



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월09일

(11) 등록번호 10-1535044

(24) 등록일자 2015년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23J 1/12 (2006.01) A23J 3/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7008821(분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년12월08일

심사청구일자 2014년04월15일

(85) 번역문제출일자 2014년04월02일

(65) 공개번호 10-2014-0044412

(43) 공개일자 2014년04월14일

(62) 원출원 특허 10-2008-7016461

원출원일자(국제) 2006년12월08일

심사청구일자 2011년09월07일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/011873

(87) 국제공개번호 WO 2007/065718

국제공개일자 2007년06월14일

(30) 우선권주장

60/748,192 2005년12월08일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Karabi Datta 외 11인, 'Bioengineered  
' golden' indica rice cultivars with  
β-carotene metabolism in the endosperm with  
hygromycin and mannose selection systems',  
Plant Biotechnology Journal, 2003년, 81-90\*  
한국영양식량학회지 제15권제3호, 497~503쪽,  
1996년.

US3806603 A

EP1070457 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이.

네덜란드 엔엘-6411 티이 헤르렌 헤트 오버룬 1

(72) 발명자

백 마르쿠스

독일 79540 괴라흐 암 바젤베그 16

헤티아라호히 나바그나나 에스

미국 아칸소주 72701 페이트빌 세터 스트리트  
2989

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 하혜경

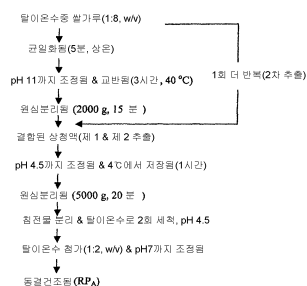
(54) 발명의 명칭 **활성 성분을 위한 보호성 하이드로콜로이드**

(57) 요약

(변형된) 쌀 배유 단백질이 활성 성분, 특히 지용성 활성 성분 및/또는 착색제를 위한 신규한 보호성 하이드로콜로이드로서 사용된다. (변형된) 쌀 배유 단백질 및 하나 이상의 활성 성분을 포함하는 조성물 및 이들의 제조방법 뿐만 아니라 (변형된) 쌀 배유 단백질 자체 및 그의 제조방법이 포함된다. 이러한 조성물은 식품, 음료, 동

(뒷면에 계속)

**대 표 도** - 도1



물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물의 강화, 보강 및/또는 착색을 위해 사용되고, 본 발명은 (변형된) 쌀 배유 단백질을 함유하는 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물 및 이러한 조성물 각각에 관한 것이다.

(72) 발명자

**루엔베르거 브루노 에이치**

스위스 체하-4123 알쉬빌 뮈엘바흐베그 23

**파라만 일란코반**

미국 아칸소주 72701 페이트빌 엔 레버렛 애비뉴  
920 아파트먼트 820

**셰퍼 크리스찬**

독일 79618 라인펠덴 앙거스트라쎄 16

**바그너 게르하르트**

독일 79664 베어 알베르트-루프 스트라쎄 17

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

쌀 배유 단백질, 및 지용성 활성 성분 또는 착색제를 포함하되, 쌀겨(rice bran)를 함유하지 않는 조성물로서, 이때 상기 지용성 활성 성분 또는 착색제는 카로텐 또는 구조적으로 관련된 폴리엔 화합물, 지용성 비타민, 트라이글리세라이드, 지용성 UV-A 필터, UV-B 필터 또는 이들의 혼합물이며, 조성물의 총량을 기준으로 0.1 내지 90중량%로 함유되고,

상기 쌀 배유 단백질은 하기 단계 a) 내지 e)를 포함하되, 단계 b), c) 및 d) 중 하나 이상을 수행하는, 분쇄(milling) 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀로부터 출발하는 방법에 의해 제조되는, 조성물:

a) 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 수용액 또는 현탁액을 제조하는 단계로서, 이때 상기 수용액 또는 현탁액의 건조 질량 함량이 상기 수용액 또는 현탁액의 총량을 기준으로 0.1 내지 30중량%인, 단계;

b) 선택적으로, 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 비-단백질 부분 또는 단백질 부분을 제거하여 쌀 배유 단백질을 수득하는 단계;

c) 선택적으로, 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 단백질 부분을 변형시켜 변형된 쌀 배유 단백질을 수득하는 단계;

d) 선택적으로, 쌀 배유 단백질을 분리하는 단계; 및

e) 선택적으로, 쌀 배유 단백질을 고체 형태로 전환시키는 단계.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

쌀 배유 단백질이 변형된 쌀 배유 단백질인, 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

카로텐 또는 구조적으로 관련된 폴리엔 화합물이  $\alpha$ -카로텐,  $\beta$ -카로텐, 8'-아포- $\beta$ -카로텐알, 8'-아포- $\beta$ -카로텐산 에스터, 칸타잔틴, 아스타잔틴, 라이코펜, 루테인, 제아잔틴, 크로세틴,  $\alpha$ -제아카로텐,  $\beta$ -제아카로텐 또는 이들의 혼합물과 같은 카로테노이드인, 조성물.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서,

카로테노이드가  $\beta$ -카로텐인, 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

지용성 비타민이 비타민 A 또는 E인, 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

단당류, 이당류, 올리고당류, 다당류, 글리세롤, 트라이글리세라이드, 수용성 산화방지제 및 지용성 산화방지제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물이 추가로 존재하는, 조성물.

**청구항 7**

제 6 항에 있어서,

단당류 또는 이당류가 수크로스, 전화당, 자일로스, 글루코스, 과당, 유당, 말토스, 사카로스 또는 당 알콜인, 조성물.

**청구항 8**

제 6 항에 있어서,

올리고당류 또는 다당류가 전분, 전분 가수분해물 또는 변형된 전분인, 조성물.

**청구항 9**

제 8 항에 있어서,

전분 가수분해물이 텍스트린, 말토텍스트린 또는 글루코스 시럽인, 조성물.

**청구항 10**

제 1 항에 있어서,

트라이글리세라이드가 식물성 오일 또는 지방인, 조성물.

**청구항 11**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

지방산의 모노글리세라이드 및 다이글리세라이드, 지방산의 폴리글리세롤 에스터, 레시틴 및 소르비탄 모노스테아레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 공-유화제(co-emulgator)가 추가로 존재하는, 조성물.

**청구항 12**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

쌀 배유 단백질의 유화력(emulsion capacity)이 220 이상인, 조성물.

**청구항 13**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

쌀 배유 단백질의 유화 활성이 0.2 이상인, 조성물.

**청구항 14**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

쌀 배유 단백질의 양이 조성물의 총량을 기준으로 1 내지 70중량%인, 조성물.

**청구항 15**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

분말 형태인 조성물.

**청구항 16**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

쌀 배유 단백질이 환원당, 당단백질 및 당펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물과 가교결합된, 조성물.

**청구항 17**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물을 강화, 보강 또는 착색하기 위한 조성물.

#### 청구항 18

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물로서 사용하기 위한 조성물.

#### 청구항 19

활성 성분을 위한 보호성 하이드로콜로이드로서 쌀 배유 단백질을 포함하되, 쌀겨는 함유하지 않는 조성물로서, 이때 상기 활성 성분은 카로텐 또는 구조적으로 관련된 폴리엔 화합물, 지용성 비타민, 트라이글리세라이드, 지용성 UV-A 필터, UV-B 필터 또는 이들의 혼합물로부터 선택되고,

상기 쌀 배유 단백질은 하기 단계 a) 내지 e)를 포함하되, 단계 b), c) 및 d) 중 하나 이상을 수행하는, 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀로부터 출발하는 방법에 의해 제조되는, 조성물:

a) 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 수용액 또는 현탁액을 제조하는 단계로서, 이때 상기 수용액 또는 현탁액의 건조 질량 함량이 상기 수용액 또는 현탁액의 총량을 기준으로 0.1 내지 30중량%인, 단계;

b) 선택적으로, 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 비-단백질 부분 또는 단백질 부분을 제거하여 쌀 배유 단백질을 수득하는 단계;

c) 선택적으로, 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 단백질 부분을 변형시켜 변형된 쌀 배유 단백질을 수득하는 단계;

d) 선택적으로, 쌀 배유 단백질을 분리하는 단계; 및

e) 선택적으로, 쌀 배유 단백질을 고체 형태로 전환시키는 단계.

#### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 발명은 활성 성분, 특히 지용성 활성 성분 및/또는 착색제를 위한 신규한 보호성 하이드로콜로이드로서 (변형된) 쌀 배유 단백질의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 (변형된) 쌀 배유 단백질 및 하나 이상의 활성 성분을 포함하는 조성물 및 이들의 제조방법 뿐만 아니라 (변형된) 쌀 배유 단백질 자체 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물의 강화, 보강 및/또는 착색을 위한 이러한 조성물의 용도, 및 이러한 (변형된) 쌀 배유 단백질을 함유하는 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물 및 이러한 조성물 각각에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002]

활성 성분, 특히 지용성 활성 성분 또는 착색제는 보통 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물에 그대로 첨가되지 않고, 화학적 안정성, 수용성, 자유-유동 및 제어된 방출 등과 같은 성질을 향상시키기 위해 방수성 콜로이드중 활성 성분의 제형 형태로 첨가된다. 공지된 방수성 콜로이드는 예를 들면 상이한 기원 (가금류, 소, 돼지, 어류)의 젤라틴 및 전분이다. 동물 기원의 방수성 콜로이드가 종교적 또는 알러지원이라는 이유로 보통 바람직하지 않고 전분계 방수성 콜로이드는 글루텐 및 옥수수 비함유 제품에 관심이 있는 소비자에게는 선호도가 낮을 수 있기 때문에, 대안적인 방수성 콜로이드에 대한 지속적인 필요성이 존재한다.

[0003]

쌀 배유 단백질은 영양분을 공급하고 저자극성인 것으로 인식되고 따라서 활성 성분의 제형을 위한 보호성 하이드로콜로이드의 적절한 대안적 공급원이 될 수 있다. 그러나, 중성 pH에서 쌀 배유 단백질의 높은 불용성 및 열등한 기능성은 식품 및 약학 제품에서 기능성 성분으로서 그 산업적 응용을 한정한다. 본 발명은 이러한 한계를 극복하고, 특히 지용성 활성 성분 및/또는 착색제의 활성 성분의 제형을 위한 보호성 하이드로콜로이드로서 (변형된) 쌀 배유 단백질을 도입한다.

- [0004] 쌀 단백질은 다른 곡물(예를 들면, 옥수수 및 밀)과 비교하여 영양면에서 높은 등급을 받고 따라서 식품 원료로서 엄청난 잠재적 용도를 갖는 것으로 인식된다. 곡물 그레인 단백질에는 필수 아미노산 시스테인 및 메티오닌이 풍부하다. 라이신은 곡물 단백질에서 1차 제한적 아미노산이지만, 쌀은 다른 곡물 단백질(밀 2.3, 옥수수 2.5g/16gN)보다 라이신(3.8g/16gN)을 더 많이 함유한다(아래 인용된 참고문헌 4 참조). 쌀이 일반적으로 보통의 그레인중(밀 10.6%, 옥수수 9.8%, 보리 11.0%, 기장 11.5%) 가장 낮은 단백질 함량(7.3%)을 갖는 것으로 간주되지만, 쌀 단백질의 알짜 단백질 이용효율(73.8%)은 곡물 그레인(밀 53.0%, 옥수수 58.0%, 보리 62.0%, 기장 56.0%)중 가장 높다.
- [0005] 다른 곡물 단백질과 비교하여, 쌀 단백질은 분리하기가 어렵고 따라서 비용이 비싸다. 주된 쌀 단백질, 글루텔린은 소수성이고 다이설파이드 결합과 가교결합된다. 추출된 단백질은 원래 매우 불용성이고 단백질 분리에 사용된 조건은 그 용해도를 추가로 감소시키며 따라서 기능성 원료로서 제한된 용도를 갖는다. 고단백질 쌀 제품은 등전적 pH에서 단백질을 알칼리 추출하고 침전시켜 쌀가루로부터 수득할 수 있다. 알파-아밀라아제, 글루코아밀라아제, 및 플롤라나아제와 같은 전분-가수분해 효소가 종종 쌀가루에서 전분을 용해시키고 제거함으로써 단백질을 분리하기 위해 사용된다. 전분 가수분해 효소에 덧붙여, 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제 효소가 쌀 단백질 농축물에서 단백질 함량을 추가로 증가시키기 위해 사용되었다. 그러나, 이러한 분리물의 적절한 추출방법 및 기능성에 대한 정보가 한정되어 있다. 승인된 식품 등급 효소 및 화학물질을 사용하는 효과적인 추출방법이 쌀 단백질의 상업적 생산 및 응용에 필수적이다.
- [0006] 이러한 필요성은 쌀 배유 단백질 및 활성 성분을 포함하는 본 발명의 조성물에 의해 달성된다.
- [0007] 배경기술 정보
- [0008] 1. 우유 및 콩에 대한 어린이 알러지에 있어서 쌀 가수분해물 제형에 대한 내성[Fiocchi, A.; Travaini, M.; D'Auria, E.; Banderali, G.; Bernardo, L.; Riva, E. Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy. Clin Exp Allergy 2003, 33(11), 1576-80].
- [0009] 2. 래트를 키울 때 조리된 필리핀 쌀 다이어트 및 분쇄된 쌀의 단백질 및 라이신 소화성 및 단백질 품질[Eggum, B. O.; Cabrera, M. I. Z.; Juliano, B. O. Protein and lysine digestibility and protein quality of cooked Filipino rice diets and milled rice in growing rats. Plant Foods Hum. Nutr. 1992, 43 (2), 163-170].
- [0010] 3. 베이킹을 위한 쌀가루[Bean, M. M.; Nishita, K. D. Rice flours for baking. In Juliano B.O., editor. Rice chemistry and technology, 2nd ed. St. Paul: Amer Assoc, of Cereal Chemists. 1985, pp 539-556].
- [0011] 4. 쌀: 화학과 기술[Juliano, B. O. Rice: chemistry and technology. St. Paul, Minn.: American Association of Cereal Chemists. 1985].
- [0012] 5. 프로나아제 처리된 쌀 글루텔린의 물리화학적 성질[Anderson, A.; Hettiarachchy, N. S.; Yu, Z. Y. Physicochemical properties of pronase treated rice glutelin. Journal of the American Oil Chemists' Society 2000, 78 (1), 1-6].
- [0013] 6. 쌀가루 단백질의 추출, 변성 및 소수성[Yu, Z. Y.; Hettiarachchy, N. S.; Rath, N. Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. J. Food Sci. 2001, 66 (2), 229-232].
- [0014] 7. 쌀 단백질의 추출 및 특성화[Padhye, V. W.; Salunke, D. K. Extraction and characterization of rice proteins. Cereal chem. 1979, 106 (3), 389-393].
- [0015] 8. 쌀 배유 글루텔린 및 프롤라민의 추출 및 조성물에 대한 연구[Tecson, E. M. S.; Esmama, B. V.; Lontok, L. P.; Juliano, B. O. Studies on the extraction and composition of rice endosperm glutelin and prolamin. Cereal Chem. 1971, 168-181].
- [0016] 9. 쌀 글루텔린의 생화학적 특성화[Wen, T. N.; Luthe, D. S. Biochemical characterization of rice glutelin. Plant Physiol. 1985, 78, 172-177].
- [0017] 10. 쌀 단백질 분리물을 위한 대량생산 방법 및 영양 평가[Morita, T.; Kiriya, S. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. J. Food Sci. 1993, 58 (6), 1939-1406].
- [0018] 11. 열안정성 알파-아밀라아제를 사용한 분쇄된 쌀가루로부터 가수분해된 쌀 몰토덱스트린의 생산 및 크기 분배[Griffin, V. K.; Brooks, J. R. Production and size distribution of rice maltodextrin hydrolyzed from

milled rice flour using heat stable alpha-amylase. J. Food Sci. 1989, 54, 190-193].

- [0019] 12. 쌀가루로부터 단백질을 분리하기 위한 효소의 용도[Shih, F. F.; Daigle, K. Use of enzymes for the separation of protein from rice flour. Cereal Chem. 1997, 74 (4), 437-441].
- [0020] 13. 쌀겨 및 쌀가루로부터 단백질 제품의 가공시 효소의 용도[Shih, F.F.; Champagne, E.T.; Daigle, K.; Zarins, Z. Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour. Nahrung 1999, 43, 14-18].
- [0021] 14. 쌀 단백질 분리물의 제조 및 특성화[Shih, F.F.; Daigle, K. W. Preparation and characterization of rice protein isolates. Journal of the American Oil Chemists' Society 2000, 77, 885-889].
- [0022] 15. 열안정화된 지방을 제거한 쌀겨로부터 단백질 추출[Tang, S.; Hettiarachchy, N. S.; Eswaranandam, S.; Crandall, P. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: II. The role of amylase, celluclast, and viscozyme. . J. Food Sci . 2003, 68 (2), 471-470].
- [0023] 16. AACC. 방법 46-08[Approved Methods of the American Association of Cereal chemists, 8th ed., vol 2. AACC, St. Paul, MN. 1990, P 1-2].
- [0024] 17. 박테리오파지 T4의 헤드의 조립중 구조적 단백질의 분해[Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970, 227, 680-686].
- [0025] 18. 우유 및 콩 단백질의 용해도에 대한 소수성 및 알짜 전하의 관계[Hayakawa, S.; Nakai, S . Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. J. Food Sci. 1985, 50, 486-491].
- [0026] 19. 쌀겨 단백질 농축물의 용해도, 유화 및 발포성질[Bera, M. B.; Mukherjee, R. K. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. J. Food Sci. 1989, 54 (1), 142-145].
- [0027] 20. 단백질의 유화성[Pearce, K.N.; Kinsella, J.E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 1978, 26, 716-722].
- [0028] 21. SAS. 2002[JMP<sup>®</sup> User's Guide, Version 5. SAS Institute Inc. Cary, NC.]
- [0029] 22. 분리된 콩 단백질[Kolar, C. W.; Richert, S. H.; Decker, C. D.; Steinke, F. H.; Vander, R. J. Isolated soy protein. In New Protein Foods; Altschul, AM., Wilcke, HL., Eds.; Academic Press: New York, 1985; Vol. 5].
- [0030] 23. 식품 연구에서 차등 주사 열량계[Biliaderis, C. G. Differential scanning calorimetry in food research: A review. Food Chem. 1983, 10, 239-265].
- [0031] 24. 단백질-안정화된 발포체 및 에멀전[Damodarn, S. Protein-stabilized foams and emulsions. J. Food Sci. 2005, 70 (3), 54-66].

