

## 단백질분해효소에 의한 쌀가루로부터 쌀전분의 분리 및 물리화학적 특성

김이재<sup>1</sup> · 오지원<sup>2</sup> · 김현석<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경기대학교 대학원 식품생물공학과, <sup>2</sup>경기대학교 바이오융합학부 식품생물공학전공

### Isolation and Physicochemical Properties of Rice Starch from Rice Flour using Protease

ReeJae Kim<sup>1</sup>, Jiwon Oh<sup>2</sup>, and Hyun-Seok Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Graduate School, Kyonggi University

<sup>2</sup>Major of Food Science and Biotechnology, Division of Bioconvergence, Kyonggi University

#### Abstract

This study aimed to investigate the impact of protease treatments on the yield of rice starch (RST) from frozen rice flours, and to compare the physicochemical properties of RST by alkaline steeping (control) and enzymatic isolation (E-RST) methods. Although the yield of E-RST, prepared according to conditions designed by the modified 2<sup>3</sup> complete factorial design, was lower than the control, the opposite trends were observed in its purity. E-RST (RST1, isolated for 8 h at 15°C with 0.5% protease; RST2, isolated for 24 h at 15°C with 1.5% protease; RST3, isolated for 24 h at 15°C with 0.5% protease) with the yields above 50% were selected. Amylose contents did not significantly differ for the control and RST2. Relative to the control, solubilities were higher for all E-RST, but swelling power did not significantly differ for E-RST except for RST1. Although all E-RST revealed higher gelatinization temperatures than the control, the reversed trends were found in the gelatinization enthalpy. The pasting viscosities of all E-RST were lower than those of the control. Consequently, the enzymatic isolation method using protease would be a more time-saving and eco-friendly way of preparing RST than the alkaline steeping method, even though its characteristics are different.

**Key words:** rice starch, enzymatic isolation method, protease, yield, physicochemical property

## 서 론

쌀은 옥수수 및 밀과 더불어 오래전부터 인류의 식량자원으로 사용되어 오고 있다(Shin, 2009). 우리나라에서도 쌀은 주로 주식으로 활용하여 왔으며, 이외 쌀을 활용하여 술, 떡, 한과와 같은 형태의 식품으로 소비하고 있다(Shin, 2009). 국내 쌀의 생산은 지속적으로 증가하고 있지만 식품의 유통체계의 발달과 식생활의 서구화로 쌀의 소비는 지속적으로 감소하고 있으며, 2002년 이후 쌀의 자급률도 지속적으로 하락하고 있는 실정이다(Shin, 2009; Kim, 2011). 또한 쌀시장의 개방과 관세문제 등으로 최소시장접근 물량이 정해져 해마다 외국산 쌀의 필수적인 수입으로 국내 쌀의 재고량은 지속적으로 증가하고 있다(Kim,

2011). 그래서 국내 쌀의 소비 촉진을 위해 정책적으로 쌀과 쌀가루를 식품원료로 활용할 것을 장려하고 있지만, 쌀의 높은 가격으로 스낵류, 면류, 떡류, 가공밥류, 주류, 조미식품류 식품들의 원료로 제한적으로 사용되고 있는 실정이다(aTFIS, 2017). 따라서 쌀로부터 식품 및 비식품 산업들에서 널리 활용이 가능한 소재의 개발이 요구된다.

전분은 포도당을 단량체로 하는 선형의 아밀로오스와 고도분지상의 아밀로펙틴으로 구성되어 있는 동중중합체(homopolymer)로 값이 싸고 연중공급이 원활하여 식품 및 비식품 산업에서 증점제, 부형제, 안정제, 겔화제 등 다양한 형태로 가공되어 활용되고 있다(BeMiller, 1997). 전분질 작물들 중 쌀은 75-80%의 전분을 함유하고 있으며, 다른 곡류에 비해 전분함량이 상대적으로 높아 전분소재의 원료로 높은 잠재력을 가지고 있다(Shin, 2009). 쌀로부터 분리된 쌀전분은 직경이 2-10 μm로 곡물 유래 전분들 중 가장 작은 전분입자를 가져 액상에서 분산성이 좋고, 지방 대체제로 활용이 가능하며, 미끄러운 질감을 부여하는 등의 특성을 나타낸다(Shin, 2009). 쌀전분의 생산 및 이용으로 쌀의 소비를 촉진할 수 있지만 쌀전분의 높은 원료(쌀)

\*Corresponding author: Hyun-Seok Kim, Major of Food Science and Biotechnology, Division of Bio-convergence, Kyonggi University, Suwon, Gyeonggi 16227, Korea  
Tel.: +82-31-249-1319; Fax: +82-31-249-9604  
E-mail: khstone@kyonggi.ac.kr  
Received July 23, 2019; revised August 6, 2019; accepted August 8, 2019

가격과 상업적 생산기술의 부재로 국내에서 전혀 생산되지 않으며, 쌀과 쌀가공소재들에 대한 높은 관세로 수입도 어려운 상황이다.

