

쌀澱粉 分解物 分析에 의한 細菌性 α -Amylase의 作用 特性

金海榮·朴官和

서울大學校 農科大學 食品工學科

(1986년 5월 2일 수리)

Characterization of Bacterial α -Amylase by Determination of Rice Starch Hydrolysis Product

Hae-Yeong Kim and Kwan-Hwa Park

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture
Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

The product specificity of *Bacillus* α -amylase on raw rice starch has been studied by using HPLC and scanning electron microscopy (SEM). Analysis of starch degradation products digested by α -amylase showed considerable differences between raw and gelatinized rice. The hydrolysis of raw rice starch resulted in formation of more glucose and maltose than those of gelatinized starch.

SEM revealed characteristic enzyme degradation patterns. Hollow curvatures were observed in gelatinized starch, indicating the substrate is hydrolyzed in the interior of the starch chain by *Bacillus* α -amylase. In contrast, raw starch were hydrolyzed from the end of the substrate, resulting in pinholes over the surface of the starch granules.

緒 論

전분의 구조는 α -D-glucose가 glucoside 결합으로 연결된 重合體로 α -1,4 glucoside 결합만으로 이루어진 線形的 amylose와 α -1,4 및 α -1,6 glucoside 결합으로 이루어진 가지구조의 amylopectin이 粒子를 형성하고 있으며, 조밀하게 배열된 結晶部分(crystalline region)과 비결정부분(amorphous region)으로 되어 있다.

전분공업에서는 조밀한 전분의 구조를 풀어 물과의 접촉을 용이하게 만들어 糊化를 시킨 후 酵

素作用이 용이하도록 한다. 이같이 호화된 전분에 液化酵素인 α -amylase가 임의로 작용하여 환원당을 生産하는데 효소의 근원에 따라 作用形態 및 生成물이 다른 것으로 알려져 있다.^{1,2,3,4)} 한편 전분은 生澱粉 상태에서도 효소작용을 받게 되는데 곡류 및 두류등에서 種子發芽時 胚芽 자체내에 포함되어 있는 α -amylase에 의해 저장전분이 분해되어 glucose, maltose 등의 저당류가 생성되는 것을 볼 수 있다.

Robytt등⁵⁾은 호화된 전분에 대한 α -amylase作用기작으로 maltosaccharide ($C_3 \sim C_8$)를 기질로 사용하여 glucose, maltose의 저당류가 생성됨을

관찰하였다.

Leach 등⁶⁾은 전분입자에 amylase를 작용시켰을 때 waxy maize, tapioca, waxy sorghum, corn, rice, sago, potato 순으로 반응속도가 감소된다고 보고하였는데 이는 전분의 構造의 差異에서 기인한다고 하였다.

전분입자의 구조는 전분의 종류에 따라 다른 것으로 알려져 있다. 쌀전분은 다른 전분보다 작은 3~10 μ m 크기의 多面體 構造를 갖고 있으며, 대략 16~25%의 amylose를 함유하고 있다.

차 등⁷⁾에 의해 쌀생전분을 발효시켰을 때 호화 전분에서와 동일한 수율의 에탄올이 생성됨을 관찰하였다. 그러나 쌀의 생전분에 α -amylase를 작용시켰을 때 효소작용을 받는 작용부위와 생성물에 대하여는 아직 알려져 있지 않고 있다.

본 연구에서는 쌀을 시료로 하여 生澱粉 상태와 糊化澱粉 상태에 전분분해 효소를 작용시켜 생성되는 당을 분석하여 효소의 작용특성을 구명하고자 하였다.

材料 및 方法

1. 재료 및 시약

쌀전분은 농촌진흥청 농산물이용과에서 분양받은 밀양 23호를 사용하였다. 불순물을 제거하기 위하여 수세, 열풍건조시킨 후 60mesh 이하로 분쇄하여 使用하였다.

α -amylase(Termamyl 120-L)와 glucoamylase(Amyloglucosidase 200-L)는 NOVO 회사(Denmark) 제품을 사용하였고, PGO enzyme(peroxidase and glucose oxidase)은 Sigma 회사(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

2. 효소에 의한 전분의 가수분해

耐熱性 α -amylase인 Termamyl을 85°C에서 10분간 열처리하여, α -amylase 이외의 효소를 불활성화시킨 후 사용하였다.