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0032] 본 발명은 활성 성분, 특히 지용성 활성 성분 및/또는 착색제를 위한 신규한 보호성 하이드로콜로이드로서 (변형된) 쌀 배유 단백질의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 (변형된) 쌀 배유 단백질 및 하나 이상의 활성 성분을 포함하는 조성물 및 이들의 제조방법 뿐만 아니라 (변형된) 쌀 배유 단백질 자체 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물의 강화, 보강 및/또는 착색을 위한 이러한 조성물의 용도, 및 이러한 (변형된) 쌀 배유 단백질을 함유하는 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물 및 이러한 조성물 각각에 관한 것이다.

## 과제의 해결 수단

[0033]

본 발명의 조성물

[0034]

본 발명의 조성물은 고체 조성물, 즉 안정한 수용성 또는 수불용성 분말이거나, 액체 조성물, 즉 상기 분말의 수성 콜로이드성 용액 또는 수중유적형 분산액일 수 있다. 안정화된 수중유적형 분산액은 수중유적형 에멀전이거나 현탁된, 즉 고체, 입자 및 유화된, 즉 액체, 액적의 혼합물을 특징으로 하고, 아래 기술한 방법에 의해 또는 유사 방식에 의해 제조될 수 있다.

[0035]

더욱 구체적으로, 본 발명은 (변형된) 쌀 배유 단백질의 매트릭스 안에서 하나 이상의 (지용성) 활성 성분 및/또는 하나 이상의 착색제를 포함하는 분말 형태의 안정한 조성물에 관한 것이다.

[0036]

바람직하게는, 조성물의 총량을 기준으로 (변형된) 쌀 배유 단백질의 양은 1 내지 70중량%, 더욱 바람직하게는 5 내지 50중량%, 더욱 바람직하게는 10 내지 40중량%, 가장 바람직하게는 10 내지 20중량%(20중량%가 가장 바람직한 것임)이고/이거나 (지용성) 활성 성분 및/또는 착색제의 양은 0.1 내지 90중량%, 바람직하게는 1 내지 80중량%, 더욱 바람직하게는 1 내지 20중량%이다. 토코페롤 및/또는 아스코빌 팔미테이트와 같은 부가적인 보조제 및/또는 부형제가 존재하면, 이들은 조성물의 총량을 기준으로 0.01 내지 50중량%, 바람직하게는 0.1 내지 30중량%, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 10중량%의 양으로 존재한다.

## 도면의 간단한 설명

[0037]

도 1 및 도 2는 화학적 및 효소적 추출 절차에 대한 검토를 나타낸다.

도 3은 쌀 단백질의 전기영동 특성을 나타낸다.

도 4는 가수분해 시간의 함수로서 알칼라아제, 리퀴파놀 또는 펩신으로 처리된 쌀 배유 단백질의 가수분해 특성을 나타낸다.

도 5는 가수분해도의 함수로서 알칼라아제, 리퀴파놀 또는 펩신으로 처리된 쌀 배유 단백질 가수분해산물의 표면 소수성을 나타낸다.

도 6은 가수분해도의 함수로서 알칼라아제, 리퀴파놀 또는 펩신으로 처리된 쌀 배유 단백질 가수분해산물의 용해도를 나타낸다.

도 7은 SDS PAGE 겔 전기영동에 의해 측정된 펩신, 리퀴파놀 및 알칼라아제로 처리함에 의해 생성된 쌀 단백질 및 가수분해산물의 분자 크기 특성을 나타낸다.

도 8은 SDS PAGE 겔 전기영동에 의해 측정된 알칼라아제로 처리된 쌀 단백질 가수분해산물의 분자 크기 특성을 나타낸다.

도 9는 가수분해도의 함수로서 알칼라아제, 리퀴파놀 및 펩신으로 처리된 쌀 단백질 가수분해산물의 유화 특성을 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038]

(변형된) 쌀 배유 단백질

[0039]

본 발명의 바람직한 실시태양에서, 쌀 배유 단백질은 변형된 쌀 배유 단백질(그 제조방법이 아래에 설명된다)이다(식별번호 [0109] 내지 [0151] 및 실시예 1 내지 7 참조). 특히 바람직한 쌀 단백질은 다음 단계에 의해 수득된 것이다: 알칼리성 추출, (효소적으로 변형, 특히 알칼라아제를 사용함), 원심분리 및 한외여과. 추가의 사용을 위해 필요하면 이렇게 수득된 변형된 쌀 배유 단백질이 또한 건조될 수 있다. 그러나, 본 발명은 이렇게 제조된 변형된 쌀 배유 단백질의 사용에 제한되지 않는다.

[0040]

유화력(emulsion capacity)이 220 이상, 바람직하게는 350 이상, 더욱 바람직하게는 500 이상, 더욱 바람직하게는 500 내지 1000인 (변형된) 쌀 배유 단백질이 훨씬 바람직하다. 부가적으로, 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 사용된 (변형된) 쌀 배유 단백질의 유화 활성은 0.2 이상, 바람직하게는 0.45 이상, 더욱 바람직하게는 0.5 이상, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 1.0이다. 유화력의 측정법이 실시예 8에 설명되어 있고, 이러한 유화 활성의 측정이 실시예 9에 설명된다. 본 발명은 또한 (변형된) 쌀 배유 단백질 자체에 관한 것이다.

- [0041] 본 발명의 추가의 바람직한 조성물에서, (변형된) 쌀 배유 단백질은 환원당, 당단백질 또는 당펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물로 가교결합된다.
- [0042] 활성 성분
- [0043] 활성 성분은 일반적으로 사람 또는 동물에게 약리학적 효과를 갖는 성분 또는 건강상의 장점을 제공하는 성분이다. 바람직하게는, 활성 성분은 지용성 활성 성분 및/또는 착색제이다.
- [0044] 지용성 활성 성분 및/또는 착색제는 바람직하게는 카로틴 및 구조적으로 관련된 폴리엔 화합물, 지용성 비타민, 코엔자임 Q10, 다중불포화된 지방산(예를 들면, 에이코사펜타엔산(EPA) 및 도코사헥사에노산(DHA)와 같은) 및 이들의 에스터(예를 들면, (동일 또는 상이한 지방산을 함유하는) 에틸 에스터 또는 트라이글리세라이드), 다중불포화 지방산이 풍부한 모노글리세라이드, 다이글리세라이드, 트라이글리세라이드, 지용성 UV-A 필터, UV-B 필터, 뿐만 아니라 이들의 약리학적으로 허용가능한 유도체, 예를 들면 특히 C<sub>1-20</sub> 카본산과 이의 에스터, 및 이들의 임의의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0045] 가장 바람직한 지용성 비타민은 비타민 A 또는 E이다.
- [0046] 카로틴 및 구조적으로 관련된 폴리엔 화합물의 바람직한 예는 α-카로틴, β-카로틴, 8'-아포-β-카로텐알, 8'-아포-β-카로텐산 에스터, 예를 들면 에틸 에스터, 칸타잔틴, 아스타잔틴, 라이코펜, 루테인, 제아잔틴, 크로세틴, α-제아카로텐, β-제아카로텐, 뿐만 아니라 이들의 약리학적으로 허용가능한 유도체, 예를 들면 특히 C<sub>1-20</sub> 카본산과 이의 에스터, 및 이들의 임의의 혼합물이다.
- [0047] 가장 바람직한 카로테노이드는 β-카로텐이다.
- [0048] "β-카로텐"이란 용어는 모든 시스 뿐만 아니라 모든-트랜스 이성질체 및 모든 가능한 혼합된 시스-트랜스-이성질체를 포함한다. 다른 카로테노이드에 대해서도 마찬가지이다.
- [0049] "제아잔틴"이란 용어는 중성 R,R-제아잔틴 뿐만 아니라 S,S-제아잔틴, 메조-제아잔틴 및 이들의 임의의 혼합물을 포함한다. 루테인에 대해서도 마찬가지이다.
- [0050] (지용성) 활성 성분은 자연 기원, 즉 식물로부터 분리되고/추출되고, 정화되고/되거나 농축될 수 있을 뿐만 아니라 화학적 및/또는 미생물적 (발효성) 경로에 의해 합성된 것일 수 있다.
- [0051] 추가 성분
- [0052] 활성 성분 및 (변형된) 쌀 배유 단백질 이외에 본 발명의 조성물은 바람직하게는 하나 이상의 수용성 산화방지제 및/또는 지용성 산화방지제를 함유할 수 있다.
- [0053] 수용성 산화방지제는 예를 들면 아스코르브산 또는 이의 염, 바람직하게는 소듐 아스코르베이트, 수용성 폴리페놀, 예를 들면 하이드록시티로솔 및 올리유로페인 아글리콘; 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG) 또는 로즈마리나 올리브의 추출물일 수 있다.
- [0054] 지용성 산화방지제는 예를 들면 토크페롤, 예를 들면 d1-α-토크페롤(즉, 합성 토크페롤), d-α-토크페롤(즉, 천연 토크페롤), β- 또는 γ-토크페롤, 또는 이들중 2종 이상의 혼합물; 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT); 부틸화 하이드록시아니솔(BHA); 에톡시퀸, 프로필 갈레이트; t-부틸 하이드록시퀴놀린; 또는 6-에톡시-1,2-다이-하이드록시-2,2,4-트라이메틸퀴놀린(EMQ), 또는 지방산, 바람직하게는 아르코빌 팔미테이트 또는 스테아레이트의 아스코르브산 에스터일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물은 또한 지방산의 모노글리세라이드 및 다이글리세라이드, 지방산의 폴리글리세롤 에스터, 레시틴; N-아실화 아미노산 및 이의 유도체, 알킬 또는 알켄일 라디칼과의 N-아실화 펩타이드, 및 이들의 염; 알킬 또는 알켄일 에터 또는 에스터 설페이트, 및 이들의 유도체 및 염; 폴리옥시에틸렌화 알킬 또는 알켄일 지방 에터 또는 에스터; 폴리옥시에틸렌화 알킬 또는 알켄일 카복실산 및 이들의 염; N-알킬 또는 N-알켄일 베타인; 알킬트라이메틸암모늄 또는 알켄일트라이메틸암모늄 및 이들의 염; 폴리올 알킬 또는 알켄일 에터 또는 에스터; 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 공-유제(co-emulgator)를 함유할 수 있다.
- [0056] 폴리 알킬 또는 알켄일 에터 또는 에스터의 바람직한 예는 에틸렌 산화물(예를 들면, 캄파니 세픽(Seppic)에 의해 상표명 몬타독스 40 DF(Montanox 40 DF)하에 시판된 소비탄 팔미테이트 20 EO 또는 폴리소르베이트 40, 캄파니 ICI에 의해 상표명 트윈 20(Tween 20)하에 시판된 소비탄 팔미테이트 20 EO 또는 폴리소르베이트 20)의 20 단위 이상과 폴리옥시에틸렌화된 소비탄 알킬 또는 알켄일 에스터 및 소비탄 모노스테아레이트이다.

- [0057] 본 발명에 따른 제형은 또한 정제로 압축될 수 있고, 이로써 단당류, 이당류, 올리고당류 및 다당류, 글리세롤 및 트라이글리세라이드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부형제 및/또는 보조제가 첨가될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 조성물에 존재할 수 있는 단당류 및 이당류의 바람직한 예는 수크로스, 전화당, 자일로스, 글루코스, 과당, 유당, 말토스, 사카로스 및 당 알콜이다.
- [0059] 올리고당류 및 다당류의 바람직한 예는 전분, 변형된 전분 및 전분 가수분해산물이다. 전분 가수분해산물의 바람직한 예는 텍스트린 및 말토텍스트린, 특히 5 내지 65 텍스트로스 당량(DE)을 갖는 것, 및 글루코스 시럽, 특히 20 내지 95 DE의 범위를 갖는 것이다. 용어 "텍스트로스 당량"(DE)은 가수분해도를 의미하고 건조 중량을 기준으로 D-글루코스로서 계산된 환원당의 양의 척도이고; 그 크기는 0에 가까운 DE를 갖는 천연 전분 및 100의 DE를 갖는 글루코스를 기본으로 한다.
- [0060] 트라이글리세라이드는 적절하게 식물성 오일 또는 지방, 바람직하게는 옥수수 오일, 해바라기 오일, 소이빈 오일, 잇꽃 오일, 평지씨 오일, 땅콩 오일, 팜유, 팜 커넬 오일, 면실유, 올리브 오일 또는 코코넛 오일이다.
- [0061] 고체 조성물은 또한 안티-케이킹제(anti-caking agent), 예를 들면 실리산 또는 트라이칼슘 포스페이트 등을, 물의 10중량% 이하, 통상 2 내지 5중량%를 함유할 수 있다.
- [0062] 조성물의 제조
- [0063] 본 발명의 목적은 또한
- [0064] I) (변형된) 쌀 배유 단백질의 수용액 또는 콜로이드성 용액을 제조하는 단계;
- [0065] II) 선택적으로, 하나 이상의 수용성 부형제 및/또는 보조제를 단계 I)에서 제조된 용액에 첨가하는 단계;
- [0066] III) 하나 이상의 활성 성분, 바람직하게는 하나 이상의 지용성 활성 성분 및/또는 착색제, 및 선택적으로 하나 이상의 지용성 보조제 및/또는 부형제의 용액 또는 분산액을 제조하는 단계;
- [0067] IV) 단계 I) 내지 III)에서 제조된 용액을 서로 혼합하는 단계;
- [0068] V) 이렇게 생성된 혼합물을 균질화하는 단계;
- [0069] VI) 선택적으로, (변형된) 쌀 배유 단백질을 가교결합하기 위한 가교결합제를 첨가하는 단계;
- [0070] VIa) 선택적으로, 단계 VI)를 수행한 후 생성된 혼합물을 효소 또는 열로 처리하여 (변형된) 쌀 배유 단백질을 가교결합하는 단계;
- [0071] VII) 선택적으로, 단계 V) 및/또는 VI)에서 수득된 분산액을 분말로 전환하는 단계;
- [0072] VIII) 선택적으로, 단계 VII)에서 수득된 분말을 건조시키는 단계; 및
- [0073] IX) 선택적으로, 건조 분말을 열 또는 효소로 처리하여 (변형된) 쌀 배유 단백질을 가교결합하는 단계를 포함하되, 단계 VI)가 수행될 때 단계 VIa) 또는 단계 IX)만이 수행되고 단계 VIa) 및 단계 IX) 둘다가 수행되지는 않는, 본 발명의 조성물의 제조방법이다.
- [0074] 단계 I
- [0075] 이 단계는 선택적으로 교반하면서 단지 물을 (변형된) 쌀 배유 단백질에 첨가하거나 그 반대로 하여 수행된다. 선택적으로, 균일화는 초음파를 통해 가능하다.
- [0076] 바람직하게는, 위에서 설명한 바와 같은 선호도를 갖는 (변형된) 쌀 배유 단백질이 사용된다.
- [0077] 단계 II
- [0078] 첨가될 수 있는 수용성 부형제 및/또는 보조제는 예를 들면 단당류, 이당류, 올리고당류 및 다당류, 글리세롤 및 수용성 산화방지제이다. 이들의 예는 위에 주어진다.
- [0079] 단계 III
- [0080] 활성 성분은 위에서 설명한 바와 같다.
- [0081] (지용성) 활성 성분 및/또는 착색제 및 선택된 지용성 부형제 및 보조제는 그대로 사용되거나 또는 트라이글리세라이드 및/또는 (유기) 용매 안에 용해하거나 현탁된다.

