	291.43	327.99	332.58	
33	235.71	272.79	293.61	316.69	319.19	
34	236.82	278.95	311.98	339.79	343.48	
35	239.18	277.54	303.20	332.35	343.07	
36	241.72	276.50	317.73	322.71	327.58	
37	242.02	281.32	323.14	338.08	338.83	
38	245.93	286.35	334.14	342.58	350.21	
39	247.71	278.52	317.63	323.07	326.65	
40	251.57	289.70	358.63	362.47	371.12	
Mean	240.35	277.57	313.31	331.80	336.97	
S.D.	6.93	7.44	22.61	14.70	16.17	

## Appendix 1. continued

Body weight (g)						MALE
G5 (Positive control, 268 mg/kg/day)						
Animal No.	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	
41	227.16	260.06	283.85	304.07	312.36	
42	234.74	275.98	292.62	330.25	329.19	
43	236.93	271.56	291.73	313.42	319.32	
44	233.36	269.94	295.49	322.40	330.37	
45	238.60	271.77	283.74	317.26	318.65	
46	242.59	279.33	319.83	333.29	331.13	
47	244.07	277.25	309.90	321.94	320.30	
48	243.29	282.97	324.75	331.47	334.22	
49	247.02	284.89	320.11	328.26	335.67	
50	250.86	292.02	343.24	348.48	352.82	
Mean	239.86	276.58	306.53	325.08	328.40	
SD	7.06	8.96	20.06	12.24	11.52	
G6 (Reference control I, 335 mg/kg/day)						
Animal No.	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	
51	228.85	270.69	291.64	329.16	326.64	
52	231.27	266.12	272.81	304.31	302.90	
53	234.66	279.53	319.18	342.69	358.17	
54	236.07	276.46	291.03	322.34	325.42	
55	238.67	281.26	300.54	335.54	344.02	
56	241.14	263.99	299.80	305.68	306.65	
57	242.35	281.90	329.92	335.26	341.88	
58	241.94	285.08	328.68	338.89	340.74	
59	245.71	286.98	328.37	338.66	341.19	
60	248.83	286.32	339.29	351.26	352.30	
Mean	238.95	277.83	310.13	330.38	333.99	
SD	6.29	8.31	21.86	15.40	18.32	

## Appendix 1. continued

Body weight (g)					MALE
G7 (Reference control II, 385.25 mg/kg/day)					
Animal No.	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
61	230.14	272.46	292.85	315.67	327.43
62	231.49	268.37	271.84	293.62	301.35
63	238.28	272.36	295.66	297.29	326.44
64	237.08	272.89	307.07	309.66	334.46
65	239.47	266.73	297.83	299.60	305.32
66	240.93	279.51	313.47	317.02	325.22
67	241.15	290.77	361.56	377.38	382.94
68	244.69	286.64	335.14	344.25	373.87
69	247.65	283.63	334.97	346.64	347.51
70	247.21	292.05	334.39	337.62	340.10
Mean	239.81	278.54	314.48	323.88	336.46
SD	5.92	9.28	26.74	26.90	26.27
G8 (Reference control III, 335 mg/kg/day)					
Animal No.	Day 1	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
71	230.05	272.22	297.93	321.22	326.79
72	232.35	271.75	292.77	324.49	331.06
73	235.35	273.22	299.68	320.69	326.54
74	232.53	268.88	288.03	314.95	318.13
75	238.65	274.95	320.03	353.42	361.53
76	240.27	276.34	324.27	324.26	334.69
77	241.51	284.36	342.84	348.63	357.91
78	245.54	287.02	330.72	338.21	336.06
79	248.27	290.25	329.92	339.74	340.22
80	250.31	287.86	333.14	334.00	342.72
Mean	239.48	278.69	315.93	331.96	337.57
SD	7.01	7.85	19.51	12.86	13.70

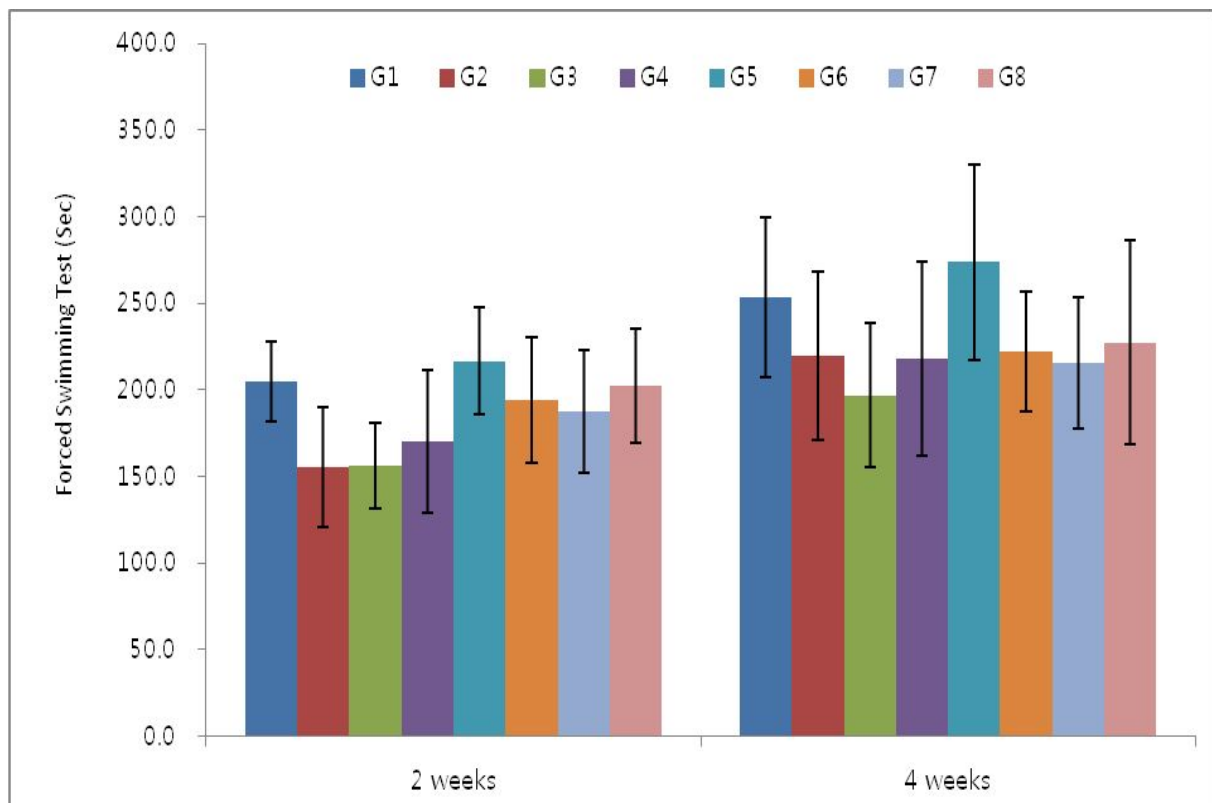


Fig. 3-3. Changes of forced swim test in each group.

Data are expressed as Mean±SEM. The results were statistically analyzed by One-Way ANOVA and Student' t-test.

Appendix 2. Individual data of forced swim test

Forced swim test (sec)			MALE
G1 (Vehicle control)			
Animal No.	2 weeks	4 weeks	
1	138	301	
2	241	438	
3	141	146	
4	237	305	
5	251	134	
6	153	185	
7	220	214	
8	248	210	
9	234	302	
10	183	297	
Mean	204.6	253.2	
S.E.M.	23.0	46.3	
G2 (Test article, 67 mg/kg/day)			
Animal No.	2 weeks	4 weeks	
11	73	192	
12	216	304	
13	283	242	
14	193	171	
15	86	101	
16	118	207	
17	97	103	
18	107	149	
19	199	375	
20	183	353	
Mean	155.5	219.7	
SEM	34.5	48.7	

## Appendix 2. continued

Forced swim test (sec)			MALE
G3 (Test article, 335 mg/kg/day)			
Animal No.	2 weeks	4 weeks	
21	125	266	
22	234	262	
23	88	81	
24	215	353	
25	168	182	
26	122	97	
27	170	191	
28	162	239	
29	188	146	
30	91	152	
Mean	156.3	196.9	
SEM	24.7	42.0	
G4 (Test article, 670 mg/kg/day)			
Animal No.	2 weeks	4 weeks	
31	194	241	
32	137	200	
33	59	108	
34	102	455	
35	144	82	
36	184	168	
37	111	159	
38	250	299	
39	348	310	
40	175	158	
Mean	170.4	218.0	
SEM	41.2	55.8	

## Appendix 2. continued

Forced swim test(sec)		MALE
G5 (Positive control, 268 mg/kg/day)		
Animal No.	2 weeks	4 weeks
41	138	283
42	214	384
43	139	135
44	263	260
45	287	504
46	268	214
47	119	129
48	253	283
49	248	325
50	238	220
Mean	216.7	273.7
SEM	30.8	56.5
G6(Reference control I, 335 mg/kg/day)		
Animal No.	2 weeks	4 weeks
51	128	201
52	241	287
53	258	227
54	119	271
55	289	288
56	124	133
57	126	149
58	234	212
59	140	132
60	282	323
Mean	194.1	222.3
SEM	36.2	34.6

## Appendix 2. continued

Forced swim test (sec)			MALE
G7(Reference control II, 385.25 mg/kg/day)			
Animal No.	2 weeks	4 weeks	
61	177	178	
62	172	183	
63	161	212	
64	308	293	
65	144	255	
66	124	128	
67	256	328	
68	101	152	
69	149	122	
70	283	307	
Mean	187.5	215.8	
SEM	35.1	37.8	
G8 (Reference control III, 335 mg/kg/day)			
Animal No.	2 weeks	4 weeks	
71	173	161	
72	235	260	
73	220	212	
74	182	240	
75	274	192	
76	69	65	
77	194	185	
78	154	203	
79	306	527	
80	216	229	
Mean	202.3	227.4	
SEM	32.9	59.1	



## 2. 수용성 쌀단백질 SRP70의 4 주간 경구투여가 Sprague-Dawley 랫드의 운동 후 피로회복에 미치는 영향 시험

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 혈액채취

- SRP70의 4주간 경구투여 및 운동능력 시험 이후 Sprague-Dawley 랫드를 희생시킨 직후 랫드의 혈액채취는 (주)캠온에서 진행되었다.
- 혈청의 처리는 venous blood를 1개의 SST tube에 3.0 ml 채혈한 뒤 clotting을 위해 30분간 실온에서 방치 후 3,000 rpm(1000×g), 10분간 원심분리하였고 분리된 혈청을 seperator(혈청분리관 or 1.5 ml tube) 1개에 0.8 ml 이상 옮긴 후 냉동보관하였다.
- 혈장(Plasma)(용기성분: EDTA)의 처리는 venous blood를 3 ml용 EDTA tube 1개에 2.0 ml 채혈 한 뒤 충분히 mixing 후 즉시 3,000 rpm(1000 x g), 10분간 원심분리하였고 분리된 혈장(상층액)을 seperator(혈청분리관 or 1.5 ml tube) 1개에 0.3 ml 이상을 옮긴 후 즉시 냉동보관 하였다.

#### (2) 혈액 바이오 마커 측정

- 분리된 혈액 및 혈장은 분리 후 3일 이내에 냉동보관으로 (의)녹십자의료재단에 이동되었으며, 혈청 크레아티닌 및 글루코스 농도 그리고 혈장 암모니아 농도는 (의)녹십자의료재단의 기기 및 전문 연구원에 의해 측정되었다.

## 나. 실험결과 및 고찰

### (1) glucose

- 혈중 glucose 농도가 감소하면 피로감을 느끼게 되고, 지구력 운동 수행능력을 저해하는 결과가 초래된다. 즉, 운동 후반부에 근육의 글리코겐 함량이 감소하면 혈중 glucose가 근육으로 유입되는 양이 증가하는데, 이로 인해 혈중 glucose가 고갈된다.
- 혈중 glucose가 증가되는 이유는 혈장 glucose를 증가시키는 호르몬인 glucagon, catecholamin등에 의해 간에 저장되어있는 glycogen이 glycogenolysis 과정을 통해 glucose로 전환되어 혈중 glucose를 증가시키기 때문이다.
- 본 실험에서는 대조군과 비교하여 SRP 섭취군에서 전체적으로 혈중 glucose 농도가 높은 것으로 나타났으며, SRP의 섭취 농도 별 혈중 glucose 농도가 각각 88.00, 91.71, 98.80 mg/dL로 점차 증가하는 것으로 확인되었다.
- 따라서 혈중 glucose 농도를 근거하여 보았을 때 수용성 쌀단백질 SRP70을 섭취한 랫드의 피로도가 SRP70의 섭취 농도와 비례하여 저하되었음을 추측할 수 있다.

Table 3-3. Blood glucose concentration after forced swim test of Sprague-Dawley taking SRP70 for 4weeks

Glucose(mg/dL)			
No.	Name	MEAN	SD
G1	control	70.80	11.81
G2	srp1	88.00	12.30
G3	srp2	91.71	12.15
G4	srp3	98.80	10.52
G5	bcaa	95.00	9.65
G6	ISP70	87.37	11.60
G7	EYP60	83.96	17.60
G8	JBP	82.32	15.62

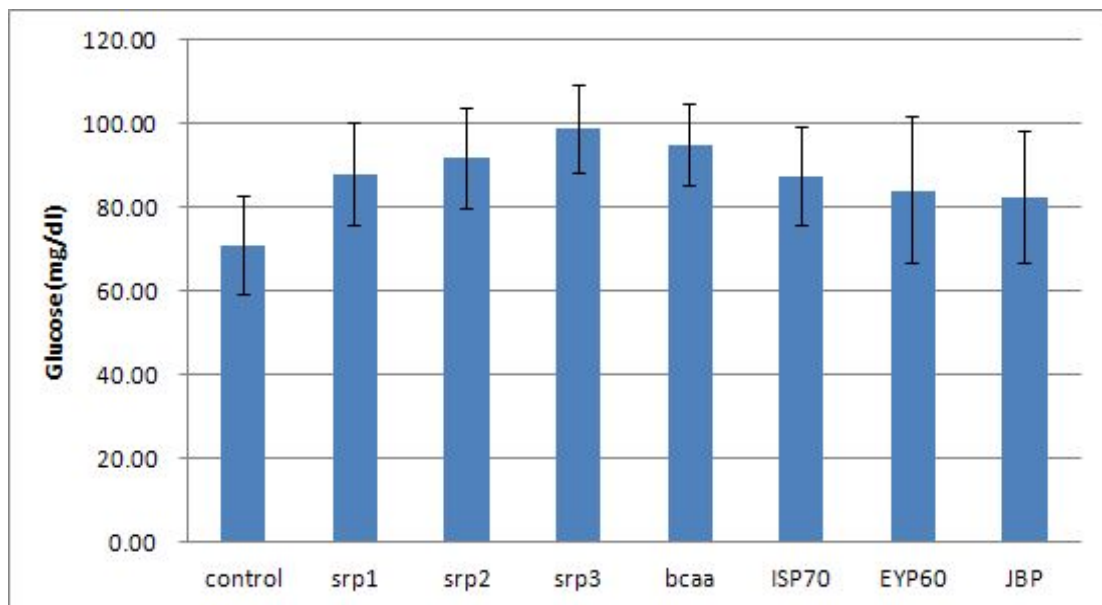


Fig. 3-4. Graph of blood glucose concentration after forced swim test of Sprague-Dawley taking SRP70 for 4weeks.

## (2) Creatinine

- Creatinine은 염기성 물질로, 크레아틴의 무수물이며 크레아틴 대사의 최종산물이다. 화학명은 메틸글리코시아미딘이다. 생체 내에서는 주로 근육 중에 크레아틴인산 형태로 존재하지만, 이 크레아틴이 대사과정에서 탈수, 환원된 것이 크레아티닌이고, 요중으로 배설된다. 보통 혈중에는 1~2 mg/100 ml 포함되어 있다.
- Creatinine 형성은 골격근의 creatine phosphate 농도와도 관련이 있다. Creatinine은 골격근에서 이화작용의 부산물과 같은 creatine으로부터 생성된다고 보고 근력 향상을 측정하는 하나의 수단으로 사용되기도 하며, 근육에서 creatine 포화는 creatinine 농도증가와 관련이 있다. 따라서 건강한 경우 거의 근육량에 비례하여 일정한 값을 나타내며, creatinine 양도 많아지는 것으로 해석될 수 있다.
- 본 실험에서는 대조군의 크레아티닌 함량 0.64 mg/dl, SRP70의 섭취 농도별 결과 0.66, 0.67, 0.66 mg/dl로 혈중 크레아티닌 농도에 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 따라서 SRP70 섭취가 랫드의 근력 향상에 영향을 미치지 않았으므로 해석할 수 있다.

Table 3-4. Blood creatinine concentration after forced swim test of Sprague-Dawley taking SRP70 for 4weeks

Creatinine(mg/dL)			
No.	Name	MEAN	SD
G1	control	0.64	0.05
G2	srp1	0.66	0.05
G3	srp2	0.67	0.05
G4	srp3	0.66	0.04
G5	bcaa	0.66	0.04
G6	ISP70	0.65	0.05
G7	EYP60	0.63	0.05
G8	JBP	0.66	0.08

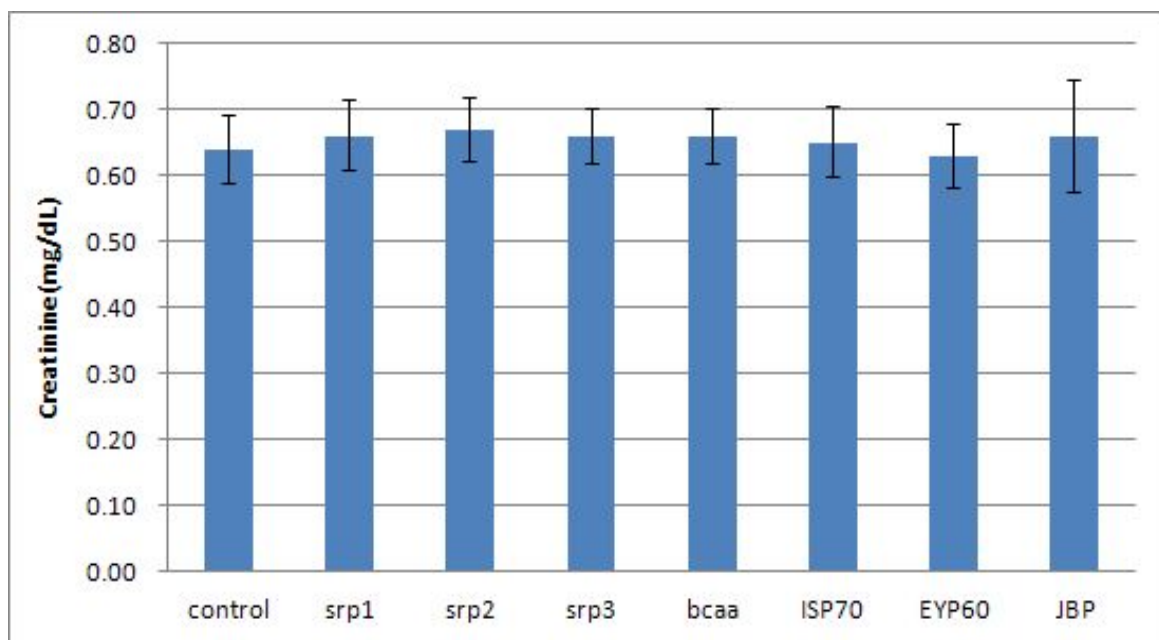


Fig. 3-5. Graph of blood creatinine concentration after forced swim test of Sprague-Dawley taking SRP70 for 4weeks.

### (3) Ammonia

- Aspartic acid는 근육 내에서 Purine nucleotide 회로의 주요 구성 성분으로서 극심한 고강도 운동 중에 ATP 풀을 재생시켜 근육에 에너지를 제공하고, 이 과정에서 유리 암모니아를 형성하게 된다. 운동 시 아미노산의 분해 결과 생성된 암모니아는 근육으로부터 혈액으로 방출되고, 혈중 암모니아는 뇌에 전달되어 중추피로를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 한편 근육세포 내에 축적된 암모니아는 근육의 통증감지와 관련이 있는 구심성 신경을 자극하고, TCA cycle 및 당신생 작용을 저해하며, 젖산 생성을 초래함으로써 근육의 피로를 유발하게 된다.
- 분석 결과 대조군의 혈장 암모니아 농도는 753.57  $\mu\text{g/dL}$  이며 SRP70 섭취 농도 군 별 각각 694.29, 638.00, 600.71  $\mu\text{g/dL}$ 의 결과를 얻었다. SRP70을 섭취한 그룹의 혈장 암모니아 농도가 전체적으로 낮았으며, SRP70의 섭취 농도가 증가할수록 혈장 암모니아 농도 또한 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 SRP70의 섭취가 운동 후 랫드의 피로 저하 효능에 효과가 있는 것으로 해석될 수 있다.

Table 3-5. Blood plasma ammonia concentration after forced swim test of Sprague-Dawley taking SRP70 for 4weeks

Ammonia( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )			
No.	Name	MEAN	SD
G1	control	753.57	199.33
G2	srp1	694.29	160.32
G3	srp2	638.00	140.19
G4	srp3	600.71	67.27
G5	bcaa	624.00	156.12
G6	ISP70	705.43	192.78
G7	EYP60	589.30	153.76
G8	JBP	714.60	136.91

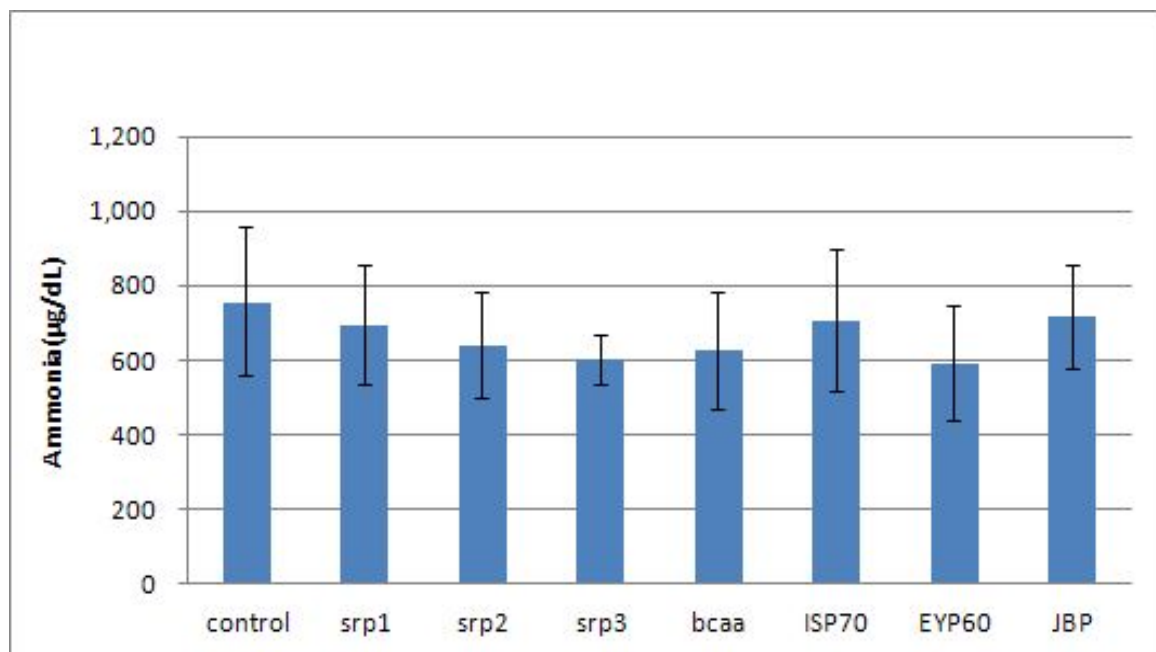


Fig. 3-6. Graph of blood plasma ammonia concentration after forced swim test of Sprague-Dawley taking SRP70 for 4 weeks.

