

전분의 제조와 가공이용에 관한 연구

제 2 보 세균성 아밀라아제에 의한 전분의 가수분해

李 瑞 來

서울대학교 농과대학
(1970. 7. 6. 수리)

Studies on the Preparation and Utilization of Starch

II. Hydrolysis of Starch by Bacterial Amylases

Su Rae Lee

College of Agriculture, Seoul National University, Suwon

(Received July 6, 1970)

SUMMARY

- 1) Conditions for the hydrolysis of starch by bacterial liquefying amylase (BLA), saccharifying amylase (BSA) and isoamylase were investigated. Out of four syrups prepared by different combinations of these enzymes, those made by BLA followed by BSA and/or isoamylase were comparable to sucrose syrup in canning of orange segments.
- 2) Two branched maltooligosaccharides were isolated from the hydrolyzate of starch by BLA and BSA, and their structures were tentatively identified as pentaose and hexaose having an α -1, 6-linkage at the branching point.

I. 머릿말

고초균이 분비하는 세균액화형 아밀라아제(bacterial liquefying amylase, BLA로 약함)는 전분액화력이 강하고 내열성이 크다는 이유로서 공업적 수준에서 생산되고 이용된 최초의 효소제라 생각된다.

일찍이 후쿠모도⁽¹⁾는 고초균종의 어떤 균주(*Bacillus subtilis var. amylosacchariticus* Fukumoto)는 BLA와는 달리 전분액화력은 그리 높지 않으나 당화한도가 훨씬높은 세균당화형 아밀라아제(bacterial saccharifying amylase, BSA로 약함)를 분비한다고 지적하였다. 그러나 이 효소는 내열성이 낮기 때문에 종래 주목을 그리 끌지 못하였으나 최근 이 효소제를 사용하여 만든 물엿은 다른 방법에 의하여 만든 물엿보다 특이한 풍미를 가지는 것으로

일본에서는 차차 산업계의 관심을 끌게 되었다.

BSA의 효소학적 성질에 관하여는 이미 상세한 연구가 이루어져 있으므로⁽²⁻⁵⁾ 앞으로 남아있는 과제는 이 효소제를 사용한 전분분해액에서 볼 수 있는 풍미의 원인을 규명하는 일과 식품공업에서의 새로운 용도를 개척하는 일이라 할 수 있다.

저자는 BLA 및 BSA에 의한 전분분해액 중에서 두가지의 새로운 소당류를 분리, 정제하여 그의 화학구조를 추정하였고 또한 몇가지 아밀라아제를 사용하여 만든 물엿의 밀감류 통조림용 시럽으로서의 사용가능성을 검토하였으므로 이에 그 결과를 발표한다.

II. 실험재료 및 방법

(1) 효소제

BLA, BSA, isoamylase, glucoamylase는 어느것

이나 정제효소를 사용하였다. BLA, BSA, glucoamylase의 활성도는 당화력으로 측정하였는 바 0.5% 가용성전분 수용액(pH 5.6) 10 ml에서 40°C, 30분간에 10 mg의 glucose 당량을 생성하는 효소역가를 1단위로 표시하였다.⁽⁶⁾

Isoamylase의 활성도는 Kobayashi의 방법⁽⁷⁾에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 0.1 M 초산완충액(pH 6.0)에 용해한 가용성 감쌀전분의 1% 수용액 5 ml에 적당히 희석한 효소액 1 ml를 가하고 40°C에서 60분간 반응시킨다. 이 용액 1 ml에 대하여 0.1 N HCl 1 ml, 0.01 N I₂-KI 용액 1 ml, 증류수 22 ml를 가하고 15분 후에 Hitachi 광전광도계에 의하여 610 mμ에서의 흡광도를 측정하였으며 흡광도 1.0의 증가를 나타내는 효소량을 isoamylase 1 단위로 하였다.