- [0082] 적절한 유기 용매는 할로젠화 지방족 탄화수소, 지방족 에터, 지방족 및 사이클릭 카보네이트, 지방족 에스터 및 사이클릭 에스터(락톤), 지방족 및 사이클릭 케톤, 지방족 알콜 및 이들의 혼합물이다.
- [0083] 할로젠화 지방족 탄화수소의 예는 모노할로젠화 또는 폴리할로젠화 선형, 분지형 또는 사이클릭 C1- 내지 C15-알칸이다. 특히 바람직한 실시예는 모노염화 또는 폴리염화, 또는 모노브롬화 또는 폴리브롬화 선형, 분지형 또는 사이클릭 C1- 내지 C15-알케인이다. 모노염화 또는 폴리염화 선형, 분지형 또는 사이클릭 C1- 내지 C15-알케인이 더욱 바람직하다. 메틸렌 클로라이드 및 클로로포름이 가장 바람직하다.
- [0084] 지방족 에스터 및 사이클릭 에스터(락톤)의 예는 에틸 아세테이트, 이소프로필 아세테이트 및 n-부틸 아세테이트; 및  $\gamma$ -부티롤락톤이다.
- [0085] 지방족 및 사이클릭 케톤의 예는 아세톤, 다이에틸 케톤 및 아이소부틸 메틸 케톤; 및 사이클로펜탄온 및 아이소포론이다.
- [0086] 사이클릭 카보네이트의 예는 특히 에틸렌 카보네이트 및 프로필렌 카보네이트 및 이들의 혼합물이다.
- [0087] 지방족 에터의 예는 다이알킬 에터이고, 여기서 알킬 잔기는 탄소수 1 내지 4이다. 하나의 바람직한 예는 다이메틸 에터이다.
- [0088] 지방족 알콜의 예는 에탄올, 아이소-프로판올, 프로판올 및 부탄올이다.
- [0089] 또한 임의의 오일(트라이글리세라이드), 오렌지 오일, 리모넨 등 및 물을 용매로서 사용할 수 있다.
- [0090] 첨가될 수 있는 지용성 부형제 및/또는 보조제는 예를 들면 옥수수 오일, 지방산의 모노글리세라이드 또는 다이글리세라이드, 폴리글리세롤 지방산 및 중쇄 트라이글리세라이드("MCT")이다.
- [0091] 단계 IV
- [0092] 본 발명의 선택적인 방법에서, 단계 III)는 수행되지 않고, 활성 성분 및 선택적 지용성 부형제 및/또는 보조제는 단계 I) 또는 II)의 용액에 바로 첨가된다.
- [0093] 단계 V
- [0094] 균일화를 위해, 통상적인 기술, 예를 들면 고압 균일화, 고전단 유화(회전-고정자 시스템), 마이크로화, 습식 분쇄, 마이크로채널 유화, 막 유화 또는 초음파화가 적용될 수 있다. 식품, 음료, 동물 사료, 화장품 또는 약제학적 조성물의 강화, 보강 및/또는 착색을 위한 (지용성) 활성 성분 및/또는 착색제를 함유하는 조성물의 제조를 위해 사용된 다른 기술이 본원에서 그 전문을 참조로서 인용하는 유럽 특허 출원 제 EP-A 0 937 412 호(특히 문단 [0008], [0014], [0015], [0022] 내지 [0028]), 유럽 특허 출원 제 EP-A 1 008 380 호(특히 문단 [0005], [0007], [0008], [0012], [0022], [0023] 내지 [0039] 호) 및 미국 특허 제 US 6,093,348 호(특히 칼럼 2, 라인 24 내지 칼럼 3, 라인 32; 칼럼 3, 라인 48 내지 65; 칼럼 4, 라인 53 내지 칼럼 6, 라인 60)에 개시되어 있다.
- [0095] 단계 VI
- [0096] 가교결합제는 바람직하게는 환원당, 당단백질, 및 당펩타이드로 구성되는 군으로부터 선택된다. 따라서, (변형된) 쌀 배유 단백질과 당 또는 당단백질/당펩타이드의 당 부분 사이의 분자간 가교결합이 형성된다. 가교결합제의 바람직한 예는 글루코스, 프럭토스, 사카로스 및 자일로스와 같은 환원당이다.
- [0097] 단계 VIa
- [0098] 가교결합은 위에서 설명한 바와 같은 가교결합제를 부가적으로 함유하는 혼합물을 열로 처리하여 메일라드 형 반응(Maillard type reaction)으로, 즉 약 30 내지 약 160°C, 더욱 바람직하게는 약 70 내지 약 100°C, 가장 바람직하게는 약 80 내지 약 90°C의 온도에서 열 처리함으로써, 당과 단백질의 가교결합을 야기함으로써 달성할 수 있다.
- [0099] 가교결합제와 (변형된) 쌀 배유 단백질의 가교결합은 또한 가교결합 효소(아실트랜스퍼라아제, EC 2.3, 예를 들면 트랜스글루타미나아제, EC 2.3.2.13, 단백질-글루타민:  $\gamma$ -글루타미드트랜스퍼라아제)로 처리함으로써, 즉 효소로 처리함으로써 달성할 수 있고, 약 0 내지 약 70°C, 바람직하게는 약 20 내지 약 40°C의 온도에서 통상적으로 수행될 수 있다. 바람직하게는 단계 VIa)에 따른 효소 처리는 가교결합 효소, 특히 트랜스-글루타미나아제로 처리하는 것이다.

- [0100] 효소적 가교결합은 트랜스글루타미나아제의 경우,  $\epsilon$ -( $\gamma$ -글루타밀)-라이신 아이소펩타이드 결합의 형성에 의해 안정한 단백질-함유 다당류 네트워크를 생성한다. 당단백질 또는 당펩타이드를 사용하는 것은 효소적 가교결합을 위해 바람직하다.
- [0101] 모든 기술, 즉 메일라드형 반응에서 단백질과 당의 가교결합을 야기하는 열처리 및 효소적 가교결합은 친유성 잔기의 도입을 위해 사용될 수 있고, 조성물의 건조된 형태(단계 IX), 또는 수용액 또는 현탁액(단계 VIa)으로 수행될 수 있다. 효소적 가교결합은 바람직하게는 수용액 또는 현탁액으로 수행된다.
- [0102] 단계 VII
- [0103] 이렇게 수득된 분산액은 수중유적형 분산액으로서, 유기 용매(존재한다면)를 제거한 후 고체 조성물, 예를 들면 건조 분말로 임의의 종래의 기술, 예를 들면 분사 건조, 분사 건조와 유동상 과립화를 함께 사용하여(후자의 기술은 유동상 분사 건조 또는 FSD로서 통상적으로 공지됨), 또는 분말-캐치(powder catch) 기술에 의해(이로써 분사된 에멀전 액적은 흡수제(예: 전분, 규산화칼슘 및 이산화규소)의 상 안에 포획된다) 전환되고 후속적으로 건조될 수 있다.
- [0104] 분사-건조는 약 100 내지 약 250℃, 바람직하게는 약 150 내지 약 200℃, 더욱 바람직하게는 약 160 내지 약 190℃의 유입구 온도, 및/또는 약 45 내지 약 160℃, 바람직하게는 약 55 내지 약 110℃, 더욱 바람직하게는 약 65 내지 약 95℃의 유출구-온도(생성물 온도)에서 수행될 수 있다.
- [0105] 단계 VIII
- [0106] 단계 VII에서 수득된 분말의 건조는 바람직하게는  $\leq 100^\circ\text{C}$ , 바람직하게는 20 내지 100℃, 더욱 바람직하게는 60 내지 70℃의 온도에서 수행된다. 건조가 진공에서 수행된다면, 온도는 더욱 낮다.
- [0107] 단계 IX
- [0108] 열 처리를 통한 가교결합은 단계 VIa에 대해 위에서 이미 설명한 바와 같이 수행된다. 효소 처리에 대해서도 마찬가지이지만, 바람직하게는 용액/현탁액으로 수행된다.
- [0109] (변형된) 쌀 배유 단백질의 제조
- [0110] 본 발명은 또한 하기 단계 a) 내지 e)를 포함하되, 단계 b), c) 및 d)중 하나 이상을 수행하는, 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀로부터 출발하는 (변형된) 쌀 배유 단백질의 제조방법에 관한 것이다:
- [0111] a) 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 수용액 또는 현탁액을 제조하는 단계로서, 이때 상기 수용액 또는 현탁액의 건조 질량 함량은 바람직하게는 상기 수용액 또는 현탁액의 총량을 기준으로, 0.1 내지 30중량%, 바람직하게는 10 내지 15중량%인, 단계;
- [0112] b) 선택적으로, 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 비-단백질 부분 또는 단백질 부분을 제거하여 쌀 배유 단백질을 수득하는 단계;
- [0113] c) 선택적으로, 분쇄 전에 쌀겨가 제거된 분쇄된 쌀의 단백질 부분을 변형시켜 변형된 쌀 배유 단백질을 수득하는 단계;
- [0114] d) 선택적으로, (변형된) 쌀 배유 단백질을 분리하는 단계;
- [0115] e) 선택적으로, (변형된) 쌀 배유 단백질을 고체 형태로 전환하는 단계.
- [0116] 본 발명의 문맥상, "쌀 배유 단백질"은 특히 단계 a) 및 b); 또는 단계 a) 및 d); 또는 단계 a), b) 및 e); 또는 단계 a), b) 및 d); 또는 단계 a), d) 및 e); 또는 단계 a), b), d) 및 e)를 수행함으로써 수득된 생성물을 의미한다. 단계 a), b) (및 d) 및/또는 e))가 수행되는 실시태양이 바람직하고, 특히 단계 a), b) 및 d)(및 e))가 수행되는 실시태양이 바람직하다.
- [0117] 본 발명의 문맥에서, "변형된 쌀 배유 단백질"은 특히 단계 c)가 수행되는 생성물, 즉 단계 a) 및 c), 또는 단계 a), b) 및 c), 또는 단계 a), c) 및 d), 또는 단계 a), c) 및 e), 또는 단계 a), b), c) 및 d), 또는 단계 a), b), c), d) 및 e)를 수행함으로써 수득된 생성물을 의미한다.
- [0118] 변형된 쌀 배유 단백질(및 그의 선택물)은 쌀 배유 단백질보다 더욱 바람직하다. 단계 a), b), c) 및 d)(및 e))를 수행함으로써 수득된 생성물이 가장 바람직하다.

- [0119] 단계 a)
- [0120] 분쇄된 쌀은, 쌀겨가 분쇄 전에 제거되는데 쌀겨는 "쌀가루"로도 공지된다.
- [0121] 이러한 단계는 물을 쌀가루에 첨가하거나 그 반대로 하고, 쌀가루가 완전히 분산될 때까지 선택적으로 격렬하게 교반하면서(기계적 교반기를 사용하여), 또는 쌀가루 현탁액을 균일화제로 예를 들면 실온에서 5분 동안 균일화함으로써 간단히 수행된다.
- [0122] 단계 b)
- [0123] 비단백질 부분의 제거
- [0124] 단계 b)는 바람직하게는 쌀가루를 90℃에서 2시간 동안 비-단백질 분해 효소, 예를 들면 터마밀(Termamyl)<sup>®</sup>의 0.5% 수성 현탁액으로 처리하고 이어서 50℃에서 30분 동안 셀룰라아제의 0.1% 수성 현탁액으로 처리하고(임의의 pH 조정 없이(pH 6-7)), 효소를 비활성화하고, 쌀가루의 단백질 부분으로부터 비-단백질 부분을 분리하고 제거함으로써 달성될 수 있다.
- [0125] 비-단백질 분해 효소의 바람직한 예는 α-아밀라아제 및 셀룰라아제와 같은 전분-분해 효소, 즉 셀룰로스-분해 효소, 및 이들의 혼합물이다. α-아밀라아제의 바람직한 예는 미국 소재의 노보 노디스크 바이오캡 노쓰 아메리카 인코포레이티드(Novo Nordisk Biochem, North America, Inc.)로부터 시판되는 터마밀<sup>®</sup> 120, 유형 L이다. 다른 바람직한 예는 미국 소재의 노보 노디스크 바이오캡 노쓰 아메리카 인코포레이티드로부터 시판되는 리퀴자임<sup>®</sup> 수프라(Liquzyme Supra), 일본 나고야 소재의 아마노 파마수티칼 캄파니 리미티드(Amano Pharmaceutical Co. Ltd.)로부터 시판되는 아밀라아제 S "아마노(Amano)" 35 G, 미국 제넨코 인터내셔널 인코포레이티드(Genencor International, Inc.)로부터 시판되는 멀티펙트 셀룰라아제(Multifect Cellulase), 및 일본 나고야 소재의 아마노 파마수티칼 캄파니 리미티드로부터 시판되는 셀룰라아제 T "아마노" 4이다.
- [0126] 효소의 반응은 무기산(예를 들면, 염화수소산) 또는 유기 산(예를 들면, 시트르산) 또는 염기가 사용되면 용액 또는 현탁액을 중성화함으로써, 또는 가열에 의해 효소를 변성시킴으로써 종결될 수 있다.
- [0127] 변성은 용액을 80 내지 95℃, 바람직하게는 80 내지 85℃(특히 3.5 내지 4.5의 낮은 pH에서)의 온도까지 10 내지 15분 동안 가열시켜 달성될 수 있다. 이후 용액을 50℃까지 냉각시킬 수 있다.
- [0128] 비-단백질 부분의 분리는 원심분리(15분 동안 5000g)(이로써 비-단백질 부분은 수성상에 있다) 후, 이어서 탈이온수를 세척하여 달성된다. 쌀 배유 단백질은 펠렛으로 남아 있다.
- [0129] 단백질 부분의 제거
- [0130] 선택적으로 소위 "알칼리성 추출" 또는 소위 "염-추출"은 원심분리 또는 여과 전에 수행될 수 있다.
- [0131] "알칼리성 추출"이란 우선 40 내지 60℃에서 3시간 동안 알칼리 용액(예를 들면, 수성 NaOH 용액)을 사용하여 쌀가루의 용액 또는 현탁액의 pH를 7 내지 12, 바람직하게는 8 내지 10, 더욱 바람직하게는 약 9까지 조정함을 의미한다.
- [0132] 단백질 수율이 단백질 기능성보다 더욱 중요한 경우, pH를 바람직하게는 8 내지 12, 더욱 바람직하게는 9 내지 12, 훨씬 바람직하게는 10 내지 12까지 조정하는 것이 유리하다.
- [0133] 바람직하게는, 이러한 염기는 약 0.1 내지 5M, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 2M의 농도를 갖는다. 염기는 무기 염기이다. 무기 염기의 예는 알칼리토 수산화물(예를 들면 수산화나트륨이 바람직하고, 수산화 포타슘 및 수산화칼슘)이다.
- [0134] "염 추출"은 "알칼리-추출"과 유사하고, 단 염기에 덧붙여 염화나트륨과 같은 염이 사용된다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 수성 0.08M 염화나트륨 용액(NaOH로 pH 11로 조정함)을 추출 용매로서 사용한다.
- [0135] 모든 경우(알칼리성 또는 염 추출), 단백질 부분은 수성상으로 전이된다. 단백질 부분은 비-단백질 부분으로부터 원심분리 또는 여과에 의해 분리될 수 있다.
- [0136] 단계 c)
- [0137] 쌀가루의 변형은 이를(그 단백질 부분을) (시판되는) 식품 등급 알칼리성, 중성 및/또는 산성 프로테아제로 처리하여 달성될 수 있다. 몇몇 프로테아제에 있어서, 효소에 대한 상세한 설명 및 최적 조건은 실시예에 주어진

다.

- [0138] 프로테아제는 박테리아 또는 진균으로부터 뿐만 아니라 과일로부터 유래하거나 동물로부터 유래할 수 있다. 알칼리성 프로테아제의 예에는 시판되는 알칼라아제(Alkalase)<sup>®</sup> (미국 노쓰캐롤라이나주 프랭클린톤 소재의 노보 노디스크 바이오캡), 알칼라인 프로테아제(Alkaline protease)<sup>®</sup> (미국 뉴욕주 뉴욕 소재의 엔자임 디벨롭먼트 코포레이션(Enzyme Development Corporation)), 프로텍스(Protex) 6L<sup>®</sup> (제넨코어(Genencor)<sup>®</sup> 박테리얼 알칼라인 프로테아제, 미국 뉴욕주 로체스터 소재의 제넨코어 인터내셔널 인코포레이티드(Genencor International, Inc.)) 및 제넨코어<sup>®</sup> 프로테아제 899 (미국 뉴욕주 로체스터 소재의 제넨코어 인터내셔널 인코포레이티드)가 있다.
- [0139] 중성 프로테아제의 예에는 시판되는 브로멜레인(Bromelain)<sup>®</sup> (미국 뉴욕주 뉴욕 소재의 엔자임 디벨롭먼트 코포레이션), 리퀴파놀(Liquipanol)<sup>®</sup> (미국 뉴욕주 뉴욕 소재의 엔자임 디벨롭먼트 코포레이션) 및 박테리아성 중성-프로테아제(미국 뉴욕주 로체스터 소재의 제넨코어 인터내셔널 인코포레이티드)가 있다. 중성 프로테아제의 추가의 예는 카리카 파파야(Carica papaya) 식물로부터 생산된 네덜란드 델프트 소재의 DSM 푸드 비버리지즈(DSM Food Beverages)로부터 시판되는 콜루필린(Collupilin)<sup>®</sup>, 즉 과일 유래의 효소이다.
- [0140] 산성 프로테아제의 예는 펩신(미국 시그마(Sigma)) 및 산 프로테아제(일본 나고야 소재의 아마노 파마수티칼 캄파니 리미티드)이다.
- [0141] 본 발명의 방법의 바람직한 실시태양에서, 쌀가루의 단백질 부분은 40 내지 60℃에서 10 내지 80분 동안 7 내지 10의 pH 범위에서 2종의 상이한 알칼리성 프로테아제에 의해 후속적으로 처리된다.
- [0142] 바람직하게는, 이들 프로테아제중 하나는 알칼라아제<sup>®</sup>, 프로텍스 6L<sup>®</sup> 또는 알칼라인 프로테아제<sup>®</sup>와 같은 세린 특이적 프로테아제이고 다른 것은 리퀴파놀<sup>®</sup> 또는 브로멜레인<sup>®</sup>과 같은 시스테인 특이적 프로테아제이다.
- [0143] 이 단계는 또한 효소를 한번에 첨가하지 않고 효소를 여러번 나누어 (후속적으로 또는 동시에) 첨가함으로써 변형될 수 있다.
- [0144] 단계 c)는 또한 단계 d) 후에 수행될 수 있고, 즉 우선 쌀 배유 단백질을 분리하고 이를 변형시킨다.
- [0145] 단계 d)
- [0146] 단계 d)는 바람직하게는 원심분리 및/또는 여과에 의해, 바람직하게는 한외여과에 의해 수행된다. 한외여과는 미리 원심분리하지 않고 수행될 수 있다.
- [0147] 효소 비활성화 후, 가수분해산물은 바람직하게는 낮은 속도로 원심분리되어(10분 동안 1000g) 불용성 단백질 및 불순물을 분리한다.
- [0148] 이어서 단백질 가수분해산물의 가용성 부분을 왓만(Whatman) #4 여과지를 통해 여과하고 여과액을, 분자량 컷 오프(MWCO; molecular weight cut-off)가 5kDa 이상, 바람직하게는 30kDa 이상, 바람직하게는 50kDa 이상, 가장 바람직하게는 50 내지 750kDa인 막을 사용하여 순차적 한외여과(UF) 및 투석여과(DF)에 도입한다.
- [0149] 한외여과 및 투석여과는 20 내지 25psi의 유입구 압력 및 10 psi의 유출구 압력으로 실온에서 수행될 수 있다. 용액을 5의 농도 계수까지 한외여과할 수 있다. 한외여과 직후, 잔류물을 탈이온수의 체적 2배로 2회 투석여과할 수 있다. 한외여과 및 투석여과중, 단백질을 가용성으로 유지하기 위해 용액의 pH를 pH 8.0 내지 9.0으로 유지할 수 있다.
- [0150] 단계 e)
- [0151] 고체 형태, 예를 들면 건조 분말로의 전환이 당해 기술분야의 숙련인에게 공지된 임의의 건조 방법에 의해 달성될 수 있다. 분사 건조 또는 동결-건조가 바람직하다. 분사 건조가 바람직하게는 약 200 내지 약 210℃의 유입구 온도 및 약 70 내지 약 75℃의 유출구 온도에서 수행된다. 동결-건조는 바람직하게는 약 -20 내지 약 -50℃에서 10 내지 48시간 동안 수행된다.
- [0152] 본 발명의 목적은 또한 위에서 설명한 바와 같은 임의의 방법에 의해 수득될 수 있는 (변형된) 쌀 배유 단백질이다.