쌀전분은 쌀의 배유부의 단백질 매트릭스에 단단히 박혀 있는(embedded) 상태로 존재하는데, 쌀단백질을 구성하는 글루텔린(총 단백질의 약 79~90% 차지)의 소수성결합 및 이황화결합 등으로 인해 강한 단백질 매트릭스를 형성하고 있어 다른 곡류에 비해 쌀전분을 분리 및 정제가 어렵다(Adoracion et al., 1993; Amagliani et al., 2017). 그래서 염기성 용액에 용해되는 글루텔린의 특성을 바탕으로 주로 알칼리침지법(alkaline steeping method)을 통해 쌀(또는 쌀가루)로부터 단백질을 제거하여 쌀전분을 분리하게 된다(Maningat & Juliano, 1979; Lim et al., 1999). 쌀전분을 분리 및 정제 시 알칼리침지법은 많은 시간이 요구되며 폐수 및 전분의 증화에 다른 과량의 염이 발생하는 문제점을 가지고 있다(Wang & Wang, 2004). 이와 같은 알칼리침지법의 문제점들을 해결하기 위해 최근 protease를 이용하여 쌀전분을 분리 및 정제하는 방법이 시도되었다(Wang & Wang, 2001, 2004). Wang & Wang (2001)은 protease를 이용한 효소적 쌀전분 분리·정제법은 페이스팅 점도 특성에 있어서는 차이가 있지만 알칼리침지법에 의한 쌀전분의 수율 및 화학적 특성과 유사한 쌀전분을 얻을 수 있다고 보고하였다. 또한 효소적 쌀전분 분리·정제법은 알칼리의 사용이 없기 때문에 폐액과 염의 발생을 저감할 수 있는 방법이라 제안하였다(Wang & Wang, 2001, 2004). 그러나 개발된 효소적 쌀전분 분리·정제법은 protease의 반응조건들에 따른 쌀전분의 수율 및 특성에 대해 충분한 조사가 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구는 쌀가루로부터 protease 처리를 통해 쌀전분을 제조 시 쌀전분의 수율 및 특성에 대한 protease의 반응조건들(반응온도, 반응시간, protease 첨가량)의 영향을 조사하였으며, 제조된 쌀전분의 특성을 알칼리침지법에 의한 쌀전분의 것과 비교분석하여 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분의 상업화 가능성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

경기도 김포 지역에서 2017년도에 재배되어 2018년도 정된 멥쌀(백미)을 시중에서 구입하여 쌀전분 분리를 위한 원료로 사용하였다. 식품첨가물 등급의 protease (Alphalase NP, minimum 1,600 AZO/g, from *Bacillus amyloliquefaciens*, 최적반응온도 60°C, 최적 pH 6.5)는 (주)비전바이오캡(BISION Co., Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 이외 쌀전분의 분리 및 특성 평가에 사용된 용매 및 시약들은 ACS 등급 이상의 것을 사용하였다.

### 쌀가루 제조

멥쌀은 과량의 수돗물로 3회 세척하고 멥쌀 무게의 3배 가량의 탈이온수를 가하여 상온(~24°C)에서 3시간 동안 침지한 후 체반에서 30분간 탈수하였다. 수화된 멥쌀은 롤 간격을 5 mm, 3 mm와 1 mm로 조정된 롤밀(DK104, Sdjung Tech, Daegu, Korea)를 순차적으로 통과시키면서 분쇄하였다. 습식제분된 쌀가루는 적외선수분측정기(LP16, Mettler-Toledo AG, Greifensee, Switzerland)를 이용하여 수분함량을 측정하고 폴리프로필렌 지퍼백에 넣어 -45°C에서 48시간 동안 동결한 후 -20°C에서 저장하면서 쌀전분 제조에 사용하였다.

### 실험디자인

쌀전분의 효소적 분리 조건은 protease의 반응시간(8-24 h), 반응온도(15-40°C)와 효소사용량(0.5-1.5%, d.b)을 요인들로 하여 반복점들과 중심점들(5개)을 포함시키는 변형된 2<sup>3</sup> 완전요인설계법에 따라 21개의 실험점들을 도출하였다. 각 처리요인들의 수준을 -1, 0, 1로 부호화된(coded) 값과 실제값을 Table 1에 나타내었다. 반응변수(response)는 도출된 protease 반응조건에 따라 제조된 쌀전분의 분리수율로 하였다.

**Table 1. Modified 2<sup>3</sup> factorial design matrix and response<sup>1)</sup> for the yield of starches isolated from the frozen rice flour by food-grade protease**

Run	Coded (actual) levels			Yield (% d.b. <sup>2)</sup> )
	Time (h)	Temperature (°C)	Protease (% d.b)	
1	0(16)	0(27.5)	0(1.0)	45.2
2	1(24)	1(40.0)	-1(0.5)	42.7
3	-1(8)	1(40.0)	-1(0.5)	44.3
4	1(24)	-1(15.0)	-1(0.5)	51.6
5	1(24)	1(40.0)	1(1.5)	43.3
6	0(16)	0(27.5)	0(1.0)	47.2
7	1(24)	1(40.0)	1(1.5)	43.5
8	-1(8)	-1(15.0)	-1(0.5)	52.9
9	0(16)	0(27.5)	0(1.0)	46.5
10	-1(8)	1(40.0)	1(1.5)	45.9
11	1(24)	-1(15.0)	1(1.5)	50.8
12	1(24)	1(40.0)	-1(0.5)	41.8
13	1(24)	-1(15.0)	-1(0.5)	50.2
14	0(16)	0(27.5)	0(1.0)	46.9
15	-1(8)	-1(15.0)	-1(0.5)	52.5
16	-1(8)	-1(15.0)	1(1.5)	46.4
17	1(24)	-1(15.0)	1(1.5)	50.5
18	-1(8)	1(40.0)	1(1.5)	44.9
19	-1(8)	-1(15.0)	1(1.5)	47.3
20	-1(8)	1(40.0)	-1(0.5)	44.8
21	0(16)	0(27.5)	0(1.0)	45.2

<sup>1)</sup>Mean values of three replicate measurements.