## 제 4 절 위탁과제 : 쌀 부산물 유래 단백질, 식이섬유, 피틴산, 이노시톨의 대량 생산 공정의 최적화

### 1. 단백질 및 식이섬유 소재의 품질평가 및 대량생산 공정의 확립

#### 가. 제품의 품질평가 요인

- 얻어진 단백질 및 식이섬유 제품의 품질은 구성성분을 기준으로 판단하여야 한다. 즉, 단백질, 지방, 회분, 수분, 탄수화물의 함량을 기준으로 경시적 변화에 대한 결과를 조사하고, 식품으로서의 품질관리 기준에 적합 여부를 조사하여야 한다. 얻어진 수용성 단백질 및 불용성 단백질, 식이섬유의 품질관리 기준을 다음의 Table 4-1에 보였다

Table 4-1. Quality control items for protein and dietary fiber

항목	수용성단백질	불용성 단백질	불용성 식이섬유
외관	연갈색의 분말	미황색의 분말	미황색의 분말
수분	< 10%	< 10%	< 10%
불용성 성분 함량	< 5%	> 95%	> 95%
일반세균	< 5,000 cfu/g	< 5,000 cfu/g	< 5,000 cfu/g
대장균군	불검출	불검출	불검출
식이섬유 함량	< 5%	< 20%	> 60%
조단백	> 70%	> 70%	< 30%
수용성 탄수화물	< 1%	< 1%	< 1%
조지방	< 5%	< 5%	< 5%
조회분	< 2%	< 2%	< 2%

- 품질평가 요인에서 외관의 경우 3종의 원료에서 얻어진 불용성 단백질과 식이섬유는 각각 그 원료의 색에서 연유된 칼라를 지니고 있어 일관적인 색의 지정은 불가능하다. 따라서 각



각의 원료의 색을 기준으로 제품의 색에 전이된 형태의 제품만이 가능하였다. 여기서 색을 통일하기 위한 탈색의 과정은 제품의 가격 및 안전성 측면에서 추가적인 공정의 적용이 의미가 없다고 판단하였다.

- 수분의 경우 제품의 변질을 방지하기 위한 기준으로 10%를 설정하였으며, 이는 일반적인 식품원료의 수분기준을 기준으로 하였다. 불용성 성분의 함량은 세척횟수에 따라 달라지지만, 일반적으로 3회의 세척을 위한 기준으로 불용성 성분의 함량을 95% 이상으로 설정하였다.
- 수용성 성분의 함량을 5% 이상으로 할 경우 세척횟수를 1회로 줄일 수 있으나, 이는 식이섬유의 함량이 낮아지고, 칼로리가 높아지는 점 때문에 본 연구에서 제품화를 위한 기준으로 수용성 성분의 함량을 5% 이내로 제한 하였다. 이 기준은 추후 산업화 과정에서 전체적인 공정의 구성을 감안하여 조정 가능한 것으로 세척횟수, 시간, 첨가하는 물의 양에 따라 조정 및 조절이 가능하다.
- 일반세균의 경우 식품원료의 경우 정확한 기준이 설정되어 있지는 않으나, 본 연구에서는 일반적인 기준으로서 5000cfu/g의 기준을 설정하였다. 일반세균의 경우 원료에서 기인하는 부분은 없다고 볼 수 있으며, 제조공정의 건조과정, 분쇄과정에서 연유될 수 있다. 따라서 제품의 제조과정 상의 외부 오염균의 유입을 예방한다면 일반세균 설정 기준을 만족시키는 것은 매우 용이하다고 할 수 있다. 대장균군의 경우 현재 식품공전상의 관리기준으로 설정하였다. 즉, 대장균군의 경우 불검출이 전제로 되어 있어 이를 기준으로 설정하였다.

## 나. 단백질 및 식이섬유 소재의 대량 생산 공정 및 설비 최적화

### (1) 수세공정

- 쌀 부산물 원료에서 불용성 단백질 및 식이섬유를 얻기 위해서는 먼저 수용성 성분의 제거가 필요하다. 수용성 단백질의 세척은 얻어진 부산물을 1차적으로 물을 혼합하여 균질화 하고 여기에서 불용성 성분을 회수하는 방식으로 이루어졌다. 수용성 성분의 제거는 통상적으로 연속공정의 원심분리기를 이용하지만 lab. scale에서는 원심력과 시간을 기준으로 하여 적절한 조건을 선정하였다. 그 결과를 다음의 Fig. 4-1, Fig. 4-2에 보였다.

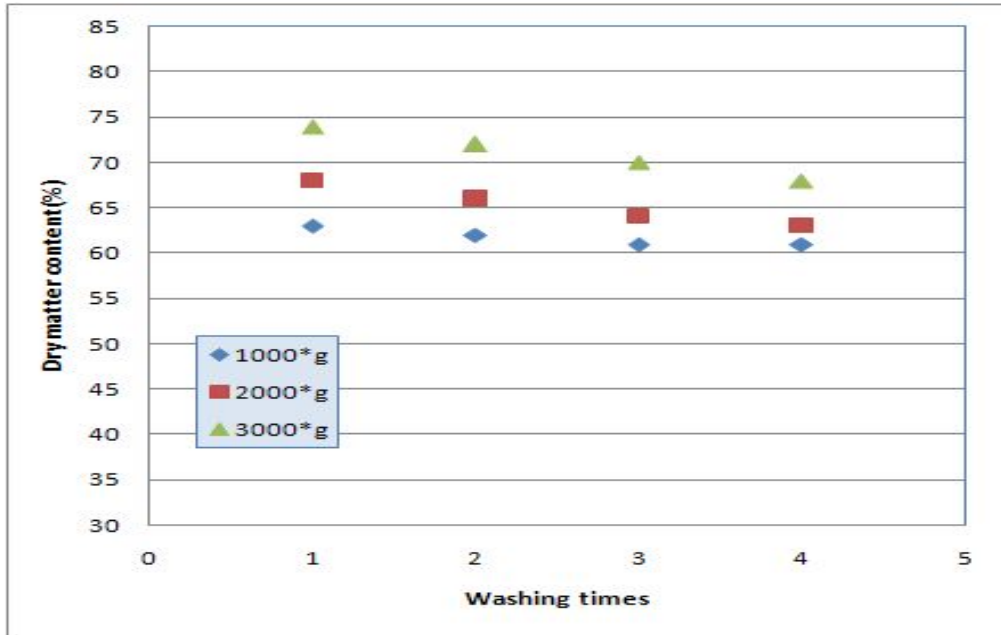


Fig. 4-1. Change of dry matter content with washing times at different centrifugal forces.  
Raw material : Defatted rice bran.

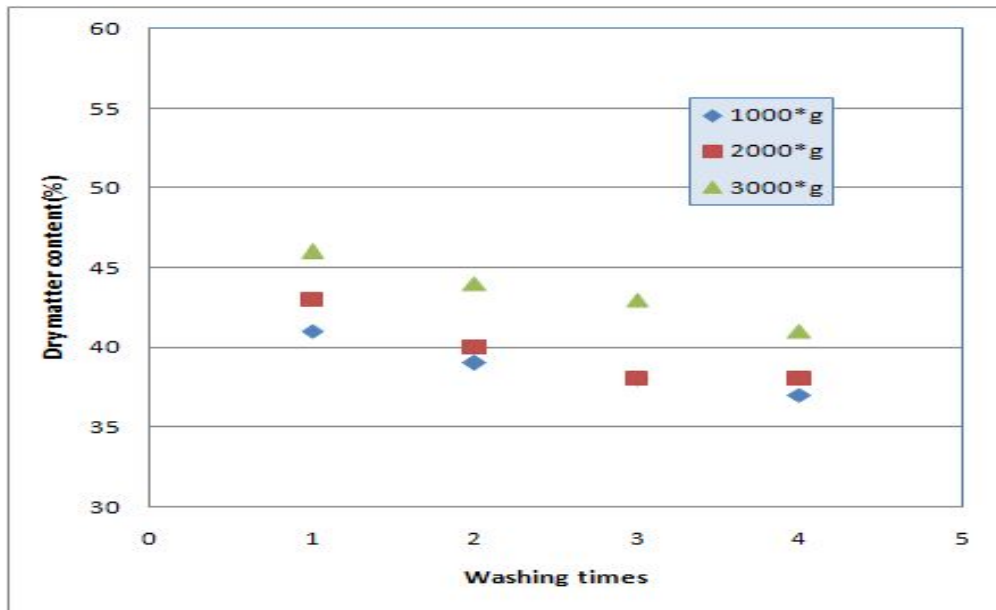


Fig. 4-2. Change of dry matter content with washing times at different centrifugal forces.  
Raw material : Malt rice meal.

## (2) 효소반응공정

- 효소반응공정은 처리하는 효소의 활성을 최적화 할 수 있는 공정의 확립이 가장 중요한 요소가 된다. 효소의 활성을 유지하기 위한 변수로는 온도, 효소의 양, rpm, 처리시간 등을 고려할 수 있다. 그러나 이러한 변수는 공정의 구성에 필요한 장치의 설계단계에서는 거의 문제가 되지 않는다. 따라서 효소반응공정의 구성은 기본적인 사항(온도, rpm)을 기준으로 하여 디자인 하였다.

## (3) 탈수공정

- 효소반응이 완료되면 불용성 단백질 및 식이섬유의 회수를 위하여 탈수공정을 거치게 된다. 탈수공정의 경우 원심분리기 또는 Filter press를 사용하게 된다. 원심분리기는 제품의 생산 Capa.상 연속식을 사용하여야 한다. 일반적으로 연속식 원심분리기는 Disk type, Horizontal decanter를 고려할 수 있으며, Horizontal decanter가 가장 적절한 것으로 고려되었다. 그 이유는 연속공정이 가능하면서 동시에 얻어지는 Cake의 고형분 함량이 가장 높기 때문에 후속적인 건조공정에서 시간과, 에너지를 절약할 수 있어, 전체 공정의 생산성을 극대화 할 수 있기 때문이다. 다음의 Table 4-2.에 원심분리기, Filter Press, Decanter를 기준으로 생산성을 비교하였다. 설비의 기준은 유사한 처리 Capa.를 기준으로 하였다.

Table 4-2. Comparison of productivity in dehydrating process

	원심분리기	Filter Press	Decanter
Feed의 고형분(%)	10	10	10
Cake의 고형분(%)	19	55	43
Productivity (고형분 kg/hr)	1	2.8	12.2

- 그 결과 원심분리기를 기준으로 할 때 Horizontal decanter는 Fig. 4-3에 나타낸 바와 같이 얻어지는 Cake의 고형분 함량이 상대적으로 높으며 특히 Filter Press와 비교할 경우 필터 프레스의 경우 얻어지는 고형분의 함량이 다소 높으나 준비와 해체하는 시간이 매우 길고, 운전의 용이성이 많이 떨어진다는 단점이 있어 전체적인 Productivity를 고려할 때 Horizontal decanter가 가장 우수한 것으로 나타났다.

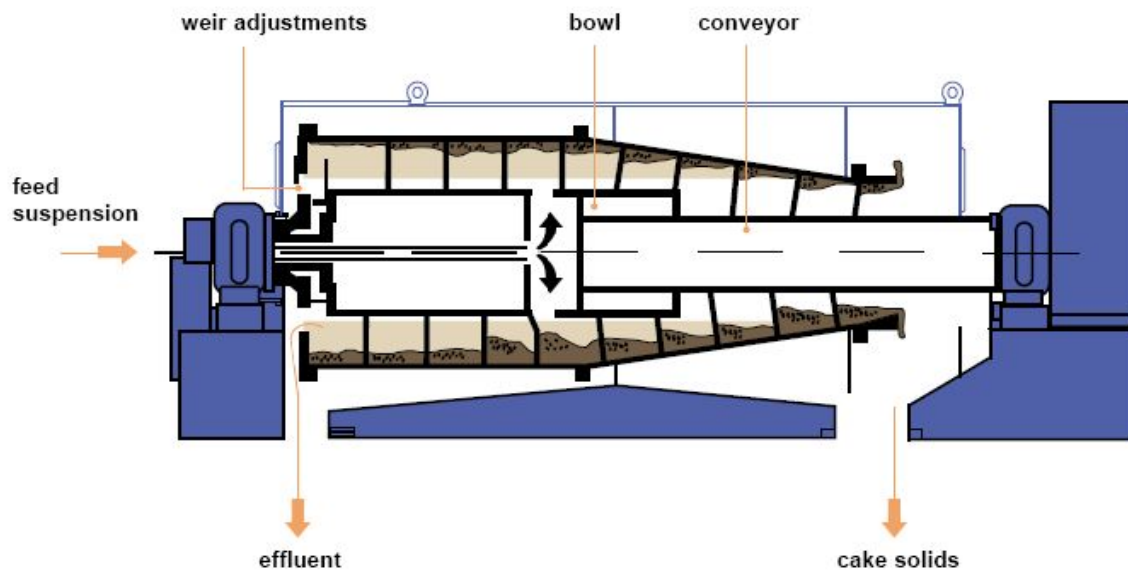


Fig. 4-3. Schematic diagram of horizontal screw decanter.

#### (4) 건조공정

- 건조공정은 건조시의 온도와 밀접한 관련이 있다. 특히 일부 시료의 경우 함유한 당성분의 양에 따라 고온 건조 시 갈변하는 특성이 있어 제품의 색을 일정하게 유지하기 위해서는 건조과정에서 적절한 온도와 시간의 설정이 매우 중요하다. 본 연구의 불용성 식이섬유의 경우 수용성 성분을 제거하는 것이 1차 공정이었으므로 그 완벽여부에 따라 건조공정에서의 허용 가능한 온도와 시간이 조정되게 된다.
- 일반적으로 제품의 품질관리기준의 설정 한도에서 온도는 가능한 높게, 시간은 가능한 짧게 설정하는 것이 공정의 생산원가를 낮추면서 생산성은 높이는 방법이 될 수 있다. Horizontal screw decanter를 사용하여 얻어진 시료를 이용한 건조방법 별 건조시간 및 생산성을 비교하여 보았다. 그 결과를 Table 4-3에 보였다.

Table 4-3. Comparison of productivity with different drying process

	열풍건조	진공건조(60 Torr)	동결건조
건조소요시간*(hr)	40	26	48
Productivity(kg/hr)	3.5	2.5	1.45
분말의 색깔의 진하기(1~10)	5	2	1

\* : 최종 수분함량 5%이하 기준

- 열풍건조의 경우 탈수과정에서 수분의 함량이 충분히 낮아진다면 적절한 뒤적임의 과정을 통해 건조과정을 빠르게 할 수 있었다. 그러나 건조과정상의 온도를 올리는 부분이 잔류당의 카라멜화 반응으로 인하여 고온으로 건조하는 과정에서 색이 진해지는 문제점이 있었다.
- 진공건조의 경우 동결건조와 마찬가지로 진공도에 따라 수분의 증발이 진행되므로 갈변이 거의 진행되지 않았으며 품질도 일관되게 유지되었으나 생산성이 열풍건조에 비하여 떨어지는 단점이 있었으며, 동결건조의 경우 얻어지는 제품의 밀도가 상대적으로 낮아지며 고가의 비용이 소요되고 생산성이 매우 낮으나 제품의 품질은 가장 우수한 방법이었다.
- 본 연구에서는 제품의 가격과 품질 및 생산성을 고려하여 열풍건조와 진공건조를 병행하는 방식을 고려하였다. 즉, 초기의 수분이 많은 상황에서는 진공건조방식을 택하고, 그 후에는 열풍건조방식으로 건조하여 생산성을 향상시킬 수 있는 방법을 선정하고자 하였다.

### (5) 분쇄공정

- 건조가 완료된 불용성 식이섬유는 분쇄하여 분말화 과정을 거치게 된다. 분쇄과정은 요구되는 분말의 입자크기에 따라 사용하는 분쇄기가 달라지게된다. 일반적으로 건조공정에 따라 얻어진 분말의 겉보기 밀도 역시 달라지므로 이를 감안하여 분쇄기 및 mesh의 크기를 선정하여야 하였다.
- 다음의 Table 4-4에 각 건조공정별 분쇄입자의 겉보기 밀도를 보였다. 동결건조의 경우 가장 낮은 밀도를 보였으며 이 경우 분쇄과정에서 미세분말의 비산이 심하였고, 보관과정에서 습도증가에 따른 흡습이 가장 많았다.

Table 4-4. Apparent powder density comparison with different drying process

Process	Convection Drying	Vacuum Drying	Freeze Drying
Apparent Density(g/ml)	0.64	0.55	0.46

### (6) 포장공정

- 제품의 포장방법은 그 제형에 따라 구분되어 진다. 식이섬유 및 단백질의 경우 최종 형태가 분말상이므로 이를 감안하여 수분의 완전히 차단될 수 있는 포장재의 선정이 필요하다. 가장 널리 사용되는 것으로는 알루미늄에 폴리에틸렌을 라이닝 한 것으로서 저렴한 가격 및 내구성, 산소 차단성으로 인하여 가장 적합한 것으로 판단되었으며, 그 외의 투명의 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등도 가능하였으나, 분말의 특성 상 내구성 측면과, 수분투과성 측면이 주요 고려대상으로 할 경우 라이닝된 알루미늄이 가장 적합하였다. 알루미늄의 경우 진공포장도 가능하였으며, 이 경우 포장 후 70℃에서 6개월간 저장하여도 제품의 품질에는 아무런 이상이 없었다.
- 불용성 단백질 및 식이섬유의 경우 효모의 제거가 완벽할 경우 가장 안정적인 품질유지가 가능하였으며, 불완전한 효모제거의 경우 흡습성이 증가되어 완벽한 차단, 밀봉이 중요한 인자로 나타났다. 일반적인 습도조건에서는 분말의 흡습성은 문제가 되지 않았으나, 여름철 상대습도가 90%에 이를 경우 흡습으로 인하여 분말의 유동성이 현저하게 저하되는 문제점이 발생하였다. 따라서 포장시 포장실의 상대습도를 최대 70% 이하로 유지하여야 하였으며, 포장에 소요되는 시간 역시 최소화 하여 흡습을 줄여야 하였다.

- 포장지의 경우 수분의 차단이 가장 완벽한 재질은 알루미늄에 폴리에틸린이 라미네이팅된 재질로서 시중에서 손쉽게 구할 수 있는 것이었으며, 그 외의 일반적인 폴리에틸렌, 폴리프로필렌의 경우 20 kg 정도의 양을 포장하는 것이 용이하지 않았으며 보관성 측면에서도 알루미늄 파우치에 비하여 뛰어나지 않았다.
- 그러나 포장용지의 가격적인 면에서 알루미늄 파우치의 가격이 상대적으로 비싸 이를 감안하여야 한다면 폴리프로필렌 수지를 이용한 포장 및 별도의 지박스 포장으로 대체가 가능하다고 보았다. 포장 시 용기 내에는 반드시 수분의 흡수를 위한 실리카겔을 첨가하여야 하며 입구는 열접착을 이중으로 하여 외부와 완벽하게 차단하여야 한다.
- 분말은 진공포장하는 것도 용이하였으며 그 경우 진공을 해제할 경우 손쉽게 분말로 되어 사용에 문제가 없었다. 진공포장의 경우 공기투과성이 낮은 재질로 알루미늄파우치, 폴리프로필렌 등이 적용 가능하였으며, 경우에 따라 질소를 퍼징하고 밀봉하는 것도 입자의 유동성과 유통기간을 확보하는데 용이하였다. 질소 퍼징의 경우 포장단계가 추가되어야 하는 문제점 및 번거로움 때문에 권장하기는 어려우나 제품의 입자유동성은 가장 잘 유지되는 측면에서 장점이 있었다.
- 포장방법의 경우 앞서 제시된 결과와 같이 기밀용기를 기준으로 밀봉하여 유통하는 것이 가장 적절하며, 흡습성이 있어 이를 예방하기 위하여 방습제를 포함시켜서 포장하는 것이 좋다. 유통방법의 경우 상온에서 분말상이 잘 유지되므로 별도의 유통조건을 필요로 하지는 않는다. 특히, 냉장 또는 냉동과 같은 유통조건의 필요성은 없다고 본다.

(7) 공정 최적화

- 위에서 얻어진 공정을 기준으로 하여 전체공정을 구성하였다. 이를 Fig. 4-4, 4-5, 4-6에 보였다. 개별 공정의 최적 조작조건을 다음의 Table 4-5에 보였다. 또한, 시스템의 구현을 위한 Mixer의 Design Sheet을 Table 4-6에 보였다. 또한 시스템의 디자인을 위한 일반적인 고려사항을 [공정 디자인 자료]에 별도 표기하였다.

Table 4-5. Optimum operation conditions for water insoluble fiber from rice

공정명	운전조건	기타조건
Mixing	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Temp. : RT</li> <li>● Rpm : 500 이상(균질화 필요)</li> <li>● Time : 30min. 이상</li> <li>● 용매배수 : 5배수</li> </ul>	2~3회 반복하여 세척함. 원료의 종류에 따라 원심력의 조절이 필요함.
Centrifuge	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Horizontal Decanter Type</li> <li>● 원심력 : (1,000~2,000)×g</li> </ul>	
Enzyme Treatment	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 처리시간 : 45~90℃, 2~6hrs</li> </ul>	효소에 따른 처리시간 및 온도 조건의 설정.
Centrifuge	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Horizontal Decanter Type</li> <li>● 원심력 : 4,000×g</li> </ul>	
Drying	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Oven Temp. : 90℃</li> <li>● Vacuum Drying : 10~30 Torr</li> <li>● Freeze Drying : &lt;0.1 Torr</li> <li>● Time : 36hrs 이상</li> </ul>	건조방식에 따라 차등화 된 건조시스템을 적용함.
Powdering /Sieving	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 분쇄기는 습도가 조절되는 환경에서 분쇄 후 선별기를 통하여 30~100 mesh 까지 차등 선별함.</li> </ul>	
Packing	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 알루미늄 파우치에 질소충전, 진공열압착의 방법으로 포장함.</li> </ul>	



① 불용성 쌀단백질 제조 공정도

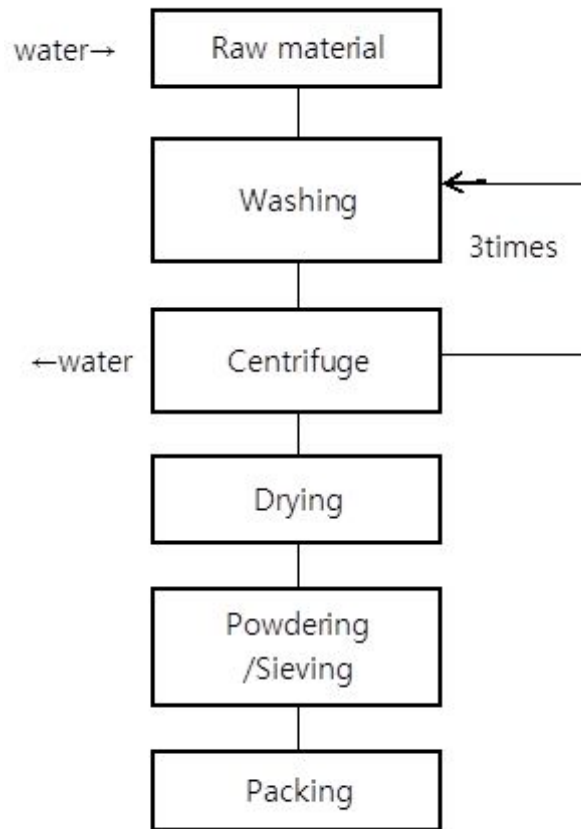


Fig. 4-4. Schematic diagram of water insoluble protein production process.

② 수용성 단백질 제조공정도

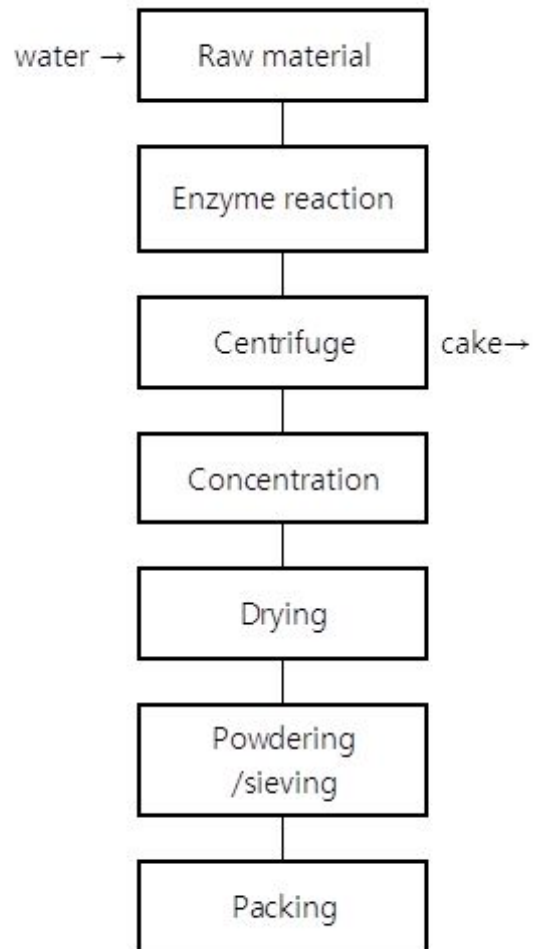


Fig. 4-5. Schematic diagram of water soluble protein production process.