쌀전분에 효소반응을 시킨 후 침전물과 상등액의 분리과정을 도시하면 Fig. 1과 같다. 쌀전분 40g에 증류수 160ml를 가한 뒤, 생전분은 그대로 호화전분은 100°C에서 5분간 가열한 후 glucoamylase는 pH 4.5, α -amylase는 pH 6.0으로 조절한 후, 55°C에서 반응시켰다. Glucoamylase와 α -amylase를 同時에 작용시킬 때에는 용액의 pH를 6.0에서 반응시켰다.

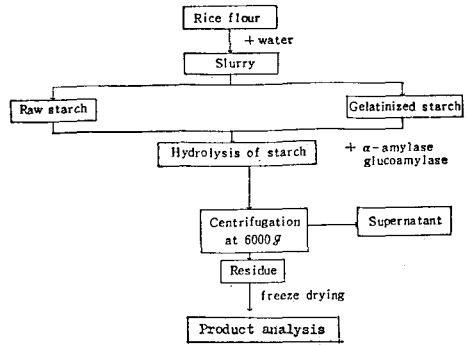


Fig. 1. Flow sheet for the hydrolysis of rice starch.

3. 당용액 분석

생전분과 호화전분에서 전분분해효소를 반응시킨 당용액을 時間別로 뽑아 6,000g에서 5분간 원심분리하여, 그 상등액을 취하여 HPLC로 당류분석⁸⁾을 하였다. 이때 HPLC는 다음과 같은 조건으로 하였다.

Model : Varian 8500

Column : 당분석용(MCI CK 085)

Solvent : water

Flow rate : 30ml/hr

Detector : RI

4. 당분해량 측정

생전분, 호화전분 각 상태에서 전분분해효소 처리후 반응시간별 1ml를 취하여 5,000g에서 원심 분리한 후 상등액 0.5ml를 회석하여 환원당은 DNS 方法⁹⁾으로 550nm에서 測定하였고, glucose는 PGO enzyme과 o-dianisidine을 사용하여 450nm에서 測定하였다.

5. 분해 잔류물의 미세구조

생전분과 호화전분에 0.25%의 α -amylase를 2.5시간 작용시킨 후, 원심분리하여 상등액을 제거한 후 침전물을 acetone농도별(70, 90, 100%—각 15분간)로 2회 반복하여 탈수¹⁰⁾시킨 후, 실온에서 건조시킨 다음 전자현미경(SEM)으로 관찰하였다.

結果 및 考察

1. 효소농도별 환원당의 생성

쌀생전분에 α -amylase 농도별로 처리했을 때

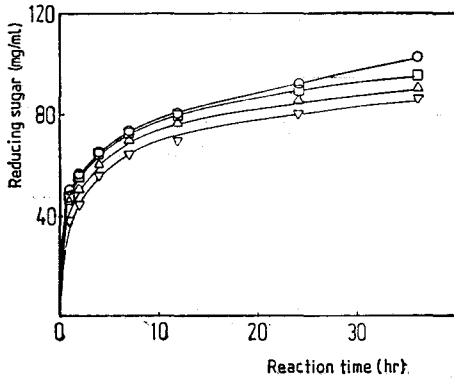


Fig. 2. α -Amylase digestion of raw rice flour as a function of time at various enzyme concentration.

○—○ 0.25% △—△ 0.0625%
 □—□ 0.125% ▽—▽ 0.025%

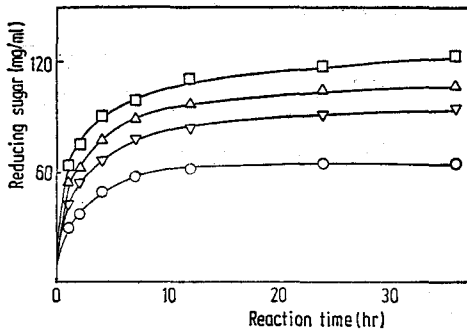


Fig. 3. Glucoamylase digestion of raw rice flour as a function of time at various enzyme concentration.

□—□ 0.5% △—△ 0.25%
 ▽—▽ 0.125% ○—○ 0.05%

生成된 환원당의 양은 Fig. 2와 같다. 농도에 따라 분해속도가 차이는 있었으나, 농도와 분해속도가 비례하는 부분은 극히 짧은 시간이었다.

Glucoamylase 농도별로 생성된 환원당의 양 (Fig. 3)은 α -amylase와는 달리 일정반응시간 후에는 반응시간과 관계없이 일정량을 유지해 최종 분해량은 효소농도에 좌우되었다. 이것은 생성물인 glucose의 저해작용으로 추측된다.