<sup>2)</sup>Dry weight basis.

효소적 분리법에 의한 쌀전분 제조

동결된 쌀가루(100 g)를 탈이온수(300 mL)와 혼합하고 반응온도에 도달할 때까지 가온하면서 교반하였다. 이후 protease를 가하여 반응시간 동안 반응온도를 유지하면서 교반하였다. 효소반응이 완료된 후 효소반응물을 400 mesh 표준체망(No. 400, Chunggye; Seoul, Korea)을 통과 시켜 전분 유를 분리하였다. 회수된 전분 유는 원심분리(100 g, 20 min)하여 상층액과 침전물을 분리한 후 침전물 상층부의 단백질을(밝은 노란색 층 또는 회백색 층)을 시약 스푼을 이용하여 조심스럽게 긁어(scraping) 제거하였다. 단백질을 제거된 침전물은 과량의 탈이온수를 가하여 분산시키고 상온에서 10분간 교반한 후 원심분리(100 g, 20 min)하였다. 이와 같은 일련의 과정은 침전물의 상층부에서 단백질을 더 이상 관찰되지 않을 때까지 3~6회 반복하였다. 최종적으로 회수한 침전물은 무수에탄올을 가하여 분산시키고 상온에서 30분간 교반한 후 감압여과하고 50°C에서 24 h 동안 열풍건조하여 쌀전분을 제조하였다. 한편 효소적 분리법에 의한 쌀전분의 대조군은 동일한 쌀가루를 원료로 하여 알칼리 침지법(Wang & Wang, 2004)에 의해 제조된 쌀전분으로 하였다. 제조된 쌀전분의 수율은 아래의 계산식에 의해 결정하였다.

$$\text{쌀전분 수율(\%)} = \frac{\text{제조된 쌀전분의 건물량(g, d.b)}}{\text{초기 쌀가루의 건물량(g, d.b)}} \times 100$$

총 전분 및 아밀로오스 함량

쌀전분들의 총 전분 함량은 AACC법 73-13에 따라 total starch assay kit (Megazyme Int., Wicklow, Ireland)를 이용하여 측정하였다(AACC, 2000). 아밀로오스 함량은 Chrastil (1987)에 따른 비색법을 이용하여 분석하였다. 효소적 분리법에 의해 얻은 쌀전분의 상대적 순도(relative purity)는 다음의 계산식에 의해 결정되었다.

$$\text{상대적 순도(\%)} = \frac{\text{효소적 분리법에 의한 쌀전분의 총 전분 함량(\%)}}{\text{대조군의 총 전분 함량(\%)}} \times 100$$

용해도와 팽윤력

쌀전분(0.5 g, d.b)을 탈이온수(25 mL)와 원심분리관에서 혼합한 후 85°C의 항온수욕조에서 5분 간격으로 vortexing 하면서 총 30분간 가열하고, 냉수욕조에서 20분간 냉각시켰다. 냉각된 쌀전분 페이스트는 원심분리(3,000 g, 20 min)하여 침전물과 상층액으로 분리하였다. 상층액은 정용 플라스크로 옮기고 탈이온수를 가하여 100 mL로 정용하였으며, 희석된 상층액은 페놀-황산법을 통해 총 당 함량을 측정하여 용해도를 아래의 계산식에 의해 결정하였다. 팽윤력은 원심분리 후 회수된 침전물의 무게를 측정하여 아래의 계산식에 따라 산출하였다(Kim & Kim, 2015).

$$\text{용해도 (\%, d.b)} = \frac{\text{상층액 내의 총 당(g)} \times 0.9}{\text{쌀전분의 건물량(g, d.b)}} \times 100$$

$$\text{팽윤력 (g/g)} = \frac{\text{침전물의 무게(g, w.b)}}{\text{쌀 전분의 건물량(g, d.b)} \times \left(\frac{1 - \text{용해도(\%)}}{100}\right)}$$

용해도 계산식의 0.9는 포도당의 몰 질량(180 g/mol)에 대한 무수포도당(anhydrous glucose unit)의 몰 질량(162 g/mol)의 비율이다.

호화특성

쌀전분의 호화특성은 시차주사열량계(DSC 4000, Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석하였다(Kim et al., 2013). 쌀전분(5 mg, d.b)을 스테인리스강 팬에 정밀하게 칭량하고 총 20 mg이 되도록 탈이온수를 가하여 기계적으로 밀봉한 후 상온(~24°C)에서 18 h 동안 방치하였다. 제조된 팬은 시차주사열량계를 사용하여 25~100°C까지 5°C/min의 가열속도로 스캔하여 DSC thermogram을 얻었다. Pyris software (version 11.1.0.04.88, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하여 호화온도와 호화엔탈피를 결정하였다.

페이스팅 점도 특성

쌀전분의 페이스팅 점도 특성은 신속점도분석기(RVA-3D, Newport Scientific, New South Wales, Australia)를 사용하여 분석하였다. 쌀전분(2 g, d.b)을 알루미늄 용기에 직접 칭량하고 탈이온수를 가하여 총 28 g으로 한 후 시약스푼과 플라스틱 회전축을 이용하여 완전히 분산시켰다. 제조된 분석시료는 신속점도분석기를 이용하여 미리 결정된 온도 프로파일에 따라 160 rpm으로 플라스틱 회전축을 회전시키며 페이스팅 점도변화를 조사하였다. 온도 프로파일은 초기 2분간 50°C로 온도를 유지시킨 후 95°C까지 12°C/min의 가열속도로 95°C까지 온도를 상승시켜 95°C에서 2분 30초간 유지하였고, 이 후 12°C/min의 냉각속도로 50°C까지 온도를 낮춰 50°C에서 2분간 유지하여 총 14분에 걸친 페이스팅 점도 프로파일을 얻었다.