(2) Paper chromatography

당류의 정성을 목적으로는 Toyo 여지 50에 시료를 도말하고 전개용매 1-butanol : pyridine : water (6 : 4 : 3 용량비)에 의하여 3차 전개하고 질산은 침지법⁽⁸⁾에 의하여 발색시켰으며 전분의 부분적 가수분해에 의하여 얻은 maltooligosaccharide를 표준물질로 사용하였다. Preparative paper chromatography는 이에 준하였는데 여지의 한쪽에 시료를 한줄로 도말하고 4차 전개후 여지의 양면에서 얻은 guide strip만을 발색하여 필요한 부분을 확인, 절취한 후 증류수로 화합물을 용출하였다.

(3) 분석방법

환원당의 정량은 시료의 당농도에 따라 Fehling Lehman Schoorl 법⁽⁹⁾ (정량범위 0.3~10 mg) 또는 Somogyi-Nelson 법⁽¹⁰⁾ (정량범위 10~600 μg)에 의하여 하였다. 전 탄수화물의 양은 phenol 황산법⁽¹¹⁾에 준하여 정량하였다.

III. 실험 결과

(1) Amylase 들에 의한 전분의 가수분해

BLA와 BSA에 의한 전분의 분해한도를 보기 위하여 0.5% 가용성전분 수용액(pH 5.6)에 대한 분해곡선을 보면 Figure 1과 같다. BLA는 가용성전분을 25%까지 분해하나 BSA는 61%까지 분해할 수 있음을 재확인하였다.

가용성전분이 BLA에 의한 가수분해 한도가 다름에 따라 BSA의 작용에 어떠한 영향을 미치는가를 보기 위하여 2% 가용성전분액 20 ml에 2~8 단위의 BLA를 가하여 40°C에서 15분 내지 24시간 작용시킨 다음 5분간 끊어 효소를 불활성화시키고 BSA를 8단위씩 가하여 다시 24시간 반응시

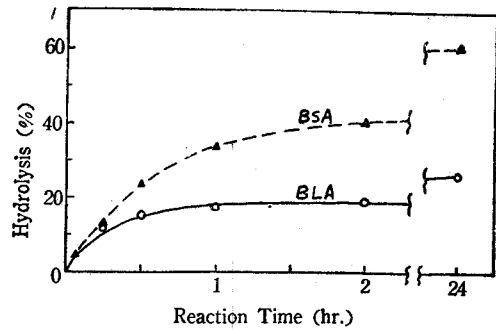


Figure 1. Hydrolysis of soluble starch by BLA or BSA

키면서 적당한 시간간격으로 환원력을 정량하여 Figure 2와 같은 결과를 얻었다.

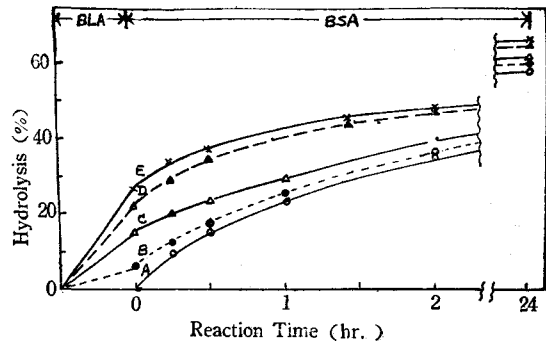


Figure 2. Hydrolysis of soluble starch by BLA followed by BSA. Conditions of hydrolysis : 20 ml of 2% soluble starch solution was hydrolyzed by varying amounts of BLA (A, none; B, 2 units, 15 min.; C, 8 units, 15 min.; D, 8 units, 3 hr.; E, 8 units, 24 hr.), followed by 8 units of BSA for 24 hr. at 40°C.

BLA에 의한 가수분해율이 증가함에 따라 BSA에 의한 분해속도가 증가하기는 하였으나 최종 가수분해율에는 큰 차이가 없었으며 최종 분해산물로서는 glucose, maltose, maltotriose, isomaltosyl-maltose 및 5당류 이상의 소당류를 생성한다는 점에서 큰 차이를 볼 수 없었다.