③ 불용성 식이섬유 제조공정도

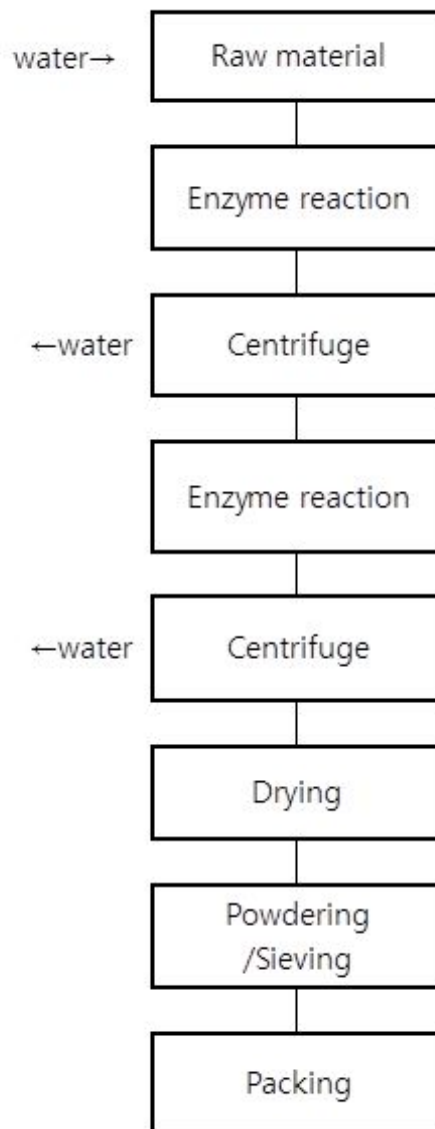


Fig. 4-6. Schematic diagram of water insoluble dietary fiber production process.

Table 4-6. Mixer Design Data Sheet

AZI CORPORATION				SPECIFICATION DATA SHEET					
				Rice Fiber Production Process					
01	CUSTOMER			DOCUMENT No.					
02	JOB NAME Rice Fiber			SHEET No.					
03	JOB No.			DATE		'2010. 10. 10			
04	LOCATION			APP'D BY		CH'D BY	MADE BY		
05	PLANT NAME					SJP			
06	ITEM No.			REV	DATE	LINE No.			
07	NUMBER OF REQUIRED 4			A					
08	SERVICE Mixing T/K			B					
09	MANUFACTURER								
10	TYPE			Mixer ELECTRIC MOTOR					
11	MODEL No.			INSTALLATION GlassWool 10t(Jacket Type)					
12	OPERATING CONDITIONS			CONSTRUCTION					
13	CONTINUOUS	0	INTERMITTENT	8	HRS/DAY	CASE MOUNT	BRACKET	C.L FOOT	VERT.
14	LIQUID Water + Cake			SPLIT		RADIAL		AXIAL 0	
15	CORR./EROS. No.			ROTATION VIEWED FROM DRIVER		CW		CCW	
16	SOLID	Yes	QUANTITY	10WT%		NO. OF STAGES		SINGLE	
17	PUMPING TEMP. 50-80 °C			IMP. TYPE	CLOSE	SEMI OPEN		OPEN	
18	DENSITY 1100 KG/m <sup>3</sup>			IMP. DIA.	MAX.	MIN.		MM	
19	VISCOSITY <200 Cp			POWER TRANSMISSION		DIRECT GEAR		BELT	
20	VAPOR PRESS. AT PT. Kg/cm <sup>2</sup> A			JACKET 1) Steam					
21	HEIGHT OF LIQUID LEVEL H			COUPLING TYPE		FLEXIBL		GEAR SPACER	
22	CAPACITY MAX. 4 NOR. 3.5 M <sup>3</sup> /H			SHAFT SEAL		GLAND		M/C SEAL * REMARK	
23	TOTAL HEAD 7 M			SEALING		SELF		EXTERNAL	
24	PRESSURE	SUCTION Kg/cm <sup>2</sup> A		PACKING SIZE		MM		NO. OR EQUAL	
25	DELIVERY Kg/cm <sup>2</sup> A			MECH. SEAL TYPE		SINGEL/INSIDE/BALANCED			
26	DIFFERENTIAL Kg/cm <sup>2</sup> A			BASE PLATE		COMMON		0 SEPARATE	
27	NPSH AVAILABLE M			BEARING TYPE		PUMP SIDE			
28	PERFORMANCE			DRIVER SIDE					
29	NPSH REQUIRED M			LUBRICATION		OIL			
30	MIN. CONTINUOUS FLOW M <sup>3</sup> /H			NOZZLE		SIZE	CODE	FACING	POSITION
31	SPEED	1,000RPM	EFFICIENCY	%		SUCTION	*	ANSI#150	RF
32	BHP KW			DELIVERY		*	ANSI#150	RF	
33	COOLING WATER	°C	Kg/cm <sup>2</sup> /G	L/MIN		H.W. IN	40	ANSI#150	RF
34	BRG.	L/MIN	STUFFIN BOX	L/MIN		H.W. OUT	40	ANSI#150	RF
35	GLAND	L/MIN	PEDESTAL	L/MIN		TEST & INSPECTION			
36	FLUSHING FLUID					REQ'D	WITNESS		
37	CASE DSN TEMP.	120 °C	PRESS.	1	Kg/cm <sup>2</sup> /G	PERFORMANCE	0	0	
38	DRIVER DATA			NPSH REQ'D					
39	SUPPLIED BY			HYDRSTATIC		0		PRESS.	Kg/cm <sup>2</sup> /G
40	MFR.	HICO	TYPE		PNEUMATIC			PRESS.	Kg/cm <sup>2</sup> /G
41	RATED OUTPUT 7.5 KW RATED AMP. AMP.			MATERIAL					
42	1800 RPM	3 PHASE	380 VOLTS	60	CYC.	BALANCE	0		
43	AREA CLASS. Exe II T2, HIGH EFFICIENCY			DIMENSION		0	0		
44	Inverter duty type			DISASSEMBLY		0			
45	MATERIAL		ACCESSORIES			SPARE PARTS			
46	CASING	SUS 304		COUPLING GUARD		0	GLAND PACKING		
47	IMPELLER	SUS 304		COMMON BED		0	CASE WR'G RING		
48	CASE WR'G RING	SUS 304		ANCHOR BOLTS AND NUTS		0	IMP. WR'G RING		
49	IMP. WR'G RING			COMPANION FLANGE			SHAFT SLEEVE		
50	SHAFT	SUS 304		COOLING PIPING			RADIAL BRG.		
51	SLEEVE	SUS 304		VENT PIPING WITH VALVE			THRUST BRG.		
52	CASE GASKET	PTFE OR EQUAL		DRAIN PIPING WITH VALVE			OIL SEAL PART 0		
53	MECHANICAL SEAL/SEAL PACKING			SEAL PIPING WITH VALVE			MECH. SEAL PART 0		
54	SIC1, SIC1 / PTFE OR EQUAL. OR EQUAL						GASKET & PACKING 0		
55	GRAND PACKING OR EQUAL						THRUST COLLAR		
56									
57	WEIGHT	PUMP	BASE	DRIVER	TOTAL	Kg			
58	CODE & STANDARD MARKER STANDARD			PAINTING					
59	REMARKS 1) JACKET : CASING MUST BE FACKETED WITH DESIGN TEMP.,PRESS., 120°C, 1 BAR G.								
60	2) SPARE PART : 1 SET 포함								
61	* SUPPORT FRAME 2 SET 포함								
62	3) REFER TO THE ATTACHED DRAWING								

### ③ 공정 디자인 자료

#### 1. GENERAL INFORMATION

##### 1.1. Definitions

Owner :

Contractor :

##### 1.2. Language and Units

###### 1.2.1. Language

All documents and drawings to be submitted shall be lettered in English or Korean.

###### 1.2.2. Units, unless otherwise specified.

<u>Glossary</u>	<u>Units</u>
Temperature	°C (Degree C)
Pressure	Kg/cm <sup>2</sup> g, mmH <sub>2</sub> O(psi for flange rating)
Flow Rate	Kg/hr, MT/hr, Nm <sup>3</sup> /hr, and m <sup>3</sup> /hr
Enthalpy	kcal/kg
Length	mm(inch for nominal pipe size)
Energy	kcal
Velocity	m/s
Density	kg/m <sup>3</sup>
Weight	kg

##### 1.3. Basic Design Information

###### 1.3.1. Site Location

Kyunggi-Do, Korea

###### 1.3.2. Climate condition

한국의 일반적인 기후 조건으로 기온 -20~40°C, 상대습도 20~100%를 기준으로 함.

###### 1.3.3. Temperature for design for heating, ventilation and protective purpose

The yearly mean	:	11°C
Winter average	:	-12°C (January)
Min. Temperature	:	-18°C
Summer average	:	30°C (July)
Max. Temperature	:	40°C

#### 1.3.4. Air temperature for cooling tower, air compressors and air blowers

Dry bulb temp.	:	37°C
Wet bulb temp.	:	27°C

#### 1.3.5. Relative Humidity

Max.	:	83%
Min.	:	68%
Average	:	76%

#### 1.3.6. Barometric Pressure

Annual mean air pressure	:	1.016 mb
Monthly mean highest air pressure	:	1.034 mb in January
Monthly mean lowest air pressure	:	999 mb in July

#### 1.3.7. Rainfall

The yearly mean	:	1240 mm
Spring	:	18.1%
Summer	:	57.1%
Autumn	:	18.5%
Winter	:	6.3%

#### 1.3.8. Wind

Max. velocity	:	8.7 m/s (April)
Min. design velocity	:	45 m/s
Average	:	1.3 m/s

#### 1.3.9. Seismic Load

##### 1) For Structure

Earthquake load shall be calculated in accordance with the formula as given in

UBC 1994.

Site condition ; SEISMIC ZONE : ZONE 2  
OCCUPANCY : I = 1.0  
SOIL TYPE : S3

Total design lateral force : V

$$V = [ZIC / RW]^W$$

2) For Equipment

Earthquake force shall not be considered simultaneously with wind loading, or with forces from ingrequent surging fluids in equipment.

Total lateral seismic force calculated using the following equation of ANSI/ASCE 7-88, EQ.7:

$$V = Z.I.C.S.K.W(Z.I.C.S.K = 0.163)$$

(Z) Earthquake risk Zine 2, Table 21

(I) Importance factor shall be, Table 22

(S) Soil profile coefficient S1 (later) as recommended by Geological Investigation

(Table 24, Use CS = 0.14 comservative)

(C) Section 9.4 of ANSI/ASCE 7-88, Equation 8

(CS) As per Section 9.4 and Table 24

(W) Total dead load, Section 3, ANSI/ASCE 7-88, including the partition loading

(K) Horizontal force factor as per Table 23.

1.3.10. Snowfall

Max. record : 230mm for one day period

1.3.11. Utility Conditions

Instrument air

Supply pressure : mim.6.0 kg/cm<sup>2</sup>G  
Dew poing : -40°C at 1.03 kg/cm<sup>2</sup>abs  
Oil content : none

Instrument power supply

For 4-20mA DC transmission signal : 24 V DC  
For PLC system : DC24V or 110V, 60Hz,1Ph  
Uninterruptible power supply (UPS) unit with batteries and charger will be provided.

Electrical power supply

Equipment	Description	Phase	Voltage
Motor	Below 75 kW	3	380
Moter	75kW & above	3	440
Instrument	Instrument	1	220
Space heater for 3.3kV motor		1	220

## 2. SCOPE OF WORK AND SUPPLY

The followings shall be included in the scope of supply & work of bidder, unless otherwise specified. (■-Perform by Vendor, □-Perform by Contractor/Owner)

### 2.1. Scope of Supply

- Equipment proper all necessary equipment with standard accessories
- Emulsifying machine and Geared motor with accessories (motor cover, etc.)
- Coupling and quard
- Mechanical seal or packing
- Tachometer for each item (Total : 7 sets)  
(Manufacturer : AUTONICS, Sensor Type:PR18-5DP, Indicator Type : F4C-2P)
- Common bed.
- Interconnecting pipe, valves, fitting in skid.
- Hot dip galvanized anchor bolts/nuts w/washer
- Initial charge of Iubricants.
- Name plate & lifting device
- Earth Lug
- Others indicated on data sheet or specification
- Spare parts for two(2) years normal operation
- Spare parts for erection and commissioning.
- Special tool , if required
- Other required accessories
- Enclosure of instruments :



## 2.2. Scope of Work

- Engineering design & documentation
- Manufacturing
- Test & inspection
- Performance guarantee
- Painting (anti-corrosion)
- Protection & packing
- Transportation to Kyunggi-Do BKBio.
- Mechanical guarantee
- Maker's standards as approved by purchaser
- Documentation as per "vendor data requirements"

## 2.3. Out of Scope

- Foundation
- Power supply.
- Grounding work (under & above ground).

## 3. APPLICABLE CODES & STANDARDS

### 3.1. Material

All materials such as cast iron, carbon steel and stainless steel is in conformity with ASTM or the standard, which is equivalent to ASTM in manufacturer's countries as to physical and chemical properties, dimensions and identification.

### 3.2. Equipment and machinery

#### 3.2.1. Code and standard

The machines/equipment and accessories covered by this specification shall be designed, inspected and tested in accordance with, but not limited to, the following listed codes, standards of latest edition in effect at time of Purchase Order placement, unless otherwise specified in this specification and the related specification in Attachment.

<u>Equipment and machinery</u>	<u>Code and standards</u>
Pressure vessels	ASME SEC. VIII, DIV.1
Emulsifying machine	Maker Standards

However, the catalogue equipment and package unit such as centrifuge, conveyor, mixer, special pump, compressor, blower, PSA and steam turbine etc. may be designed and manufactured according to manufacturer's standards

### 3.2.2. Design pressure and temperature

Design pressure shall be at least 10% (min. 1.8 kg/cm<sup>2</sup>) higher than maximum operating pressure in general, which is indicated in kg/cm<sup>2</sup>. Design temperature shall be at least 30°C higher than max. operating temperature. In case min. operating temperature is lower than 0°C, this min. operating temperature is applied as design temperature

### 3.2.3. Safety device

All pressure vessels incorporating a source of pressure which is higher than its design pressure, are protected by a relief valve adjusted to the design pressure. Calculation of safety valve shall be made in accordance with API RP 520 and ASME Sec VIII, Div I.

## 3.3. Piping

### 3.3.1. Codes and standards

#### Piping design

ASME B31.3 "Chemical plant and petroleum refinery piping"

#### Piping materials

Pipes	:	ANSI
Fittings	:	ANSI
Flanges	:	ANSI B 16.5

## 3.4. Instrumentation

### 3.4.1. Codes and standards

ISA RP(Recommended practices) and STD.

ICE(International electro technical commission)STD.

ANSI STD. and codes

JIS

KS

### 3.4.2. Signal transmission and control system

Remote transmission and control systems:

General	:	4-20 mA DC. Pneumatic 0.2-1.0 kg/cm <sup>2</sup> G
Temperature	:	mA or Resistance, direct wiring

Local indication and control system

Electric	:	4-20 mA DC
Pneumatic	:	0.2-1.0 kg/cm <sup>2</sup> G
Control valves	:	Electric and pneumatic

### 3.4.3. Instrument enclosure in hazardous area

Explosion proof (or flame proof) certified to the international authorities such as FM, CENELEC, CSA and etc. to be applied.

## 3.5. Electrical

### 3.5.1. Codes and standards

All equipment components, devices and instruments shall comply with the latest applicable standards of KS (Korea) and IEC (other countries) unless otherwise specified.

## 4. TEST AND INSPECTION

In accordance with the requirements that specified in this requisition and/or any Technical Specification attached hereto, vendor shall make inspection and test.

4.1. The vendor shall arrange and perform the tests, examinations and inspection and submit the documents to the purchaser.

4.2. The purchaser, the client and/or their representatives have the right to visit the vendor's relevant shop(s) and have access to materials and/or equipment at any time

to obtain design and manufacturing information and/or to inspect the materials and/or equipment.

- 4.3. Tests, examinations and inspection witnessed and/or approved by the client, purchaser and/or their representatives does not relieve the vendor of his obligation to provide his own quality control and inspection of the materials and equipment to assure himself that the purchaser's requirements are met. Neither does such inspection relieve the vendor from guarantees as to materials, equipment, workmanship or performance or both.
- 4.4. The purchaser and/or his representative reserve the right to reject any equipment and/or material that is found to be of unacceptable quality or workmanship, or fails comply with the purchaser's requirements.
- 4.5. Shop test shall be made by and at the expense of the vendor. Owner's Engineer shall have the option of dispatching a representative to the vendor's factory to observe such tests.
- 4.6. The vendor shall ensure that the materials and equipment sub-ordered shall be inspected in accordance with all pertinent inspection procedures. The vendor shall submit unpriced copies of all direct sub-orders including the specifications and inspection requirements of the sub-order, to the purchaser without any extra charge, if the purchaser requires the ven to do so.
- 4.7. In the event that material(s) cannot be identified as to specifications, or reasonable doubt exists as to its identity, the vendor shall under the purchaser's and/or his representative's instruction carry out verification tests at vendor's expense.
- 4.8. Re-inspection costs incurred by the purchaser and/or his representative due to failure of the vender's /sub-vendor's materials and equipment, or both shall be charged to the vendor.

## 5. GENERAL REQUIREMENT

### 5.1. General

This specification covers the general requirements for all equipment and/or materials required by technical specification.

No work shall be commenced before the purchaser's approval of the relevant documents prepared by the vendor.

## 5.2. Design

The works shall be designed to facilitate inspection, cleaning, maintenance and repair. The design shall incorporate every reasonable precaution and provision for the safety of all those concerned in the operation and maintenance of the works.

## 5.3. Compliance with specification

If the vendor discovers any discrepancy, he shall immediately request clarification in writing to the purchaser. Any work performed before authorization by the purchaser shall be at the vendor's risk. In the event of conflict between the provisions of the following documents, the order of precedence among them shall be as follows.

- 1) Minutes of meeting with the purchaser
- 2) Data sheet
- 3) Technical specification
- 4) Drawings
- 5) General requirements
- 6) Codes and standards
- 7) Vendor's specification

## 5.4. Sub-vendors

In order to attain uniformity throughout the project, the purchaser reserves the right to designate one sub-vendor to each item before placing the purchase order. The price adjustment resulting from there shall be borne by the vendor. The vendor shall submit a list of his sub-vendors for major items with his proposal.

## 5.5. Spare parts

The vendor shall describe all spare parts with each price. All spare parts shall be correctly marked with the manufacture's parts number, parts name, and/or reference number. All spare parts shall be boxed separately from the equipment.

## 5.6. Special tools

The vendor shall supply special tools for installation, operation, repair, maintenance and overhaul of equipment. All special tools shall be packed in toolboxes.

## 5.7. Noise

5.7.1. Vendor shall submit noise level analysis report.

5.7.2. The noise level measured at the property limit (fence) shall be less than 85 dBA (calibrated). The major noisy equipment shall meet the limitation of OSHA of USA.

5.7.3. Vendor shall submit the design data for noise protection device.

## 5.8. Painting

All carbon steel surfaces shall be cleaned and painted with standard paint systems pertinent to chemical plant environment except soleplate and shall have rust inhibitor on machined surfaces.

## 5.9. Guarantee

The Vendor shall guarantee that the equipment furnished is free from fault in design, workmanship, and material, and is of sufficient size and capacity, and is of proper material to fulfill satisfactorily the operating conditions specified. If any defect in design, material, workmanship or operating characteristics during the first year of operation, but not later than 24 months from date of shipment, the vendor agrees to make all necessary or desirable alterations, repairs, and replacements of defective equipment at free of charge. Also, vendor shall pay transportation fee involved to and from the user's plant. No allowance will be made for alterations or repairs without written consent or approval of supplier. If the defect or failure to function cannot be corrected, the vendor agrees to replace promptly at free of charge, or refund the full purchase price. In any case, the vendor will be responsible for contingent liability.

## 5.10. Protection for Shipment and Handling

5.10.1. Each unit shall be suitably prepared for the shipment specified and for outdoor storage for a period of at least six months in a manner requiring no disassembly

prior to operation.

- 5.10.2. The Vendor shall be solely responsible for the adequacy of the preparation for shipment provisions employed with respect to materials and application.
- 5.10.3. Equipment shall be completely free of water/oil prior to any shipment preparation.
- 5.10.4. Exposed finished and machined surfaces, including bolting, shall be given a heavy coating of rust inhibiting compound. Internal metal surfaces shall be sprayed or coated with a suitable rust preventative.
- 5.10.5. Bearing assemblies and exposed ends of shafts shall be fully protected from rusting and entry of moisture and dirt.
- 5.10.6. Adequate protection shall be provided against mechanical damage and atmospheric corrosion during transportation, and for a mutually acceptable period of outdoor storage at job site prior to installation.
- 5.10.7. Those openings that require rust preventative shall be suitably tagged to indicate the type and nomenclature of the rust preventative used.
- 5.10.8. Solid steel plugs shall be used instead of plastic plugs for any part that is pressurized during start-up operation.
- 5.10.9. Open ends of tubes and pipe shall be capped (taping is not adequate) for protection.
- 5.10.10. All equipment shall be packed, securely anchored, and weather protected for the shipment method. Separate, loose, or spare parts shall be boxed, and each part individually protected as required. Each individual container shall be marked both inside and outside with the equipment number and service for which the parts are intended.
- 5.10.11. Each container shall also include a complete Bill of Material identifying each part.

5.11. Documents and Drawings to be submitted

The Vendor shall submit the completed documents and drawings in accordance with the "Vendor Data Requirement" in time. In addition to the above, Vendor shall include in his proposal document all the other information such as;

- Technical description of equipment
- Description of scope of supply
- List of guaranteed items and their values
- Reference data, drawings and calculation sheets, etc
- Installation, Operating and Maintenance manual
- Deviation list (Attached Format)
- Priced all spare part list (Attached Format)
- Recommended priced special tool list (Attached Format)

5.11.1. All vendor's drawings and documents must show purchaser's job number, purchaser's tag number, purchaser's inquiry number, quantity, and vendor's reference no., drawing title, vendor's drawing number and revision number.

5.11.2. Technical specifications, data sheets and final certified copies of all documents shall be in ISO size and in case of A4 they shall have 25 millimeters binding margin on the left edge.

5.11.3. All electric equipment and instruments shall be proper for electric area classification and the IEC certificates shall be provided as follows

- 1) Small junction box & instruments; Eexd(explosion-proof)
- 2) Large control panel & junction: NFPA 496 w/type z
- 3) Electric motor: Eexd or Eexe: With temperature rising limit certificate



## 2. 피틴산, 이노시톨 제품의 소재의 품질평가 및 대량생산 공정의 확립

### 가. 피틴산, 이노시톨 제품의 품질평가 및 보존성 연구

- 흡착수지는 컬럼에 충전해서 이온교환 수지와 유사하게 사용한다. 흡착에 영향을 주는 인자로는 pH, 온도, 통액속도 등이 있으며 이는 각 조건에 맞게 결정되어야 한다.

#### (1) pH의 영향

- 흡착수지는 일반적으로 중성 또는 산성 range로 사용한다. 그 이유는 알칼리에서는 탈착하는 성질이 주로 발생하기 때문이다. 주로 사용하는 최적의 pH는 그 대상에 따라 다르지만, 물리흡착이 추가되므로 처리액의 등전점 부근이 최적의 조건이 된다.

#### (2) 온도의 영향

- 일반적으로 상온에서 별도의 가온, 냉각 없이 행하여도 무방하다.

#### (3) 통액 속도

- 통액 속도는 컬럼의 효율에 영향을 주는 가장 중요한 인자로서 대개 그 운전조건은 실험에 의하여 결정되어 진다. 용도에 따라 어느 정도의 유속범위가 결정되어져 있다. 본 피틴산의 경우 대개 0.5~2 Bed vol/hr의 속도로 통액하여 준다.

#### (4) 통액의 방향

- Up-flow와 Down-flow가 있다. 일반적으로 Up-flow의 경우 비중이 큰 액을 통액하는 경우와 빠른 유속으로 통액하는 경우에 수지가 상할 염려가 있다.

#### (5) 수지의 재생 방법

- 피틴산의 경우 제거된 이온은 중화과정에서 첨가한 칼슘이온이므로 이를 탈착하여 제거하여야 한다. 이는 일반적으로 2%의 염산을 사용한다. 이 경우 탈착된 칼슘은 염화칼슘의 형태로 용출되게 된다.
- 피틴산 생산공정의 핵심사항은 재용해 시의 산을 피틴산을 사용한 다는 것이다. 이렇게

하면, 피틴산으로 인하여 별도의 음이온 교환수지를 사용할 필요가 없다는 것이다. 이는 분리하고자 하는 피틴산의 음이온과 용해한 산의 음이온이 동일하기 때문에 양이온만 제거하면 별도의 처리과정 없이 순수한 피틴산을 얻을 수 있다.