통계처리

설계된 반응조건에 따라 쌀전분은 3회 반복하여 제조하여 수율을 결정하였다. 쌀전분의 수율들의 평균값들은 Design Expert (version 7, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 요인분산분석을 수행하였고, 주요인들과 이들의 교호작용들의 유의성을 95% 신뢰수준에서 검증하였다. 한편 대조군과 선별된 쌀전분들의 물리화학적 특성들은 3회 반복하여 분석하였고, 일원분산분석(one-way ANOVA)을 수행하여 평균±표준편차로 나타내었다. 분석된

특성치들의 평균값들 사이의 통계적 유의성은 Tukey's HSD multiple range test를 이용하여 95% 신뢰수준에서 검증하였다. 쌀전분들의 통계적 계산과 분석은 Minitab 18 (Minitab Inc., State College, PA, USA)를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분의 분리 및 수율

변형된 2<sup>3</sup> 완전요인설계법에 의해 도출된 protease 반응 조건들에 따라 제조된 쌀전분의 수율을 Table 1에 나타내었다. 쌀전분들의 수율은 42.7-52.9%의 범위에 있었으며, 쌀가루의 건물량 대비 0.5%의 protease를 가하여 15°C에서 8시간 동안 효소반응을 통해 제조한 경우(Run 8)가 52.9%로 가장 높은 수율을 나타내었다(Table 1). 그러나 모든 protease 반응조건들에 의해 제조된 쌀전분들의 수율은 알칼리 침지법에 의한 것(대조군, 61.8%)보다 낮은 수율을 나타내었다. 이는 본 연구에서 사용된 protease의 최적 pH가 6.5로 중성에 가깝기 때문으로 생각된다(Wang & Wang, 2001). Wang & Wang (2001)은 산성 및 알칼리 protease (각각 최적 pH 3.0과 9.8)를 사용하여 이들의 최적반응조건에서 쌀전분을 분리한 경우 알칼리 침지법에 의한 쌀전분의 수율과 유사하거나 유의적으로 높았으나, 중성 protease (최적 pH 7.5)의 경우에는 유의적으로 낮은 수율을 보고하였다.

효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분의 수율에 대한 protease 반응조건들의 영향을 조사하기 위해 Table 1의 결과를 이용하여 요인분산분석을 수행하였다(Table 2). 쌀전분의 수율에 반응온도와 protease 사용량은 유의적이었으나 ( $p < 0.05$ ), 반응시간은 유의적인 영향을 미치지 않았다 ( $p > 0.05$ ; Table 2). 그럼에도 반응시간과 반응온도, 반응시

간과 protease 사용량, 반응온도와 protease 사용량의 교호작용들은 모두 쌀전분의 수율에 유의적이었었다( $p < 0.05$ ; Table 2). 주요인들의 교호작용을 설명하는 반응표면 plot들에 의하면, 쌀전분의 수율은 주어진 반응시간에서 반응온도가 낮아질수록 증가하였으나, 30-40°C의 반응온도 범위에서는 반응시간이 연장될수록 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1A). 또한 반응시간이 짧아질수록, protease 사용량이 적어질수록 쌀전분의 수율은 증가하였고(Fig. 1B), 주어진 반응온도에서 protease 사용량이 증가할수록 쌀전분의 수율은 감소하였다(Fig. 1C). 따라서 쌀가루로부터 protease 처리를 통해 쌀전분을 분리할 때, 반응온도는 낮을수록, 반응시간은 짧을수록, protease 사용량은 적을수록 쌀전분의 수율이 증가하는 것으로 추정된다. 이러한 해석은 본 연구에 사용된 protease가 *Bacillus* 속의 세균으로부터 분리된 것으로 amylase 계통의 전분분해효소들이 미량 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다. 본 연구에 사용한 protease의 amylase 활성을 0.1% soluble starch 용액에 protease를 가하여 40°C에서 30분간 가열하여 생성된 환원당의 양으로 결정하였을 때(Aquino et al., 2003), 5.4 U/mL (1 unit은 단위 시간(min)당 1  $\mu$ mol의 환원당을 생성하는 효소양으로 정의)이었다. 한편 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들이 알칼리 침지법에 의한 것(대조군)의 물리화학적 특성에 상응하는지를 비교하기 위하여 본 연구에서 50% 이상 수율을 보이는 protease 반응조건들에 의해 제조된 쌀전분들을 선별하여 물리화학적 특성을 비교하였다. 선별된 쌀전분들은 Table 1에 제시된 조건들 중 0.5% protease를 이용하여 15°C에서 8시간 동안 분리한 것(Run 8과 15; RST1), 1.5% protease를 이용하여 15°C에서 24시간 동안 분리한 것(Run 11과 17; RST2)과 0.5% protease를 이용하여 15°C에서 24시간 동안 분리한 것(Run 4와 13; RST3)들이었다.