BSA에 의한 전분의 가수분해에 isoamylase가 어떠한 영향을 미치는가를 알기 위하여 2% 가용성전분용액 100 ml를 BLA 20단위로 40°C에서 30분간 분해시킨 다음 isoamylase를 0.7~6단위 가하여 한시간씩 작용시켰다. 이 작용액에 BSA 8단위를 가하여 24시간 작용시키면서 여러 시간간격으로 환원력을 정량하여 Figure 3과 같은 결과를 얻었다.

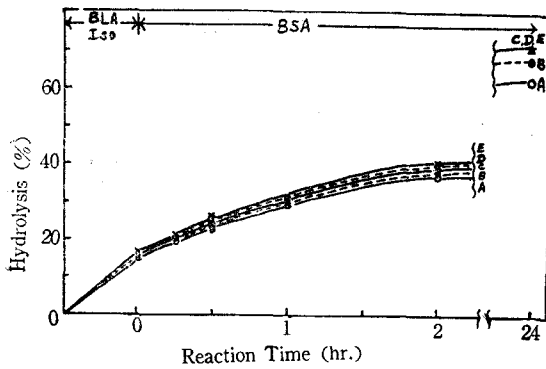


Figure 3. Hydrolysis of soluble starch by BLA and isoamylase followed by BSA
 Conditions of hydrolysis: 100 ml of 2% soluble starch solution was hydrolyzed by 20 units of BLA for 30 min. followed by varying amounts of isoamylase (A, none; B, 0.7 units; C, 1.5 units; D, 3 units; E, 6 units) for one hr. at 40°C. These hydrolyzates were further acted upon by 8 units of BSA for 24 hr.

Isoamylase의 작용에 의하여 전분의 가수분해율에는 약간의 증가를 보였을 뿐이었다. 그러나 BLA와 BSA만을 사용하였을 때 측정되는 5당류 이상의 소당류는 isoamylase의 사용에 의하여 소실되는 것을 볼 수 있었고 isoamylase의 활성도를 높임에 따라 isomaltosylmaltose의 양도 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 isoamylase에 의하여 amylopectin 분자 중의 α -1,6 결합이 개열되고 이에 따라 BLA나 BSA의 작용을 받지 못하던 isomaltosylmaltose를 비롯하여 분지된 maltooligosaccharide의 축적이 일어나지 않으며 전분분자는 glucose, maltose, maltotriose까지 분해되는 것을 설명하여 주고 있는 것이다.

(2) BLA, BSA 및 isoamylase를 사용한 물엿의 제조

위에서 얻은 실험결과를 참고로 여러가지 타잎의 물엿을 얻기 위하여 2% 가용성전분용액 1 l를 BLA, BSA 및 isoamylase에 의하여 40°C에서 Table 1과 같은 조건하에 가수분해하였다.

Table 1. Hydrolytic conditions of soluble starch by BLA, BSA and isoamylase

Syrup designation	First hydrolysis			Second hydrolysis			% Final hydrolysis
	Enzyme	Units*	Time	Enzyme	Units*	Time	
A	BLA	180	30 min	BSA	400	20 hr	61.8
B	BLA	180	30 min	BSA Isoamylase	400 150	20 hr	63.3
C	BLA	400	20 hr	—	—		
D	BLA Isoamylase	400 300	20 hr	—	—	36.3	

* Enzyme units added per liter of 2% soluble starch solution at 40°C.

이와같이 얻은 전분분해액은 10분간 끓인 후 여과하고 약 20%의 당농도가 되게끔 100 ml로 감압농축하였다. 각 시료의 점도를 비교하기 위하여 당농도를 10%로 희석한 다음 Ostwald 점도계로 40°C에서 증류수를 대조로 측정한 상대적 점도는 Table 2와 같다. 다른 종류의 효소제를 사용함으로써 최종 가수분해도는 상이하였으나 점도에는 큰 차이를 인정하기 곤란하였다. 네가지 물엿의 당조성을 보기 위하여 paper chromatography에 의하여 확인한 결과는 Figure 4와 같다.