#### 나. 피틴산 및 이노시톨 소재의 대량생산 공정 및 공정의 최적화

- 탈지미강에서 피틴산을 분리하는 가장 공정은 다음 Fig. 4-7과 같다.



Fig. 4-7. Production process of phytic acid isolation from Defatted rice bran.

- 이 중 중화하여 얻어진 것은 피틴산이 아닌 피틴산의 염의 형태인 피틴이라고 불리며 결합한 금속이온의 종류에 따라 나트륨, 칼슘 등 다양한 형태가 가능하다.
- 탈지미강에서 피틴산을 추출하는 방법은 산을 이용한 용매추출법이 가장 널리 알려져 있으며 산업적으로 적용이 용이하다. 따라서 산을 이용한 추출공정에 대한 기본적인 조건을 확인하였다. 추출하여 얻어진 추출액 중 피틴의 정량은 비색법을 이용하였다(Ali I. Mohamed *et. al.* 1986. New chromophore for phytic acid determination. *Cereal Chemistry* 63(6): 475-478)

### (1) 염산 농도의 영향

- 염산의 농도를 0.1~0.6%까지 변화시키면서 탈지미강의 10배수에 해당하는 용매를 가하고 상온에서 6시간 동안 mixing하여 추출하면서 pH의 변화 및 피틴의 추출 수율을 조사하였다. 원료 탈지미강의 피틴의 함량은 11.1%였고 그 결과를 Table 4-7에 나타내었다.

Table 4-7. Effect of HCl concentration on phytin yield

HCl(%)	pH change during extraction				Yield(%)
	0 hr	1 hr	3 hr	6 hr	
0.1	2.9	4.8	5.1	5.7	82.9
0.2	2.3	4.1	4.5	4.6	95.5
0.3	1.7	2.6	2.6	2.7	98.6
0.4	1.4	1.7	1.8	1.9	99.1
0.5	1.2	1.5	1.5	1.5	99.2
0.6	1.2	1.3	1.3	1.3	99.3

- Table 4-7에서 알 수 있는 바와 같이 사용한 염산의 농도는 6시간의 추출을 기준으로 할 때 0.3%면 충분한 것으로 판단하였다. 그 이유는 0.3% 염산을 10배수 가할 경우 6시간 추출에 의해 피틴의 수율이 거의 99%에 달할 정도로 매우 높기 때문에 추가적인 염산의 농도를 높이는 것은 의미가 없다고 보았다. 추출시간의 경우 pH의 변화를 기준으로 볼 때 1시간 이상이면 충분하다고 보았다. 그러나 이는 극히 단시간의 추출에 해당하므로 추출시간은 실제공정에서는 작업의 효율을 감안할 때 2시간 정도로 결정하였다.

### (2) 산의 종류에 따른 영향

- 피틴을 추출하기 위한 산의 종류에 따른 피틴 추출수율을 비교하였다. 이는 피틴을 추출하고 정제하는 과정에서 이온교환과정을 거치게 되는데 이때의 효율에 많은 영향을 미치게 되므로 각각의 이온을 고려하여 피틴의 추출수율을 조사하였다. 일반적으로 염산이 가장 용이하다고 볼 수 있으나 추출시간 및 수율을 감안하여 그 차이를 조사하였다. 산은 일반적으로 사용이 용이한 황산을 기준으로 비교하였다. 그 외의 질산도 이용될 수 있으나, 식품공정상 가능한 부분은 염산이므로 추출수율의 측면에서만 고려하여 비교하였다(Table 4-8).

Table 4-8. Effect of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration on phytin yield

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	pH change during extration				Yield(%)
	0 hr	1 hr	3 hr	6 hr	
0.1	4.5	4.8	5.5	5.7	64.3
0.2	2.2	4.3	4.5	4.6	88.1
0.3	1.7	2.6	2.6	2.9	97.1
0.4	1.5	2.1	2.2	2.5	96.9
0.5	1.3	1.8	1.6	1.7	96.4
0.6	1.2	1.3	1.6	1.5	95.9

- Table 4-8에서 알 수 있는 바와 같이 사용한 황산의 농도는 6시간의 추출을 기준으로 할 때 염산과 마찬가지로 0.3%면 충분한 것으로 판단하였다. 그 이유는 0.3% 황산을 10배수 가할 경우 6시간 추출에 의해 피틴의 수율이 거의 97% 이상에 달할 정도로 매우 높기 때문에 추가적인 황산의 농도를 높이는 것은 의미가 없다고 보았다. 추출시간의 경우 pH의 변화를 기준으로 볼 때 1시간 이상이면 충분하다고 보았다.
- 그러나 이는 극히 단시간의 추출에 해당하므로 추출시간은 실제공정에서는 작업의 효율을 감안할 때 2시간 정도로 결정하였다. 사용하는 산은 염산으로 하고 추출용매의 부피를 4~20배까지 다르게 하면서 추출하였을 경우 추출되는 피틴의 수율은 다음과 같았다. 염산의 농도는 0.3%로 하고 추출시간은 4시간으로 하였다.

### (3) 추출 용매의 부피에 따른 영향

Table 4-9. Effect of HCl volume on phytin yield

용매배수	Yield(%)
4	52.6
7	88.7
10	97.2
15	98.5
20	98.9

- 용매의 배수는 Table 4-9.에 나타난 바와 같이 앞서의 실험에서 얻어진 10배수 이상에서는 증가의 의미가 없다고 보았다. 따라서 최종적인 용매의 부피는 10배수로 확정하였다. 미강은 분쇄된 분말상이므로 여기에서 피틴을 추출하기 위해서는 무엇보다 충분한 양의 용매가 필요하므로 10배수보다 적을 경우 미강 분말이 완전히 잠기지 않는 경우가 발생하여 추출 수율이 저하되고 효율이 떨어지는 결과가 발생한다고 본다.

#### (4) 중화에 사용되는 알칼리의 종류에 따른 회수율

- 추출 후 얻어진 여액에는 피틴이 이온의 형태로 존재하며 여기에는 단백질 역시 다수 존재하여 피틴산을 얻기 위해서는 이를 정제하는 과정이 필요하다. 이를 위하여 피틴산을 중화하여 피틴의 형태로 얻고 이를 재용해한 후 이온교환수지를 거쳐 이온을 제거하면 피틴산의 형태로 얻을 수 있다. 이를 위하여 중화 과정에서 사용되는 이온 특히 1, 2가의 금속이온의 종류에 따른 피틴의 회수율을 조사하여 비교하였으며 이를 Table 4-10에 나타내었다. 사용한 중화용 알칼리로는 NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>로서 이는 식품공정에서 사용가능한 것으로 하였다. 그 외에 암모늄이온 등도 고려할 수 있으나, 식품공정을 감안하여 적용 가능한 것만 대상으로 하였다.

Table 4-10. Effect of HCl volume on phytin yield

Alkali	Recovery of phytin(%)
NaOH	95.5
Ca(OH) <sub>2</sub>	99.2

- 그 결과 사용되는 알칼리의 종류에 따라 큰 차이는 없었으나 2가 이온의 경우가 수율이 다소 높은 것으로 나타났다. 그러나 이는 중화 시 최종적인 적정 pH에 따른 영향도 고려해야 하므로 최종 pH를 8.5이상으로 할 경우 수율에는 별 차이가 없었다. 따라서 사용하는 알칼리제로는 NaOH를 선정하였다. NaOH는 식품용으로 가정 널리 사용되며 물에 대한 용해도가 높아 중화에 소요되는 시간이 짧기 때문이다.

#### (5) 피틴산 및 이노시톨 생산공정의 최적화

- 피틴산을 추출 및 중화하여 얻어진 피틴은 순도에 있어 금속이온을 Na로 가정할 경우 85% 이상으로 매우 고순도였다. 따라서 이를 이온교환수지과정을 통하여 정제하여 피틴산으로 만드는 공정 및 전체공정의 최적운전조건을 결정하고 수율을 산정하기 위한 과정을 거쳤다.

- 이온교환 수지는 양이온 및 음이온 교환 수지를 고려할 수 있으며, 양이온 수지의 경우 중화과정에서 첨가한 알칼리제에 함유되어 있던 Na가 있으며 이를 제거하고 H로 대체하여야 피틴산의 형태로 얻어지게 된다. 음이온 교환 수지의 경우 ~15% 정도에 해당하는 불순물로서 주를 이루고 있는 단백질을 제거하기 위하여 사용하며 이는 과도한 비용의 지출을 요구하는 공정이기도 하다.
- 따라서 본 연구에서는 이러한 과정을 최소화할 수 있는 공정을 개발하고자 하였으며 이를 시도하여 한가지의 이온교환 수지만 통과함으로써 피틴산을 얻을 수 있는 공정을 개발하였다. 이는 전체공정의 효율측면에서 매우 유리하며 원가절감을 통한 제품의 경쟁력을 높일 수 있는 근거가 된다.
- 이노시톨은 피틴산을 가수분해하여 얻는 것으로 1차년도 연구결과를 바탕으로 최적조건을 설정하여 피틴산으로부터 제조하였다. 즉 160°C에서 6시간동안 가수분해한 후 가수분해 결과 생성된 인산기를 Ca(OH)<sub>2</sub>를 첨가하여 pH 6.5로 조정함으로써 침전시켜 제거하였다. 이로부터 얻어진 이노시톨은 농축과정을 통하여 결정화시켰다(Fig. 4-8).

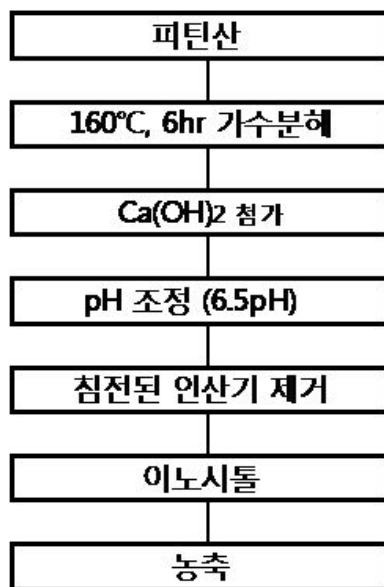



Fig. 4-8. Production process of inositol extraction from phytic acid.

## 제 5 절. 세부과제 : 쌀 부산물 유래 소재의 응용 및 제품화

### 1. 쌀단백질의 규격 및 성적서

- 협동기관 및 위탁기관을 통해 완성된 단백질 함량 70% 이상의 불용성 쌀 단백질 및 수용성 쌀 단백질 제품은 상품화를 통하여 각각 RP70 및 SRP70(가제)이라 이름지었고 구성 영양성분 및 미생물 분석을 통하여 아래와 같은 규격을 설정하여 규격서 및 성적서를 발행하였다(Fig. 5-1, 5-2, 5-3, 5-4).



**BK bio co., Ltd.**  
#405 Starwood Bldg, 5439-1 Sangdaewon-Dong, Jungwon-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do, (zip. 462-819) South Korea,  
Tel. +82-(0)31-743-7361, Fax. +82-(0)31-743-7362

---

### ***SPECIFICATIONS***

**RP70**  
**BK Rice Protein Powder RP70**

**CHARACTERISTICS**  
RP70 is extracted from rice protein part and has an amino acid profile identical to that of whole protein and dried without any carrier.

<b>ANALYSIS</b>	<b>SPECIFICATIONS</b>
Appearance :	White to brown powder
Taste :	Neutrally sweet to slightly bitter
Water content :	< 10%
Protein :	> 70% (as dry basis, Nx6.25)
Carbohydrates :	5 to 15% (as dry basis)
Fat :	< 6% (as dry basis)
Ashes :	< 5%
Solubility :	Insoluble, dispersion in water
Heavy metals (as Pb) :	< 20 ppm
Arsenic :	< 1 ppm

**MICROBIOLOGY**

Total Plate Count :	< 5,000 cfu/g
Yeast/Molds :	< 1000 cfu/g
<i>E. coli</i> :	Negative
Coliform :	Negative

**PACKAGING**  
25 kg/bag

**STORAGE**  
Hygroscopic product, store in a dry place. Best use within : 24 months.

Fig. 5-1. Specifications of insoluble rice powdered protein 'RP70' published by BK bio.



#405 Starwood Bldg, 5439-1 Sangdaewon-Dong, Jungwon-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do, (zip. 462-819) South Korea,  
Tel. +82-(0)31-743-7361, Fax. +82-(0)31-743-7362

## *Certificate of Analysis*

### **RP70**

#### **BK Rice Protein Powder RP70**

#### **CHARACTERISTICS**

RP70 is extracted from rice protein part and has an amino acid profile identical to that of whole protein and dried without any carrier.

<b>ANALYSIS</b>	<b>SPECIFICATIONS</b>	<b>RESULTS</b>
Appearance :	White to brown powder	Conform
Taste :	Neutrally sweet to slightly bitter	Confirm
Water content :	< 10%	4.2%
Protein :	> 70%(as dry basis)	71%
Carbohydrates :	20 to 30% (as dry basis)	17%
Fat :	1 to 5% (as dry basis)	2.2%
Ashes :	< 5%	2.1%
Solubility :	Insoluble, dispersion in water	Conform
Heavy metals(as Pb):	< 20 ppm	Not detected
Arsenic :	< 1 ppm	Not detected
<b>MICROBIOLOGY</b>		
Total Plate Count :	< 5,000 cfu/g	$1.2 \times 10^2$ cfu/g
Yeast/Molds :	< 1,000 cfu/g	Negative
<i>E. coli</i> :	Negative	Negative
Coliform :	Negative	Negative

Fig. 5-2. Analysis certification of insoluble rice powdered protein 'RP70' published by BK bio.





#405 Starwood Bldg, 5439-1 Sangdaewon-Dong, Jungwon-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do, (zip. 462-819) South Korea,  
Tel. +82-(0)31-743-7361, Fax. +82-(0)31-743-7362

## SPECIFICATIONS

### SRP70

#### BK Rice Protein Powder SRP70

#### CHARACTERISTICS

SRP70 is extracted from rice protein part and has an amino acid profile identical to that of whole protein and dried without any carrier.

#### ANALYSIS

Appearance :  
Taste :  
Water content :  
Protein :  
Carbohydrates :  
Fat :  
Ashes :  
Solubility :  
Heavy metals (as Pb):  
Arsenic :

#### SPECIFICATIONS

White to brown powder  
slightly bitter  
< 8%  
> 70%(as dry basis, Nx6.25)  
5 to 15%(as dry basis)  
< 5%(as dry basis)  
< 5%  
Soluble in water  
< 20 ppm  
< 1 ppm

#### MICROBIOLOGY

Total Plate Count : < 5,000 cfu/g  
Yeast/Molds : < 1000 cfu/g  
*E. coli* : Negative  
Coliform : Negative

#### PACKAGING

25 kg/bag

#### STORAGE

Hygroscopic product, store in a dry place. Best use within: 24 months.

Fig. 5-3. Specification of soluble rice powdered protein 'RP70' published by BK bio.



#405 Starwood Bldg, 5439-1 Sangdaewon-Dong, Jungwon-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do, (zip. 462-819) South Korea,  
Tel. +82-(0)31-743-7361, Fax. +82-(0)31-743-7362

## *Certificate of Analysis*

### **SRP70**

#### **BK Rice Protein Powder SRP70**

#### **CHARACTERISTICS**

SRP70 is extracted from rice protein part and has an amino acid profile identical to that of whole protein and dried without any carrier.

<b>ANALYSIS</b>	<b>SPECIFICATIONS</b>	<b>RESULTS</b>
Appearance :	White to brown powder	Conform
Taste :	Neutrally sweet to slightly bitter	Confirm
Water content :	< 6%	4.2%
Protein :	> 70%(as dry basis)	83%
Carbohydrates :	5 to 15%(as dry basis)	10%
Fat :	< 5%	3%
Ashes :	< 5%	2.1%
Solubility:	soluble in water	Conform
Heavy metals (as Pb):	< 20 ppm	Not detected
Arsenic :	< 1 ppm	Not detected
<b>MICROBIOLOGY</b>		
Total Plate Count :	< 5,000 cfu/g	$1.2 \times 10^2$ cfu/g
Yeast/Molds :	< 1000 cfu/g	Negative
<i>E. coli</i> :	Negative	Negative
Coliform :	Negative	Negative

Fig. 5-4. Certification of soluble rice powdered protein 'RP70' published by BK bio.

## 2. 쌀단백질의 특성 연구

### 가. RP70 및 SRP70의 구성 아미노산 조성

- 조단백질 함량 70% 이상의 불용성 쌀단백질 RP70 및 수용성 쌀단백질 SRP70의 구성 아미노산 16종에 대한 정량시험을 진행하였다. 분석은 ninhydrin HPLC 분석을 통해 이루어졌으며 결과는 아래 표와 같다. 분석 결과 RP70 및 SRP70의 구성 아미노산은 유래 물질인 쌀과 거의 동일한 비율로 구성되어있음이 확인되었으며 Glutamic acid의 함량이 약 20%의 높은 비율로 함유되어 있음이 확인되었다. 또한 운동능력 증진 및 피로 회복 등에 관한 효과가 보고되어지고 있는 BCAA(Branched Chain Amino Acid)의 함량이 RP70 19.57%, SRP70 16.98% 의 높은 비율로 함유하고 있음 또한 확인되었다(Table 5-1).

Table 5-1. Table of Composition Amino acid of RP70 and SRP70

구성아미노산	현미(%) (한국농화학학회지 1977)	RP70(%)	SRP70(%)
Aspartic acid	9.5	9.43	10.45
Threonine	3.9	3.62	3.41
Serine	5.2	5.31	5.72
Glutamic acid	19.4	19.89	21.64
Proline	4.6	4.74	4.34
Glycine	4.7	4.63	5.10
Alanine	6.5	5.93	5.91
Valine	6.2	6.39	5.71
Methionine	2.1	2.78	1.86
Isoleucine	4.0	4.27	3.68
Leucine	8.5	8.91	7.59
Tyrosine	4.4	5.33	4.98
Phenylalanine	5.7	6.00	5.73
Lysine	3.6	2.58	2.90
Histidine	2.5	2.31	2.38
Arginine	9.3	7.88	8.60
total	100.1	100	100
*BCAA	18.7	19.57	16.98

나. SRP70의 분자량 분포 특성 확인

- SRP70의 분자량 분포를 확인하기 위하여 HR-MS 분석을 진행하였다. 분석 결과 SRP70의 분자량은 대부분 1000 이하의 분포를 나타내었으며 대부분 300~700의 펩타이드 물질임이 확인되었다(Fig. 5-5, 5-6, 5-7, 5-8).

(1) 실험방법

- 시료농도: 2 mg/ml

● Materials

1	solvent	DW, Acetonitrile(B&J)
2	regent	Formic acid(Aldrich)

● Methods

1	Chromatography	Thermo Accela UPLC		
2	Mass spectrometry	Thermo LTQ-Orbitrap XL		
3	Colum	ACQUITY BEH130C18, 1.7um, 100×2.1mm		
4	Solvent	A: DW(0.1% Formic acid) B: Acetonitrile(0.1% Formic acid)		
5	Elution condition	Time	A	B
		0.0	99	1
		3.0	99	1
		53.0	50	50
		53.5	0	100
		56.0	0	100
		56.5	99	1
		60.0	99	1
6	Flow rate	0.3 ml/min		
7	Injection	3 $\mu$ l		

● Instrument Condition

1	Detection ion mode	Positive ion ((M+H)+)
2	Scan range	MS: m/z 300~1600
3	Spray voltage	4.5 kV
4	Capillary voltage	35 V
5	Capillary Temp	300℃
6	CID energy	35
7	Software	Xcalibur

(2) 실험결과

● MS Chromatogram: 분자량 600기준

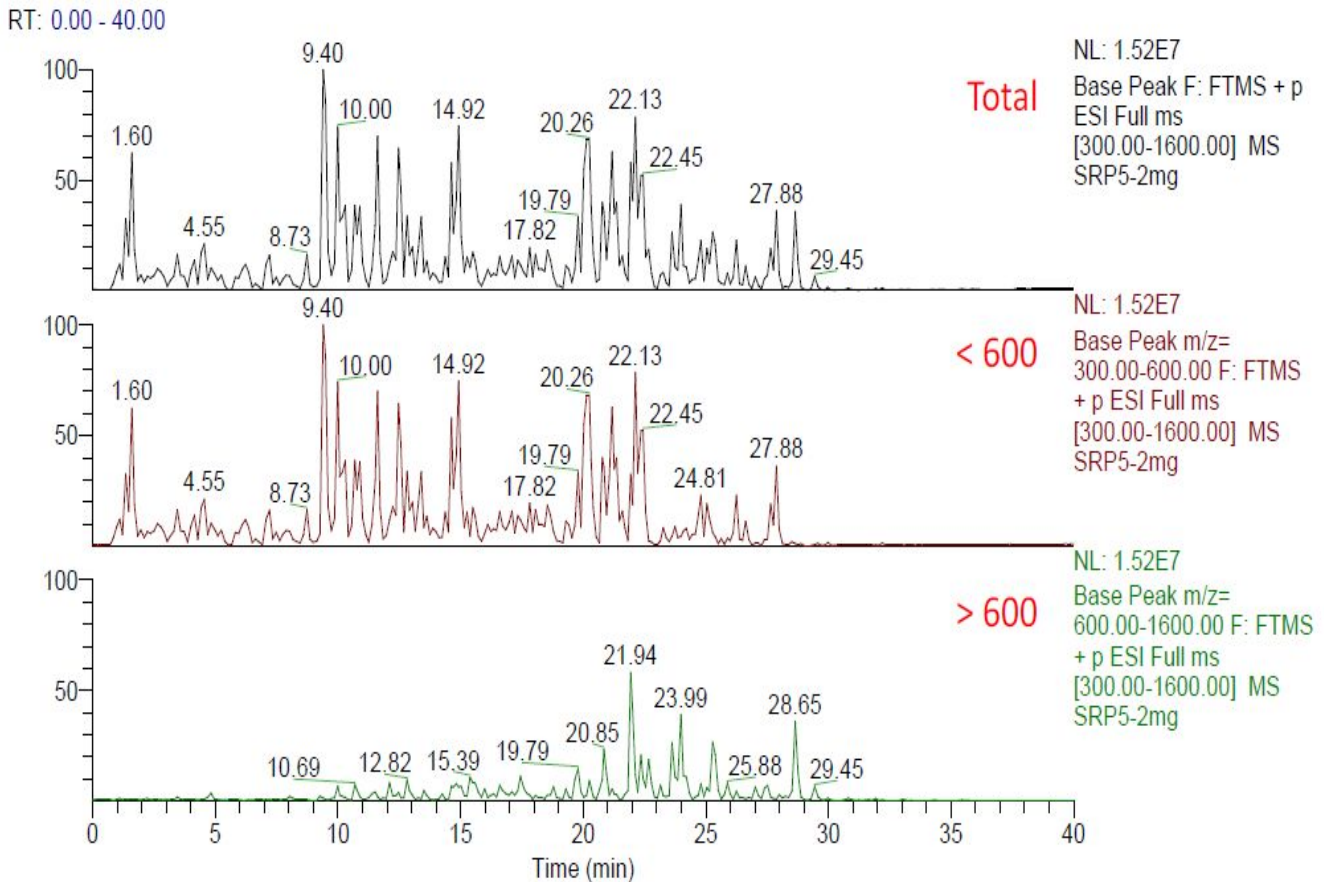


Fig. 5-5. The results of MS Chromatogram using soluble rice protein.