2. 당 분해량 측정 및 분석

생전분과 호화전분 상태에서 α -amylase와 glucoamylase에 의해 생성되는 환원당 및 glucose 양을 반응시간별로 측정하여 Fig. 4, 5에 각각 표시하였다.

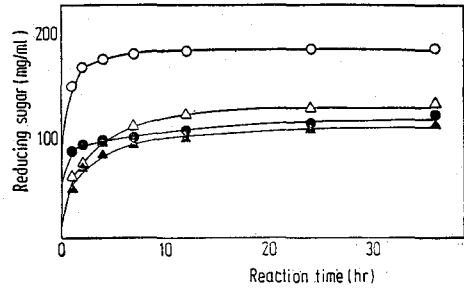


Fig. 4. Reducing sugar production from rice starch by starch degrading enzymes.

○—○ gelatinized starch+glucoamylase
 △—△ raw starch+glucoamylase
 ▲—▲ raw starch+ α -amylase
 ●—● gelatinized starch+ α -amylase

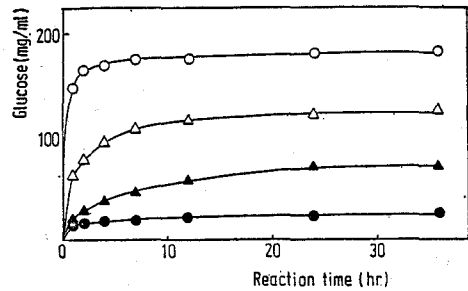


Fig. 5. Glucose production from rice starch by starch degrading enzyme.

○—○ gelatinized starch+glucoamylase
 △—△ raw starch+glucoamylase
 ▲—▲ raw starch+ α -amylase
 ●—● gelatinized starch+ α -amylase

환원당의 생성량은 호화전분에 glucoamylase를 작용시켰을 때 가장 높았고, 다음으로 생전분에 glucoamylase를 작용시켰을 때 이었다. 한편 glucose 생성량으로 보았을 때에는 호화전분에 glucoamylase를 작용시켰을 때 가장 높았고, 다음으로 생전분에 glucoamylase, 생전분에 α -amylase, 호화전분에 α -amylase를 반응시킨 순서로 생성되었다.

또한 생성된 당 종류를 알아보기 위하여, 효소 작용을 시킨 후 시간별로 시료를 채취하여 HPLC로 당분석을 하고, 36시간 분해시킨 시료를 Fig. 6에 표시하였다. 분해 생성된 당 종류의 시간별 농도변화는 Fig. 7, 8에 나타내었다.

호화전분에 α -amylase를 작용시켰을 경우에는 glucose의 생성이 16%정도인 반면 maltose 및 maltotriose가 각각 3%에 이르고, maltotetrose

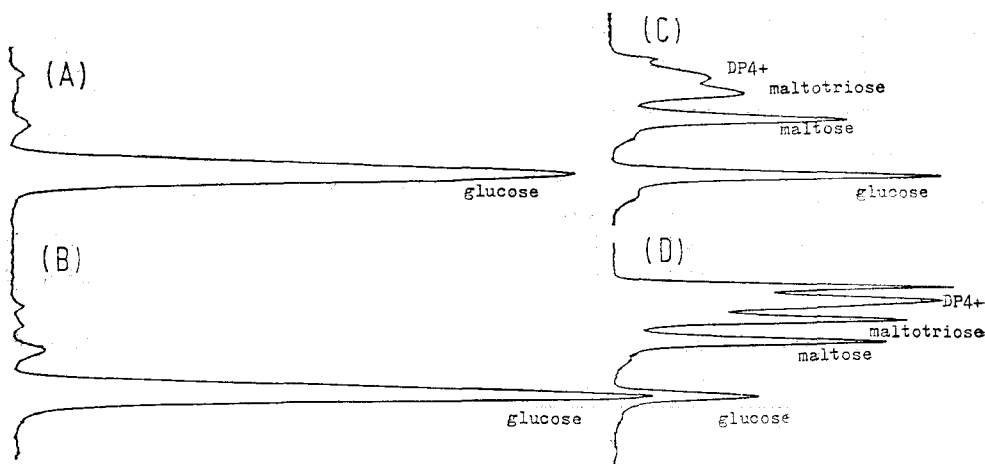


Fig. 6. HPLC chromatogram of rice starch hydrolysate by the reaction of starch degrading enzymes.
 (A) raw starch+glucoamylase (B) gelatinized starch+glucoamylase
 (C) raw starch+ α -amylase (D) gelatinized starch+ α -amylase