밀감류의 통조림용 시료로서 위에서 만든 네가지 물엿이 설탕으로 만든 시료와 어떻게 다른가를 알기 위하여 250 ml 삼각후라스크에 약 20%당농도의 시료 50 ml씩을 넣고 이에 산 및 알칼리

처리에 의하여 껍질을 벗긴 온슈우밀감(溫州蜜柑)의 과육편(peeled orange segments) 50 g를 담그어 밀봉한 다음 냉장고에 1개월간 저장하였다. 저장기간이 끝난 후 밀감과육편을 꺼내어 표면에 묻은 시료를 티슈페이퍼로 제거하고 그들의 중량을 평량하여 Table 2와 같은 결과를 얻었다.

밀감류의 통조림에 있어서 BLA만을 사용하여 만든 물엿을 설탕시료 대용으로 사용하면 밀감과육편의 고형물 중량이 크게 감소되어 상품가치가 저하되는 것을 볼 수 있다. 그러나 BLA와 아울러 BSA 및/또는 isoamylase를 같이 사용하여 만든 물엿에서는 고형물의 중량감소를 가져오지 않았다. 이러한 결과는 BLA만을 사용하여 만든 물엿은 고분자량의 분지된 소당류를 많이 함유하고 있

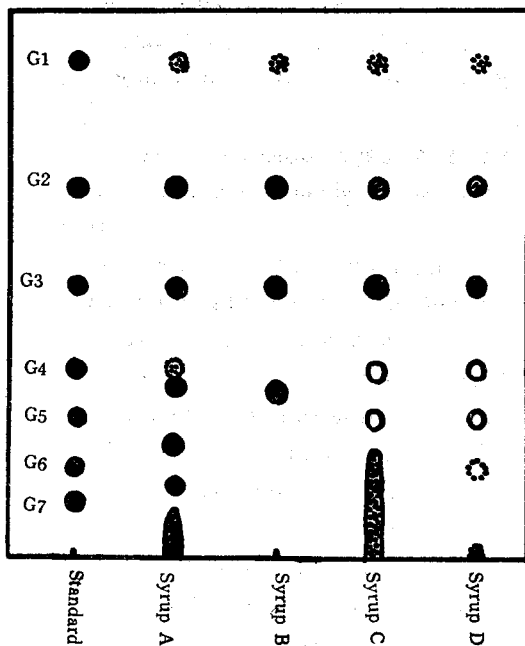


Figure 4. Paper chromatogram of four syrups prepared by different combinations of amylases

므로 밀감류의 세포막을 투과하기 곤란한 때문인 것으로 생각된다.

(3) BLA 및 BSA 에 의한 전분분해액에서 두가지 새로운 소당류의 분리 및 등정
2% 가용성전분용액 1l를 BLA 180 단위에 의하여 30분간, BSA 400 단위에 의하여 20시간 40°C

Table 3. Characterization of two oligosaccharides isolated from hydrolyzate of soluble starch by BLA and BSA

Oligosaccharide	R _{glu} *1	R.P. *2	Hydrolysis products by *4		
		T.S. *3	Isoamylase	Glucosylase	BSA
Isomaltosyl maltose ⁽⁵⁾	0.41	1.0/3.8	None	Glucose Maltose Maltotriose	None
A	0.23	1.0/4.2	Maltose Maltotriose	Glucose Maltose IMM	Glucose IMM
B	0.15	1.0/5.2	Maltose Maltotetraose	Glucose Maltose IMM	Glucose IMM A

*1. Solvent system, 1-butanol : pyridine : water (6 : 4 : 3)

*2. Reducing power by Somogyi-Nelson method⁽⁶⁾ expressed as glucose equivalent.

*3. Total sugar by phenol-sulfuric acid method⁽¹⁰⁾.