● MS Chromatogram: 분자량 범위별 분석 결과

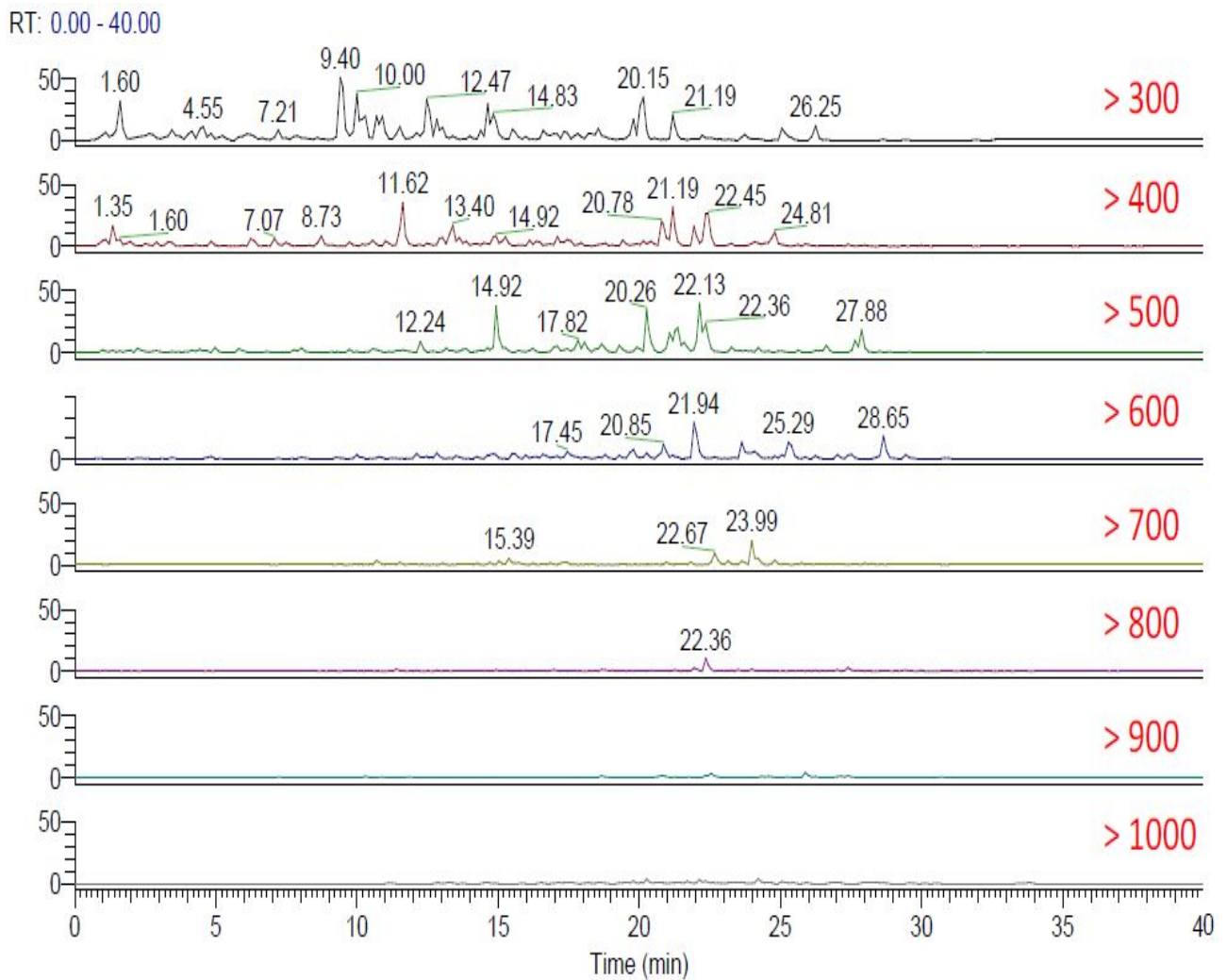


Fig. 5-6. The results of MS Chromatogram using soluble rice protein.

- Mass spectrum:  $m/z$  300~1600  
RT: 0.01-37.73 AV: 298 NL: 1.25E5

F: FTMS + p ESI Full ms [300.00-1600.00]

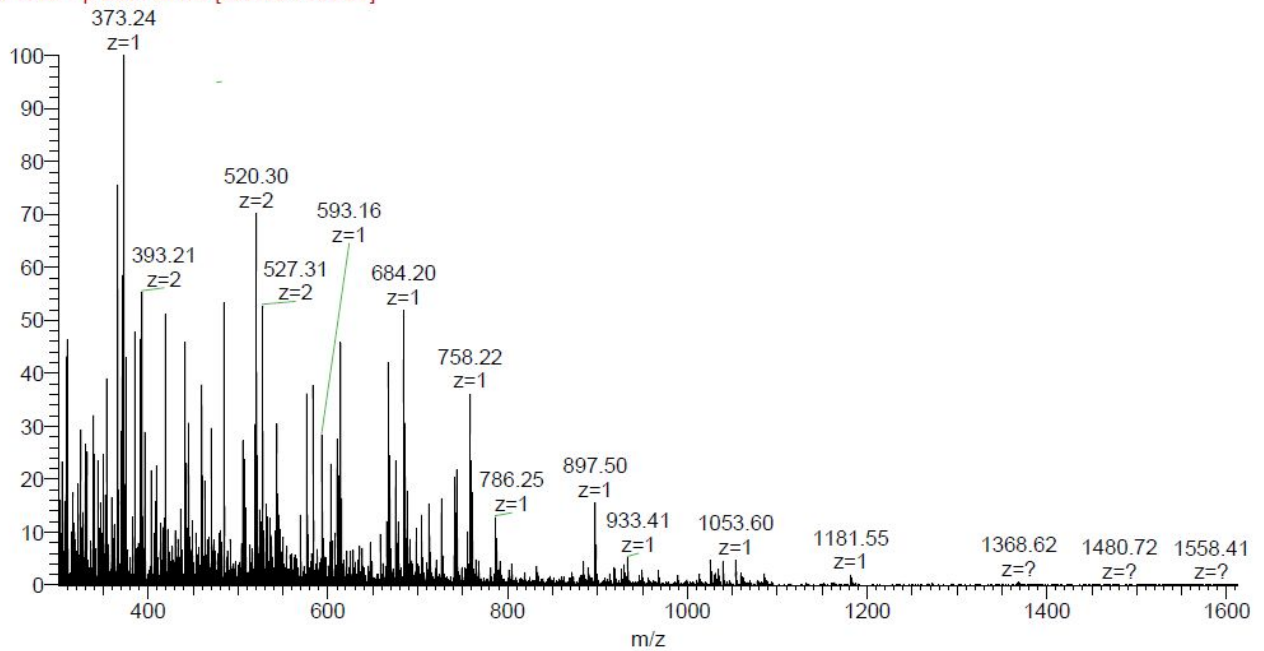


Fig. 5-7. The results of MS Chromatogram using soluble rice protein.

- Mass spectrum:  $m/z$  300~1000  
RT: 0.01-37.73 AV: 298 NL: 1.25E5

F: FTMS + p ESI Full ms [300.00-1600.00]

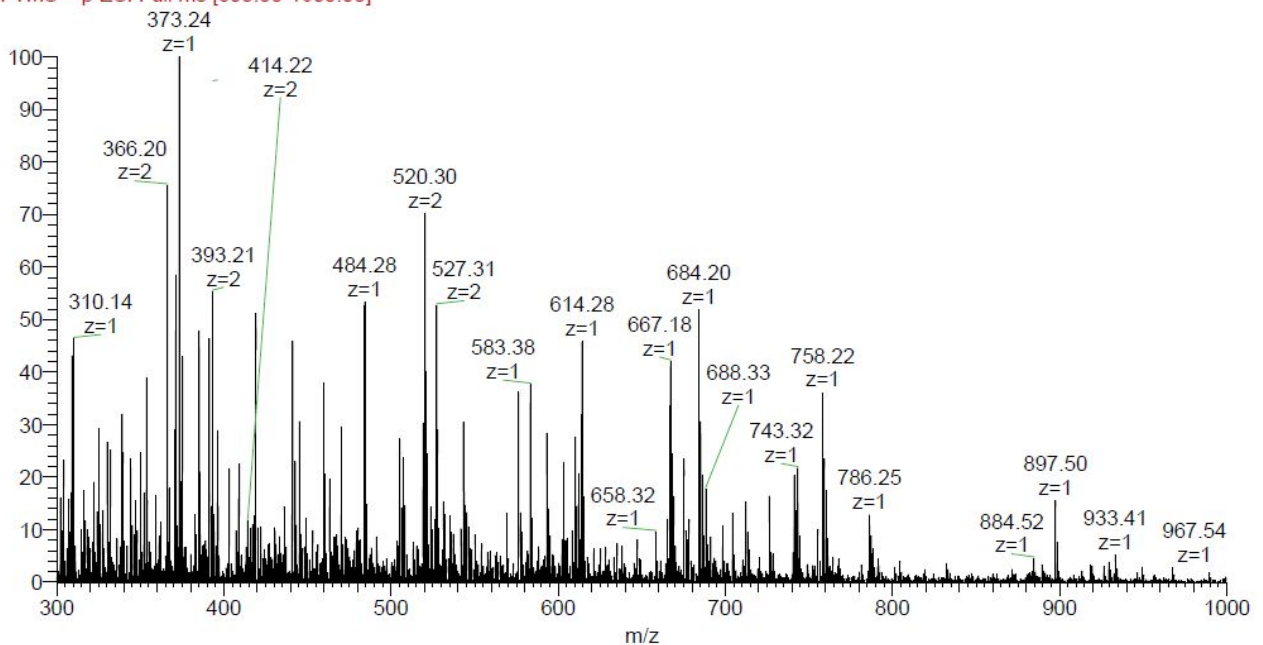


Fig. 5-8. The results of MS Chromatogram using soluble rice protein.

#### 다. 아미노태 질소

- SRP70의 아미노산으로 분해 정도를 파악하기 위하여 아미노태 질소 함량을 측정하였다. Formol 적정법에 따라 용출액 2 ml를 100 ml measuring flask에 취하고 증류수로 100 ml에 맞추어 교반하였다. 희석된 용출액 25 ml를 100 ml 비이커에 취하여 0.1N-NaOH를 첨가하여 pH meter로 pH 8.4가 되도록 하였다. 여기에 35% formaldehyde solution (v/v)(Samchun Pure Chemical) 20 ml를 가한 다음, 다시 0.1 N-NaOH로 pH 8.4까지 중화 적정 하였다. 다음 식에 대입하여 아미노태 질소값을 분석하였다. 그 결과 SRP70의 아미노태 질소 함량 600±42 mg%로, 아미노산 단위로의 분해 정도가 크지 않음을 확인 할 수 있었다.

$$\text{아미노태질소 (mg\%)} = \frac{(A - B) \times 1.4 \times F \times D \times 100}{S}$$

A : 0.1 N-NaOH의 소비 ml

B : 0.1 N-NaOH의 공실험 소비 ml

F : 0.1 N-NaOH의 factor 값

D : 희석배수

S : 시료 채취량(g)

1.4 : 0.1N-NaOH 1ml에 상당하는 질소량(mg)



## 라. pH 안정성

- SRP70의 pH에 따른 안정성을 확인하기 위하여 각 pH에서 SRP70 수용액의 단백질 함량을 측정하였다. 일반적으로 단백질의 경우 pH 4 부근에서 등전점을 가지며 침전되는 현상을 나타내며, 대표적인 우유 단백질인 알부민의 경우 pH 4.6에서 등전점을 나타낸다. 따라서 pH 2~12에서 전반적인 SRP70 수용액의 용해도를 측정하였고 pH 4~5의 범위를 주요 범위로 판단, 좀 더 세부 범위에서 용해도를 측정하였다.
- 실험 방법은 SRP70을 10배의 증류수로 희석한 뒤 각 시험 용기에 1 ml씩 분주하고 0.1N-NaOH 및 0.1N-HCl을 이용하여 pH를 조정, 총 부피가 10 ml가 되도록 하였다. 그 다음 각 용액의 상등액을 취하여 lowry-method를 이용, 수용성 단백질을 정량하여 각각의 pH 용액에 따른 SRP70의 용해도를 측정하였다.
- 그 결과 pH 5~12 범위의 수용액에서 매우 안정적이었으며, pH 4.8에서부터 점차 침전 현상이 그리고 pH 4.2에서 최대 침전도를 보였다. 따라서 SRP70의 등전점(Isoelectric point)을 pH 4.2로 결론지었다(Fig. 5-9).

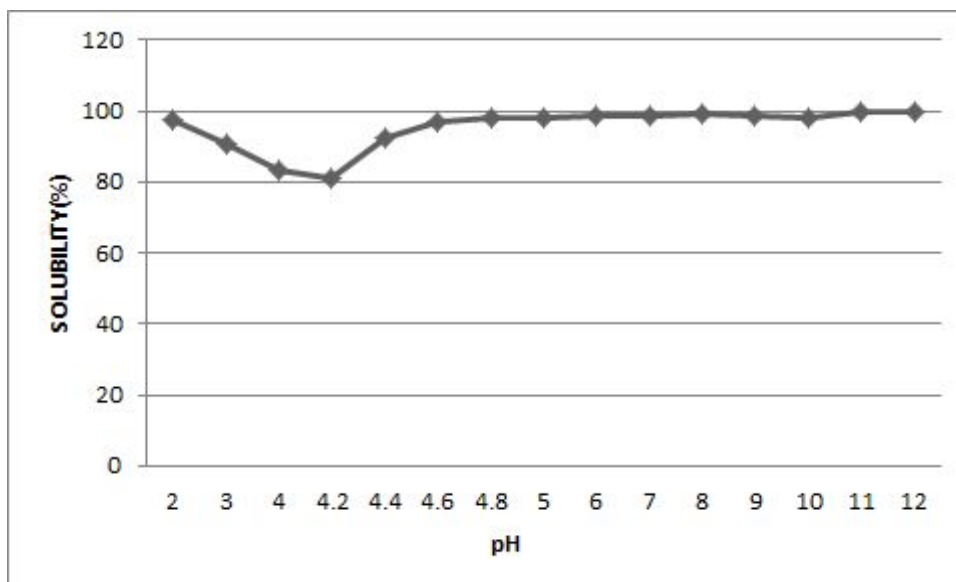


Fig. 5-9. Solubility graph of soluble rice protein as pH conditions.

마. 열안정성

- SRP70의 열안정성 확인을 위한 실험을 실시하였다. SRP70을 증류수로 100배 희석한 뒤 15 ml test tube에 10 ml 씩 분주한 다음 60, 80, 100, 120℃의 온도에서 각각 0.5h 및 1h 처리 하였다.
- 그 결과 80℃, 1h 처리 조건에서부터 단백질의 감소가 점차 시작되었으며, 100℃ 1h에서 약 2%의 손실이 그리고 120℃ 1h에서 약 3%의 단백질 손실이 관찰되었다. 따라서 SRP70이 열에 비교적 안정한 물질임을 확인 할 수 있었고 일반적인 음료 제조 공정에서의 살균 및 공정 온도에서도 안정할 수 있음이 확인되었다(Fig. 5-10).

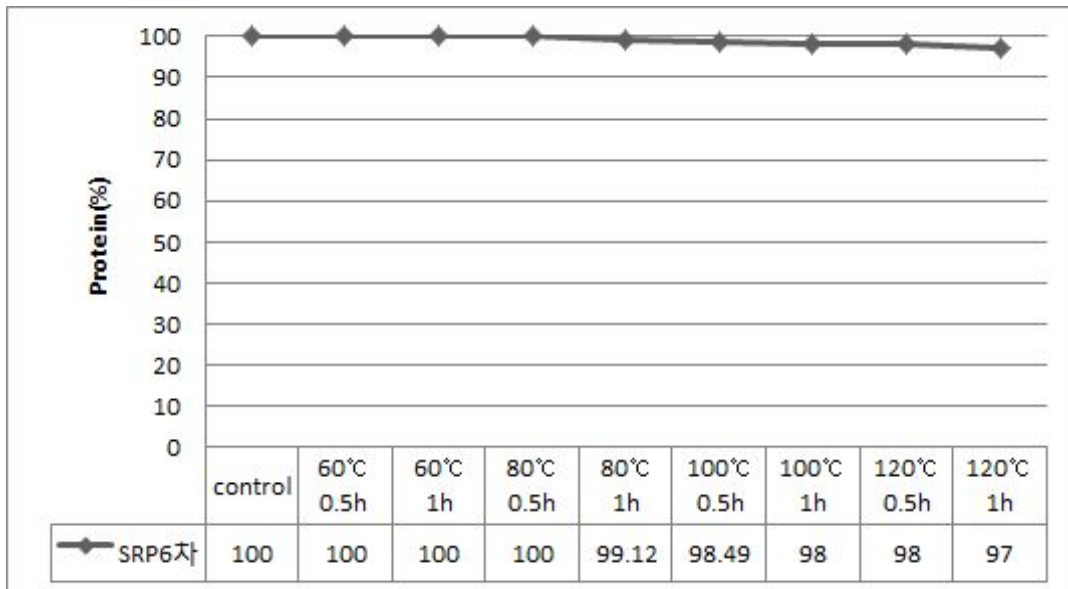


Fig. 5-10. Soluble protein contents of soluble rice protein as reaction temperature and time.

바. 저장기간에 따른 안정성

- 수용성 쌀단백질의 음료에의 가공 적성을 시험해 보기 위하여 SRP70 수용액을 제조한 뒤 저장 기간에 따른 단백질 함량 변화를 시험해 보았다. 또한 저장기간에 따른 위생 안정성을 확인해 보기 위하여 살균 후 저장 기간에 따른 미생물 시험도 동시에 진행하였다. 시험은 SRP70을 증류수에 넣어 3% 수용액을 제조한 뒤 100℃, 15min autoclave를 이용하여 살균한 다음 0, 1, 2, 3, 4, 8, 12 주간 Lowry-method를 이용한 단백질 정량시험 및 미생물 시험을 진행하였다.
- 시험결과 0, 1, 2, 3, 4, 8, 12 주간 단백질 함량에 유의적인 변화는 없었으며(Fig. 5-11), 살균 후 12주 이후까지 일반세균 및 대장균, 대장균 군 불검출로 판정되어 100℃, 15min 살균에 의해 멸균되었으며, 12주간 멸균상태가 유지되었음을 확인할 수 있었다(Table 5-2).

Table 5-2. Microbiology test results of hydrolysed SRP70 as storage period

weeks	Total bacteria	E. coli	coliform
0	ND	ND	ND
1	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND

\*ND : No Detected

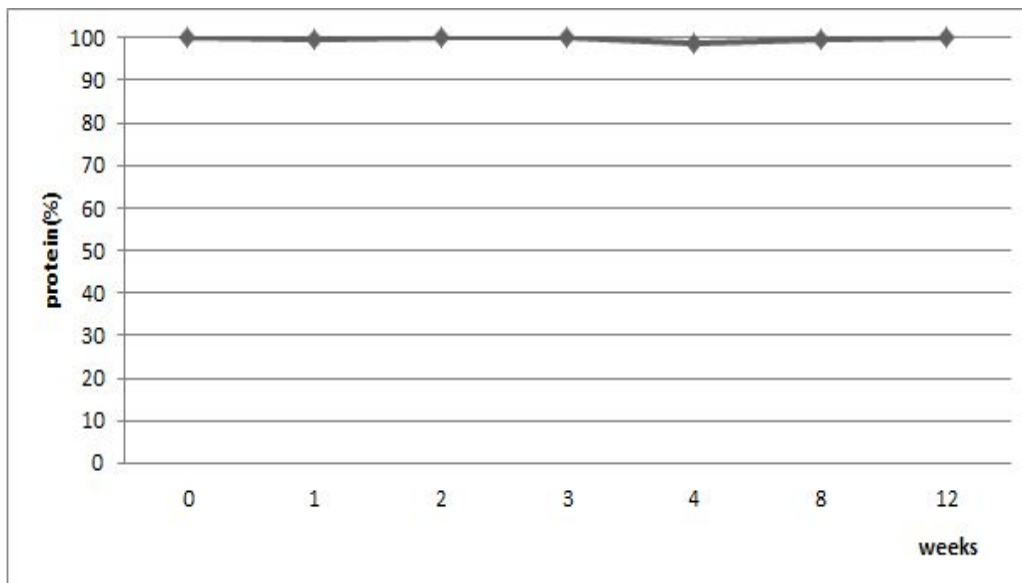


Fig. 5-11. Soluble protein contents of soluble rice protein as storage period.

### 3. 쌀 부산물 유래 소재의 제품화 및 응용

#### 가. 쌀 단백을 활용한 제품개발

##### (1) 수용성 쌀단백질을 활용한 쌀 우유(Rice Milk) 제조법 개발

- 쌀로부터 분리된 단백질은 콩 또는 우유 단백질에 비해 알레르기 발생 가능성이 적어 알레르기를 보유한 현대인들이 늘어나고 있는 만큼 공급의 필요성 또한 늘어나고 있다. 현재 해외에서는 이러한 알레르기를 지닌 사람을 위해 그리고 새로운 맛의 단백질 공급원으로서 rice milk 를 개발하여 판매 중에 있고, 국내 유음료 업체에서 또한 시도한 바가 있다.
- 그러나 국내에서 개발된 rice milk는 우유와 혼합된 형태의 음료로서, 우유에 알레르기가 있는 사람들에게는 음용이 불가능하다는 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 실험에서는 단백질 공급원 음료로서 100% 쌀만을 이용하여 rice milk를 개발하여 쌀단백의 이용 가능성을 확인해 보았다.

##### (가) 쌀 우유 base 제조

- ① 쌀 100 g을 1시간동안 불린 뒤 믹서로 2~3분간 미분쇄 및 호화시킨다.
- ② 호화된 쌀에  $\alpha$ -amylase 0.1~1%를 첨가한 뒤 water bath에서 100℃, 1시간동안 반응시킨다.
- ③ ②의 반응이 완료되면 50℃의 water bath에서 protease를 0.1~1% 첨가한 뒤 1시간동안 반응시킨다.
- ④ 반응이 완료되면 거즈를 이용해 여과한 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한다.

##### (나) 관능조건 부여 실험

- 쌀로부터 추출한 수용성 쌀 단백질이 첨가된 쌀당화액을 기본 베이스로 한 쌀우유(Rice milk)의 개발을 목적으로 배합비 조성 실험을 하였다. 쌀우유 제품의 관능특성은 기존의 곡물의 느낌과 단맛이 강조되었던 쌀 가공음료와 차별화 하여 우유와 유사한 관능적 특성을 가지는 풍부하고 고소한 맛을 부여하는데 주력하였다.
- 이를 위하여 효소처리를 통해 제조된 쌀 당화액을 제품의 기본 베이스로 하여 쌀 당화액에서 부족한 지방의 풍미를 더하기 위해 식물성 지방의 첨가를 검토한 결과 flavor가 소량 첨가되었을 때 제품내의 지방함량에는 큰 변화 없이 쌀 당화액 고유의 맛과 어우러진 부드러운 관능특성을 부여할 수 있었다. 또한 milky한 느낌을 강조하기 위한 향의 첨가 예비 실험 결

과 flavor 접목된 타입이 가장 우수한 관능 결과를 나타내었다.

- 또한 제품 보존 시 발생하는 침전문제의 개선을 위하여 안정제의 첨가를 검토한 결과, gum 을 0~1% 첨가하였을 때 제품 내 쌀 유래성분의 자연적인 침전현상의 개선이 가능하였으며, 적당한 점도가 부여되어 풍부한 조직감의 부여가 가능하였다.

**(다) 영양성분 강화 실험**

- 쌀우유 제품의 영양성분 중 단백질과 칼슘함량의 함량을 일반 우유 수준으로 강화하기 위하여 관능조건이 충족된 쌀우유에 추가적으로 칼슘제제와 쌀추출 단백질의 배합비 설정 실험을 수행하였다. 칼슘함량을 일반 우유수준의 1 mg/ml로 맞추기 위한 칼슘제제의 첨가 비교 실험 결과 용해도가 우수하며, 미색을 강조시켜 줄 수 있는 유화 액상 탄산칼슘 제제의 첨가 (배합비 0.625%)를 통하여 칼슘 함량을 일반 우유수준으로 강화 할 수 있었다.
- 단백질 함량의 강화를 위한 실험 결과, 효소 처리하여 얻어진 쌀 당화액의 단백질 함량은 21 mg/ml 로서 쌀 우유 제품의 단백질 함량을 우유수준의 30 mg/ml에 맞추기 위해 9 mg/ml 수준의 쌀 추출 단백질 첨가를 검토 하였다. 수용성 쌀 추출 단백질 SRP70의 첨가를 검토 비교하기 위하여 현재 시중에 유통 및 판매되고 있는 A사와 B사의 쌀 추출단백질과 쌀우유 첨가 시의 용해도 및 관능특성을 비교 실험 하였다. A사와 B사의 쌀추출 단백질 및 수용성 쌀 추출 단백질 SRP70의 단백질 함량 및 그에 따른 제품의 배합비는 Table 5-3에 나타내었다.

Table 5-3. Protein percentage and mix ratio as a type of rice extracted proteins

구 분	단백질 함량(%)	배합비(%)
A사 쌀 추출 단백질	80	1.125
B사 쌀 추출 단백질	40	2.25
수용성 쌀 단백질 SRP70	70	1.285

- 수용성 쌀 추출 단백질 SRP70의 첨가에 의한 쌀우유의 관능 특성 비교를 위한 관능검사는 시중에 판매되어지는 A사와 B사의 쌀 추출 단백질과 비교하여 5℃로 냉장 보관 되어 있는 시료를 관능검사 실시 전 30분 전에 냉장고에서 꺼내어 약 50 ml 씩 흰 종이컵에 담아 관능 검사 요원에게 제공하였다.