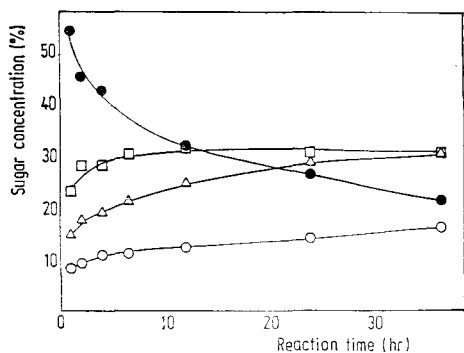


Fig. 7. Changes of sugar concentration during the hydrolysis of gelatinized rice by α -amylase.

○-○ glucose △-△ maltose
 □-□ maltotriose ●-● maltotetrose

이상의 당류도 상당히 높은 농도로 존재하였다. 그 반면 생전분에서는 glucose가 45%, maltose가 30%가 생성되어 상대적으로 많았고, maltotetrose 이상의 당 생성은 3%로 적었다. 이 결과는 PGO enzyme을 사용하여 glucose를 정량한 결과와 잘 일치하고 있다.

생전분에서는 glucose와 maltose는 반응시간이 경과함에 따라 농도가 증가하고, maltotriose와 maltotetrose이상의 당류는 시간이 지남에 따라 감소되는 경향을 보여준다. 이것은 glucose와 maltose가 主生成物로 생성됨을 보여주고 있다. 호화전분에 α -amylase를 처리했을 때에는 mal-

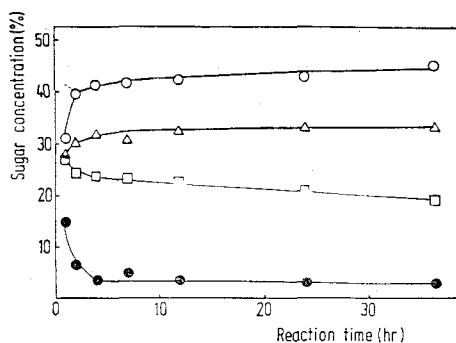


Fig. 8. Changes of sugar concentration during the hydrolysis of raw rice starch by α -amylase.

○-○ glucose △-△ maltose
 □-□ maltotriose ●-● maltotetrose

triase, maltose 등이 主生成物로 시간이 지날수록 농도가 증가하고 있다. 이것은 Klentz등¹⁾이 starch에 termamyl을 작용시켜 주 생성물로 maltotriose, maltose를 얻은 결과와 일치됨을 보여 주고 있다.

따라서 glucoamylase는 호화전분 및 생전분에서 환원당과 glucose양을 측정했을 때 모두 비교적 높은 분해속도를 보이는 것으로 보아 전분의 말단기로부터 주로 glucose만을 잘라내는 것으로 보인다. 그러나 α -amylase를 작용시켰을 경우, 생전분과 호화전분에서 거의 비슷한 수준으로 환원당이 생성되었으나 glucose는 생전분에서 많이

Table 1. Digestion of rice starch by the reaction of glucoamylase (G) and α -amylase (A) at 30°C for 60hr

	Enzyme concentration (%)	Glucose (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)
Raw starch	G 0.250	83.2	83.1
	G 0.500	90.0	92.3
	G 1.000	99.1	97.4
	A 0.125	47.0	64.4
	A 0.250	49.8	67.6
	A 0.500	51.5	71.0
	A 0.25 + G 0.50	154.0	158.4
Gelatinized starch	G 0.500	152.0	153.0
	A 0.250	13.4	68.5
	A 0.25 + G 0.50	159.9	163.5

생성된 반면, 호화전분에서는 glucose가 거의 생성되지 않았다. 즉 호화전분에서 α -amylase가 사슬의 임의의 부위에 작용하여 환원당을 생성하나 생전분에서는 α -amylase가 전분 사슬의 말단기로부터 glucose 또는 maltose 단위로 가수분해 시키는 것으로 추측된다.

한편 효소에 의한 생전분의 최대 가수분해 정도를 알아보고, 에탄올 동시발효의 가능성을 검토하기 위하여 효모의 작용 최적온도인 30°C에서 생전분과 호화전분에 α -amylase, glucoamylase 및 두 효소를 혼합하여 각각 60시간동안 분해시켰다(Table 1). 55°C에서 반응시켰을 때에 비하여 효소의 분해속도는 전반적으로 감소되었으나 생성물의 농도비와 최대 분해량은 유사하였다.