*4. One-ml aliquot of the oligosaccharide (about 10 mg) was incubated with 1 ml of enzyme solution (3 and 15 units of isoamylase, 1 and 5 units of glucosylase for 30 minutes or 30 units of BSA for 5 hours) at 40°C. IMM stands for isomaltosylmaltose.

Table 2. Some properties of starch syrups made by different combination of amylases in canning of orange segments

Syrup designation	Enzymes used	Relative viscosity	Weight of orange segments (g)
A	BLA, BSA	1.35	43.5
B	BLA, BSA, isoamylase	1.30	42.3
C	BLA only	1.36	36.6
D	BLA, isoamylase	1.34	40.8
*Control	Sucrose only	—	41.8

* Fifty grams of orange segments were dipped in 50 ml each of the individual syrups and their weight was taken after one-month storage in the cold.

에서 작용시켜 66%의 가수분해를 일으켰다. 이 가수분해액중에서 포도당과 맥아당을 제거하기 위하여 baker's yeast 50 g를 서너번 수세한 후 200 ml 증류수에 현탁한 것을 이에 가하고 KH₂PO₄ 용액으로 pH 4.8로 조절하였다. 이 혼합액은 28°C에서 24시간 발효시킨 후 원심분리하여 상등액을 이온교환수지로 제염하고 20 ml 정도로 농축하였다. 이 과정에 의하여 최초에 존재하던 환원력의 93%가 제거되었다.

이 농축액은 preparative paper chromatography에 의하여 분별하여 maltopentaose 및 maltohexaose보다 R_f 값이 각각 낮은 두가지 화합물을 분리하고 R_{glu} 값 0.23 과 0.15의 것을 각각 소당류 A 및

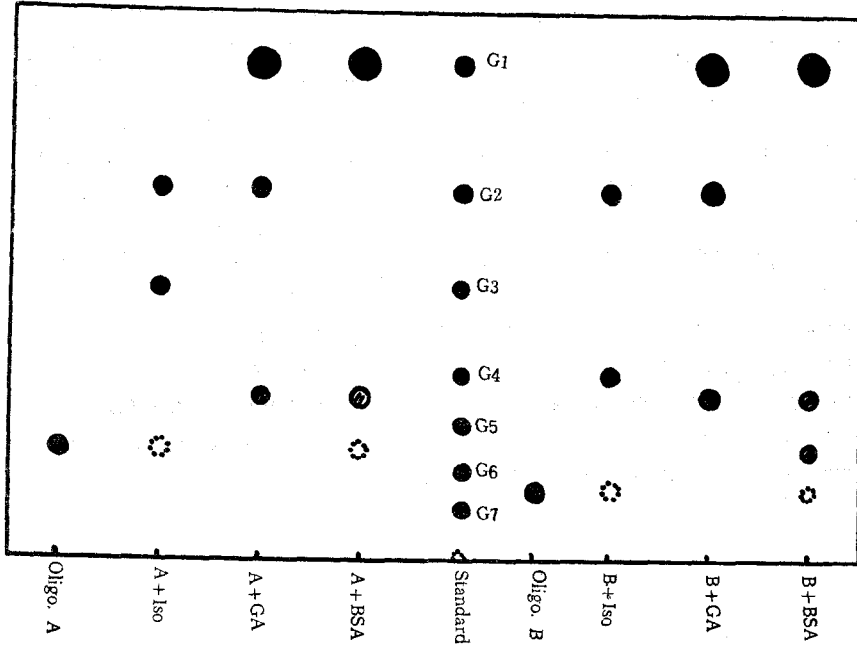
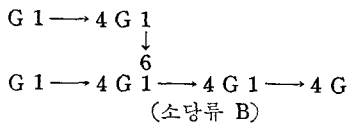
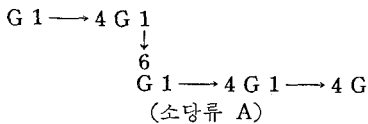


Figure 5. Paper chromatogram of hydrolyzates of oligosaccharides A and B by isoamylase (Iso), Glucoamylase (GA) and BSA

소당류 B라 하였다.