- [0153] 산업상 이용가능성
- [0154] 본 발명은 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물의 강화, 보강 및/또는 착색을 위한 위에 설명한 바와 같은 조성물의 용도, 뿐만 아니라 이러한 위에서 설명한 조성물을 함유하는 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 및 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0155] 본 발명은 또한 위에서 설명한 바와 같이 (변형된) 쌀 배유 단백질을 함유하는 식품, 음료, 동물사료, 개인 위생 조성물 또는 약학 조성물 뿐만 아니라 바람직하게는 위에 설명한 바와 같은 이러한 (변형된) 쌀 배유 단백질의 활성 성분, 특히 지용성 활성 성분 및/또는 착색제를 위한 보호성 하이드로콜로이드로서의 용도에 관한 것이다.
- [0156] 본 발명의 문맥상 사람을 포함하는 동물은 사람 이외에 특히 농장 동물, 예를 들면 양, 소, 말, 가금류(불고기용 영계 및 달걀 착색), 새우 및 어류(특히 연어 및 무지개 송어) 뿐만 아니라 애완동물, 예를 들면 고양이, 개, 새(예를 들면 플라밍고) 및 어류를 포함한다.
- [0157] 본 발명의 조성물이 착색제 또는 기능성 성분으로서 사용될 수 있는 음료는 탄산음료, 예를 들면 향을 낸 탄산수, 소프트 드링크 또는 미네랄 드링크 뿐만 아니라 비-탄산 음료, 예를 들면 향을 낸 물, 과일주스, 과일 펀치 및 이들 음료의 농축된 형태일 수 있다. 이는 천연 과일 또는 식물성 주스 또는 인공 향료를 기본으로 한다. 알콜성 음료 및 인스턴트 음료 분말이 또한 포함된다. 게다가, 설탕 함유 음료, 칼로리나 인공 감미료가 없는 다이어트 음료가 또한 포함된다.
- [0158] 또한, 천연 공급원 또는 합성 공급원으로부터 수득된 유제품은 본 발명의 조성물이 특히 착색제 또는 기능성 성분으로서 사용될 수 있는 식품의 범위 안에 있다. 이러한 제품의 일반적인 예는 우유 드링크, 아이스크림, 치즈, 요거트 등이다. 두유 드링크 및 두부 제품과 같은 우유 대체품이 또한 본 명세서의 범위 안에 있다.
- [0159] 설탕 절임 제품, 캔디, 껌, 디저트, 예를 들면 아이스크림, 젤리, 푸딩, 인스턴트 푸딩 분말 등과 같은 본 발명의 조성물을 착색제 또는 기능성 성분으로서 함유하는 단 제품이 또한 포함된다.
- [0160] 본 발명의 조성물을 착색제 또는 기능성 성분으로서 함유하는 시리얼, 스낵, 쿠키, 파스타, 스프 및 소스, 마요네즈, 샐러드 드레싱 등이 또한 포함된다. 또한, 유제품 및 시리얼을 위해 사용된 과일 제제가 또한 포함된다.
- [0161] 본 발명의 조성물을 통해 식품에 첨가된 (지용성) 활성 성분 및/또는 착색제의 최종 농도는 식품 조성물의 총 중량을 기준으로 0.1 내지 500ppm, 특히 1 내지 50ppm이고 착색되거나 보강될 특정 식품 및 착색 또는 보강의 의도하는 등급에 의존한다.
- [0162] 본 발명의 식품 조성물은 바람직하게는 본 발명의 조성물 형태로 (지용성) 활성 성분 및/또는 착색제를 식품에 첨가함으로써 수득된다. 식품 또는 약학 제품의 착색 또는 보강을 위해, 본 발명의 조성물은 본 발명의 수분산성 고체 조성물의 적용에 대해 자체 공지된 방법에 따라 사용될 수 있다.
- [0163] 일반적으로 조성물은 수성 스탁 용액, 건조 분말 믹스 또는 특정 용도에 따른 다른 적절한 식품 원료와의 예비 혼합물일 수 있다. 혼합은 최종 용도의 제형에 따라 예를 들면 건조 분말 블렌더, 저전단 믹서, 고압 균일화기 또는 고전단 믹서를 사용하여 수행될 수 있다. 매우 명백하듯이, 이러한 전문적인 사항은 전문가들의 기술 범위 이내에 있다.
- [0164] 조성물이 착색제로서 사용된 정제 또는 캡슐과 같은 약학 조성물은 또한 본 발명의 범위 안에 있다. 정제의 착색은 본 발명의 조성물을 액체 또는 고체 착색제 조성물의 형태로 정제 코팅 혼합물에 별도로 첨가함으로써, 또는 정제 코팅 혼합물의 성분중 하나에 착색 조성물을 첨가함으로써 달성될 수 있다. 착색된 경질 또는 연질-젤 캡슐은 착색 조성물을 캡슐 덩어리의 수성 용액 안에 도입함으로써 제조될 수 있다.
- [0165] 본 발명의 조성물이 활성 성분으로서 함유된 씹을 수 있는 정제, 거품이 나는 정제 또는 필름코팅된 정제와 같은 정제 또는 경질 젤 캡슐과 같은 캡슐 등의 약학 조성물은 또한 본 발명의 범위 안에 있다. 본 발명의 조성물은 일반적으로 정제화 혼합물에 분말로서 첨가되거나 캡슐의 제조를 위해 자체 공지된 방식으로 캡슐 안으로 충전된다.
- [0166] 본 발명의 조성물이 예를 들면 달걀 노른자, 식탁 가금류, 불고기용 영계 또는 수생 동물(특히 새우, 연어, 무지개 송어)의 착색을 위한 착색제로서 사용되거나 또는 활성 성분으로서 사용되는 영양가 있는 성분, 콤파운드 사료, 우유 대체물, 액체 다이어트 또는 사료 제제의 예비혼합물과 같은 동물 사료 제품이 또한 본 발명의 범위

안에 있다.

[0167] 본 발명의 조성물이 착색제 또는 활성 성분으로서 사용된 개인 위생 조성물 조성물, 즉 미용품, 화장품 및 피부 제품, 즉 피부 및 모발 케어 제품, 예를 들면 크림, 로션, 바스, 립스틱, 샴푸, 컨디셔너, 스프레이 또는 젤은 또한 본 발명의 범위 안에 있다.

[0168] 본 발명은 또한 다음 실시예에 의해 추가로 설명된다:

[0169] [실시예]

[0170] 다음 약어가 사용된다:

[0171] UF = 한외여과

[0172] DF = 투석여과

[0173] DH = 가수분해도

[0174] DI수 = 탈이온수

[0175] MWC0 = 분자량 컷오프

[0176] SDS = 소듐 도데실 설페이트

[0177] 쌀가루를 라이스랜드 푸즈(Riceland Foods, 미국 아리조나주 스티가트)로부터 수득하였다. 다음 식품 등급 효소를 단백질을 분리할 때 사용하였다: (1) 터마밀 - 열안정성 알파-아밀라아제, 미국 소재의 노보 노디스크 바이오캡, 노쓰 아메리카 인코포레이티드. (3) 멀티펙트 셀룰라아제 - 편갈 셀룰라아제(Fungal Cellulase), 2000 IU/g, 미국 소재의 제넨코 인터내셔널 인코포레이티드. 다음 상세한 설명의 식품 등급 프로테아제를 사용하였다(표 1a 및 1b)

[0178] [표 1a]

| 효소 상세한 설명 I |            |                                      |                                       |
|-------------|------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 효소          | 프로테아제의 유형  | 공급원                                  | 차별적 특이성                               |
| 프로텍스 6L     | 세린 프로테아제   | 바실러스 리체니포미스 (Bacillus licheniformis) | 펩타이드 결합을 위한 넓은 특이성을 갖는 단백질의 가수분해      |
| 브로멜레인       | 시스테인 프로테아제 | 파인애플 줄기                              | 넓은 특이성, 그러나 펩타이드에서 Arg-Arg에 대한 강한 선호도 |
| 알칼라아제       | 세린 프로테아제   | 바실러스 리체니포미스                          | 넓은 특이성, 및 큰 비전하 잔사의 카복실 자리에 대한 선호     |
| 리퀴파놀        | 시스테인 프로테아제 | 농축 파파인                               | 넓은 특이성                                |
| 알칼라인 프로테아제  | 세린 프로테아제   | 박테리아성 프로테아제                          | 펩타이드 결합에 대한 넓은 특이성을 갖는 단백질의 가수분해      |
| 웹신          | 아스파틱 프로테아제 | 돼지 위장                                | 티로신, 페닐알라닌, 및 트립토판 잔기의 C-말단 측쇄        |

[0179]

[0180] [표 1b]

| 효소 상세한 설명 II |       |        |                                           |
|--------------|-------|--------|-------------------------------------------|
| 효소           | pH-범위 | 활성/g   | 회사                                        |
| 프로텍스 6L      | 6-10  | 580000 | 미국 뉴욕주 14618 로체스터 소재의 제넨코어 인터내셔널 인코포레이티드  |
| 브로멜레인        | 5-8   | 150000 | 미국 뉴욕주 10001 뉴욕 소재의 엔자임 디벨롭먼트 코포레이션       |
| 알칼라아제        | 6-9   | 2.4AU  | 미국 노스 캐롤라이나주 27525 프랭클린톤 소재의 노보 노디스크 바이오켄 |
| 리퀴파놀         | 5-8   | 125000 | 미국 뉴욕주 10001 뉴욕 소재의 엔자임 디벨롭먼트 코포레이션       |
| 알칼라인 프로테아제   | 6-9   | 175000 | 미국 뉴욕주 10001 뉴욕 소재의 엔자임 디벨롭먼트 코포레이션       |

[0181]

[0182] 요약

[0183] 알칼리, 염 및 효소적 방법에 의해 쌀 배유 단백질을 분리하고 그 추출성 및 물리화학적 및 기능적 성질에 대해 평가하는 것을 최적화하여 실험을 수행했다. 목적은 추출 방법을 최적화하고 추출물의 물리화학적 성질을 평가하여 향상된 쌀 단백질 기능성을 위한 최적 추출 방법을 확인하는 것이다.

[0184] 쌀 단백질 분리물을 화학적 및 효소적 방법에 의해 제조하였다. 예비적 시험을 수행하여 최대 수율 및 단백질 함량을 갖는 단백질의 추출 조건을 최적화하였다. 화학적 및 효소적 방법의 절차의 예는 쌀 단백질 분리물 제제 RP<sub>A</sub>에 대해 도 1에서 주어지고 도 2에서 쌀 단백질 분리물 제제(RP<sub>ET</sub>)에 대해 90℃에서 터마밀<sup>®</sup> 처리에 이어 셀룰라아제 처리를 수행하였다.

[0185] 여과에 의해 (변형된) 쌀 배유 단백질의 분리

[0186] 한외여과 실험을 1" 직경 중공-섬유 폴리설폰 막 카트리지가 장착된 로미콘 한외여과 시스템[Romicon ultrafiltration system; 미국 소재의 코흐 막 시스템즈(Koch membrane systems)]으로 수행하였다. (변형된) 쌀 배유 단백질의 가용성 분획을 와트만 # 4 여과지를 통해 여과하였고 여과액을, 공칭 분자량 컷오프가 50, 30, 10 및 5kDa인 막-카트리지를 사용하여 후속적인 한외여과에 도입하였다. 각각의 MWC0 카트리지에서, 용액을 5의 농도 계수에서 한외여과하였다. 한외여과 직후, 잔류물을 탈이온수 2배의 체적으로 2회 투석여과하였다. 제 1 (50kDa) 한외여과(UF) 및 투석여과(DF)의 스머든 물질을 고이게 하고 다음 MWC0(30kDa) UF 및 DF에 도입하였다. MWC0 카트리지를 각각으로부터 생성된 잔류물을 동결건조하고 DH, 용해도 및 유화성에 대해 평가하였다.

[0187] (A) 단백질 추출

[0188] 실시예 1: 알칼리성 추출에 의한 쌀 배유 단백질의 분리("화학적 추출")

[0189] 실시예 1-1:(REP 1-1)

[0190] 500g의 쌀가루를 실온에서 블렌더 안에서 세팅 6으로 5분 동안 4L 탈이온수(1:8, w/v)로 균일화하였다(미국 뉴욕주 가디너 소재의 더 버티스 캄파니(The Virtis Co.), 버티시어 템페스트(Virtishear Tempest)). 슬러리를 1N NaOH를 사용하여 pH 11.0까지 조정하고, 현탁액을 40℃에서 3시간 동안 교반하였다. 용액중 용해된 단백질을 원심분리에 의해 분리하였다(5,000g, 20분). 이러한 절차를 다시 한 번 반복하여 잔사로부터 더 많이 추출한다. 제 1 추출과 제 2 추출의 조합된 상청액에서 단백질을 pH 4.5에서 등전적으로 침전하고 4℃에서 2시간 동안 유지하였다. 침전물을 20분 동안 10,000g에서 원심분리에 의해 회수하고, 탈이온수로 세척하고(1:4, w/v, pH 4.5), pH 7.0까지 조정하고, 동결건조하고, 5℃에서 저장하였다.

[0191] 선택적 실시예 1-2(REP 1-2)

- [0192] 5Kg 쌀가루를 40L의 탈이온수(1:8, w/v)로 균일화하고, 슬러리의 pH는 3N NaOH를 첨가함으로써 pH 11로 조정되었고, 현탁액을 3시간 동안 40℃에서 교반하였다. 용액중 용해된 단백질을 원심분리에 의해 분리하였다(5000g, 15분). 이러한 절차를 한번 더 반복하여 잔사로부터 더욱 많이 추출하였다. 제 1 추출과 제 2 추출의 조합된 상청액에서 단백질을 pH 4.5에서 등전적으로 침전하고 4℃에서 2시간 동안 유지하였다. 침전물을 20분 동안 5000g에서 원심분리에 의해 회수하고, 탈이온수로 2회 세척하고(1:4, w/v, pH 4.5), pH 7.0까지 조정하고, 5℃에서 저장하였다.
- [0193] 선택적 실시예 1-3(REP 1-3)
- [0194] 쌀가루 1kg을 균일화기(미국 뉴욕주 가디너 소재의 더 버티스 캄파니, 버티시어 템페스트)에서 5분 동안 8L 탈이온수를 균일화하였다. 슬러리를 1 N NaOH를 사용하여 pH 11까지 조정하고, 현탁액을 40℃에서 3시간 동안 교반하였다. 용액중 용해된 단백질을 원심분리에 의해 분리하였다(2000g, 15분). 이러한 절차를 반복하여 잔사로부터 추가로 단백질을 추출한다. 제 1 추출과 제 2 추출의 조합된 상청액에서 단백질을 pH 4.5에서 등전적으로 침전하고 4℃에서 1시간 동안 유지하였다. 침전물을 20분 동안 5000g에서 원심분리에 의해 회수하고, 탈이온수로 세척하고(1:4, w/v, pH 4.5), pH 7.0까지 조정하고, 동결건조하고(RP<sub>A</sub>), 5℃에서 저장하였다(도 1).
- [0195] 실시예 1-4(REP 1-4): 염 추출에 의한 쌀 배유 단백질의 분리
- [0196] 쌀 단백질(RP<sub>S</sub>)의 염 추출은 상기 알칼리 방법(REP 1-3 참조)과 유사하지만, 0.08M 염화나트륨의 조합된 용액(NaOH로 pH 11까지 조정됨)은 추출 용매로서 사용되었다.
- [0197] 실시예 2: 비-단백질 부분의 효소적 분해에 의한 쌀 배유 단백질의 분리("효소적 추출")
- [0198] 실시예 2-1:(REP 2-1)
- [0199] 쌀가루 500g을 3L 증류수(1:6, w/v) 안에 분산시켰다. 쌀가루-물을 40℃에서 15분 동안 교반하여 슬러리를 형성하였다. 슬러리를 0.5% 알파-아밀라아제로 처리하고 온도를 점차적으로 90℃까지 높이고 90℃에서 2시간 동안 배양하였다. 용해된 전분을 20℃에서 15분 동안 5,000×g에서 원심분리에 의해 제거하였다. 잔사를 1.5L 탈이온수와 다시 혼합하고 0.1% 셀룰라아제로 처리하고 50℃에서 30분 동안 배양하였다. 효소를 90℃에서 pH를 3.5까지 낮춤으로써 비활성화하였다. 용해된 전분 및 셀룰로스 분획을 15분 동안 5,000×g에서 원심분리에 의해 제거하였다. 침전된 단백질을 따뜻한 탈이온수로 2회 세척하고 가용성 설탕 및 남아 있는 효소를 제거하고, pH 7.0까지 조정하고 동결건조하고 5℃에서 저장하였다.
- [0200] 선택적 실시예 2-2: (REP 2-2)
- [0201] 쌀가루 5Kg을 30 L 탈이온수로 균일화하고 60℃에서 15분 동안 교반하였다. 슬러리를 0.2% 터마일로 처리하고, 온도를 점차적으로 90℃까지 올리고 이 온도에서 2시간 동안 배양하였다. 용해된 전분을 치즈 클로쓰(cheese cloth)로 여과하여 제거하였다. 펠렛을 15L 탈이온수와 다시 혼합하고 50℃에서 30분 동안 0.1% 펙티나아제와 함께 배양하고, 또 다른 0.1% 효소 터마일을 가하였다. 온도를 90℃까지 구배적으로 높이고 이 온도에서 30분 동안 배양하였다. 효소를 pH를 90℃에서 5.0까지 낮춤으로써 비활성화하였다. 용해된 셀 벽 성분 및 잔사성 전분을 치즈 클로쓰로 여과하여 제거하였다. 단백질 펠렛을 따뜻한 탈이온수로 2회 세척하여 남아 있는 가용성 당 및 효소를 제거하고, pH 7.0까지 조정하고, 5℃에서 저장하였다.
- [0202] 선택적 실시예 2-3: (REP 2-3)
- [0203] 쌀가루 1Kg을 6 L 탈이온수로 균일화하고 60℃에서 15분 동안 교반하였다. 슬러리를 0.5% 터마일로 처리하고, 온도를 점차적으로 90℃까지 올리고 이 온도에서 2시간 동안 배양하였다. 용해된 전분을 원심분리에 의해 제거하였다(5000g, 15분). 펠렛을 3L 탈이온수와 다시 혼합하고 50℃에서 30분 동안 0.1% 셀룰라아제로 배양하였다. 효소를 pH를 90℃에서 4.5까지 낮춤으로써 비활성화하였다. 용해된 셀룰로스 분획을 원심분리에 의해 제거하였다. 침전된 단백질을 따뜻한 탈이온수로 2회 세척하고 가용성 당 및 남아 있는 효소를 제거하고, pH 7.0까지 조정하고, 동결건조하고(RP<sub>ET</sub>) 5℃에서 저장하였다(도 2).
- [0204] 선택적 실시예 2-4(REP 2-4)
- [0205] 아밀라아제 S(RP<sub>EA</sub>) 추출은, 아밀라아제 S가 터마일 대신 사용된 것을 제외하고는 본질적으로 터마일 방법과 동일하다(참조: REP 2-3). 아밀라아제 S는 70℃에서 최적 활성을 갖고 90℃에서 수행하는 터마일 방법보다 더 온화한 추출 조건을 제공한다. 단백질 분리물의 수분, 단백질, 전분, 섬유, 지방 및 회분 함량은 문헌[Approved

Methods of the American Association of Cereal Chemists, 8<sup>th</sup> Ed., Vol. 2, AACC, St. Paul, MN, 1990, p 1-2; Method 46-08]에 개시된 바와 같이 측정되었다.