- 훈련된 20명의 관능검사 요원은 다양한 연령과 성별의 직원으로 구성하였다. 시료 용기에는 무작위로 추출한 3자리의 숫자를 표시하고 제공 순서를 각각 다르게 제공하였고 입을 헹굴 수 있도록 물을 준비하였다. 관능검사의 항목은 쌀우유의 색깔, 냄새, 맛의 3가지 항목을 9점 평점법으로 평가한 뒤 전체적인 기호도를 결정하였다.

**(라) 쌀추출 단백질 관능비교 결과**

- 수용성 쌀 추출 단백질의 관능 특성 비교를 위하여 시중에 유통중인 A사와 B사의 쌀 추출 단백질과 수용성 쌀 추출 단백질 SRP70이 첨가된 쌀우유의 색, 향, 맛의 9점 평점을 통한 전체적인 기호를 평가한 결과는 Table 5-4와 같다.
- 세가지 시료의 색은 모두 쌀 당화액과 쌀 추출 단백질로부터 유래된 연한 황색을 띠는 미색을 나타내어 유의적인 편차를 보이지 않았고, 향과 맛의 경우 A사와 B사의 쌀 추출 단백질로부터 유래되는 이미와 이취의 영향으로 수용성 쌀 추출 단백질 SRP-70이 높은 점수를 받았다.
- 전체적인 기호도는 A사의 쌀 추출 단백질이 첨가된 시료를 선택한 인원이 4명, B사의 쌀추출 단백질이 첨가된 시료를 선택한 인원은 없었으며, 수용성 쌀 추출단백질 SRP-70을 선택한 인원이 16명으로 평가되어 쌀우유의 단백질 강화를 위한 쌀 유래 단백질급원으로서 수용성 쌀 추출단백질 SRP-70의 첨가(배합비율 1.285%)가 적합한 것으로 판단되었다.

Table 5-4. The results of sensory test as a type of rice extracted proteins

samples	Rice protein Dosage(%)	Color	Flavor	Taste	Overall Preference
A-RP	1.125	5.8±0.2 <sup>a</sup>	5.1±0.3 <sup>b</sup>	4.7±0.1 <sup>ab</sup>	4
B-RP	2.25	5.6±1.0 <sup>a</sup>	3.6±0.4 <sup>c</sup>	4.2±0.7 <sup>b</sup>	0
SRP70	1.285	5.4±0.8 <sup>a</sup>	7.3±1.1 <sup>a</sup>	6.7±0.6 <sup>a</sup>	16

A-RP : A사 쌀 추출단백질, B-RP : B사 쌀 추출단백질, SRP-70 : 수용성 쌀 추출단백질

- 제조실험을 통해 확정된 쌀 우유의 배합비는 Table 5-5와 같다. 쌀추출 단백질이 첨가된 쌀 우유의 제조방법은 쌀당화액 97.91%를 기본 베이스로 하여 수용성 쌀 추출 단백질 SRP70 1.285%, 탄산칼슘 0~1%, milky powder 0~1%의 첨가 후 gum 0~1%를 40~50℃의 온수조

건에서 완전 용해시킨 후 flavor를 첨가하여 고르게 혼합된 혼합물을 60~70℃로 가열하여 균질화 하고, 그 균질된 용액을 예열한 후 냉각하는 균질, 멸균 및 냉각공정을 진행하게 된다.

- 상기 공정을 통해 열처리 및 냉각 된 쌀우유를 정해진 용기에 충전하여 포장하고 저장하는 포장 및 저장 공정을 진행함으로써 쌀우유의 제조를 완료하게 된다.

Table 5-5. Mix ratio of rice milk

원재료명	배 합 비(%)	비 고
쌀 당화액	70~100	단백질 함량 30 mg/ml
SRP70	1.285	
milky powder	0~1	-
탄산칼슘	0~1	-
립팩	0~1	-
gum	0~1	-
합 계	100	-



<Rice Milk>



<Rice Drink>

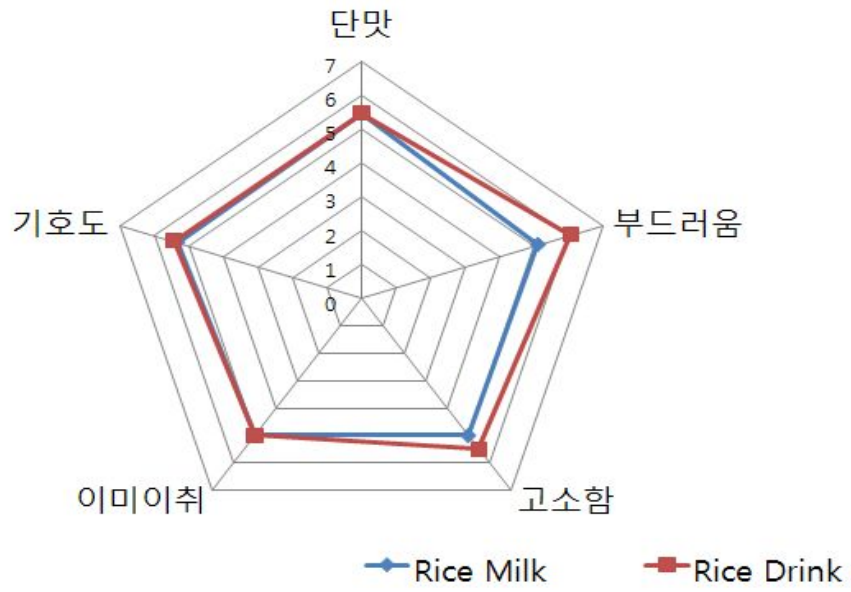


Fig. 5-12. Sensory test of Rice Milk and Rice Drink - result of total average analysis.



(2) 수용성 쌀단백질을 활용한 단백질 음료 제조법 개발

- SRP70의 기능성 단백질 음료 개발 가능성을 확인하기 위하여 수용성 쌀 단백질을 이용하여 음료를 제조하였다. 일반적인 아미노산 및 단백질 보충제의 경우 60kg 성인 남성기준, 1일 4g 을 섭취하도록 권장하고 있다. SRP70의 경우 약 70%의 아미노산 및 펩타이드를 함유하고 있으므로 이를 환산하여 1일 5.2g을 권장량으로 설정하여 200ml 캔음료 제조, 1일 4 캔 권장 SRP70 1.3g 을 함유하는 단백질 음료를 제조하였고 음료의 배합비 및 제조 공정은 아래와 같다(Table 5-6).

Table 5-6. Compounding ratio of protein drink produced by using SRP70

원재료	%(wt/wt)
쌀단백질	0.65
과당	5~10
salt	0.01~0.5
구연산	0.001~0.5
과일농축액	1~2
과일향	0.01~1
소다향	0.01~1
펙틴	0.1~1
정제수	85~90
합계	100

- 위와 같은 배합을 통해 제조된 단백질 음료 A와 시판중인 아미노산 음료 두가지 B, C 를 대상으로 선호도 조사를 실시하여 보았다. 평가는 음료의 맛과 향, 전체적인 선호도를 대상으로 하여 9점 평점을 통하여 실시하였으며 20명의 패널을 대상으로 이루어졌다.
- 검사 결과 SRP70을 이용하여 제조된 단백질 음료의 맛과 향 그리고 전반적인 기호도 조사에서 각각 55%, 45%, 70%의 선호도를 보이며 가장 높은 점수를 받았으며 B사 및 C사의 단백질 음료에는 맛과 향 그리고 기호도에서 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 결론적으로, SRP70을 이용한 기능성 단백질 보충음료의 제조 및 상업화의 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다(Table 5-7).

Table 5-7. 쌀 추출 단백질 별 관능검사 결과

samples	Taste	Flavor	Overall Preference
A(SRP70)	11	9	14
B	5	5	4
C	4	6	2

A-RP : A사 쌀 추출단백질, B-RP : B사 쌀 추출단백질, SRP-70 : 수용성 쌀 추출단백질

### (3) Extruder 기술을 이용한 씨리얼 믹스 제품의 개발

- Extruder 기술은 식품공업에서 주로 사용하는 기술로서 특히 곡류 식품의 가공분야, breakfast cereal 제품 및 스낵, bar 형태의 영양강화 식품, 유아식 등 그 활용 범위가 매우 넓다.
- 본 연구를 통해 개발된 제품 중 불용성 쌀단백 제품은 그 성상 및 관능적 특성에 있어 Extruder 기술을 적용하기에 가장 적당하다고 판단하였고, 이를 원료로 이용하여 그레놀라(granola) 제품 개발을 시험해 보았다. 원료 및 성분배합비율은 Table 8과 같이 불용성 쌀단백질 RP70 5~20%를 함유하는 것으로 하였고 'D사'의 Extruder 기기 및 그레놀라 제조 기술 노하우를 바탕으로 제품을 제조하였다. Extruder 기술을 이용한 제품의 제조공정도는 Fig. 5-13과 같다.
- 현재 'D사'의 그레놀라 제품은 요거트 등 국내 유가공업체의 제품에 공급되어지고 있다. 본 연구를 통하여 획득 및 건조, 보관된 주박을 이용하여 그레놀라 제품을 제조한 결과, 관능적으로 좋은 평가를 받았으며 영양적인 면에서도 우수한 제품 제조가 가능한 것으로 판단하고 있다. 따라서 현재 유통되고 있는 그레놀라 제품에의 사용이 가능할 것으로 기대하고 있다.

Table 5-8. Mixed ingredient proportion and raw material of Granola

원 료 명	성분 배합 비율 (%)	비고
귀 리	10~30	
R P 7 0	5~20	
백 설 탕	10~30	
식용 유지	5~10	
소 맥 분	1~10	
견 과 류	1~5	
견과류분말	1~5	
과 당	1~10	
미 분	1~10	
정 재 염	0.29	
바 닐 린	0.08	
flavor	0.01~0.1	
콘플레이크	30	
합계	100.00%	



Fig. 5-13. Flow chart of granola using insoluble rice protein and cooked granola.

나. 쌀 단백질을 이용한 시제품 적용 및 상용화 추진

(1) 특수영양식

- ‘D사’의 제품은 액상형의 특수영양식으로서 단백질 보충이 필요한 환자를 위하여 1캔당 13 g의 단백질이 함유되어있다. 단백질로는 분리대두단백 및 카제인 가수분해물을 사용하던 제품으로 (주)비케이 바이오에서는 시립박으로부터 생산된 불용성 쌀 단백질을 제안하였고 시제품 생산을 시도해 보았다 (Fig. 5-14)(Table 5-9).
- 제품의 제조는 기존의 단백질 대신 불용성 쌀 단백질을 원료로 사용하였고 제조공정도는 Fig. 5-14와 같다. 특수영양제품은 환자를 대상으로 한 영양식으로서 단백원을 쌀 단백질로 대체 할 경우, non-GMO에 따른 안전성 증가 및 allergy 발생 가능성이 적어져 환자식으로서의 기능성 및 소비자 선호도 또한 높아질 것으로 기대된다.

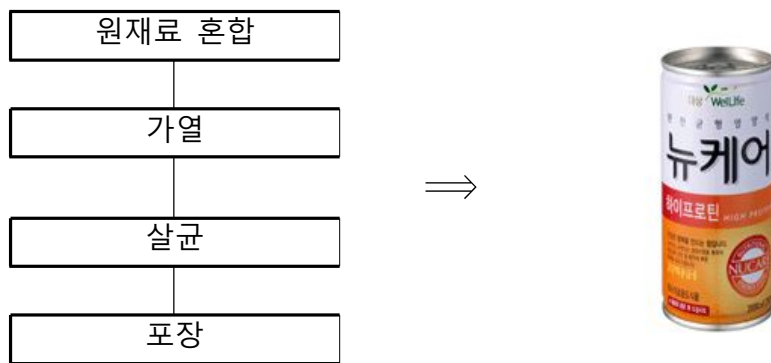


Fig. 5-14. Production process of "Nutrition drink" using "RP 70".

Table 5-9. Nutrition composition of "Nutrition drink" product

1회분량당 (200ml)	함량	1회분량당
열량	200 Kcal	
탄수화물	24 g	
식이섬유	0.8 g	
당유	3.20 g	
단백질	12 g	24%
지방	6 g	
포화지방	2.40 g	
트랜스지방	0 g	
콜레스테롤	0 mg	
나트륨	180 mg	

(2) 다이어트 선식

- ‘K사’의 다이어트 선식 제품은 식이조절용 및 다이어트용 선식으로 곡류가공품이다. 단백질의 경우 영양소 함량 기준에 맞추기 위해 현재 수입산 쌀단백분말을 사용하고 있고, (주)비케이바이오 에서는 국내 생산된 불용성 쌀단백분말을 제안, 시제품 생산을 시도하였다 (Table 5-10).
- 제품의 제조는 기존의 수입산 쌀 단백질 대신 본 연구를 통해 개발된 “RP 70”을 사용하였으며 제품의 제조공정도는 Fig. 5-15와 같다.



Fig. 5-15. Production process of "diete cooked food" using "RP 70".

Table 5-10. Nutrition composition of "diete cooked food" product

영양성분 (40g당)	함량	영양소	함량
열량	125 cal	비타민B1	0.3 mg(30%)
탄수화물	26 g(8%)	비타민B2	0.36 mg(30%)
식이섬유	9 g(36%)	비타민B6	0.45 mg(30%)
당류	8 g	비타민C	100 mg(100%)
단백질	6.5 g(12%)	비타민E	10 mg a-TE(100%)
지방	1 g(2%)	나이아신	3.9 mg NE(30%)
포화지방	0 g(0%)	엽산	250 ug(100%)
트랜스지방	0 g(0%)	아연	2.4 mg(20%)
콜레스테롤	0 mg(0%)	철	15 mg(100%)
나트륨	180 mg(0%)	칼슘	140 mg(20%)
비타민A	210 ug RE(30%)		

### (3) 시리얼

- 'D사'의 시리얼 제품은 곡류가공품으로 시중의 일반 시리얼에 비해 단백질을 강화시킨 것이 특징인 단백질 강화 시리얼이다. 본 연구 기관에서는 국내 생산된 불용성 쌀단백 분말을 새로운 단백질 원료로서 제안하였고, 샘플 생산 결과 관능적으로 우수한 평가를 받아 시리얼 제품 원료로서 검토 중에 있다(Fig. 5-16)(Table 5-11).



Fig. 5-16. Production process of "cereal" using "RP 70".

Table 5-11. Nutrition composition of "cereal" product

1회 제공량 당 함량		% 영양소기준치	1회 제공량 당 함량		% 영양소기준치
열량	113 kcal		비타민B1	0.32 mg	32%
탄수화물	27 g	8%	비타민B2	0.38 mg	32%
식이섬유	0 g	0%	비타민B6	0.38 mg	25%
당류	10 g		엽산	62 µg	25%
단백질	1 g	2%	비타민C	25 mg	25%
지방	0.1 g	0%	비타민D	1.26 µg	25%
포화지방	0 g		비타민E	2.50 mgα-TE	25%
불포화지방	0 g		나이아신	4.26 mgNE	33%
트랜스지방	0 g		철분	1.87 mg	13%
콜레스테롤	0 mg	0%	아연	1.78 mg	15%
나트륨	160 mg	8%	칼슘	0 mg	0%
비타민A	175 µg RE	25%			

다. 쌀 미강 추출액을 이용한 시제품 적용

- 피틴산 소재는 레토르트 등의 즉석 식품류, 통조림 제품 및 야채 등의 신선식품의 산화방지, 변색방지, 미생물 생육억제 및 유통기한의 연장 등을 위하여 광범위하게 사용되어지고 있다. 본 실험에서는 연구를 통해 개발된 피틴산 소재의 산업화를 위하여 식품의 가공 공정에 적용을 시도해 보았다(Fig. 5-17)(Table 5-12).

(1) 즉석쌀밥

- 미강으로부터 추출된 피틴산 소재는 즉석쌀밥 등의 쌀가공 식품에 산화방지 및 미생물 증식 억제 등의 목적으로 사용되어지고 있다. 국내 'O사' 즉석쌀밥 제조업체에서는 현재 수입산 피틴산을 즉석밥 제조시 원료로 사용하고 있고, 본 연구기관에서는 미강으로부터 추출된 피틴산 소재를 제안하여 제품 생산에의 적용을 시도해 보았다. 피틴산을 첨가한 즉석밥의 제조공정도는 Fig. 17과 같다.

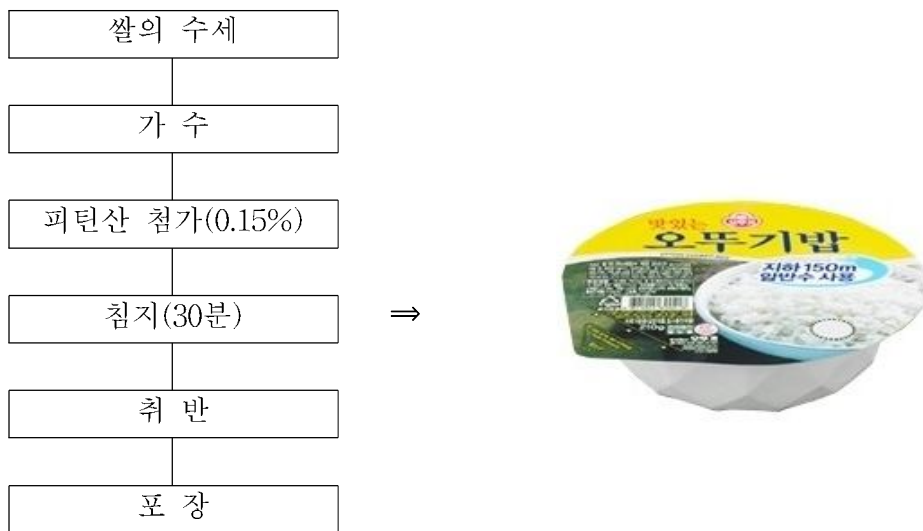


Fig 17. Flow chart of instant cooked rice.

Table 5-12. Nutrition composition of "instant cooked rice"

1회분량당 (210 g)	합량	% 영양소기준치
열량	305 Kcal	-
탄수화물	68 g	21
단백질	6 g	10
지방	1 g	2
콜레스테롤	0 mg	0
나트륨	10 mg	0



(2) 통조림 제품

- 본사와 협력업체인 'D사'에서는 고등어 통조림 제조 시 피틴산 소재를 첨가하여 통조림 캔에 의한 변색방지 및 제품의 산화를 예방하고 있다. 이에 본 기관에서는 연구를 통하여 개발된 피틴산 소재를 제안하였고 제품생산에의 적용을 시도해 보았다. 통조림 제품의 제조공정도는 Fig. 5-18과 같다. 현재 'D사'에서 시제품 생산에 사용되고 있는 피틴산 제품은 전량 수입산으로, 원료의 대체가 이루어질 경우 수입산의 국내산 대체효과 및 쌀의 소비촉진에 이바지 할 수 있을 것으로 예상된다(Table 5-13).

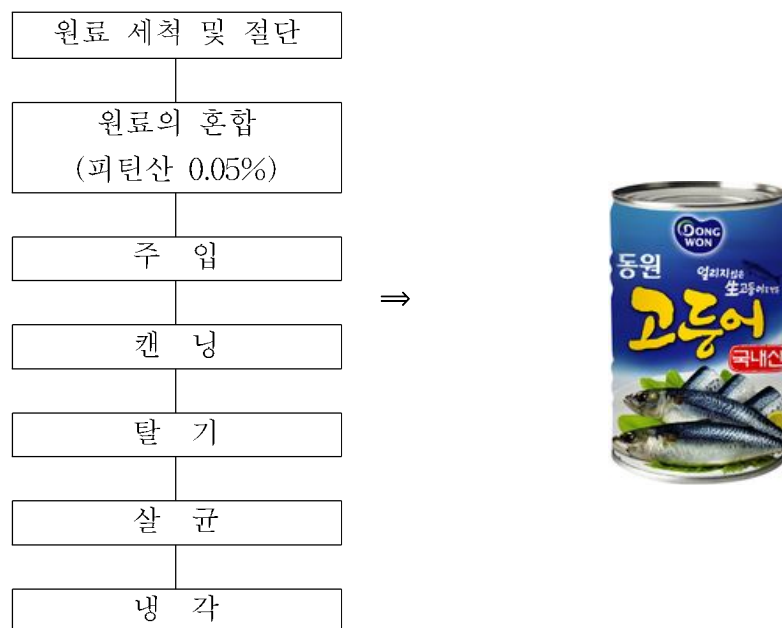


Fig. 5-18. Flow chart of mackerel canned food.

Table 5-13. Nutrition composition of "mackerel canned food"

1회분량당 (100g)	합량	% 영양소기준치
열량	140 Kcal	
탄수화물	0g	0
단백질	17 g	28
지방	8 g	16
포화지방	2.5 g	17
콜레스테롤	70 mg	23
나트륨	710 mg	36

### (3) 셀러드

- 피틴산 소재는 가공 식품 뿐만 아니라 급식업체 및 편의점, 레스토랑의 밥 또는 과일, 야채 등의 색도유지 및 신선도 유지를 위한 목적으로 사용되어지기도 한다. 본 연구기관에서는 국내의 셀러드 제조 업체를 통하여 피틴산의 적용 가능성을 검토하기 위하여, 셀러드의 주된 원료이자 셀러드 유통기한 설정 시 주된 기준이 되는 양상추의 저장성 시험을 시도해 보았다.
- 쌀 미강으로부터 추출된 피틴산 소재를 셀러드 제품에 적용한 뒤 가속시험을 통해 야채의 보존성 테스트를 실시하였다. 피틴산 소재는 일반적으로 야채의 세척 과정에서 많이 사용되어지는 첨가물과 혼합하여 피틴산 소재를 0.075% 함유하는 수용액을 제조하여 사용하였다. 실험 방법은 셀러드의 원료인 양상추를 4%의 피틴산 함유 수용액에 3분간 침지한 뒤, 물로 헹구면서 손으로 자른 뒤 10℃에서 3일간 보존하였고, 대조군으로서는 피틴산 처리 없이 신선한 양상추를 물로 헹구면서 손으로 자른 뒤 10℃에서 3일간 보존하여 신선도를 비교해 보았다.
- 그 결과 4% 피틴산 함유 수용액에 침지한 뒤 보존한 양상추의 경우에는 3일 후에도 신선함이 보존되었지만, 피틴산 처리를 하지 않은 양상추의 경우 양상추의 갈변 및 전체적인 신선도가 많이 저하되어 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 피틴산 제품의 셀러드용 야채 보존성 향상 및 신선도 유지에 사용되어 질 수 있을 것으로 기대하고 있다.

Table 5-14. Mix proportion of phytic acid solution

성분명	배합비(중량%)
에칠알콜	40.0
식염	1
미강유추출물	0.9
피틴산	0.075
물	58.025

#### (4) 떡 가공품

- 떡 가공품의 경우 저장, 유통 중 노화 및 산화되기 쉬운 제품으로 떡 가공품의 저장성 향상 및 미생물 생육억제를 목적으로 산도조절제를 첨가하고 있다. 이에 본 연구기관에서는 산도조절제의 대체를 목적으로 국내 떡 가공품 업체를 대상으로 쌀 미강 추출 피틴산 소재를 제안하였고, 피틴산을 이용한 제품 생산을 시도하여 보았다.
- 그 결과 기존의 산도조절제 첨가 제품의 비교하였을 때, 미생물 생육 억제 효과는 물론 떡의 노화현상 지연 효과가 우수하게 나타나 제품에의 적용을 기대하고 있다. 쌀 미강 추출 피틴산을 첨가한 떡 가공품의 제조공정은 Fig. 5-19와 같다.

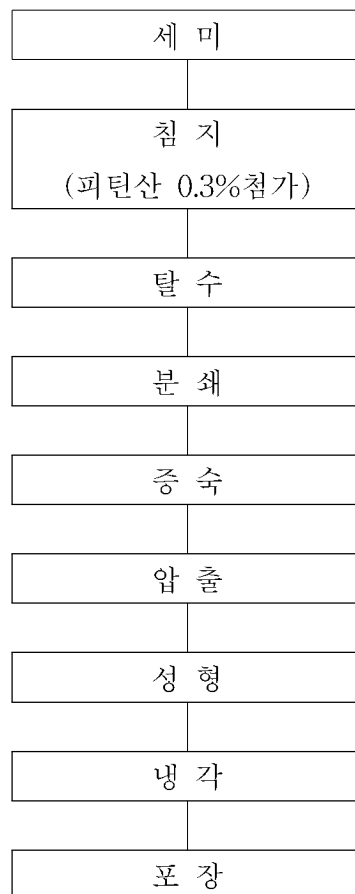


Fig. 5-19. Flow chart of processed rice cake.