**Table 2.** ANOVA (analysis of variance) for the effects of factors and interactions on the yield of starches isolated from the frozen rice flour

Source	SS <sup>1)</sup>	df <sup>1)</sup>	MS <sup>1)</sup>	F-value	Prob>F
Regression	208.7	7	29.8	55.8	<0.0001
A <sup>2)</sup>	1.2	1	1.2	2.3	0.1526
B	161.8	1	161.8	302.9	<0.0001
C	4.1	1	4.1	7.6	0.0173
AB	9.8	1	9.8	18.4	0.0011
AC	8.6	1	8.6	16.1	0.0017
BC	16.3	1	16.3	30.6	0.0001
ABC	6.9	1	6.9	12.9	0.0037
Curvature	3.1	1	3.1	5.7	0.0341
Pure error	6.4	12	0.5		
Corrected total	218.2	20			
r <sup>2</sup>	0.9702				

<sup>1)</sup>SS, sum of squares; df, degree of freedom; MS, mean square.

<sup>2)</sup>The terms, A, B, and C, indicate the time, temperature, and protease concentration, respectively.

### 쌀전분의 상대적 순도와 아밀로오스 함량

선별된 쌀전분들의 상대적 순도는 대조군(알칼리침지법에 의해 제조된 쌀전분)에 대한 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분의 총 전분 함량의 백분비율로 나타내었다(Table 3). RST1, RST2와 RST3의 상대적 순도는 각각 102.5, 102.9, 100.9%이었고(Table 3), 이러한 결과는 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들이 대조군보다 높은 순도를 가진다는 것을 의미한다. 한편 아밀로오스 함량에 있어 대조군은 19.8%, RST1은 18.4%, RST2는 20.1%, RST3는 18.9%이었다(Table 3). 대조군과 선별된 쌀전분들 사이의 아밀로오스 함량의 차이는 미미한 수준이었으나, 통계적으로 대조군에 비해 RST2는 유의적이지 않았고 RST1과 RST3는 유의적으로 낮았다. 이것은 protease에 함유되어 있는 미량의 amylase 계통의 효소들에 의해 쌀전분들이 분리되는 동안 미미하게 손상된 결과인 것으로 생각된다.

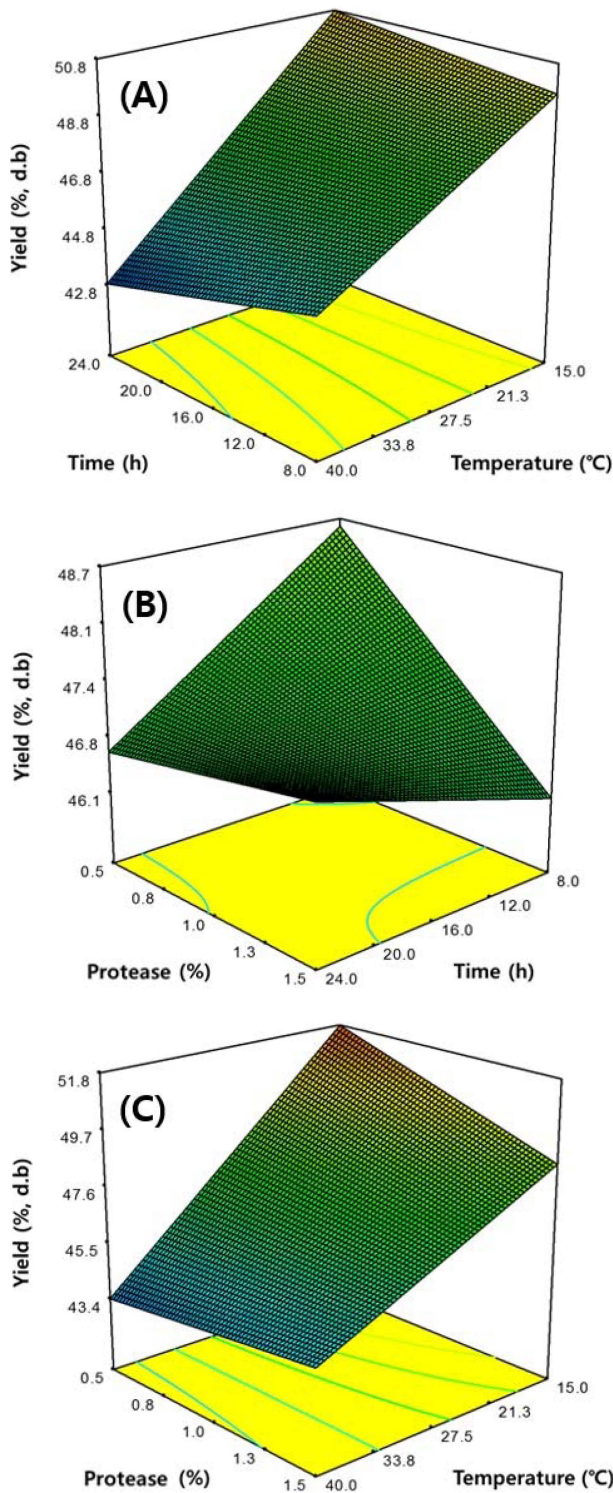


Fig. 1. Response surface plots describing the effects of the interactions among time, temperature and protease loading on the yield of starches isolated from the frozen rice flours by food-grade protease.