(B) 단백질 변형

실시예 3: 프로테아제에 의한 알칼리-추출된 쌀 배유 단백질의 변형(REP 3-1 내지 3-8)

REP 3-1 내지 REP 3-5의 제조를 위한 상세한 설명

알칼리 추출된 쌀 배유 단백질 분리물 REP 1-1를 프로테아제로 처리하였다. 단백질을 탈이온수(1:12.5, w/v)와 혼합하고, 균일화하고, 각 효소의 최적 pH까지 조정하고 50℃에서 10분 동안 교반하였다. 분산액을 식품 등급 프로테아제로 각 효소의 최적 조건하에 처리하였다. 각 효소의 최적 조건은 표 2에 나타난다. 시판되는 식품 등급의 프로테아제(브로멜레인(REP 3-1), 프로텍스 6L(REP 3-2), 펩신(REP 3-3), 알칼라아제(REP 3-4), 및 리퀴파놀(REP 3-5))를 사용하여 용해도 및 기능성 성질을 향상시켰다. 생성된 가수분해산물의 가수분해도를 OPA 방법(Nielsen 등, Journal of Food Science 2001, 66(5), 642-646)에 의해 최적화하여 기능성을 최대화하였다. 효소적 반응은 각 효소의 특이적 비활성화 조건에 의해 요구된 DH에서 종결되었다. 가수분해된 생성물을 분사건조하고 5℃에서 저장하였다.

[표 2]

| 단백질 가수분해에서 사용된 최적 효소 조건 |                       |      |       |       |
|-------------------------|-----------------------|------|-------|-------|
| 효소                      | 효소량(단백질 중량을 기준으로 중량%) | pH   | 온도(℃) | 시간(분) |
| 리퀴파놀                    | 1.0                   | 8.0  | 50    | 60    |
| 브로멜레인                   | 1.0                   | 7.0  | 50    | 60    |
| 알칼라아제                   | 1.0                   | 9.0  | 60    | 60    |
| 프로텍스 6L                 | 1.0                   | 10.0 | 60    | 60    |
| 펩신                      | 0.5                   | 3.0  | 37    | 30    |

도 4는 가수분해 시간의 함수로서 알칼라아제, 리퀴파놀 또는 펩신으로 처리된 쌀 배유 단백질의 가수분해 특성을 나타낸다.

도 7은 SDS PAGE 겔 전기영동에 의해 측정된 펩신, 리퀴파놀 및 알칼라아제로 처리함에 의해 생성된 쌀 단백질 및 가수분해산물의 분자 크기 특성을 나타낸다:

레인 1 - 표준 마커;

레인 2 - 쌀 단백질(대조);

레인 3 - 펩신 2.2% DH;

레인 4 - 펩신 6.5% DH;

레인 5 - 리퀴파놀 3.9% DH;

레인 6 - 리퀴파놀 10.5% DH;

레인 7 - 알칼라아제 7.7% DH;

레인 8 - 알칼라아제 14.7% DH.

도 8은 SDS PAGE 겔 전기영동에 의해 측정된 알칼라아제로 처리된 쌀 단백질 가수분해산물의 분자 크기 특성을 나타낸다:

레인 1 - 표준 마커;

레인 2 - 쌀 단백질(대조);

레인 3 - 알칼라아제 5.2% DH;

레인 4 - 알칼라아제 7.7% DH;

- [0227] 라인 5 - 알칼라아제 11.2%;
- [0228] 라인 6 - 알칼라아제 13.5%;
- [0229] 라인 7 - 알칼라아제 14.7%.
- [0230] REP 3-6, 3-7 및 3-8의 제조를 위한 상세한 설명
- [0231] REP 1-2는 실시예 REP 3-1, REP 3-2, REP 3-3, REP 3-4 및 REP 3-5에서와 같이 REP 1-1 대신 REP 3-6, REP 3-7 및 REP 3-8의 제조를 위해 사용되었다.
- [0232] REP 3-6
- [0233] 알칼리 추출된 쌀 단백질 분리 REP 1-2를 탈이온수(8% w/v)로 균일화하고 pH 8.0까지 조정하였다. 단백질 용액을 1% 알칼라아제로 50℃에서 3.5분 동안 처리하였다. 효소를 15분 동안 pH 5.0에서 70℃에서 비활성화하였다. 단백질 가수분해산물(REP 3-6)을 5℃에서 분사 건조하고 저장하였다.
- [0234] REP 3-7
- [0235] 알칼리 추출된 쌀 단백질 분리물 REP 1-2를 탈이온수(8% w/v)로 균일화하고 pH 8.0까지 조정하였다. 단백질 용액을 1% 알칼라아제로 50℃에서 7.5분 동안 처리하였다. 효소를 15분 동안 pH 5.0에서 70℃에서 비활성화하였다. 단백질 가수분해산물(REP 3-7)을 5℃에서 분사 건조하고 저장하였다.
- [0236] REP 3-8
- [0237] 알칼리 추출된 쌀 단백질 분리 REP 1-2를 탈이온수(8% w/v)로 균일화하고 pH 8.0까지 조정하였다. 단백질 용액을 1% 알칼라아제로 50℃에서 11분 동안 처리하였다. 효소를 15분 동안 pH 6.0에서 70℃에서 비활성화하였다. 단백질 가수분해산물(REP 3-8)을 5℃에서 분사 건조하고 저장하였다.
- [0238] 실시예 4: 2가지 유형 프로테아제에 의한 알칼리-추출된 쌀 배유 단백질의 변형(REP 4)
- [0239] 알칼리 추출된 쌀 배유 단백질 분리물(REP 1)을 세린 프로테아제 및 시스테인 프로테아제로 처리하였다. 단백질을 탈이온수(1:12.5, w/v)와 혼합하고, 균일화하고, pH 9.0까지 조정하고 60℃에서 10분 동안 교반하였다. 분산액을 식품 등급 알칼라아제 2.4L(0.5%)로 처리하고 15분 동안 60℃에서 배양하였다. 이어서 리퀴파놀(0.5%)을 반응 혼합물에 첨가하고 15분 동안 50℃에서 배양하였다. 효소적 반응을 10분 동안 80℃에서 종결하고 변형된 쌀 배유 단백질을 분사건조하고 5℃에서 저장하였다.
- [0240] 실시예 5: 프로테아제에 의한 알칼리-추출된 쌀 배유 단백질의 변형 및 상기 변형된 쌀 배유 단백질의 후속적인 한외여과 및 투석여과(REP 5)
- [0241] 알칼리 추출된 쌀 배유 단백질 분리물(REP 1)을 세린 프로테아제 및 시스테인 프로테아제로 처리함에 의해 연장된 가수분해에 도입하였다: 단백질을 탈이온수(1:12.5, w/v)와 혼합하고, 균일화하고, pH 9.0까지 조정하고 60℃에서 10분 동안 교반하였다. 분산액을 식품 등급 알칼라아제 2.4L(0.5%)로 처리하고 60분 동안 60℃에서 배양하였다. 이어서, 리퀴파놀(0.5%)을 반응 혼합물에 첨가하고 50℃에서 60분 동안 배양하였다. 효소-반응은 80℃에서 10분 동안 종결하였다. 이렇게 변형된 쌀 배유 단백질을 와트만 #5 여과지를 통해 여과하였다. 여액을 2 내지 10L 용적을 갖는 로미콘 한외여과 시스템(미국 코슈 막 시스템)에 장착된 50kDa 중공-섬유 폴리설폰 막-카트릿지의 MWC0로 한외여과에 도입하였다. 용액은 10의 농도 계수에서 한외여과되었다. 한외여과 직후, 잔사를 탈이온수의 체적 2배로 2회 투석여과하였다. 생성된 잔사를 분사건조하였다.
- [0242] 실시예 6: 비-단백질 부분의 효소적 분해에 의한 쌀 배유 단백질의 분리, 프로테아제에 의한 상기 쌀 배유 단백질의 변형 및 상기 변형된 쌀 배유 단백질의 후속적인 한외여과 및 투석여과(REP 6-1 내지 REP 6-5)
- [0243] REP 6-1
- [0244] 실시예 2(REP 2-1)에서 수득한 효소적으로 추출된 쌀 배유 단백질 분리물을 세린 프로테아제 및 시스테인 프로테아제로 처리함에 의해 연장된 가수분해에 도입하였다: 단백질을 탈이온수(1:12.5, w/v)와 혼합하고, 균일화하고, pH 9.0까지 조정하고 60℃에서 10분 동안 교반하였다. 분산액을 식품 등급 알칼라아제 2.4L (0.5%)로 처리하고 60℃에서 60분 동안 배양하였다. 이어서 리퀴파놀(0.5%)을 반응 혼합물에 첨가하고 50℃에서 90분 동안 배양하였다. 효소적-반응을 10분 동안 80℃에서 종결하였다. 가수분해산물을 저속(10분 동안 1000g)으로 원심분리하고 불용성 단백질 및 불순물을 분리하였다. 변형된 쌀 배유 단백질의 가용성 부분을 와트만 #4 여과지를

통해 여과하고 50 kDa의 MWCO로 한외여과에 도입하였다. 용액은 10의 농도 계수에서 한외여과되었다. 한외여과 직후, 잔류물을 탈이온수의 체적 2배로 2회 투석여과하였다. 효소적 가수분해, 원심분리 및 한외여과 과정에서, (변형된) 쌀 배유 단백질의 pH는 단백질을 가용성으로 유지하기 위해 8.0에서 유지되었다. 생성된 잔류물은 분사건조하였다(REP 6-1).

[0245] REP 6-2의 제조에 대한 상세한 설명

[0246] 실시예 2(REP 2-2)에서 수득한 효소적으로 추출된 쌀 배유 단백질 분리물을 알칼라아제로 처리하였다: 단백질을 탈이온수(4%)와 혼합하고, 균일화하고, pH 9.0까지 조정하고 50℃에서 10분 동안 교반하였다. 분산액을 알칼라아제 2.4L (1%)로 처리하고 혼합물을 50℃에서 8분 동안 배양하였다. 효소적-반응을 15분 동안 70℃에서 pH 5.0에서 종결하였다. 가수분해산물을 저속(1000rpm, 1분)으로 원심분리하고 불용성 단백질 및 불순물을 제거하였다. 가수분해산물의 가용성 부분을 10kDa MWCO 막으로 한외여과에 도입하였다. 용액은 5의 농도 계수까지 한외여과되었다. 생성된 잔류물(>10kDa)을 5℃에서 분사건조하고 저장하였다(REP 6-2).

[0247] REP 6-3의 제조를 위한 상세한 설명

[0248] 실시예 2(REP 2-2)에서 수득한 효소적으로 추출된 쌀 배유 단백질 분리물을 알칼라아제로 처리하였다: 단백질을 탈이온수(4%)와 혼합하고, 균일화하고, pH 9.0까지 조정하고 50℃에서 10분 동안 교반하였다. 분산액을 알칼라아제 2.4L(1%)로 처리하고 혼합물을 50℃에서 12분 동안 배양하였다. 효소적-반응을 15분 동안 70℃에서 pH 5.0에서 종결하였다. 가수분해산물을 저속(1000rpm, 1분)으로 원심분리하고 가용성 단백질 및 불순물을 분리하였다. 가수분해산물의 가용성 부분을 10kDa MWCO 막으로 한외여과에 도입하였다. 용액은 5의 농도 계수까지 한외여과되었다. 생성된 잔류물(>10kDa)을 5℃에서 분사건조하고 저장하였다(REP 6-3).

[0249] REP 6-4의 제조를 위한 상세한 설명

[0250] 실시예 2(REP 2-2)에서 수득한 효소적으로 추출된 쌀 배유 단백질 분리물을 알칼라아제로 처리하였다: 단백질을 탈이온수(4%)와 혼합하고, 소듐 메타바이설파이트(20mg/g 단백질)를 첨가하고, 균일화하고, pH 9.0까지 조정하고 50℃에서 10분 동안 교반하였다. 분산액을 알칼라아제 2.4L(1%)로 처리하고 혼합물을 50℃에서 8분 동안 배양하였다. 효소적-반응을 15분 동안 70℃에서 pH 5.0에서 종결하였다. 가수분해산물을 저속(1000rpm, 1분)으로 원심분리하고 불용성 단백질 및 불순물을 제거하였다. 가수분해산물의 가용성 부분을 10kDa MWCO 막으로 한외여과에 도입하였다. 용액은 5의 농도 계수까지 한외여과되었다. 생성된 잔류물(>10kDa)을 5℃에서 분사건조하고 저장하였다(REP 6-4).

[0251] REP 6-5의 제조를 위한 상세한 설명

[0252] 실시예 2(REP 2-2)에서 수득한 효소적으로 추출된 쌀 배유 단백질 분리물을 알칼라아제로 처리하였다: 단백질을 탈이온수(4%)와 혼합하고, 소듐 메타바이설파이트(10mg/g 단백질)를 첨가하고, 균일화하고, pH 9.0까지 조정하고 50℃에서 10분 동안 교반하였다. 분산액을 알칼라아제 2.4L(1%)로 처리하고 혼합물을 50℃에서 30분 동안 배양하였다. 효소적-반응을 15분 동안 70℃에서 pH 5.0에서 종결하였다. 가수분해산물을 저속(1000rpm, 1분)으로 원심분리하고 불용성 단백질 및 불순물을 제거하였다. 가수분해산물의 가용성 부분을 10kDa MWCO 막으로 한외여과에 도입하였다. 용액은 5의 농도 계수까지 한외여과되었다. 생성된 잔류물(>10kDa)을 5℃에서 분사건조하고 저장하였다(REP 6-5).

[0253] (C) 펩신 보조된 쌀 단백질 추출 및 이어서 한외여과

[0254] 실시예 7: 산성 프로테아제에 의한 쌀 배유 단백질의 변형 및 상기 변형된 쌀 배유 단백질의 후속적 한외여과 (REP 7)

[0255] 500g의 쌀가루를 실온에서 블렌더 안에서 5분 동안 3L 탈이온수(1:6, w/v)로 균일화하였다. 슬러리를 3 N HCl를 사용하여 pH 2.4까지 조정하고, 현탁액을 37℃에서 30분 동안 교반하였다. 슬러리를 0.44% 펩신으로 처리하고 130분 동안 37℃에서 배양하였다. 용액중 용해된 변형된 쌀 배유 단백질을 원심분리에 의해 분리하였다 (5,000g, 20분). 잔사성 쌀가루를 500mL 탈이온수와 혼합하고 가용성 부분을 원심분리에 의해 분리하여 잔사로 부터 더 많이 추출한다. 제 1 추출과 제 2 추출의 조합된 상정액에서 단백질을 실시예 5에서 설명한 바와 같은 50kDa의 MWCO를 갖는 막을 사용하여 한외여과에 도입하였다. 조합된 UF 및 DF는 작은 단백질 분획 및 다른 불순물을 효과적으로 제외하였다.

[0256] (D) 분석방법

[0257] 실시예 8: 유화력의 측정

[0258] (변형된) 쌀 배유 단백질의 유화력을 오일 적정을 기준으로 다음 문헌[Gbogouri 등, Journal of Food Science 2004, Vol. 69, Nr. 8, 615]의 방법에 따라 측정하였다. (변형된) 쌀 배유 단백질의 분산액(0.1% w/w, 50mL, pH 7.0)을 탈이온수 안에서 제조하였다. 단백질 용액을 세팅 1에서 균일화기로 균일화하였다(미국 뉴욕주 가디너 소재의 더 버티스 캄파니, 버티시어 템페스트). 옥수수 오일을 연동 펌프를 사용하면서 약 17g/분의 유속으로 단백질 용액에 첨가하였다. 에멀전의 전도성을 전도성-측정계에 의해 연속적으로 기록하고 에멀전의 역전지점의 측정을 위한 계수로서 사용하였다. 역전 지점에 첨가된 오일의 양을 유화력을 계산하기 위해 사용했다. 유화력은 유화된 오일 마이너스 블랭크를 샘플에서 단백질의 함량으로 나눈값의 비로서 표현된다. 블랭크는 탈이온수 50 mL중 상 역전 전에 첨가된 오일의 양이다.