이들 소당류의 화학구조를 규명하기 위하여 중합도를 예상하고 이들 소당류에 isoamylase, glucoamylase 및 고단위의 BSA를 작용시켜 얻어지는 분해산물을 paper chromatography에 의하여 동정한 결과는 Table 3 및 Figure 5와 같다.

이상의 결과에 의하여 새로 분리된 소당류는 각각 다음의 구조식을 가지는 것으로 추리된다(G: Glucose).



후쿠모도 등⁽⁶⁾은 BLA에 의한 전분분해액중에 isomaltosylmaltose가 축적되는 것을 확인하였는바 이 구조단위는 상기한 두가지 소당류에도 존재한다. 여기에서 분리한 두가지 소당류가 상당히 고단위의 BSA를 작용시켰을 때에만 분해되어 isomaltosylmaltose를 생성한다는 것은 오카다 등⁽¹²⁾이 발표한 바 BSA가 분지된 maltodextrin에 작용할

때 α -1,6결합에 의한 분지점에서 환원말단기 쪽을 향하여 적어도 3개의 glucose 단위가 필요하다는 결론을 생각할 때 상기한 바와 같은 소당류가 일단 생성되면 BSA의 작용에 대하여 상당한 저항성을 가지게 되므로 BLA와 BSA에 의한 전분분해액 중에는 isomaltosylmaltose와 아울러 이번에 확인한 소당류 A, B가 축적되는 것을 이해할 수 있다.

IV. 요 약

1) 세균액화효소 (BLA), 세균당화효소 (BSA), isoamylase에 의한 전분의 가수분해 조건을 조사한 다음 이들 효소를 여러가지로 배합하여 물엿을 만들었다. 네가지 물엿 중에서 BLA와 BSA 또는 isoamylase를 같이 사용하여 만든 것은 밀감류 통조림용 시럽으로서 설탕시럽과 비슷한 결과를 나타 내었다.

2) BLA 및 BSA에 의한 전분분해액 중에서 두 가지 소당류를 분리하고 그들의 구조를 결정한 바 α -1,6결합을 하나씩 가지는 5당류 및 6당류임을 확인하였다.

본 연구는 국제식량농업기구 앙드레·마이ер 장학금에 의하여 일본국 오오사카시립대학 이학부에 체류중 이루어진 것이다. 본 실험의 수행에 있어

서 많은 지도와 편의를 베풀어주신 福本壽一郎 교수, 岡田茂孝 박사 및 그외의 여러 연구원에게 깊은 사의를 표하는 바이다.

인 용 문 헌

- 1) 福本壽一郎 : 大阪工研報告, 9, 1 (1943).
- 2) Fukumoto, J., Yamamoto, T., and Ichikawa, K.: Proc. Japan Acad., 27, 352 (1951).
- 3) 福本壽一郎, 岡田茂孝 : 醸工誌, 41, 427 (1963).
- 4) 福本壽一郎, 山本武彦, 萬谷司郎 : 酵素化學심포지움, 18, 223 (1966).
- 5) 萬谷司郎, 山本武彦, 福本壽一郎 : 아밀라아제 심포지움, 95 (1967).
- 6) 辻阪好夫 : 大阪工研報告, 23, 1 (1960).
- 7) Kobayashi, T.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 19, 163 (1955); 酵素研究法(朝倉書店)第2卷, P. 127 (1956).
- 8) Welker, N. E., and Campbell, L. L.: J. Bacteriol., 86, 681 (1963).
- 9) 東京大學 農藝化學教室 : 實驗農藝化學 (朝倉書店) 下卷 P. 587 (1959).
- 10) Somogyi, N.: J. Biol. Chem., 195, 19 (1952); Nelson, N.: J. Biol. Chem., 153, 375 (1944).
- 11) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F.: Anal. Chem.: 28, 350 (1956).
- 12) 岡田茂孝, 北畑壽美雄, 東原昌孝, 福本壽一郎 : 日農化, 44, 521 (1969).