라. 쌀 부산물 이용 사료용 단순 제품 개발

- 쌀 가공 부산물인 주박, 시럽박, 탈지미강을 이용하여 단순 사료용 분말을 제조하였다. 부산물 그 자체로도 영양성분이 풍부하기 때문에 공정비용 저하를 위하여 별도의 처리는 실시하지 않고 원료의 단순 살균 공정을 이용하여 품질관리만을 실시하여 공정을 확립하였고, 원료의 영양성분을 분석하였다(Fig. 20)(Table 15).



Fig. 5-20. Processing drawing of simple feed production.

Table 5-15. Proximity composition of rice and rice byproducts

	주 박	탈지미강	시럽박
탄수화물(%)	63.6	58.6	47.1
단백질(%)	21.3	18.7	43.5
지질(%)	4.3	4.5	2.5
수분(%)	4.5	5.5	4.3

마. 소재 활용 가능 범위의 시장조사.

- 본 연구를 통해 개발된 단백질 및 식이섬유, 피틴산 그리고 이노시톨 소재의 활용 가능한 가공 식품들은 음료, 유제품, 제과, 제빵 등의 일반식품류, 동결 및 가공공정 등을 통한 즉석식품류, 유아 및 어린이등 특정 대상을 상대로 한 영\*유아식, 이유식, 환자식 등의 특수용도 식품, 생리활성 기능성을 소구하는 건강기능식품분야까지 폭넓게 적용될 수 있다.
- 현재 국내의 제품화된 적용가능 제품군들을 크게 음료류, 가공식품류, 기능성 식품류를 기본으로 하여 정의하여 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 수용성 쌀 단백질

분류	제품	제품명	제조사	특징
아미노산 음료		아미노-벨류	동아오츠카	아미노산을 함유하는 기능성 음료로서 500 ml당 필수 아미노산 중 특히 근육에서 대사되는 BCAA(분지쇄 아미노산-발신, 로이신, 이소로이신) 이 200 mg 함유되어있는 것이 특징이다.
아미노산 음료		아미노업	해태음료	아미노산을 함유하는 기능성 음료.
혼합음료		엑셀레이드	해태음료	스포츠음료로 단백질으로는 효소분해 대두단백질을 첨가하였다.

<p>아미노산 음료</p>		<p>핫식스</p>	<p>롯데 칠성</p>	<p>과라나, 아미노산(BCAA-발신, 로이신, 이소로이신) 등 기능성분을 함유하여 순간적 활력 증강과 집중력 향상을 통해 Performance를 향상시켜주는 음료.</p>
<p>기능성 음료</p>		<p>팻다운</p>	<p>CJ</p>	<p>체지방 감소를 목적으로 하는 기능성 음료로 나이아신, 대두단백혼합분말, 대두섬유 분말 등을 함유하고 있다.</p>

(2) 불용성 쌀 단백질

분류	제품	제품명	제조사	특징
기능성 편의식		곡물 이야기 자연이키운 베리	농심 켈로그	체중조절용 조제식품으로서 현대인들에게 필수적인 12가지 영양소를 함유한 스낵이다. 10%의 단백질을 함유하고 있는 고단백 스낵으로서 단백원으로는 밀단백을 사용하고 있다.
기능성 편의식		닥터유	오리온	다이어트용 및 에너지 보충용 Bar 형태의 제품으로서 분리단백너겟 첨가를 특징으로 한다.
육류가공품		정말 맛있는 소시지	CJ	돼지고기 및 닭고기를 이용한 육류가공품으로 분리대두단백을 첨가하였다.
육류가공품		백설햄 비엔나	CJ	돼지고기를 이용한 육류 가공품으로 분리대두단백을 첨가하였다.
육류가공품		스모크햄	대상	돼지고기를 주 원료로 하는 햄 제품으로 대두단백을 원료로 한다.

<p>어육가공품</p>		<p>삼호 요리 어묵</p>	<p>CJ</p>	<p>어육가공품으로서 대두단백을 첨가하고 있다.</p>
<p>즉석편의식</p>		<p>쇠고기죽</p>	<p>대상</p>	<p>간단한 조리과정을 통해 섭취 가능한 쇠고기 죽 제품으로 콩단백발효물(대두)을 사용하고 있다.</p>
<p>즉석편의식</p>		<p>마늘 수프</p>	<p>대상</p>	<p>밀가루 대신 우리 쌀로 만든 것이 특징인 마늘 수프 제품으로 콩단백발효물(대두)을 원료로 한다.</p>
<p>즉석편의식</p>		<p>수프 타임 (브로콜리 치즈)</p>	<p>대상</p>	<p>물만 부어 간편하게 먹을 수 있는 것이 특징인 즉석수프 제품으로 콩단백발효물(대두)를 함유하고 있다.</p>
<p>즉석편의식</p>		<p>맛있는 밥&amp;엔 (쇠고기)</p>	<p>대상</p>	<p>별도의 조리가 필요없이 밥에 뿌려 먹을 수 있는 양념 제품으로 콩단백발효물을 원료로 하고 있다.</p>



냉동식품		한입 돈까스	대상	돼지고기와 닭고기를 주원료로 하는 돈까스 제품으로 대두단백을 함유하고 있다.
냉동식품		소불 떡갈비	대상	돼지고기 갈비살, 야채를 혼합하여 오븐에 구워낸 제품으로 대두단백을 함유하고 있다.
냉동식품		섬산적	대상	돼지고기, 소고기 및 야채를 혼합하여 오븐에 구워낸 제품으로 대두단백을 원료로 한다.
소스류		소불고기 양념	대상	소불고기, 전골, 바비큐용 양념으로 양조간장을 주 원료로 하며 탈지대두분을 함유하고 있다.
조미식품		삼선짜장 분말	대상	해물 추출물이 들어있어 해물짜장의 맛을 느낄 수 있는 것이 특징인 삼선짜장분말 제품으로 콩단백발효물(탈지대두, 탈지대두분)을 함유하고 있다.

(3) 쌀 식이섬유

분류	제품	제품명	제조사	특징
곡류가공품		올브렌	농심 켈로그	식이조절식품 및 식사대용식품으로 밀을 기본으로하는 시리얼로서 일반 시리얼에 비해 식이섬유를 강화한 것을 특징으로 한다.
두유		너두 나두	연세 우유	콩을 이용한 두유제품으로 정장작용에 도움을 주는 귀리 식이섬유의 첨가를 특징으로 한다.
두유		콩&팥 두유	연세 우유	콩 및 팥을 이용한 두유제품으로 정장작용에 도움을 주는 귀리 식이섬유의 첨가를 특징으로 한다.
두유		검은 참깨 두유	연세 우유	항산화효과가 있는 검은깨 페이스트를 첨가한 두유로 정장작용에 도움을 주는 귀리 식이섬유의 첨가를 특징으로 한다.
두유		두유로 굿모닝 시리얼	매일 유업	두유에 현미, 쌀, 보리 등 7가지 곡물을 첨가한 음료 제품으로 식이섬유를 원료로 함유하고 있다.

<p>우유</p>		<p>연세우유 골드플러스 RT</p>	<p>연세 우유</p>	<p>일반 우유에 부족한 식이섬유를 첨가한 것을 특징으로 한다.</p>
<p>즉석편의식</p>		<p>수프 타임 (12야채)</p>	<p>청정원</p>	<p>물만 부어 간편하게 먹을 수 있는 즉석수프 제품으로 양파, 양배추 등 12가지 야채를 한번에 섭취가능한 것이 특징이며 특화이버슬2(식이섬유)를 원료로 포함하고 있다.</p>

(4) 피틴산 및 이노시톨

분류	제품	제품명	제조사	특징
즉석밥		햇반	CJ	곡류가공품으로 전자레인지를 이용하여 간단히 섭취가 가능한 즉석밥으로 선도유지 및 미생물 증식 억제를 위해 피틴산 제품을 이용하고 있다.
즉석 가열식품 (레토르트)		김치제육 덮밥	CJ	시중에서 맛볼 수 있는 ‘김치제육’의 맛을 그대로 살린 레토르트 제품으로 선도유지 및 미생물 증식 억제를 위해 피틴산 제품을 이용하고 있다.
즉석 가열식품 (레토르트)		카레밥	CJ	20가지 이상의 천연 향신료가 잘 어우러진 것이 특징인 즉석가열제품. 산미료로 글루코노델타락톤을 사용중이다.
육류가공품		햄스빌 두꺼운 베이컨	CJ	돼지고기를 이용한 육류 가공품으로 pH 조절을 위해 산도조절제를 첨가하였다.
육류가공품		백설햄 비엔나	CJ	돼지고기를 이용한 육류 가공품으로 산화방지를위하여 L-아스코르빈산나트륨을 첨가하였다.

<p>육류가공품</p>		<p>스팸</p>	<p>CJ</p>	<p>돼지고기를 이용한 육류 가공품으로 산도조절제를 첨가하였다.</p>
<p>육류가공품</p>		<p>런천미트</p>	<p>대상</p>	<p>돼지고기를 주원료로 하는 육류가공품으로 산도조절제를 함유하고 있다.</p>
<p>어육가공품</p>		<p>삼호 요리 어묵</p>	<p>CJ</p>	<p>냉동연육, 소맥전분 및 대두단백 등을 혼합한 어육가공품으로서 산도조절제를 첨가하였다.</p>
<p>즉석편의식</p>		<p>카레여왕 (치킨 카레)</p>	<p>대상</p>	<p>간편한 가열 조리만으로 바로 섭취 가능한 레토르트 제품으로 산도조절제를 함유하고 있다.</p>
<p>즉석편의식</p>		<p>카레여왕 (망고 바나나)</p>	<p>대상</p>	<p>간편한 가열 조리만으로 바로 섭취 가능한 레토르트 제품으로 pH조절 및 품질유지를 위해 자몽종자추출물을 함유하고 있다.</p>

<p>양념류</p>		<p>생 와사비</p>	<p>대상</p>	<p>일본산 생 와사비가 듬뿍 들어가 생와사비 특유의 깊은 맛을 느낄 수 있는 것이 특징으로 식물성식이섬유(대두) 및 산도조절제(구연산)를 원료로 한다.</p>
<p>혼합음료</p>		<p>엑셀 레이드</p>	<p>해태 음료</p>	<p>구연산 및 구연산나트륨을 첨가한 스포츠음료로 이노시톨을 함유하고 있다.</p>



## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008- 2009)	쌀 부산물로부터 단백질 및 식이섬유 분 획 제조기술 개발	쌀 가공 부산물인 주박, 시럽박, 미강의 획득 및 특징 분석	100	- 주박의 획득 체계 및 보존법 확립
			100	- 주박, 시럽박, 미강의 구성물 분석 및 특징 평가
		고순도의 단백질, 식이섬유의 최적분리 및 제조공정을 확립	100	- 부산물로부터 수용성*불용성 단백질 분리 및 최적 분리 조건 확립
			100	- 부산물로부터 식이섬유 분획 분리 및 최적 분리 조건 확립
	쌀 미강으로부터 천연보존제(피틴산) 및 이노시톨 제조 기술 개발	미강원료의 획득체계 및 보존법 확립	100	- 미강원료인 공급 체계 구축
		미강으로부터 피틴산 분리 및 최적 분리 조건 확립	100	- 산 추출 시 최적 염산 농도는 0.3%, 추출시간은 1시간으로 확립 - 산 추출 시 용매 배수는 10배수로 확립 - 중화용매는 NaOH로 선정 - 이온교환수지를 사용하여 정제하는 공정 확립
		미강으로부터 이노시톨 분리 및 최적 분리조건 확립	100	- 최적 가수분해 조건을 160℃에서 6시간으로 확립 - 중화공정은 Ca(OH)2를 사용하여 pH 6.5로 조정하는 것으로 확립 - 재결정공정은 농축, 냉각, 결정형성, 여과공정을 도입, 95.9%의 순도를 지니는 이노시톨 생산공정 확립
	쌀 부산물 유래 단백질, 탄수화물, 피틴산, 이노시톨의 대량 생산 공정의 최적화	수용성 단백질 제품의 포장 및 유통 방법 확립	100	- 단백질 건조 조건별(동결건조, 분무건조, 부형제 첨가 등) 품질 안전성 검토 - 경제적인 실온 유통을 기본으로 포장재별 제품 안전성 확인 및 최종 유통 조건 확립
		수용성 단백질 대량 생산 공정 및 설비 최적화	100	- 단백질 생산 공정에 중요 단계인 분리공정 집중 검토 - 미세한 단백질의 침전이 수율이나 품질에 영향을 미치게 되므로 반복 및 원심분리의 혼합 적용과 중화 공정을 정확하고 안정성 있게 확립



구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차년도 (2009- 2010)	부산물(주박, 시럽박, 미강)로부터 식이섬유의 분획 최적화	부산물(주박, 시럽박, 미강)로부터 불용성 단백질 분리 및 최적 분리 조건 확립	100	- 주박, 시럽박, 미강으로부터 수용성 분획 및 전분 제거를 통한 불용성 단백질 의 분리 및 식이섬유의 분리 조건 확립
		각 분획의 보존 조건별 shelf life 평가	100	- 최종 제품화를 위한 불용성 단백질 및 식이섬유의 보관 조건별 안정성 평가 시 5% 이하의 수분함유로 건조 제품화 시 밀봉 상태에서 2년 동안 품질 유지 가능
	쌀 미강으로부터 천연 보존제(피틴산) 및 이노시톨의 보존실험	시험 제품 예시를 통한 식품보존성 기능평가	100	- 쌀밥에 피틴산과 이노시톨을 첨가하여 저장성 향상을 위한 최적 농도를 결정 - 피틴산의 S. Typhimurim과 E. coli O157:H7에 대한 항균효과를 확인 - 신선한 닭고기, 돼지고기, 소고기에 피틴산을 첨가하여 저장성 향상도를 조사함 - 생고기와 가열처리한 식육에 피틴산 첨가 시 항산화능을 측정하여 보존제로의 이용가능성을 확인
	쌀 부산물 유래 식이섬유, 피틴산, 이노시톨의 대량 생산 공정의 최적화	불용성 단백질 식이섬유 제품의 품질 평가 및 보존성 연구	100	- 불용성 단백질 및 식이섬유는 성분 자체가 안정화 되어 있고, 6개월간의 가속 실험을 통해 안정성 확인
		불용성 단백질 식이섬유 제품의 포장 및 유통 방법 확립	100	- 습기 차단 후 비닐 및 알루미늄 포장 시 2년간 실온 유통
		피틴산, 이노시톨 제품의 품질 평가 및 보존성 연구	100	- 피틴산의 경우 빛 흡수 시 검은색으로 변색이 되어 빛을 차단해야 함. 빛차단 후 안정성을 위해 냉장 보관 - 이노시톨은 백색의 안정화된 분말로 흡습을 방지하여 실온 보관
		피틴산, 이노시톨 제품의 포장 및 유통 방법 확립	100	- 피틴산의 경우 빛이 차단되는 플라스틱 용기에 냉장 6개월 유통 - 이노시톨의 경우 탈기 후 비닐 및 박스 포장 후 2년간 실온 유통 가능
		피틴산, 이노시톨 제품의 대량생산 공정 및 설비 최적화	100	- 산업화를 위한 피틴산 최적 추출 정제 조건 확립 - 최적의 온도를 대상으로 가수분해 및 정제공정 확립
	쌀 부산물 유래 소재의 제품화 및 응용	고순도 쌀 단백을 활용한 제품 개발	100	- 쌀단백을 활용한 rice milk 및 단백질 보충 음료 개발 - 쌀단백 제품을 활용하여 영양식, 다이어트 선식, 시리얼 등への 적용
		쌀 미강 추출액 첨가 즉석식품류 개발	100	- 즉석쌀밥, 고등어 통조림, 혼합 샐러드, 떡 가공품에 적용
		Extruder 기술을 이용한 시리얼 믹스 개발	100	- 쌀단백질을 원료 하여 Extruder 기술을 이용한 그래놀라 혼합 제품 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
3차 년도 (2010- 2011)	단백질 소재의 동물실험을 통한 효능평가	고순도 쌀 단백질의 세포 및 동물실험	100	- SRP70의 간보호 효과에 대한 INVITRO 및 INVIVO TEST - SRP70의 섭취가 랫드의 운동능력 향상 및 피로회복에 미치는 영향 시험	
	식이섬유 소재의 동물실험을 통한 효능평가	불용성 식이섬유를 원료로 한 세포 및 동물실험	100	- 탈지미강을 원료로 효소를 이용한 탈진분 및 탈단백 공정을 실시한 결과 식이섬유 함량 63% - 건강기능식품 규정에 따라 원료의 식이섬유 함량 600mg/g 이상 함유할 경우 콜레스테롤 개선, 식후혈당상승억제 및 배변활동 원활 기능을 지니는 식이섬유 원료로 사용 가능	
	쌀 부산물 유래 소재의 제품화 및 수출화	산업화 공정 효율 검증		100	- 불용성 및 수용성 단백질 생산공정 확립 및 Scale up - 불용성 및 수용성 단백질의 mass balance 검토
		수용화 단백질의 특성 연구		100	- 종류 및 반응 조건에 따르는 관능 및 품질 특성에 따른 효소의 선정 및 반응 조건 확립 - 수용성 쌀단백질 제품의 특성 연구 : 구성 아미노산, 분자량 분포 특성, 아미노태 질소, pH 안정성, 열안정성 및 저장기간에 따른 안정성
		쌀 단백질 및 식이섬유를 이용한 다이어트 식품 개발 및 개별인정형 건강기능식품 등록		100	- 제품의 안전성 평가 - 제품의 규격화 - 음료 및 시리얼 등 최종 제품 제형화 - 개별인증등록을 임상시험 지원사업 참여
		피틴산, 이노시톨 함유 혈압 및 콜레스테롤 저하용 건강식품 개발		100	- 기능성 음료 및 편의식 제조 - 피틴산: 산도조절 역할 및 미생물 오염 방지 - 이노시톨: 기능성 부여
		수용화 단백질을 이용한 음료 개발		100	- 수용성 쌀단백질을 활용한 RICE MILK 제조법 개발 및 관능평가 - 수용성 쌀단백질을 활용한 단백질 음료 제조법 개발 및 관능평가를 통한 상업화 가능성 확인
		사료용 부산물 단순 가공 제형 개발 : 저순도 단백분말, 주박분말, 당질분말		100	- 탈지미강 및 시립박 원료를 이용한 단순 가공을 통하여 단백질 및 식이섬유 사료 제품 개발

## 제 2 절 관련분야에의 기술발전예의 기여도

- 본 연구과제를 통하여 쌀 가공 공정에서 발생하는 부산물로부터 기능성 소재 개발의 기초 자료를 제시하였다. 또한 효소반응을 이용하여 기능성 식품 원료로서 활용이 가능한 소재의 개발 공정을 확립하여 식품산업에 있어 다양하고 새로운 종류의 제품을 개발할 수 있는 기반을 마련하였다.
- 여러 가지 쌀 가공 부산물을 소재 개발의 원료로서 검토하여 각 원료의 특성을 파악하였으며 각 기능성 소재에 따르는 최적의 원료를 입증하였다. 또한 이를 바탕으로 단백질 및 식이섬유 소재, 피틴산 및 이노시톨 제조 기술을 개발하였다.
- 기존 기술 개발의 한계였던 쌀 단백질의 수용화 정도 및 쓴맛 등의 품질 문제가 크게 개선된 수용성 쌀 단백질 제조 기술을 개발하였다. 이를 활용하여 RICE MILK 및 단백질 보충 음료 제조법 등을 개발하였고 상업적 활용 가능성 또한 높게 평가되었다. 따라서 수용화 문제로 인해 불가능 하던 쌀 단백질을 활용한 음료의 제조를 비롯하여 식품산업 및 제약산업에서 새로운 소재로서 활용되어 질 수 있을 것으로 기대된다.
- 또한 수용성 쌀 단백질의 간보호 기능 및 운동 후 피로회복 향상에 관한 효과가 검증되었다. 따라서 기능성을 가지는 수용성 쌀 단백질 소재의 개발은 식품산업에 있어 새로운 기능성 제품을 개발할 수 있는 시발점이 될 것이고 국민의 건강 증진과 보건 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.
- 본 연구를 통하여 쌀 가공 부산물로부터 고순도의 단백질, 식이섬유 및 피틴산과 이노시톨의 최적분리 및 제조공정을 개발하였고 제품의 SIMULATION을 통해 상업적 활용 가능성을 평가하였다. 또한 수용성 쌀 단백질의 간기능 보호 효과 및 운동 후 피로회복에 관한 효과가 입증되었다. 따라서 개발된 소재를 활용은 식품산업 및 제약산업에서의 새로운 제품의 개발 활성화에 기여할 수 있을 것이며 결과적으로 국민의 건강 증진과 보건 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 기존의 수입품 및 GMO, 알러지 반응등의 문제를 일으킬 수 있는 대두 및 우유 유래 소재를 대체함으로써 수입제품의 국산화를 통한 외화낭비를 줄일 수 있고, 부산물을 재활용하고 고부가화 함으로써, 환경의 개선 및 지역농가 등의 소득이 증대할 것으로 기대된다.

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1. 연차별 연구성과

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도								0		
2차년도	2							2		
3차년도	2							3		
계	4							5		

## 2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자		학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	공동저자				
2011	Shelf-life of cooked rice supplemented with phytic acid	박영서	최문실, 한복경, 최혁준	Food Engineering Progress	vol. no.1 p 276~281	국내	비SCI
2011	Hydrolysis of Rice Syrup Meal using Various Commercial Proteases	김창원	박진우, 최혁준, 한복경, 유승석, 김병용, 백무열, 김영록	Journal of Life Science	vol.21, no.2 p 309~315	국내	비SCI
2011	현미와 흑미의 항산화 성분 및 항산화 활성	고미림	최혁준, 한복경, 유승석, 김현석, 최성원, 허남운, 김창남, 김병용, 백무열	Food Engineering Progress	vol.15, No.3 p 195~202	국내	비SCI
2011	탈지미강 단백질의 가수분해 및 분해물의 특성 연구	김창원	김현석, 김병용, 백무열	Food Engineering Progress	vol.15, no.1 p 41~47	국내	비SCI
2011	단백질가수분해효소를 이용한 탁주박의 가수분해 및 그 분해물의 특성	김창원	최혁준, 한복경, 유승석, 김창남, 김병용, 백무열	Food Engineering Progress	vol.43, no.6 p 729~734	국내	비SCI

### 3. 특허 성과

특허 출원 성과					
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	비고
2009	피틴산의 제조방법	(주)비케이바이오 외	대한민국	10-2009-0129656	-
2010	쌀부산물로부터 불용성 및 수용성 식이섬유의 제조방법	(주)비케이바이오 외	대한민국	10-2010-0113762	-
2011	수용성 쌀펩타이드의 제조방법	(주)비케이바이오 외	대한민국	10-2012-0001494	-
2011	간보호 기능을 가지는 쌀 펩타이드	(주)비케이바이오 외	대한민국	10-2012-0001495	-

### 4. 실용화\*산업화 계획

#### ● 소재 제품화 계획

본 과제를 통하여 개발된 수용성 단백질 및 식이섬유 소재의 생산을 실시 할 계획이다. 최우 선적으로 수용성 쌀 단백질의 제품화를 계획하고 있으며, 3개 이상의 OEM 업체를 탐색하고 시 생산을 시도하여 생산에 가장 적합한 공장을 선정할 계획이다.

나아가 생산된 수용성 쌀 단백질 소재를 이용하여 기능성 단백질 음료를 개발, (주)비케이바 이오에서 추진하고 있는 유통 network를 활용하여 제품의 판매를 추진할 계획이다.

### 5. 교육\*지도\*홍보 등 기술 확산 계획 등.

#### ● Sales kit

쌀 단백질 소재의 Sales kit를 작성, (주)비케이바이오의 소재 영업망을 통하여 제품을 적극 적 으로 홍보할 예정이다. 현재 영업사원을 통하여 완제품 생산 업체를 대상으로 제품의 호응도를 파악한 결과, 쌀 단백질에의 기대 및 구매의사가 매우 높음이 확인되었다. 따라서 Sales kit 작 성 및 샘플 제공을 통하여 각 식품회사에서 제품 개발에의 적용을 적극 추진하고 2012년 이내 에 신규 매출 확보를 목표로 한다.

- 해외 전시회 참가.

중소기업 지원제도를 활용하여 해외 전시회 참가를 통한 쌀 단백질의 해외 홍보를 적극적으로 추진할 계획이다. 또한 현재 (주)비케이바이오와 협력중인 유럽 및 아시아 등의 해외 업체와의 co-marketing을 추진하여 수출을 도모할 계획이다.