[0259] 선택적으로, 단백질 가수분해산물 REP 3-6, 3-7, 3-8, 6-2, 6-3, 6-4, 6-5의 유화력을 오일 적정을 기본으로 한 뵈러마르(Vuilleumard) 및 그 밖의 방법에 따라 측정하였다. 단백질 분산액(0.5% w/w, 40mL, pH 7.0)을 증류수중 제조하였다. 단백질 용액을 세팅 6에서 균일화기로 균일화하였다(미국 뉴욕주 가디너 소재의 더 버티스 캄파니, 버티시어 템페스트). 옥수수 오일을 펌프를 사용하면서 약 12g/분의 유속으로 단백질 용액에 첨가하였다. 에멀전의 전도성을 전도성-측정계에 의해 연속적으로 기록하고 에멀전의 역전지점의 측정을 위한 계수로서 사용하였다. 역전 지점까지 첨가된 오일의 양을 유화력을 계산하기 위해 사용했다. 유화력은 유화된 오일 마이너스 블랭크를 샘플에서 단백질의 함량으로 나눈값의 비로서 표현된다. 블랭크는 탈이온수 40mL중 상 역전 전에 첨가된 오일의 양이다.

[0260] 실시예 9: 유화 활성의 측정

[0261] 유화 활성을 다음 문헌[Pearce and Kinsella, Journal of Agric Food Chem. 1978, 26:716-722]의 탁도계량 방법에 의해 측정하였다. pH 7.0의 10mM 포스페이트 완충제중 (변형된) 쌀 배유 단백질의 0.1% 용액의 6mL 및 옥수수 오일 2 mL의 혼합물을 세팅 6에서 초음파 분해기로 1분 동안 균일화하였다(미국 뉴욕주 가디너 소재의 더 버티스 캄파니, 버티시어 템페스트). 혼합물 50 $\mu$ L를 균일화한지 0 내지 10분 후 SDS의 0.1% 수용액(w/v) 5mL로 옮겼다. 500nm에서 용액의 흡수도를 분광계로 측정하였다(일본 교토 소재의 시마즈 모델(Shimadzu Model) UV-1601). 균일화 후 시간 0에서 흡수도는 (변형된) 쌀 배유 단백질의 유화 활성이다.

[0262] 도 9는 가수분해도의 함수로서 알칼라아제, 리퀴파놀 및 펩신으로 처리된 쌀 단백질 가수분해산물의 유화 특성을 나타낸다.

[0263] 실시예 10: 가수분해도의 측정

[0264] DH를 닐슨 등의 방법에 의해 측정하였다(Nielsen, P. M., Petersen, D.&Dambmann, C, 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Science, 66 (5), 642-646)). o-프탈다이알데하이드(OPA) 시약을 다음과 같이 제조하였다: 7.620g의 다이소듐 테트라보레이트 데카하이드레이트( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 및 200mg의 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 150mL의 탈이온수중 용해하고 이어서 160mg의 OPA(에탄올 4mL중 미리 용해된 97% OPA) 및 176mg의 99% 다이티오토레이톨(DTT)와 혼합한다. 최종 용액은 탈이온수 200mL로 구성되었다. 0.1g의 동결건조된 단백질 샘플을 10mL 탈이온수 안에 용해하였다. 흡수도를 측정하기 위해, 3mL의 OPA 시약을 10mL의 튜브에 넣고 이어서 샘플 용액 400 $\mu$ L, 세린 표준물질(10mg/100mL) 및 탈이온수를 각 샘플, 표준물질 및 블랭크에 대해 각각 4개의 튜브 안에 첨가하였다. 이어서 5초 동안 혼합하고 정확히 2분 동안 보존하였다. 흡수도를 분광계로 340nm에서 판독하였다(일본 교토 소재의 시마즈 모델 UV-1601). DH를 다음 수식과 같이 계산하였다:

### 수학식 1

[0265] 
$$\text{DH} = h/h_{\text{총합}} * 100\%$$

[0266] 상기 식에서,

[0267] h는 가수분해된 결합의 수이고  $h_{\text{총합}}$ 은 단백질 당량당 펩타이드 결합의 총수이다.

## 수학식 2

[0268]

$$h = (\text{세린-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ 당량/g 단백질}$$

[0269]

상기 식에서,

[0270]

$h$ 는 가수분해된 결합의 수이고  $h_{\text{총합}}$ 은 단백질 당량당 펩타이드 결합의 총수이고, 시리얼 단백질의 경우  $\alpha$ 는 1.00,  $\beta$ 는 0.40이고,  $h_{\text{총합}}$ 은 8.0이다.

## 수학식 3

[0271]

$$\begin{aligned} \text{세린-NH}_2 &= [(A_{340\text{샘플}} - A_{340\text{블랭크}}) / (A_{340\text{표준물질}} - A_{340\text{블랭크}})] * 0.9516 \text{ meqv/L} * \\ &0.01 * 100 / (X * P) \end{aligned}$$

[0272]

상기 식에서,

[0273]

세린-NH<sub>2</sub> = meqv 세린 NH<sub>2</sub>/g 단백질이고;  $X$ 는 샘플 g이고;  $P$ 는 샘플중 단백질 %이고; 0.01은 샘플 체적(리터)이다.

[0274]

실시예 11: 단백질 및 총 용해도의 측정

[0275]

단백질 용해도는 다음 문헌[Bera, M. B., Mukherjee, R. K. 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. J Food Sci 54(1): 142-145]의 버라 및 무커지의 방법을 약간 변형하여 측정된다. 단백질 샘플 200mg을 탈이온수 10mL중 분산시키고, pH를 1N HCl 또는 1N NaOH에 의해 7.0까지 조정한다. 분산액을 30분 동안 연속적으로 교반하고 5000rpm에서 15분 동안 원심분리하였다(미국 캘리포니아 폴리톤 소재의 베크만(Beckman) model J2-21). 상청액을 회수하고, 상청액중 단백질 함량을 오토마틱 켈다(Automatic Kjeldahl)방법(AACC 1990)에 의해 측정하였다. 단백질 용해도의 백분율을 다음 수학식 4로 계산하였다:

## 수학식 4

[0276]

$$\text{단백질 용해도(\%)} = \frac{\text{상청액의 단백질 함량}}{200\text{mg 단백질-분리물에서 단백질}} \times 100$$

[0277]

단백질 용해도를 초기 샘플중 총 단백질에 대한 상청액에서 단백질의 백분율로서 계산하였다.

[0278]

총 용해도를 오븐 건조 방법에 의해 측정하고, 단백질 분리물의 총 중량에 대한 상청액의 총 가용성 부분의 백분율로서 나타냈다.

## 수학식 5

[0279]

$$\text{총 용해도(\%)} = \frac{\text{상청액의 가용성 부분}}{200\text{mg 단백질-분리물}} \times 100$$

[0280]

도 6은 가수분해도의 함수로서 알칼라아제, 리퀴파놀 또는 펩신으로 처리된 쌀 배유 단백질 가수분해산물의 용해도를 나타낸다.

[0281]

실시예 12: 분자량의 측정

[0282] 단백질의 대략적인 분자량을 다음 문헌[Laemmli, 영국, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970, 227, 680-686]의 방법에 따라 SDS-PAGE에 의해 측정하였다. SDS-PAGE를 SDS-트리스-글라이신 불연속 버퍼 시스템즈 스랩 겔(4% 스택킹 겔, 12% 분리 겔)상에서 수행하였다. 단백질 용액(6-10  $\mu\text{g}$  단백질/ $\mu\text{l}$ )을 비-환원 샘플 완충제(62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% 글리세롤, 및 0.05% 브로모페놀 블루)중 제조하였다. 용액 12 $\mu\text{l}$ 를 겔상에 적재하였다. 전기영동을 약 40분 동안 200 V의 일정 전압에서 수행하였다. 겔에 아세트산/에탄올/수용액(10:40:50, v:v:v)중 0.1% 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue)로 염색하고 쿠마시 브릴리언트 블루없이 동일한 용매중에 탈색한다. 대략적인 분자량은 6.5 내지 200kDa의 바이오-레드(Bio-Rad) 넓은 범위 분자량 표준물질에 의해 측정하였다. 밴드의 분자량과 밀도는 상 분석 소프트웨어(미국 캘리포니아주 소재의 어드밴스트 어메리칸 바이오테크놀로지 앤 바이오메디칼 인스트루먼츠 인코포레이티드(Advanced American Biotechnology & Biomedical Instruments Inc), windows Mac & Dos)를 사용하여 측정하였다.

[0283] 실시예 13: 표면 소수성의 측정

[0284] 단백질 분리물의 표면 소수성은 다음 문헌[ Hayakawa and Nakai, Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins, J.Food Sci. 1985, 50, 486-491]에서 명시한 방법으로부터 1-아닐리노-8-나프탈렌 설포네이트(ANS)의 소수성 형광 탐침에 의해 측정되었다. 4mL의 단백질 용액을 0.008 내지 0.025% w/v의 농도를 갖는 0.01M 포스페이트 완충제(pH 7)중 제조하였다. 10 $\mu\text{l}$ 의 0.01M 포스페이트 완충제(pH 7)중 8mM ANS 10mL를 각 단백질 용액에 첨가하고 이들 용액의 형광 강도를 스펙트로-플루오로포토미터(일본 교토 소재의 시마즈 모델 RF-1501)로 390nm의 여기 및 470nm의 방출에서 측정하였다. 형광 세기 대 단백질 농도의 기울기로서 표현된 표면 소수성을 선형 회귀법으로 계산하였다.

[0285] 도 5는 가수분해도의 함수로서 알칼라아제, 리퀴파놀 또는 펩신으로 처리된 쌀 배유 단백질 가수분해산물의 표면 소수성을 나타낸다.

[0286] 실시예 14: 점도의 측정

[0287] 단백질 분리물의 점도를 실온(26 $^{\circ}\text{C}$ )에서 MVDIN 측정 스펠들(반경 = 19.36mm, 높이 = 58.08mm)이 장착된 회전식 유량계(독일 Haake VT 550)에 의해 측정하였다. 단백질 분리물을 탈이온수와 혼합하고 10%의 슬러리를 형성하고, 슬러리를 분석 전에 평형을 위해 60분 동안 방치하였다. 샘플(30mL)을 원통형 컵(반경 = 21.0mm) 안에 적재하고 컴퓨터-제어된 프로그램을 사용하여 3분 동안 0로부터 4001/s까지 변화된 전단속도에 도입하였다. 데이터를 레오윈 프로 데이터 매니저 버전 2.84(Rheowin Pro Data manager version 2.84; 독일 소재의 Haake Mess Tech)에 의해 분석하였다.

[0288] 실시예 15: 열적 성질의 측정

[0289] 열적 성질은 열 분석 소프트웨어(미국 커넥티컷 노워크 소재의 퍼킨스-엘머 코포레이션(Perkins-Elmer Corp.); Pyris-1-DSC, 버전 4.00)가 장착된 차등 주사 열량계 모델 피리스-1(Pyris-1, 미국 커넥티컷 노워크 소재의 퍼킨스-엘머 코포레이션)을 사용하여 측정하였다. 200 mg의 단백질을 적절한 양의 물 안에 분산시키고 20%의 단백질 함량의 슬러리를 형성하였다. 슬러리를 잘 혼합하고 분석 전 평형을 위해 60분 동안 방치하였다. 슬러리(약 50  $\mu\text{l}$ )를 스테인레스 스틸 팬(큰 체적 캡슐) 안에 정확히 칭량하고, 외부에 영향을 받지 않게 밀봉하고, 10  $^{\circ}\text{C}$ /분의 속도로 25 내지 140 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도증가중 스캔한다. 비어 있는 팬을 참고로서 사용하였다. 피크 온도 및 엔탈피를 데이터 가공 소프트웨어를 사용하여 서머그램으로부터 컴퓨터로 처리하였다.

[0290] 유화 활성 및 안정성을 실시예 9의 절차를 사용하여 퍼얼스(Pearce) 및 킨셀라(Kinsella)의 탁도 계량 방법에 의해 측정하였다. 시간 0에서의 흡수도를 쌀 배유 단백질의 유화 활성으로서 나타내고 에멀전 안정성(ES)은 다음 수학적 6과 같이 계산하였다:

### 수학적 6

[0291] 
$$\text{에멀전 안정성} = T_0 \times \Delta t / \Delta T$$

[0292] 상기 식에서,

[0293]  $\Delta T$ 는  $\Delta t$ 의 시간 간격으로(10분) 초기 흡수도( $T_0$ )의 혼탁도(흡수도)에서의 감소이다.

[0294] 모든 실험은 세번 수행했다. 데이터를 JMP 5.1 소프트웨어(SAS Inst) SAS(노쓰 캐롤라이나 캐리 소재의 SAS Institute Inc. Version 5, 2002, JMP<sup>®</sup> 사용자 가이드)를 사용하여 변수 및 다수의 평균 비교에 대해 분석하였다. 평균 사이의 차이의 유의성을 5% 유의 수준( $P < 0.05$ )에서 터키(Tukey) HSD 절차에 의해 측정하였다.

[0295] (E) 결과

[0296] 각각 실시예 9 및 8에서 설명한 바와 같은 방법에 의해 측정된 실시예 1 내지 7에 따라 수득한 (변형된) 쌀 배유 단백질(REP 1-1 내지 REP 7)의 유화 활성 및 유화력이 하기 표 3a에 제시된다.

[0297] REP 3에 대해, 8개의 값이 주어지는데, 왜냐하면 실시예가 8회 수행되고 각 회수는 다음 효소를 서로 사용하기 때문이다: 브로멜레인, 프로텍스 6L, 펩신, 알칼라아제<sup>®</sup> 또는 리퀴파놀<sup>®</sup> (REP 3-1 내지 REP 3-8 참조). REP 6에 대해서는 5개의 값이 주어지는데, 왜냐하면 실시예가 5회 수행되고(REP 6-1 내지 REP 6-5 참조), 각 회수는 실시예 6에 상세히 설명한 바와 같이 상이한 방법 조건을 적용하기 때문이다.

[0298] [표 3a]

| 실시예 1 내지 7에 따른 (변형된) 쌀 배유 단백질 REP 1 내지 REP 7의 유화 활성 및 유화력 (변형된) 쌀 배유 단백질 |       |                |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|----------------|
|                                                                          | 유화 활성 | 유화력 [mL/g 단백질] |
| REP 1-1                                                                  | 0.221 | 228.1          |
| REP 2-1                                                                  | 0.214 | 177.6          |
| REP 3-1(브로멜레인)                                                           | 0.469 | 283.7          |
| REP 3-2(프로텍스 6L)                                                         | 0.507 | 346.5          |
| REP 3-3(펩신)                                                              | 0.584 | 363.8          |
| REP 3-4(알칼라아제)                                                           | 0.527 | 357.1          |
| REP 3-5(리퀴파놀)                                                            | 0.578 | 386.8          |
| REP 3-6                                                                  | 0.409 | 477.5          |
| REP 3-7                                                                  | 0.361 | 426.7          |
| REP 3-8                                                                  | 0.370 | 439.1          |
| REP 4                                                                    | 0.624 | 467.8          |
| REP 5                                                                    | 0.643 | 541.7          |
| REP 6-1                                                                  | 0.604 | 581.5          |
| REP 6-2                                                                  | 0.341 | 388.9          |
| REP 6-3                                                                  | 0.342 | 421.5          |
| REP 6-4                                                                  | 0.365 | 436.8          |
| REP 6-5                                                                  | 0.277 | 341.5          |
| REP 7                                                                    | 0.473 | 228.7          |

[0299]

[0300] 하기 표 3b 및 3c에서, 각각 실시예 10 및 11에 개시된 방법에 의해 측정된 실시예 3 내지 6에 따라 수득된 변형된 쌀 배유 단백질 REP 3 및 6의 단백질 및 총 용해도 및 가수분해도가 각각 주어진다.

[0301] [표 3b]

| 실시예 3 및 6에 따른 변형된 쌀 배유 단백질 REP 3 및 REP 6의 단백질 및 총 용해도 |            |          |
|-------------------------------------------------------|------------|----------|
| 변형된 쌀 배유 단백질                                          | 단백질 용해도(%) | 총 용해도(%) |
| REP 3-6                                               | 31.1       | 45.0     |
| REP 3-7                                               | 34.7       | 49.5     |
| REP 3-8                                               | 36.9       | 53.0     |
| REP 6-2                                               | 29.4       | 47.2     |
| REP 6-3                                               | 33.3       | 56.4     |
| REP 6-4                                               | 32.8       | 49.7     |
| REP 6-5                                               | 38.3       | 58.2     |

[0302]

[0303] [표 3c]

| 실시에 3 및 6에 따른 변형된 쌀 배유 단백질 REP 3 및 REP 6의 가수분해도 |                |                 |
|-------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| 변형된 쌀 배유 단백질                                    | 가수분해도*<br>(DH) | 가수분해도**<br>(DH) |
| REP 3-6                                         | 3.7            | -               |
| REP 3-7                                         | 4.3            | -               |
| REP 3-8                                         | 5.9            | -               |
| REP 6-2                                         | 3.4            | 5.6             |
| REP 6-3                                         | 4.6            | 6.7             |
| REP 6-4                                         | 3.8            | 5.1             |
| REP 6-5                                         | 6.7            | 8.8             |
| * DH - 효소적 가수분해(원심분리 및 한외여과 전)                  |                |                 |
| ** 최종 생성물의 DH(원심분리 및 한외여과 후 효소적 가수분해)           |                |                 |

[0304]

[0305] 화학적 및 효소적 추출 절차에 대한 검토를 각각 도 1 및 2에 나타낸다. 쌀가루에 있는 총 단백질중, 알칼리- 및 염-방법은 각각 87.2 및 89.4% 단백질 함량, 67.9 및 60.3% 수율을 갖는 단백질 분리물을 추출했다.