용해도와 팽윤력

대조군과 선별된 쌀전분들의 용해도와 팽윤력을 조사하여 Table 3에 제시하였다. 용해도는 RST1, RST2와 RST3

Table 3. Mean<sup>1)</sup> values for the relative purity, amylose content, solubility, and swelling power of starches isolated from the frozen rice flour by alkaline steeping and enzymatic methods

Rice starch <sup>2)</sup>	Relative purity (%)	Amylose content (% d.b. <sup>3)</sup> )	Solubility (% d.b. <sup>3)</sup> )	Swelling power (g/g)
Control	-	19.8±0.1 <sup>a</sup>	4.8±0.2 <sup>c</sup>	12.6±0.0 <sup>b</sup>
RST1	102.5±0.0 <sup>a</sup>	18.4±0.1 <sup>b</sup>	16.5±0.8 <sup>a</sup>	14.7±0.6 <sup>a</sup>
RST2	102.9±0.0 <sup>a</sup>	20.1±0.6 <sup>a</sup>	9.1±0.0 <sup>b</sup>	12.7±0.1 <sup>b</sup>
RST3	100.9±0.0 <sup>b</sup>	18.9±0.8 <sup>b</sup>	10.2±1.2 <sup>b</sup>	12.7±0.0 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Mean values of three replicate measurements; values sharing the same lowercase letters within columns are not significantly different at  $p < 0.05$ .

<sup>2)</sup>A control indicates a rice starch isolated from the frozen rice flour by an alkaline steeping method. RST1, RST2, and RST3 corresponded to rice starches isolated from the frozen rice flour by enzyme reactions for 8 h at 15°C with 0.5% protease, for 24 h at 15°C with 1.5% protease, and for 24 h at 15°C with 0.5% protease, respectively.

<sup>3)</sup>Dry weight basis.

가 각각 16.5, 9.1과 10.2%로 대조군(4.8%)에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타내었다(Table 3). Protease에 미량 함유되어 있는 amylase 계통의 효소들에 의해 쌀전분 입자들의 부분적인 손상으로 팽윤된 전분입자들로부터 전분분자들의 침출(leaching)이 빈번하게 일어난 결과인 것으로 판단된다(Evers & Stevens, 1985; Srichungwong et al., 2005). 한편 팽윤력은 RST1 (14.7 g/g)의 경우 대조군(12.6 g/g)에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타내었지만, RST2 (12.7 g/g)와 RST3 (12.7 g/g)는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 3). 전분입자의 팽윤은 아밀로펙틴의 역할이며, 아밀로오스의 증가와 함께 억제된다고 알려져 있다(Tester & Morrison, 1990). 또한 전분입자 미소결정의 완전성(perfection) 및 안정성(stability)이 높을수록 전분입자의 팽윤은 제한된다고 보고되었다(Srichungwong et al., 2005). Evers & Stevens (1985)은 전분의 용해도가 높을수록 팽윤력은 감소한다고 하였다. 그러나 본 연구에서 분석된 팽윤력은 쌀전분의 용해도를 고려하여 결정되었기 때문에 팽윤력에 대한 용해도 차이의 영향은 배제하였다. 따라서 대조군에 비해 RST1의 팽윤력이 유의적으로 높은 것은 RST1의 아밀로오스 함량이 대조군에 비해 유의적으로 낮으며(Table 3), RST1의 미소결정이 protease 처리 동안 부분적으로 손상되었기 때문으로 생각된다. 게다가 RST2와 RST3는 장시간의 반응시간을 거쳐 제조되면서 annealing 현상에 의해 대조군이나 RST1에 비해 낮은 팽윤력을 나타낸 것으로 판단된다(Zavareze & Dias, 2011). 한편 아밀로오스 함량이 RST1과 유사한 RST3의 팽윤력이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않는 것은 RST3 내 미소결정들의 완전성과 안정성이 protease 처리하는 동안 향상되었음을 암시하며, 이로 인해 대조군에 비해 낮은 아밀로오스 함량의 영향이 상쇄되었기 때문으로 생각된다.

## 호화특성

대조군과 선별된 쌀전분들의 호화온도와 호화엔탈피를 시차주사열량계로 분석하여 Table 4에 나타내었다. 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들(RST1, RST2와 RST3)의 호화개시온도는 54.4-55.7°C, 호화최고온도는 62.9-63.7°C, 호화종결온도는 72.4-72.8°C의 범위에 있었으며, 모든 호화온도들이 대조군에 비해 유의적으로 높았다(Table 4). 전분의 호화온도는 미소결정의 완전성을 설명하며(Tester & Morrison, 1990), 호화온도가 높을수록(Zhou et al., 2010), 호화온도범위(호화개시온도와 호화종결온도의 차)가 좁을수록(Tester & Morrison, 1990) 미소결정의 완전성은 향상된다고 알려져 있다. 본 연구에서 RST1, RST2와 RST3의 호화온도범위는 각각 18.4°C, 16.9°C와 17.0°C이었으며, RST1을 제외하고 대조군(17.8°C)보다 낮은 수준을 나타내었다. 그래서 RST1은 대조군보다 호화온도가 미미하지만 유의적으로 상승하였음에도 RST1의 미소결정은 protease 처리 동안 부분적으로 손상된 것으로 생각되며, 이는 RST1의 높은 팽윤력(Table 3)에 대한 해석을 지지하는 것으로 판단된다. 반면 RST2와 RST3의 호화온도범위가 대조군보다 적은 것은 protease 처리(15°C, 24 h)에 의해 쌀전분을 분리하는 동안 annealing이 진행된 결과인 것으로 추정된다. Zavareze & Dias (2011)은 annealing은 전분의 호화개시온도와 호화최고온도를 상승시키고 좁은 호화온도범위를 유발시킨다고 하였다. 한편 호화엔탈피는 대조군(15.5 J/g)에 비해 선별된 쌀전분들(12.9-14.5 J/g)이 유의적으로 낮은 수준을 나타내었다. Tester & Morrison (1990)은 전분의 미소결정의 양은 호화엔탈피와 직접적으로 비례한다고 하였다. Zavareze & Dias (2011)은 annealing은 전분의 호화엔탈피에 있어 영향을 미치지 않거나 상승시킨다고 하였다. 그럼에도 본 연구에서 선별된 쌀전분들이 대조군에 비해 낮은 호화엔탈피를 보인 것은 protease 처리를