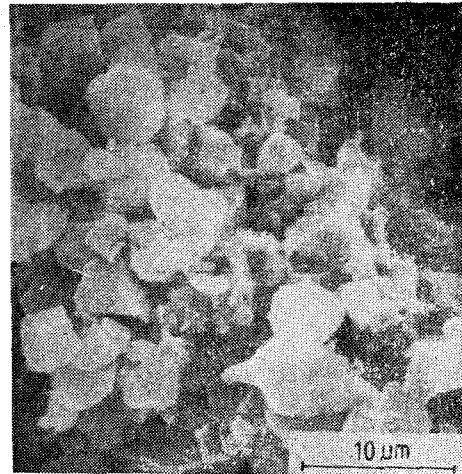
α -Amylase를 0.25% 농도로 호화전분에 작용시켰을 때 생성된 환원당 양은 68.5mg/ml이고 glucose양이 23.4mg/ml인데 반하여 생전분에 동일한 농도의 α -amylase를 처리하면 환원당은 67.6 mg/ml, glucose는 49.8mg/ml이 생성되었다. 이는 55°C에서 반응시켰을 때의 생성물 비와 유사한 결과를 보이고 있다. 또한 α -amylase와 glucoamylase를 동시에 처리한 생전분에서는 각각 처리했을 때 보다 많은 양이 분해되었다. 즉 생전분에 glucoamylase를 1.0%를 처리했을 때 glucose가 99.1mg/ml 생성된 반면, 0.5% glucoamylase 및 0.25% α -amylase를 동시에 작용시켰을 때 생성된 glucose양은 154.0mg/ml로 glu-

coamylase 단독으로 처리했을 때보다 훨씬 많은 생성물을 얻을 수 있었다. 이것은 두 효소의 상승 작용으로 α -amylase에 의해 생성된 생성물이 glucoamylase에 의해 다시 분해되는 것으로 추측된다

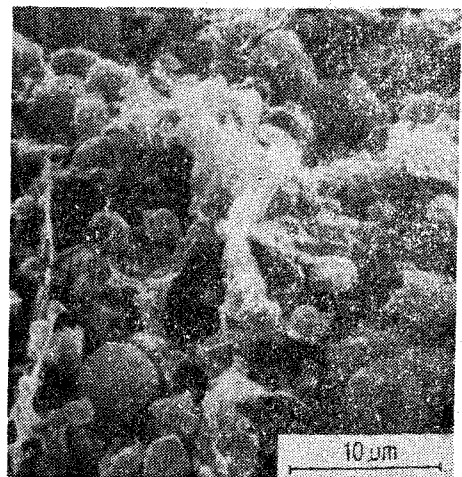
3. 분해 잔류물의 미세구조

생전분과 호화전분을 α -amylase로 2.5시간 동안 분해시킨 후 침전물을 얻어 전자 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 9, 10과 같다.

생전분 상태에서는 pinhole이 형성되고 동시에



(A)

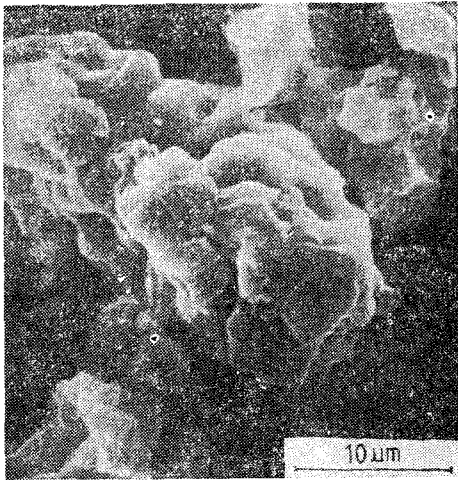


(B)

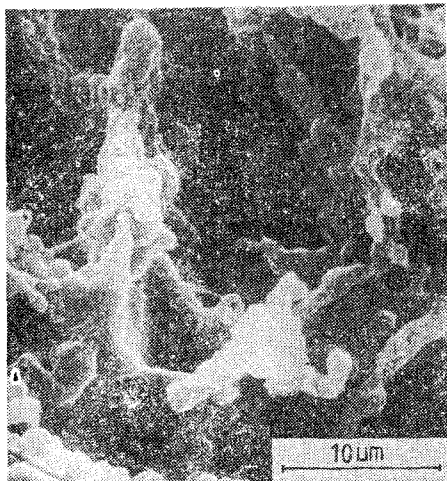
Fig. 9. Scanning electron photomicrographs of rice starch

(A) raw starch

(B) degraded by α -amylase



(A)



(B)

Fig. 10. Scanning electron photomicrographs of gelatinized rice starch.