[0306] 알칼리 및 염 방법에서, pH는 단백질 추출상에 강한 영향을 미쳤다. pH와 추출성간의 양의 상관관계는 pH 12까지 발견되었다. 그러나, 높은 pH는 바람직하지 않은 단백질 변형을 유도하고 비-단백질 성분의 추출을 증가시켜 단백질과 공침전되고 분리물 품질을 떨어뜨린다. 그러나, pH 10 이하는 쌀 단백질 추출을 위한 열등한 용매였다. 따라서, pH 11은 최적 추출 pH 관련 단백질 수율인 것으로 측정되었다. 단백질 기능-단백질의 유효성과 같은-과 관련하여, 낮은 pH(바람직하게는 8 내지 10)가 관심대상일 수 있다. 또한, pH 11에서 3분 균일화 또는 초음파 분해의 전처리와 조합된 단백질 추출은 단백질의 추출성을 향상시켰다. 이들 예비처리는 소수성으로 상호작용된 단백질-단백질 또는 단백질-다당류 상호작용을 분리하여 단백질 추출을 용이하게 했을 수 있다.

[0307] 효소 추출에서, 열 안정성 알파 아밀라아제, 티마일 이어서 셀룰로스 처리는 89.2% 수율로 85.8% 단백질 함량을 분리하였다. 효소 티마일은 90℃에서 최적 활성을 갖는다. 티마일 처리중 90℃에서 연장적 단백질 변성을 피하기 위해, 절차가 70℃에서 최적 활성을 갖는 또 다른 비-열 안정성 아밀라아제(아밀라아제 S)로 개조하였다. 셀룰라아제 처리와 조합된 아밀라아제 S 처리는 아래 표에 나타낸 바와 같이 90.5% 수율로 단백질 81.7%를 분리하였다.

[0308] [표 4]

| 최적 조건을 갖는 쌀 단백질 분리물의 단백질 함량 및 회수 <sup>a</sup> |           |            |
|-----------------------------------------------|-----------|------------|
| 쌀 단백질 분리물                                     | 단백질(%)    | 단백질 회수율(%) |
| REP 1-3: RP <sub>A</sub> (알칼리)                | 87.2±1.08 | 67.9±3.37  |
| REP 1-4: RP <sub>S</sub> (염)                  | 89.4±1.96 | 60.3±2.18  |
| REP 2-3: RP <sub>ET</sub> (티마일)               | 85.8±1.12 | 89.2±2.31  |
| REP 2-4: RP <sub>ES</sub> (아밀라아제 S)           | 81.7±1.18 | 90.5±1.36  |
| <sup>a</sup> 값은 삼중 검사의 평균이고 건조 중량을 기준으로 한다.   |           |            |

[0309]

[0310] 쌀 단백질, 알부민, 글로불린, 글루텔린 및 프롤라민의 조성은 표 4에 나타낸다. 쌀가루는 7.8% 단백질을, 총 단백질의 4.1% 알부민, 11.8% 글로불린, 77.4% 글루텔린, 및 2.1% 프롤라민과 함께 함유했다. 알칼리 및 염 추출은 글로불린을 제외하고는 유사한 단백질 특성을 갖는다: 염-추출된 단백질은 알칼리-추출된 단백질(3.1%)보다 더 높은 글로불린(6.2%)을 함유하였다. 쌀중 주된 단백질이 글루텔린이기 때문에, 알칼리- 및 염-추출된 단백질은 효소 추출된 단백질(80.2%)보다 각각 87.9 및 86.7의 더 높은 백분율로 글루텔린을 함유하였다. 반대로, 프롤라민 함량은 알칼리성(0.5%) 및 염(0.7%) 추출보다 효소-추출(2.8%)시 더 높았다.

[0311] [표 5]

| 화학적- 및 효소-추출된 단백질 분리물의 알부민, 글로불린, 글루텔린 및 프롤라민 함량 <sup>a</sup> |          |                                 |                               |                                  |                                      |
|---------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 단백질 분율 성분(%)                                                  | 총 단백질의 % |                                 |                               |                                  |                                      |
|                                                               | 쌀가루      | REP 1-3: RP <sub>A</sub><br>알칼리 | REP 1-4: RP <sub>S</sub><br>염 | REP 2-3: RP <sub>ET</sub><br>터마밀 | REP 2-4: RP <sub>EA</sub><br>아밀라아제 S |
| 총 단백질                                                         | 7.92     | 87.2±1.1                        | 89.4±1.2                      | 85.8±1.1                         | 81.7±1.0                             |
| 알부민                                                           | 4.13     | 2.9±0.1                         | 2.6±0.2                       | 1.7±0.1                          | 1.8±0.1                              |
| 글로불린                                                          | 11.88    | 3.8±0.2                         | 6.2±0.3                       | 7.7±0.0                          | 7.1±0.6                              |
| 글루텔린                                                          | 77.43    | 87.2±1.1                        | 86.7±0.9                      | 80.6±0.7                         | 81.1±1.05                            |
| 프롤라민                                                          | 2.06     | 1.5±0.4                         | 1.1±0.1                       | 2.8±0.1                          | 2.9±0.1                              |
| 비-추출성                                                         | 4.3      | 3.1±0.6                         | 2.9±0.1                       | 6.4±0.6                          | 5.7±0.4                              |
| <sup>a</sup> 값은 삼중 검사의 평균이다                                   |          |                                 |                               |                                  |                                      |

[0312]

[0313] 4개의 단백질 분리물의 조성은 다음 표 6에 나타낸다. RP<sub>A</sub> 및 RP<sub>S</sub> 모두 유사한 조성을 가졌고 효소-추출된 단백질(RP<sub>ET</sub>(84.8%) 및 RP<sub>EA</sub>(81.7%))보다 모두 높은 단백질 함량, 즉 87.2 및 89.4%를 각각 가졌다. 전분, 지질, 섬유, 회분을 포함하는 비-단백질 성분은 효소-추출된 단백질에서보다 알칼리- 및 염-추출된 단백질에서 더욱 낮았다.

[0314] [표 6]

| 쌀 단백질 분리물 <sup>a</sup> REP 1-3, 1-4, 2-3 및 2-4의 근사 조성                              |                                 |                               |                                  |                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 근사 조성(%)                                                                           | REP 1-3: RP <sub>A</sub><br>알칼리 | REP 1-4: RP <sub>S</sub><br>염 | REP 2-3: RP <sub>ET</sub><br>터마밀 | REP 2-4: RP <sub>EA</sub><br>아밀라아제 S |
| 수분                                                                                 | 2.4±0.23 <sup>a</sup>           | 2.5±0.09 <sup>a</sup>         | 2.0±0.11 <sup>a</sup>            | 2.3±0.07 <sup>a</sup>                |
| 단백질                                                                                | 87.2±1.08 <sup>ab</sup>         | 89.4±1.96 <sup>a</sup>        | 85.8±1.12 <sup>b</sup>           | 81.7±1.08 <sup>c</sup>               |
| 전분                                                                                 | 2.1±0.48 <sup>c</sup>           | 1.7±0.61 <sup>c</sup>         | 5.1±0.38 <sup>b</sup>            | 6.7±0.47 <sup>a</sup>                |
| 지질                                                                                 | 0.3±0.04 <sup>b</sup>           | 0.2±0.06 <sup>b</sup>         | 1.1±0.05 <sup>a</sup>            | 1.1±0.13 <sup>a</sup>                |
| 섬유                                                                                 | 0.6±0.43 <sup>b</sup>           | 0.5±0.17 <sup>b</sup>         | 4.8±0.46 <sup>a</sup>            | 5.3±0.51 <sup>a</sup>                |
| 회분                                                                                 | 0.4±0.07 <sup>b</sup>           | 0.7±0.04 <sup>b</sup>         | 3.7±0.13 <sup>a</sup>            | 3.4±0.09 <sup>a</sup>                |
| <sup>a</sup> 값은 삼중 측정의 평균으로 건조 중량을 기본으로 한다. 동일 열에 상이한 문자를 갖는 평균값은 상당히 상이하다(P<0.05) |                                 |                               |                                  |                                      |

[0315]

[0316] 쌀 단백질의 전기영동 특성을 도 3에 나타낸다.

[0317] SDS PAGE 겔 전기영동에 의해 측정된 쌀 단백질의 분자 크기 특성

[0318] 레인 1 - 표준 마커(6.5 - 200 kDa);

[0319] 레인 2 - RP<sub>A</sub>;

[0320] 레인 3 - RP<sub>S</sub>;

[0321] 레인 4 - RP<sub>ET</sub>;

[0322] 레인 5 - RP<sub>EA</sub>.

[0323] 쌀 단백질은 총 6개의 밴드를 가졌고 분자크기는 7 내지 97kDa로 다양하다. 주요 밴드는 97 kDa (2%), 45 kDa (3%), 33 kDa (72%), 21 kDa (7%), 14 kDa(6%), 및 7 kDa (8%)에서 관찰되었다. 가장 지배적인 밴드는 72%의 밀도를 갖는 33 kDa의 분자크기에서 관찰되었다(도 3, 레인 1 및 2). 이는 주된 쌀 단백질, 글루텔린이다.

[0324] 쌀 단백질 분리물의 열 변성 온도 및 변성의 엔탈피 값을 다음 표 7에 나타낸다.

[0325] [표 7]

| 쌀 단백질 분리물 REP 1-3, 1-4, 2-3 및 2-4 및 쌀가루 <sup>a</sup> 의 열적 성질           |                        |                              |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------|
| 쌀 단백질 분리물                                                              | 변성 온도(℃)               | 변성의 엔탈피 값(Jg <sup>-1</sup> ) |
| REP 1-3: RP <sub>A</sub> (알칼리)                                         | 81.4±1.1 <sup>a</sup>  | 1.82±0.14 <sup>b</sup>       |
| REP 1-4: RP <sub>S</sub> (염)                                           | 78.9±1.8 <sup>ab</sup> | 1.10±0.09 <sup>c</sup>       |
| REP 2-3: RP <sub>ET</sub> (터마밀)                                        | nd                     | nd                           |
| REP 2-4: RP <sub>EA</sub> (아밀라아제 S)                                    | 79.9±2.1 <sup>b</sup>  | 0.18±0.06 <sup>d</sup>       |
| 쌀가루                                                                    | 78.8±2.7 <sup>ab</sup> | 7.31±0.19 <sup>a</sup>       |
| <sup>a</sup> 값은 삼중 측정의 평균이다. 동일한 칼럼에서 상이한 문자를 갖는 평균값은 상당히 상이하다(P<0.05) |                        |                              |
| * nd, 검출불가능함                                                           |                        |                              |

[0326]

[0327]

RP<sub>A</sub>, RP<sub>S</sub>, RP<sub>ET</sub>, 및 RP<sub>EA</sub>의 변성온도는 각각 81.4, 78.9, 79.9, 및 78.8℃였다. RP<sub>A</sub>(1.82 J/g), RP<sub>S</sub>(1.10 J/g), RP<sub>ET</sub>(검출불가능함), 및 RP<sub>EA</sub>(0.18 J/g)의 엔탈피 값은 상당히 상이하며, 이는 추출방법이 추출 조건에 따라 다양한 정도로 단백질을 변성시킴을 의미한다. 엔탈피 변화는 단백질 변성의 정도를 예상하기 위해 사용될 수 있다[Biliaderis, C. G., Differential scanning calorimetry in food research: A review Food Chem. 1983, 10, 239- 265]. 엔탈피 변화는 단백질이 부분적으로 변성될 때 감소하고, 단백질이 완전히 변성될 때 엔탈피 변화는 0이다. 문헌[Yu, Z. Y., Hettiarachchy, N. S.; Rath, N., Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins, J. Food Sci. 2001, 66 (2), 229-232]은 알부민, 글로불린 및 글루텔린 각각에 대한 엔탈피 값을 2.88, 3.14, 및 3.79 J/g로 보고하였다. 우리의 연구에서, 알칼리-추출된 단백질(RP<sub>A</sub>)은 가장 높은 엔탈피 값(1.82 J/g)을 가졌고, 이는 알부민(2.88 J/g), 글로불린(3.14 J/g), 및 글루텔린(3.79 J/g)에 대한 유(Yu) 등의 값보다 상당히 낮다. 알칼리 및 염 추출에 사용된 물리적 처리는 단백질을 어느 정도까지 변성시켰다. 효소-추출된 단백질중, RP<sub>ET</sub>(터마밀, 90℃)는 어떠한 검출가능한 엔탈피 변화를 나타내지 않았으며, 이는 완전한 단백질 변성을 지시했다.

[0328]

표면 소수성 및 용해도

[0329]

쌀 단백질 분리물의 표면 소수성, 용해도 및 점도는 표 8에 나타낸다.

[0330]

[표 8]

| 쌀 단백질 분리물 <sup>a</sup> REP 1-3, 1-4, 2-3 및 2-4의 표면 소수성, 용해도 및 점도    |                                |                              |                                 |                                     |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
|                                                                     | REP 1-3: RP <sub>A</sub> (알칼리) | REP 1-4: RP <sub>S</sub> (염) | REP 2-3: RP <sub>ET</sub> (터마밀) | REP 2-4: RP <sub>EA</sub> (아밀라아제 S) |
| 표면 소수성                                                              | 563.8 ±14.8 <sup>c</sup>       | 544.2±13.1 <sup>c</sup>      | 931.3±15.6 <sup>a</sup>         | 771.6±12.3 <sup>b</sup>             |
| 용해도%(pH 7.0에서)                                                      | 13.6 ±1.6 <sup>a</sup>         | 11.6±1.5 <sup>a</sup>        | 8.1±1.1 <sup>b</sup>            | 9.3±2.0 <sup>b</sup>                |
| 점도 Pas(10%, w/v)                                                    | 17.4 ±0.6 <sup>a</sup>         | 17.2±0.9 <sup>a</sup>        | 17.0±1.1 <sup>a</sup>           | 18.2±1.4 <sup>a</sup>               |
| pH                                                                  | 7.0 ±0.2                       | 6.8±0.6                      | 6.8±0.2                         | 6.9±0.3                             |
| <sup>a</sup> 값은 삼중 측정의 평균이다. 동일 열에 상이한 문자를 갖는 평균값은 상당히 상이하다(P<0.05) |                                |                              |                                 |                                     |

[0331]

[0332]

쌀 단백질 분리물의 소수성은 544 내지 931이다. 추출방법은 이들 단백질의 소수성에서의 차이가 나는 이유이다. 효소-추출된 단백질, 즉 RP<sub>ET</sub>(931.3) 및 RP<sub>EA</sub>(791.6)의 소수성은 알칼리 및 염-추출된 단백질보다 높고, 이는 각각 563.8 및 544.2이었다. 이는 단백질 변성에 기인할 수 있고, 표면 소수성을 증가시킨다. 효소-추출된 단백질의 열-유도된 펄침이 표면 소수성을 증가시켰다.

[0333]

쌀 단백질 분리물의 용해도는 4 내지 10의 넓은 pH 범위에서 낮다(데이터는 나타내지 않음). 아미노산 조성물 및 소수성 상호작용은 용해도를 결정한다. 텍슨(Tecson) 등(8)에 의한 쌀 글루텔린의 하위분획화 연구는, 쌀 글루텔린의 높은 분자량이 과량의 분자간 및 분자내 다이설파이드 및 소수성 상호작용을 갖고 그 용해도를 감소

시킴을 나타냈다. 웬(Wen) 및 루쓰(Luthe)(9)는 또한 쌀 글루텔린에서 가장 많은 아미노산이 글루탐산/글루타민, 아스파르트산/아스파라긴, 아르기닌, 글라이신 및 알라닌이라는 것을 보고했다. 글루타민 및 아스파라긴 측쇄에서 아마이드 기는 글루텔린의 응집을 촉진시키고 쌀 단백질 용해도를 감소시켰다. 비교적으로, 효소-추출된 단백질은 알칼리- 및 염-추출된 단백질보다 낮은 용해도를 갖고, 이는 추출시 높은 수준의 변성, 높은 표면 소수성 및 수용성 단백질(알부민)의 손실에 기인할 것이다.

[0334] 쌀 단백질 분리물의 유화 및 발포성은 하기 표 9에 나타낸다.

[0335] [표 9]

| 쌀 단백질 분리물의 유화 및 발포성 <sup>a</sup>                                    |                                      |                                    |                                       |                                           |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|
|                                                                     | REP 1-3:<br>RP <sub>A</sub><br>(알칼리) | REP 1-4:<br>RP <sub>S</sub><br>(염) | REP 2-3:<br>RP <sub>ET</sub><br>(터마밀) | REP 2-4:<br>RP <sub>EA</sub><br>(아밀라아제 S) |
| 유화 활성                                                               | 0.244±0.11 <sup>a</sup>              | 0.215±0.01 <sup>a</sup>            | 0.146±0.07 <sup>b</sup>               | 0.176±0.21 <sup>b</sup>                   |
| 유화 안정성(분)                                                           | 19.6±0.91 <sup>a</sup>               | 17.1±0.81 <sup>b</sup>             | 13.2±2.11 <sup>c</sup>                | 14.7±0.91 <sup>c</sup>                    |
| 발포 용적(mL)                                                           | 12.6±1.2 <sup>a</sup>                | 13.5±1.0 <sup>a</sup>              | 8.4±0.8 <sup>b</sup>                  | 9.1±0.7 <sup>b</sup>                      |
| 발포 안정성(분)                                                           | 8.6±0.9 <sup>a</sup>                 | 8.2±0.6 <sup>a</sup>               | 5.3±0.4 <sup>b</sup>                  | 6.8±0.9 <sup>b</sup>                      |
| <sup>a</sup> 값은 삼중 측정의 평균이다. 동일 열에 상이한 문자를 갖는 평균값은 상당히 상이하다(P<0.05) |                                      |                                    |                                       |                                           |

[0336]

알칼리- 및 염-추출된 단백질의 유화성 및 발포성은 효소-추출된 단백질보다 높았다. 알칼리- 및 염-추출된 단백질의 유화 활성은 각각 0.224 및 0.216이었고, 안정성은 각각 19.6 및 17.1분이었고, 이는 효소-추출된 단백질보다 상당히 높은 것이다. 결과의 유사한 패턴은 발포 용적 및 안정성에서 관찰되었다. 유화 및 발포 성질을 갖기 위해, 단백질은 수성 상에서 용해될 수 있어야 하고 계면에서 응집성 층을 형성하기 위해 신속하게 펼쳐져야 한다. 에멀전 및 발포체를 안정화하기 위한 단백질의 분자적 그리고 물리적 요건은 유사하다(문헌 [Damodarn, S., Protein-stabilized foams and emulsions, J. Food Sci. 205, 70 (3), 54-66]). 상이한 추출 방법에 의해 획득된 기능성에서의 차이의 가능한 이유는 단백질 분리물의 단백질 순도, 조성, 표면 소수성 및 용해도에 기인할 수 있다. 그러나, 출원인이 이러한 이론에 구속되도록 하려는 것은 아니다.