**Table 4.** Mean<sup>1)</sup> values for gelatinization temperature and enthalpy of starches isolated from the frozen rice flour by alkaline steeping and enzymatic methods

Rice starch <sup>2)</sup>	Gelatinization temperature (°C)			Gelatinization enthalpy (J/g)
	$T_o^{3)}$	$T_p^{3)}$	$T_c^{3)}$	
Control	53.9±0.0 <sup>d</sup>	61.7±0.0 <sup>c</sup>	71.7±0.1 <sup>b</sup>	15.5±0.1 <sup>a</sup>
RST1	54.4±0.3 <sup>c</sup>	62.9±0.1 <sup>b</sup>	72.8±0.1 <sup>a</sup>	13.3±0.3 <sup>c</sup>
RST2	55.7±0.0 <sup>a</sup>	63.7±0.5 <sup>a</sup>	72.6±0.3 <sup>a</sup>	12.9±1.1 <sup>bc</sup>
RST3	55.4±0.1 <sup>b</sup>	63.0±0.0 <sup>b</sup>	72.4±0.4 <sup>a</sup>	14.5±0.4 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Mean values of three replicate measurements; values sharing the same lowercase letters within columns are not significantly different at  $p < 0.05$ .

<sup>2)</sup>A control indicates a rice starch isolated from the frozen rice flour by an alkaline steeping method. RST1, RST2, and RST3 corresponded to rice starches isolated from the frozen rice flour by enzyme reactions for 8 h at 15°C with 0.5% protease, for 24 h at 15°C with 1.5% protease, and for 24 h at 15°C with 0.5% protease, respectively.

<sup>3)</sup> $T_o$ ,  $T_p$ , and  $T_c$  indicate the gelatinization onset, peak, and completion temperatures, respectively.

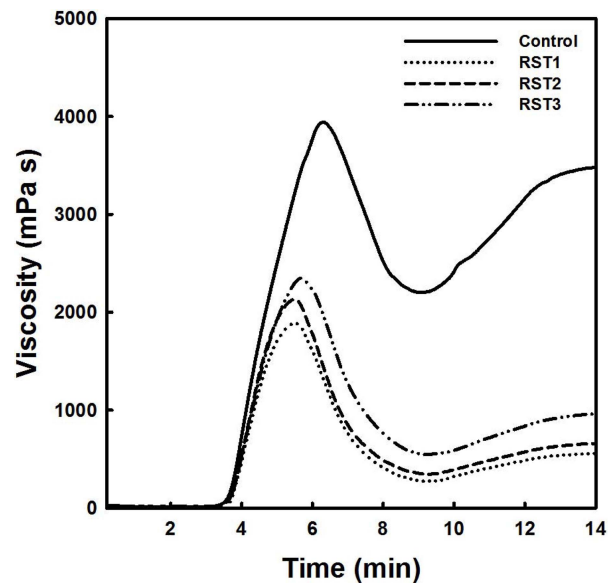
통해 쌀전분을 분리하는 과정 중 annealing에 의해 미소결정들의 완전성(또는 안정성)이 향상되는 동시에 protease의 amylase 계통 효소들에 의해 불완전한 미소결정들이 부분적으로 손상된 것으로 생각된다.

## 페이스팅 점도

신속점도분석기를 이용하여 대조군과 선별된 쌀전분들의 페이스팅 점도 특성을 조사하였다(Fig. 2). 대조군의 페이스팅 점도 프로파일은 전형적인 쌀전분의 것과 유사하였다(Srichungwong et al., 2005). 그러나 효소적 분리·추출법에 의한 쌀전분들은 대조군에 비해 페이스팅 점도가 모든 온도프로파일에 있어 낮은 수준을 나타내었다. 게다가  $\alpha$ -amylase와 amyloglucosidase에 의해 제조된 다공성 옥수수전분의 페이스팅 점도 특성과 유사하였다(Zhao et al., 2018). 따라서 선별된 쌀전분의 페이스팅 점도 특성은 본 연구에서 사용된 protease에 함유되어 있는 미량의 amylase 계통 효소들에 의해 쌀전분을 분리하는 동안 쌀전분 입자가 부분적으로 손상되었기 때문인 것으로 생각된다.

## 요 약

식품첨가물등급의 protease를 이용하여 쌀가루로부터 쌀전분을 분리하는 효소적 쌀전분 분리·정제법을 구축하기 위해 protease의 반응시간, 반응온도와 농도를 요인으로 하여 변형된 2<sup>3</sup> 완전요인설계법에 따라 protease 반응조건들



**Fig. 2.** Pasting viscosity profiles of starches isolated from the frozen rice flour. A control indicates a rice starch isolated from the frozen rice flour by an alkaline steeping method. RST1, RST2, and RST3 corresponded to rice starches isolated from the frozen rice flour by enzyme reactions for 8 h at 15°C with 0.5% protease, for 24 h at 15°C with 1.5% protease, and for 24 h at 15°C with 0.5% protease, respectively.