- (A) gelatinized starch
- (B) degraded by α -amylase

표면이 침식된 것을 볼 수 있는데, 이는 전분의 말단기에서부터 공격을 받아 제한된 분해작용을 받은 것으로 생각된다. Pinhole의 모습은 곡류의 말아지 저장전분이 분해되었을 때의 모습과 유사하였다.¹⁴⁾

호화전분의 잔유물에서는 空洞을 관찰할 수 있는데 이는 생전분 상태와는 달리 풀어진 전분의 중간중간에서 분해되었을 뿐만 아니라 호화전분의 분해속도가 생전분에서 보다 약 2배 정도(Fig. 4 참조) 빠르기 때문에 대부분의 전분이 분해되어

용출되고 빈 공간이 형성된 것으로 보인다.

이상의 결과로 보아 세균성 α -amylase는 호화된 생전분에는 전분 내의 임의의 곳에서 α -1,4결합을 자르나, 생전분에서는 사슬의 말단부터 glucose 또는 maltose 단위로 가수분해되는 것으로 추측된다.

抄 錄

쌀의 生澱粉 상태와 糊化澱粉 상태에 대한 전분분해효소의 작용특성과 利用方法을 조사하기 위하여 생전분과 호화전분에 세균성 α -amylase 및 glucoamylase를 처리하고, 생성되는 당의 종류를 정량하였다.

생전분에 α -amylase를 작용시켰을 때에는 glucose(45%), maltose(33%), maltotriose(19%), maltotetrose 이상의 당류(3%) 등의 순서로 생성되었고, 호화전분에 作用했을 때에는 maltotriose(31%), maltose(31%), maltotetrose 이상의 고당류(22%), glucose(15%)의 순서로 生成되었다.

한편 glucoamylase를 처리하였을 때에는 생전분과 호화전분에서 다같이 주로 glucose가 생성되었다.

전자현미경으로 분해된 상태를 확인한 결과, 생전분은 α -amylase에 의하여 pinhole이 생성되고 전분입자의 표면침식이 관찰되었고, 호화전분은 입자의 중앙부위에 空洞이 生成되었다.

이상의 結果로 보아 세균성 α -amylase는 생전분 입자의 표면에 작용하여 말단기부터 glucose 및 maltose 단위로 분해하며 호화된 전분입자에는 임의의 장소에서 전분을 가수분해함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Klenz, G., Krüger, M., Pantschev, C. and Fabian, G.: Lebensmittelindustrie, 30 : 128 (1983).
2. Pantschev, C., Klenz, G. and Häfner, B.: Lebensmittelindustrie, 28 : 71(1981).
3. Saito, N.: Arch. Biophy., 155 : 290(1973).
4. Manning, G.B., Campbell, L.L.: J. Biol. Chem., 236(11) : 2952(1961).
5. Robyt, J.F., French, D.: J. Biol. Chem.,

- 246(15) : 2917(1970).
6. Leach, H.W., Schoch, I.J.: *Cereal Chem.*, 38 : 34(1961).
 7. 박관화, 오병하, 홍승서, 이계호 : 한국농화학회지, 27 : 198(1984).
 8. Conrad, E.C., Palmer, J.K.: *Food Tech.*, 30 : 84(1976).
 9. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, 31 : 426(1958).
 10. Hood, L.F., Seifried, A.S. and Meyer, R.: *J. Food Sci.*, 39 : 117(1974).
 11. Palmer, G.H. and Bathgate, G.N.: In 'Advances in cereal sci. and technol.' Y. Pomeranz (ed) vol. 1, p. 237, AACC, St. Paul (1976).
 12. Whistler, R.L., Beniller, J.N. and Paschall, E.F.: *Starch*, Academic Press, London, p. 507(1984).
 13. Bechtel, D.B. and Pomeranz, Y.: In 'Advances in cereal sci. and technol.' Y. Pomeranz(ed) vol. 3, p. 73, AACC, St. Paul (1980).
 14. Tharanathan, R.N., Paramahans, S.V. and Tareen, A.K.: *Stärke*, 35 : 235(1983).