[0338] 첫째, 2종의 효소-추출된 단백질의 열적 성질은 RP<sub>A</sub> 및 RP<sub>S</sub>보다 높은 변성도를 나타냈다. 과잉 변성은 단백질 응집을 촉진시키거나 많은 소수성 아미노산을 노출시킴으로써 유화성 및 발포성에 해로울 수 있다. 표면 소수성 데이터로 효소-추출된 단백질의 증가된 소수성이 확인되었다. 과잉의 표면 소수성은 바람직하지 않은데, 왜냐하면 단백질의 유화성 또는 발포성이 촉진되어 단백질의 오랜 소수성 결합 및 감소된 용해도 및 가요성을 형성하기 때문이다.

[0339] 둘째, 높은 온도 및/또는 pH와 같은 외부 추출 조건은 다이설파이드 가교결합의 형성을 촉진시켰다. 쌀 글루텔린이 과잉의 다이설파이드 결합을 가졌다고 보고되었다. 추출된 단백질의 극히 낮은 용해도는 추출중 단백질의 열- 또는 pH-유도된 펼침이 단백질의 내부에서 티올 기를 노출한 것을 지시한다. 이러한 노출된 티올 기는 인접한 단백질 분자와의 다이설파이드 결합을 용이하게 형성할 수 있다. 새롭게 형성된 다이설파이드 결합은 단백질의 분자 가요성, 용해도 및 표면 활성을 감소시켰다. 단백질의 특정 세그먼트의 가요성은 단백질의 유화성 및 발포성을 결정하는 주요 특징중 하나이다.

[0340] 셋째, 쌀 단백질 분리물의 조성은, 알칼리- 및 염-추출된 단백질 분리물이 효소-추출된 단백질보다 더 높은 양의 단백질 및 더 낮은 양의 비-단백질 물질을 함유한다는 것을 나타냈다. 효소 추출된 단백질 분리물, RP<sub>ET</sub> 및 RP<sub>EA</sub>에서 섬유, 회분, 지질 및 잔사성 전분의 상당량은 이들의 유화성 및 발포성을 감소시켰다. 이들 비-단백질 성분은 단백질과 상호작용하고, 단백질의 알짜 전하 및 소수성을 변형시켜 단백질 기능에 영향을 미친다.

[0341] 마지막으로, 효소 추출된 단백질의 더 낮은 용해도는 유화 성질 및 발포 성질에 악영향을 미쳤다. 유화성 및 발포성을 갖도록 하기 위해, 단백질은 용해되거나 펼쳐져서 계면에서 응집성 층을 형성할 수 있어야 한다. 이는 단백질 용해도 및 가요성을 요구한다. 이러한 성질이 부족해서, 효소-추출된 단백질은 알칼리- 및 염-추출된 단백질보다 유화성 및 발포성이 약해졌다.

[0342] 이러한 조사로부터, 알칼리 및 염 방법은 단백질의 87.2 및 89.4%를 추출하였고 각각의 수율은 67.9 및 60.3%이

었다는 것이 밝혀졌다. 터마밀 및 아밀라아제 S를 사용한 효소적 방법은 84.8 및 81.8% 단백질을 추출하였고 수율은 각각 89.2 및 90.5%이었다. 알칼리- 및 염-추출된 단백질은 효소-추출된 단백질보다 높은 단백질 함량 및 낮은 비단백질 성분(전분, 지질, 섬유 및 회분)을 가졌다. 비교적, 알칼리- 및 염-추출된 단백질의 더욱 바람직한 단백질 조성, 더 낮은 소수성, 더 높은 용해도 및 더 낮은 정도의 열적 변성은 효소-추출된 단백질보다 더 높은 유화성 및 발포성에 기여했다. 따라서, 추출의 알칼리 및 염 방법은 더욱 온화한 추출 조건이고 단백질은 더 양호한 기능성을 보유했다.

[0343]

쌀 단백질은 사람이 소모하기에 영양가가 있고 저자극성이고 건강에 좋다. 승인된 식품 등급 효소 및 화학물질을 사용한 효과적인 추출은 기능성 성분으로서 쌀 단백질의 상업적 생산 및 응용에 필수적이다. 쌀 배유 단백질을 알칼리, 염 및 효소적 방법에 의해 분리하고 추출가능성 및 물리화학적 성질에 대해 평가하였다. 알칼리(RP<sub>A</sub>) 및 염(RP<sub>S</sub>) 방법은 단백질 87.2 및 89.4%를 추출하였고 수율을 각각 67.9 및 60.3%이었다. 터마밀(RP<sub>ET</sub>) 및 아밀라아제 S (RP<sub>EA</sub>)를 사용한 효소적 방법은 84.8 및 81.8% 단백질을 추출하였고, 수율을 각각 89.2 및 90.5%이었다. 차등 주사 열량계에 의해 측정된 RP<sub>A</sub> (1.82J/g), RP<sub>S</sub> (1.10J/g), RP<sub>ET</sub> (검출불가능함), 및 RP<sub>EA</sub>(0.18J/g)의 엔탈피값은 단백질의 다양한 변성 수준이 추출방법에 의존한다는 것을 입증한다. 표면 소수성 데이터는 이러한 발견을 지지하였다. 알칼리- 및 염-추출된 단백질은 효소-추출된 단백질보다 더 높은 용해도 및 유화 특성을 갖는다; 따라서, 알칼리- 및 염-추출된 단백질은 맞춤형 쌀 단백질 분리물을 제조하기 위한 향상된 기능적 용도 및 잠재적 출발 물질을 갖는다.

[0344]

열안정성 알파-아밀라아제, 즉 터마밀<sup>®</sup>로 분리된 쌀 배유 단백질을 중성, 산성 및/또는 알칼리성 프로테아제로 처리하였다. 가수분해산물의 가수분해도는 OPA 방법에 의해 최적화되어 용해도 및 유화 특성을 최대화한다. 효소 비활성화 후, 가용성 분획은 원심분리에 의해 분리되고(10분 동안 1000g), 가용성 가수분해산물은 특이적 분자량 컷오프가 50kDa인 막을 통해 여과된다. 50kDa보다 큰 생성된 가수분해산물을 분사건조하고 가수분해도, 용해도, 유화력, 활성 및 안정성에 대해 평가하였다.

[0345]

2종의 프로테아제의 조합 처리; 시스테인(리퀴파놀) 및 세린(알칼라아제) 프로테아제 후 원심분리 및 한외여과하여 용해도 및 유화성을 상당히 향상시켰다. 생성된 가수분해산물은 53.5% 용해도; 586.3mL/g 유화력, 0.604-활성, 및 24.8분-안정성을 가졌고, 이들은 비변형된 쌀 단백질 분리물보다 상당히 높았다(용해도 11.8%, 177.6mL/g 유화력, 0.214-활성 및 14.7 분-안정성).

[0346]

알칼라아제 및 리퀴파놀후 한외여과로 조합된 효소 가수분해를 수행하여 쌀 배유 단백질 용해도 및 유화 특성을 향상시켰다. 높은 순도의 균일한 분자 분획을 갖는 한외여과된 쌀 배유 단백질 가수분해산물은 그 용해도 및 유화 특성을 향상시켰다.

[0347]

실시예 12: β-카로텐의 제형 제조

[0348]

쌀 배유 단백질 및 β-카로텐을 포함하는 제형을 다음과 같이 제조하였다:

[0349]

a) (오일계) 용액 1의 제조

[0350]

옥수수 오일 7.7g 및 dl-α-토코페롤 1.4g을 혼합하였다. 16.1g의 결정성 β-카로텐을 180mL의 클로로포름(트라이클로로메탄)중 용해하고 생성된 분산액을 옥수수 오일 및 토코페롤의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 천천히 교반하고 동시에 60℃까지 가열하여 용액을 수득하였다.

[0351]

b) 수성 용액 2의 제조

[0352]

실시예 1에 따른 REP 1(REP1-1) 35g을 60℃에서 교반하면서 물 250mL 안에 다시 용해시켰다. 선택적으로 실시예 1에 따라 새로 제조된 REP 1-1이 사용될 수 있지만, 즉 동결건조 및 저장 단계가 수행되지 않고, 생성된 REP 1-1 용액이 그대로 사용되고 60℃의 온도까지 도달할 수 있다. 부가적으로 2.1g의 아스코빌 팔미테이트 및 42.7g의 수크로스를 첨가하였다. 8mL의 수성 1N NaOH를 사용하여 pH를 7.9의 값까지 조정한다. REP 1-1 대신, REP 1-2를 수용액의 제조를 위해 상응하게 사용할 수 있다.

[0353]

c) 용액 1 및 2로부터 에멀전의 제조

[0354]

격렬한 교반하에 용액 1을 용액 2에 53℃에서 첨가하고 분산액을 또 다른 30분 동안 격렬하게 교반하였다. 교반된 분산액을 30분 동안 50 내지 55℃에서 유지하였다. 잔사성 트라이클로로메탄을 50 내지 55℃에서 제거하였다. 원심분리에 의해 비발동반된 공기 방울을 제거한 후, 에멀전을 수분동안 50 내지 55℃에서 부드럽게 교

반하고 이어서 내부 상의 입자 크기에 대해 특성화하였다. 에멀전의 내부상의 평균 입자 크기(소터 직경 (Sauter diameter), D[3,2])는 레이저 굴절(Malvern Mastersizer)에 의해 측정했을 때 380nm이었다.

d) 에멀전으로부터 고체 제형의 제조:

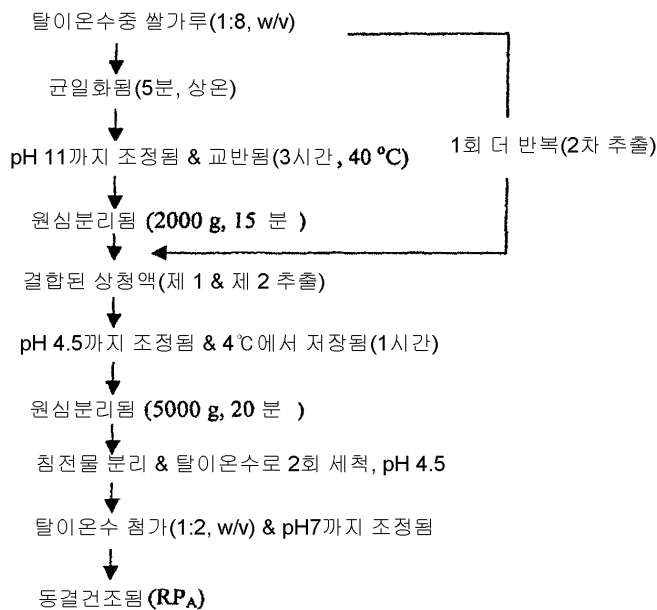
에멀전을 옥수수전분의 미리 차갑게 만든 유동상 안으로 분사하였다. 과량의 옥수수전분을 체로 쳐서 제거하고 수득된 분말을 실온에서 공기 스트림 안에서 건조할 수 있다. 0.16 내지 0.50mm의 분말 입자 분획을 체로 침으로써 수거하고 수성 분산액에서 카로테노이드 함량, 색 강도 및 색조, 옥수수 전분 함량 및 잔류 습도에 대해 특성화한다.

[표 10]

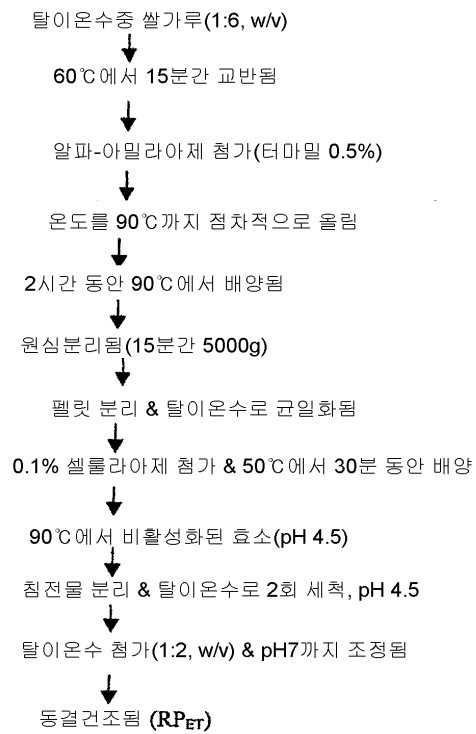
| 건조된 제형의 계산된 조성              |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| 화합물                         | 양(총 건조 중량을 기준으로 한 중량%) |
| REP 1-1: 실시예 1에 따른 쌀 배유 단백질 | 25.0                   |
| 수크로스                        | 30.5                   |
| 아스코빌 팔미테이트                  | 1.5                    |
| $\beta$ -카로텐                | 11.5                   |
| 옥수수 오일                      | 5.5                    |
| d1- $\alpha$ -토코페롤          | 1.0                    |
| 옥수수 전분 유체                   | 25.0                   |

## 도면

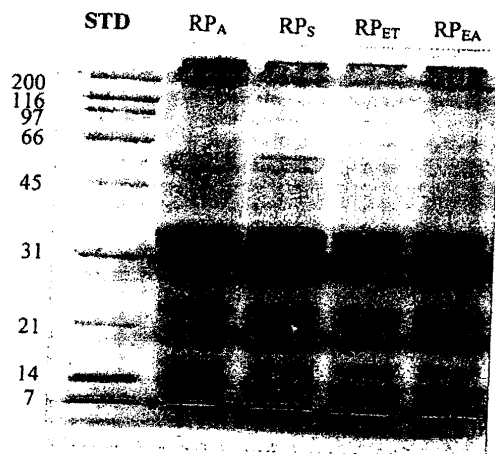
### 도면1



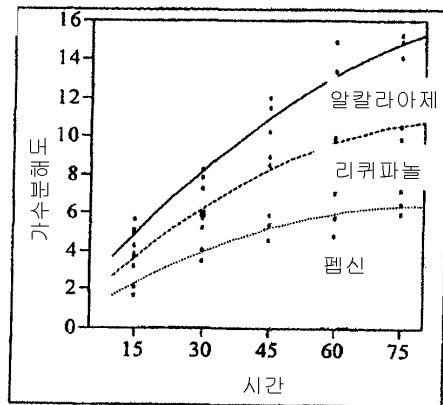
## 도면2



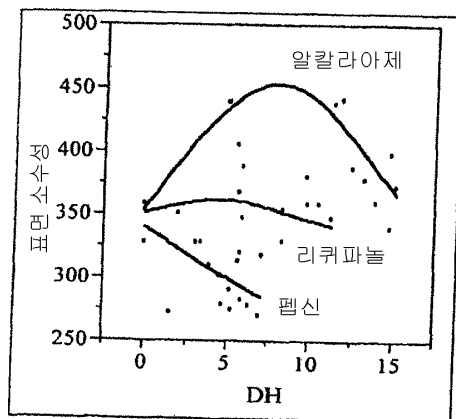
## 도면3



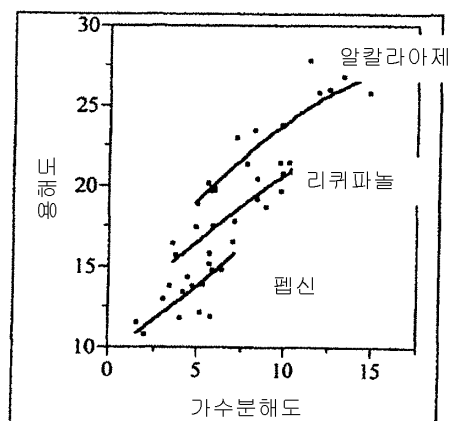
도면4



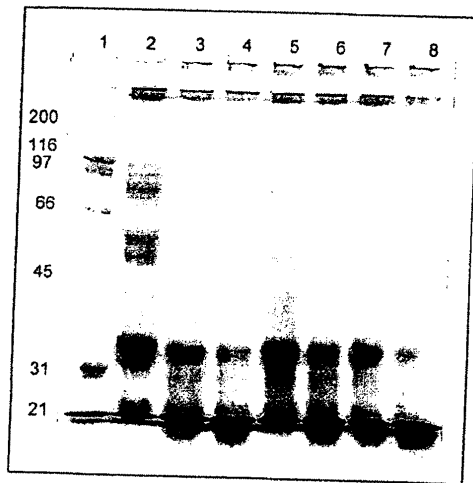
도면5



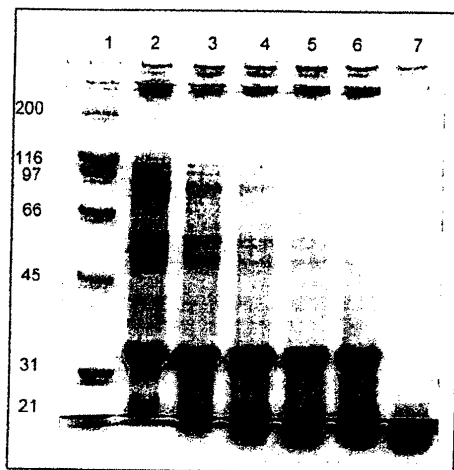
도면6



도면7



도면8



도면9