을 설계하고 이에 따른 쌀전분들의 수율을 조사하였다. 설계된 반응조건들에 따라 제조된 쌀전분들의 수율들에 기초한 반응표면분석을 통해 쌀전분 수율에 대한 protease 반응 조건들의 영향을 조사하였다. 또한 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들의 상업적 활용도를 평가하기 위해 알칼리 침지법에 의해 제조된 쌀전분(대조군)과 물리화학적 특성을 대해 비교 분석하였다. Protease를 이용한 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들의 수율은 대조군보다 낮았지만 그 상대적 순도는 높은 수준을 나타내었다. Protease에 미량 함유되어 있는 amylase 계통의 효소들에 의한 쌀전분의 부분적인 손상이 예상되에도 1.5% protease를 이용하여 15°C에서 24시간 동안 처리하여 제조된 쌀전분(RST2)의 아밀로오스 함량은 대조군의 것과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 용해도는 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들이 대조군보다 유의적으로 높은 수준을 나타내었다. 팽윤력은 RST2와 0.5% protease를 이용하여 15°C에서 24시간 동안 처리하여 제조된 쌀전분(RST3)이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 호화온도는 대조군에 비해 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들이 높은 수준을 나타내었으나 호화엔탈피는 유의적으로 낮은 수준이었다. 페이스팅 점도는 대조군에 비해 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들이 모든 온도프로파일에 있어 낮은 수준을 나타내었다. 이와 같은 결과들은 효소적 분리·정제법에 사용된 protease에 미량 함유되어 있는 amylase 계통의 효소들에 의한 쌀전분의 부분적인 손상과 protease 처리하는 동안 쌀전분에 있어 annealing이 진행된 결과인 것으로 생각된다. 그럼에도 본 연구에서 효소적 분리·정제법에 의해 제조된 쌀전분들은 높은 고형분 함량을 요구하며, 페이스트의 겔화 또는 노화의 진행이 지연되는 특성을 가공식품의 원료로 적합한 것으로 판단된다. 따라서 효소적 분리·정제법에 의한 쌀전분들은 기존의 알칼리 침지법에 의한 쌀전분과는 다른 특성을 보유한 쌀전분 소재로서 활용가능성이 있을 것으로 생각된다. 또한 효소적 분리·정제법은 알칼리 침지법에 비해 쌀전분의 제조 시간을 단축할 수 있으며, 고농도의 염 용액을 배출하지 않아 경제적인 방법인 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업(과제번호 314041-3와 318029-3)에 의해 이루어진 것의 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

## References

AACC. 2000. Approved methods of the AACC. 10th ed. Method 73-13. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA.  
Adoracion PR, Li XL, Okita TW, Juliano BO. 1993. Characteriza-

tion of poorly digested protein of cooked rice protein bodies. *Cereal Chem.* 70: 101-105.  
Amagliani L, O'Regan J, Kelly AL, O'Mahony JA. 2017. The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 64: 1-12.  
Aquino ACMM, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM. 2003. Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 323-328.  
aTFIS. 2017. A 2016 trend in the processed food market: rice-based, processed foods. Available from: <http://www.atfis.or.kr/article/M001050000/view.do?articleId=2446&page=4&search-Key=&searchString=&searchCategory=>. Accessed July 7, 2019.  
BeMiller JN. 1997. Starch modification: Challenges and prospects. *Starch/Stärke* 49: 127-131.  
Chrastil J. 1987. Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. *Carbohyd. Res.* 159: 154-158.  
Evers AD, Stevens DJ. 1985. Starch damage. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 7: 321-349.  
Kim EJ, Kim HS. 2015. Physicochemical properties of dehydrated potato parenchyma cells with ungelatinized and gelatinized starches. *Carbohyd. Polym.* 117: 845-852.  
Kim HS, Patel B, BeMiller JN. 2013. Effects of the amylose-amylopectin ratio on starch-hydrocolloid interactions. *Carbohyd. Polym.* 98: 1438-1448.  
Kim MR. 2011. The Status of Korea's rice industry and the rice processing industry. *Food Industry and Nutrition* 16: 22-26.  
Lim ST, Lee JH, Shin DH, Lim HS. 1999. Comparison of protein extraction solutions for rice starch isolation and effects of residual protein content on starch pasting properties. *Starch/Stärke* 51: 120-125.  
Maningat, CC, Juliano BO. 1979. Properties of lintnerized starch granules from rices differing in amylose content and gelatinization temperature. *Starch/Stärke* 31: 5-10.  
Shin M. 2009. Rice-Processed Food. *Food Science and Industry* 42: 2-18.  
Srichungwong S, Sunarti TC, Mishima T, Isono N, Hisamatsu M. 2005. Starches from different botanical sources II: Contribution of starch structure to swelling and pasting properties. *Carbohyd. Polym.* 62: 25-34.  
Tester RF, Morrison WR. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chem.* 67: 551-557.  
Wang L, Wang YJ. 2001. Comparison of protease digestion at neutral pH with alkaline steeping method for rice starch isolation. *Cereal Chem.* 78: 690-692.  
Wang L, Wang YJ. 2004. Rice starch isolation by neutral protease and high intensity ultrasound. *J. Cereal Sci.* 39: 291-296.  
Zavareze EdR, Dias ARG. 2011. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. *Carbohyd. Polym.* 83: 317-328.  
Zhao AQ, Yu L, Yang M, Wang CJ, Wang MM, Bai X. 2018. Effects of the combination of freeze-thawing and enzymatic hydrolysis on the microstructure and physicochemical properties of porous corn starch. *Food Hydrocolloid.* 83: 465-472.  
Zhou X, Baik BK, Wang R, Lim ST. 2010. Retrogradation of waxy and normal corn starch gels by temperature cycling. *J. Cereal Sci.* 51: 57-65.