## 6. 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 제품의 품질향상, 제조원가 절감 등을 위한 추가 연구를 통하여 up-grade를 추진 계획이다. 또한 수용성 쌀 단백질의 기능성에 관한 추가 IN-VIVO 및 IN-VITRO 실험을 실시하고, 개별인증형 등록을 목표로 연구를 진행하며 식품관련 정부출연기관들의 개별인증형 지원사업 등에 적극적으로 참여할 계획이다.



## 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

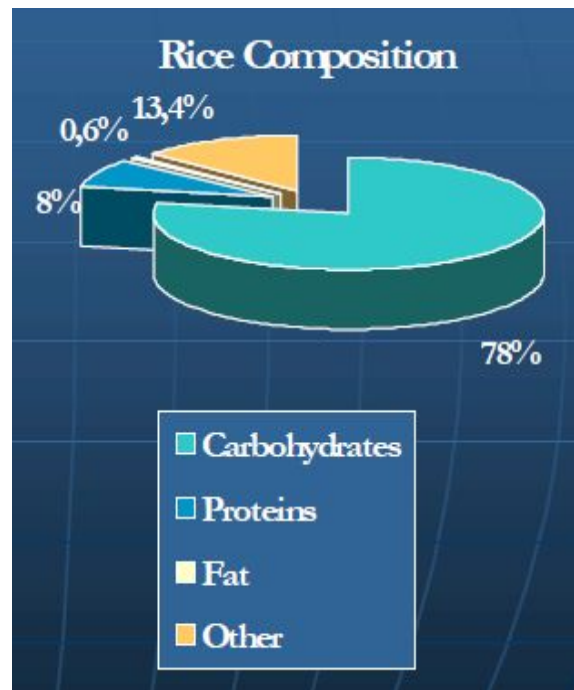
- 국내산 쌀 단백질 개발을 위하여 해외 개발된 단백질 제품에 관한 정보를 수집하였다. 대부분의 단백질 소재는 밀 또는 카제인 유래 단백질로 쌀을 원료로 한 단백질 소재는 많지 않았다. 그 중 유럽에서 생산중인 쌀 단백질 및 일본에서 생산중인 쌀 단백질 제품에 관한 정보를 획득하였고, 일본에서의 펩타이드 음료 시장에 관해 정보를 획득하였다.

### 1. 해외 단백질 제품 개발 사례

#### 가. Prothy R80

- 유럽에서 개발된 제품으로 단백질 약 78% 함유하고 있으며 구성 아미노산 중 BCAA 함량 18% 이상을 포함하고 있다. 베이지색 파우더 제품으로 물에 분산되며 가격은 20~30유로/kg 이다.
- 100% 쌀을 원료로 하여 만들어진 제품으로 GMO 문제에서 자유롭고, Lactose 및 gluten에 의해 발생될 수 있는 부작용 문제가 없다. EU 기준 Allergen Free 제품으로 영\*유아용 영양식, 체중저하 제품, 건강 보충식 및 스포츠 영양식 등 그 활용 범위가 넓은 장점이 있다.
- 구성 아미노산 함량(%)

Asparagine+Asparagique acid	9.07
Threonine	3.70
Serine	4.92
Glutimine+Glutamic acid	17.85
Proline	4.42
Glycine	4.26
Alanine	5.38
Valine	6.14
Cystine+Cysteine	1.75
Methionine	3.70
Isoleucine	4.31
Leucine	8.49
Tyrosine	5.35
Phenylalanine	5.47
Lysine	3.60
Hisitidine	2.37
Arginine	8.30
Tryptophane	0.92





## 나. ORYZA PEPTIDE

- 일본 oryza사에서 생산한 쌀 펩타이드 소재로서 100% 쌀을 원료로 하여 제조하였으며 펩타이드가 대부분을 구성하고 있다. 조단백질 함량 약 60%이며 물에 용해성이 높다.
- ORYZA PEPTIDE60을 이용하여 in-vivo 및 in-vitro 실험을 실시한 결과 고지방식이와 함께 ORYZA PEPTIDE60(P60)을 섭취한 결과 체중증가 억제작용을 나타내었다. 또한 16 멜라닌 세포에 P60의 멜라닌 성장저해작용시험을 실시한 결과, 피부의 보수에 관련되어있는 세라미드와 히아루론산의 분해를 저해하여 P60의 농도 의존적으로 멜라닌성장을 저해하였다. 따라서 쌀 펩타이드 소재의 체중증가 억제 효과 및 피부 보습효과에의 가능성이 확인되었다.



<1% and 3% solution of oryza peptide>

## 다. 일본의 대두 펩타이드 시장

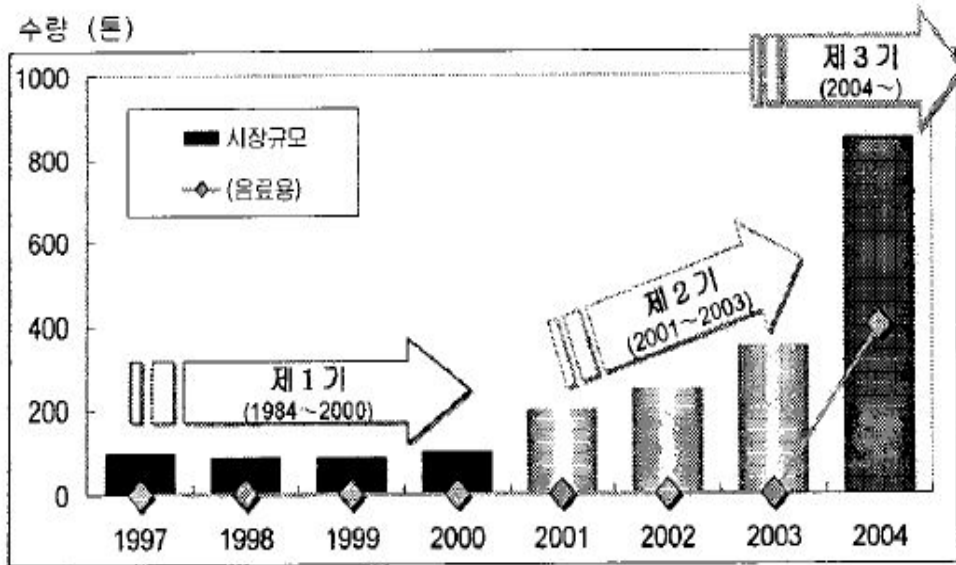
- 일본의 펩타이드 소재를 활용한 제품의 시장은 1987년 후지제유의 대두 펩타이드 소재 판매를 시작으로 2003년도부터 활성화 시작되었으며 CVS 상품을 중심으로 시장을 확보하였다.

### (1) 기능성

- 일본에 시판되고 있는 대두 펩타이드 함유 제품의 기능성 컨셉은 주로 피로회복을 강조하고 있다. 아미노산 제품이 주로 스포츠 음료로서 근육의 피로회복 및 근력증강을 컨셉으로 마케팅을 한 반면 대두 펩타이드 제품은 수면부족, 정신적 스트레스, 환경적 요인에 의한 스트레스 등 피로회복 효과를 컨셉으로 아미노산 제품과 차별화하고 있다. 제품으로는 모리나가제약의 '위더 리커버', 토우라크의 '더 펩타이드', 코카콜라의 '파워에이드' 등이 대표적이며 음료타입, 젤리타입, 파우더 등 다양한 형태의 제품이 판매되고 있다.
- 또 다른 기능성 컨셉은 '다이어트' 이다. 대두 펩타이드의 지질대사 촉진 및 기초대사량 증진에 관한 연구결과를 바탕으로 다이어트용 소재로서 활용하고 있으며 대표적 제품으로는 오리히로의 'amino body', 모리나가 제과의 '위더 Body Design' 등이 있다.
- 섭취량은 4g~8g 정도이며 섭취 후 약 20분 정도의 빠른 시간에 효과를 확인할 수 있다는 점이 시장의 주목을 받기 시작하였으며 대기업 식품부에서의 신제품 출시에 따라 시장이 급속히 성장하게 되었다.

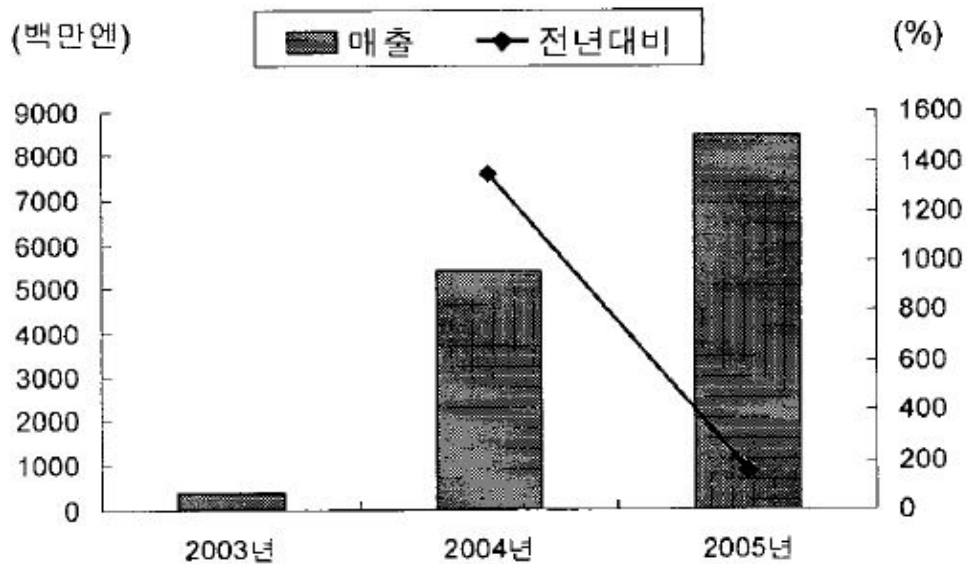
### (2) 시장경향

- 일본의 대두 펩타이드는 후지제유가 1987년 스포츠맨을 타겟으로 대두 펩타이드를 소재로서 판매하기 시작하였으나 시장 규모는 매우 작았고 2004년도에 이르러 소재공급업체가 대기업 식품업체와 공동개발 및 상품화를 통해 본격적인 시장이 형성되었다. 2004년 7월에는 코카콜라가 '파워에이드'를 CVS 한정으로 판매를 하면서 인지도를 높여 약 50 억엔이 넘는 시장을 형성하게 되었다.
- 판매 동향은 2003년도에는 통신판매 또는 스포츠 전문점에서만 판매가 이루어졌으나 2004년 신제품의 판매가 주로 CVS 한정판매로 발매되면서 CVS 상품이 75% 이상을 점하게 되었고 이를 기점으로 대두 펩타이드에 대한 소비자 인지도 2003년 10월 기준 0%에서 2005년 9월 기준 90% 이상으로 대폭 상승하였다.



- 대두펩타이드 소재시장규모는 2001년 이후 급속하게 확대(음료용도가 約50%(2004년))
- 그 결과, 원재료 생산 capacity(수용능력)를 넘어섰다.
- 2005년 하반기 시점에 대두펩타이드 전용 공장을 건설, 공급체제를 정비하였다.

<대두 펩타이드의 소재시장 규모추이>



< 대두 펩타이드 시장규모 >

- 자료출처 : Food industry and Nutrition., 11(1). 13~18, 2006. 대두 펩타이드의 시장형성과 마케팅전략

## 제 7 장 참고문헌

Yutaka N, Kiwamu O, Kazuyuki S, Hisataka M, Akinobu K, Yoshiyuki M, Koichi S, Hiroaki O, Morikazu O, Hidenori K, Hirohito T, Shinzo K, Masahiko K, Akiharu W, Daiki H, Susumu I, Tomohisa I, Naohiro K, Yasuyuki A., BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. *Nutrition* 23 (2007) 113-120.

Monteiro GA, Aoki MS, Santos CB, Monteiro AG, Russo A, Picarro IC., Effects of branched-chain amino acid (BCAA) supplementation on endurance exercise performance of pregnant rats. *Science & Sports* 24 (2009) 102 - 107.

김신애., 6주간의 chito-oligosaccharide 섭취가 흰쥐의 운동수행능력 및 피로지표에 미치는 영향. 경희대학교대학원(2010).

정기화., 간기능 개선 관련 기능성평가체계 구축. 식품의약품안전청 용역연구개발사업(2003).

이유진, 김경범, 정종문., 간기능 개선용 복합 식물 추출물(HEPA-1000)의 tert-butyl hydroperoxide(t-BHP)로 유도한 간세포 독성에 대한 보호 효과. *식품영양과학회지* 35(2006) 1121-1126.

박태선., 건강기능식품의 피로회복 관련 기능성 평가체계 구축. 식품의약품안전청 용역연구개발사업(2004).

박창수., 미나리 발효액으로부터 간기능 활성화 음료의 개발. 농림수산식품부 용역연구개발사업 (2008).

송지현., 알코올성 간질환 동물모델에 있어서 글루분을 함유하고 있는 아가리쿠스 균사체 배양액의 간기능 개선효과. 인제대학교대학원(2008).

김영균., 운동능력 향상을 위한 식품의약 개발. 과학기술부 용역연구개발사업(2006).

이미순., 천연소재 식물성 자원활용 식품개발에 관한 연구. 과학기술부 용역연구개발사업 (2002)

정용일., 고 분지아미노산 함유 옥수수 단백가수물의 제조 및 알코올성 간 손상 보호효과. 한양

대학교대학원 (2009)

Chiori I, Tsuyoshi M, Takashi T, Yuzuru E., Branched-chain amino acids promote albumin synthesis in rat primary hepatocytes through the mTOR signal transduction system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303 (2003) 59 - 4

Shinji T, Kuniya T, Daisuke M, Mitsutaka S, Michio U, Yasuhiko M, Toru K, Yasuhiko N, Kenichi M, Itaru E, Hitoshi, Hiroshi S., Usefulness of granular BCAA after hepatectomy for liver cancer complicated with liver cirrhosis. *Nutrition* 21 (2005) 480 - 486.

Tomoaki T, Yukiko I, Mikio Y, Masahiro A, Hitoshi I, Kazuaki T, Kayo N, Takako N, Naoko W, Masao O, Kenji F., Treatment with leucine stimulates the production of hepatocyte growth factor in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (2004) 772 - 77.

Milan H., Three targets of branched-chain amino acid supplementation in the treatment of liver disease. *Nutrition* 26 (2010) 482 - 490.

Shinobu N, Chiori I, Kenji T, Shoji F, Ichiro S., Pharmacological activities of branched-chain amino acids: specificity of tissue and signal transduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (2004) 387 - 389.

Shigeyuki T, Tatsuki I, Kazuhiko N, Hisamitsu M, Hidetaka S, Toshihisa M, Toru M, Takuya H, Masashi O, Motohisa A, Satoshi M, Esuke O, Masumi F, Katsumi E., A snack enriched with oral branched-chain amino acids prevents a fall in albumin in patients with liver cirrhosis undergoing chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Nutrition Research* 29 (2009) 89 - 93.

Yutaka N, Kiwamu O, Kazuyuki S, Hisataka M, Akinobu K, Yoshiyuki M, Koichi S, Hiroaki O, Morikazu O, Hidenori K, Hirohito T, Shinzo K, Masahiko K, Akiharu W, Daiki H, Susumu I, Tomohisa I, Naohiro K, Yasuyuki A., BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. *Nutrition* 23 (2007) 113 - 120.

Tomoaki T, Yukiko I, Mikio Y, Masahiro A, Hitoshi I, Kazuaki T, Kayo N, Takako N, Kenji F., Leucine stimulates the secretion of hepatocyte growth factor by hepatic stellate cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297 (2002) 1108 - 1111.

백일영, 광이섭, 서상훈, 진화은, 김영일, 우진희., 운동 전 BCAA 및 Albumin 가중 투여가 에너지 생성 물질과 대사관련 호르몬 변화에 미치는 영향. J Life Science 16 (2006) 890-897.

한상호., 웨이트 트레이닝 시 고단백 식이섭취가 신체구성 및 근기능에 미치는 영향. 계명대학교 스포츠산업대학원 (2007).

이주한., 췌장절제 성인당뇨 쥐에서 제한식이가 간조직의 autophagy에 미치는 영향. 건국대학교 대학원 (2009).

김강성, 손현수., *Aspergillus niger* CF-34로부터 분리한 두부 또는 두유비지 가용화 복합효소의 특성. 한국식품과학회지 26:5 (1994) 490-495.

김강성, 박은하, 최연배, 김교창, 이상화, 손현수., *Aspergillus niger* CF-34 효소를 이용한 두부 또는 두유비지의 가용화. 한국식품과학회지 26:5 (1994) 484-489.

Samson A, Darren N, Dominic M., Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. Journal of Cereal Science 41 (2005) 283 - 90.

Pintado ME, Pintado AE, Malcata FX., Controlled whey protein hydrolysis using two alternative proteases. Journal of Food Engineering 42 (1999) 1-13.

Xiaohong C, Huanbin W, Cuijuan L, Zhenxin G., Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. Journal of Cereal Science 50 (2009) 184 - 89.

Li ZW, Xiong J, Qi XH, Wang JY, Chen HF, Zhang ZX, Huang JW, Liang YY, Lin WX., Differential Expression and Function Analysis of Proteins in Flag Leaves of Rice During Grain Filling. ACTA AGRONOMICA SINICA 35:1 (2009) 132-139.

Almecija MC, Ibaez R, Guadix A, Guadix EM., Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. Journal of Membrane Science 288 (2007) 28 - 35.

Li Y, Shoemaker CF, Ma J, Luo C, Zhong F., Effects of Alcalase/Protease N treatments on rice starch isolation and their effects on its properties. Food Chemistry 114 (2009) 821 -

828.

Fountoulakis M, Lahm HW., Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826 (1998) 109 - 134.

Jie O, Zhaoyan C, Kuaifei X, Yaqing W, Jun D, Mingyong Z., Identification and analysis of eight peptide transporter homologs in rice. *Plant Science* 154 (2010) 134 - 140.

Gujral HS, Rosell CM., Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Research International* 37 (2004) 75 - 81.

Moatsou G, Hatzinaki A, Kandarakis I, Anifantakis E., Nitrogenous fractions during the manufacture of whey protein concentrates from Feta cheese whey. *Food Chemistry* 81 (2003) 209 - 217.

Creusot N, Gruppen H, Koningsveld GA, Kruif CG, Voragen AGJ., Peptide - eptide and protein - eptide interactions in mixtures of whey protein isolate and whey protein isolate hydrolysates. *International Dairy Journal* 16 (2006) 840 - 849.

Fabian CB, Huynh LH, Ju YH., Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. *Food Science and Technology* 43 (2010) 375 - 679.

Yu Y, Hu J, Bai X, Du Y, Lin B., Preparation and function of oligopeptide-enriched hydrolysate from globin by pepsin. *Process Biochemistry* 41 (2006) 1589 - 1593.

Chen YJ, Chen YY, Wu CT, Yu CC, Liao HF., Prolamin, a rice protein, augments anti-leukaemia immune response. *Journal of Cereal Science* 51 (2010) 189 - 197.

Sun YJ, Sun YY, Li XY, Guo X, Ma J., Relationship of Nitrogen Utilization and Activities of Key Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism in Rice Under Water - itrogen Interaction. *ACTA AGRONOMICA SINICA* 35: 11 (2009) 2055 - 2063.

Katsumi H, Masaki O, Syohei S, Mineyo N, Takuya K, Isao A, Toshihiro K, Hikaru S., Rice Protein Digestion by Sake Koji Enzymes: Comparison between Steamed Rice Grains and Isolated Protein Bodies from Rice Endosperm. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND*

BIOENGINEERING 102 (2006) 340-345.

Sho S, Saori T., Stimulation of Saccharifying Enzyme Production by Immobilized Fungal Mycelia Using Liquefied Rice Treated with Protease. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING 91:3 (2001) 256-261.

Samson A, Darren N, Dominic M., Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. Journal of Cereal Science 41 (2005) 283 - 290.

주현규, 전은자, 사동민, 박기웅, 정종배, 윤충효., 곡류의 혼합이 흰주의 성장과 혈액상에 미치는 영향. Koreaa J Plant Res 9:1 (1996) 77-88.

윤복만, 박재선, 박창희, 최용진, 전문진., 곡자첨가에 의한 산분해간장 발효 중 MCPD 및 주요 화학성분의 변화. 한국식품과학회지 30:2 (1998) 419-424.

인만진., 단백질 분해 효소를 이용한 스피루리나 추출물 제조 공정 최적화. 한국산학기술학회논문지 9:2 (2008) 550-555.

정규호, 서지형, 정용진., 단백질 분해요소 종류에 따른 콩 가수분해물의 특성. 한국식품저장유통학회지 12:5 (2005) 460-464.

채희정, 인만진, 김민홍., 단백질 분해요소로 원료 처리하여 제조한 효소분해 간장의 특성. 한국식품영양과학회지 26:5 (1997) 784-787.

차인태, 오용식, 노동현., 단백질 분해효소를 분비하는 *Micrococcus* sp. HJ19의 분리 및 특성. 한국미생물학회지 43:3 (2007) 222-226.

이영철, 김동수, 김영동, 김영명., 단백질 분해효소를 이용한 굴과 홍합 가수분해물의 제조. 한국식품과학회지 22:3 (1990) 234-240.

노민환, 이태규., 물엿농도와 열처리 조건에 따른 팔랑금 호화액의 당 및 아미노산의 변화 모니터링. 한국식품저장유통학회지 13:5 (2006) 581-588.

김진형, 김학균, 박범영, 조수현, 황인호, 김동훈, 이종문., 사후시간 경과가 한우 거세우 배최장근의 pH, 온도, R-value 및 단백질 분해효소 활성에 미치는 영향. 한국축산식품학회지 25:3



(2005) 310-315.

우은열, 김민정, 신원선, 이경애, 김강성., 산업폐기물인 비지로부터 식품첨가물로 이용할 수 있는 단백질 가수분해물의 생산. 한국식품과학회지 33:6 (2001) 769-773.

김종희, 홍순광., 식품단백질 효소분해물의 제조 및 이화학적 특성. 동아시아식생활학회지 19:1 (2009) 45-51.

소명환, 이영숙., 쌀 입국 제조시 *Rhizopus* sp. ZB9의 배양조건이 당화 아밀라아제 생성에 미치는 영향. 한국식품영양학회지 22:4 (2009) 644-649.

하태열., 쌀의 영양학적 우수성 및 가공산업 발전 방향. 식품산업과 영양 13:2 (2008) 22-26.

김주희., Effect of Corn Gluten, Wheat Gluten, Isolated Soybean Protein and their Hydrolysates on Weight Reduction in Diet-Induced Obese Rats. 이화여자대학교 대학원 (2007).

백일영, 광이섭, 서상훈, 진화은, 김영일, 우진희., 운동 전 BCAA, OKG 및 Albumin 가중 투여가 에너지 생성 물질과 대사관련 호르몬 변화에 미치는 영향. 생활과학회지 16:6 (2006) 890-897.

김종호, 유지수, 이치호, 김수영, 이시경., 전통 메주로부터 분리한 Protease 생성 곰팡이로 제조된 된장의 품질 특성. 한국응용생명화학회지 49:1 (2006) 7-14.

김만철, 장태원, 김주상, 한용재, Ramasamy Harikrishnan, 한송헌, 오덕철, 허문수., 제주 연안 퇴적층에서 분리된 미생물의 동정 및 단백질분해효소 특성. 한국생명과학회지 19:6 (2009) 787-792.

Wei C, Kwon OY, Liu XW, Kim HC, Yoon WK, Kim HM, Kim MR., Protein Profiles of Major Korean Rice Cultivars. J Food Sci Nutr 12 (2007) 103-110.

이해은, 이아영, 박주연, 우경자, 한영숙., 증편 구조에 미치는 쌀 단백질의 영향. 한국조리과학회지 20:4 (2004).

이원중, 최미라, 쏘설스키., 콩비지의 식이섬유와 단백질 분리. 한국식품과학회지 24:1 (1992)

97-100.

김율상, 임경자, 박훈, 전승규., 한국 식품중의 아미노산 조성에 관한 연구(I). 한국식품과학회지 10:4 (1978).

채희정, 이만진., 효소를 이용한 동물성 식품가공부산물물의 식품 소재화 탐색. 한국응용생명화학회 47:2 (2004) 197-201.

김미령., 효소종류에 따른 대두단백, 카제인, 글루텐, 젤라틴 단백질 가수분해물의 쓴맛과 용해도 특성. 한국식품영양과학회지 39:4 (2010) 587-594.

김석곤, 한정우, 김한성, 전경용, 조영일., 전기투석법을 이용한 아미노산으로부터 전해질 분리 정제에 관한 연구. Membrane Journal 4:3 (1994) 163-170.

윤혜현, 전은재., 열처리 대두에서 분리한 대두 단백질의 기능성. 한국식품과학회지 36:1 (2004) 38-43.

## 주 의

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