KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 26, No. 4, pp. 398~402(1994)

잣에 존재하는 아밀라제의 특성

김정상 · 석호문*
인제대학교 식품영양학과, *한국식품개발연구원

Properties of Crude Amylase Isolated from Pine Nut

Jong-Sang Kim and Ho Moon Seog*
Department of Food Science and Nutrition, Inje University
**Korea Food Research Institute*

Abstract

The participation of thermostable amylase in the decrease of viscosity of pine nut's porridge was investigated using the crude enzyme obtained from ammonium sulfate fractionation of pine nut extracts. The fraction precipitated at 35~55% saturation of ammonium sulfate had the highest specific activity of the enzyme. α-Amylase activity was maximal at 75℃, pH 5.4. Amylograph data showed that addition of the enzyme to rice flour resulted in the significant decrease of its viscosity, suggesting the existence of thermostable α-amylase in pine nut.

Key words: α-amylase, pine nut, rice

서 론

잣(*Pinus koraiensis*)은 죽이나 약식과 같은 전통식품의 소재로 사용되어 왔다. 잣을 소재로 한 가공식품가운데 인스턴트 잣죽은 다른 유사 죽류와 달리 제조과정이나 저장중 점도감소 또는 층분리되는 현상이 보고되었다[1]. 이러한 현상은 잣에 고온에서도 활성을 나타내는 아밀라제가 존재한다면 쉽게 예측될 수 있는 현상들이다. 따라서 본 연구에서는 잣에 전분을 가수분해하는 효소가 존재하는지 확인하고자 몇 가지 실험을 수행하였다. 예비실험으로 잣을 사전 열처리하여 잣죽을 제조한 결과 점도가 현저히 증가되는 것이 관찰되었다. 따라서 잣에는 그동안 밝혀지지 않은 열에 의해 불활성화되는 아밀라제가 존재할 가능성이 높다고 보고 이를 확인하기 위하여 일차적으로 잣으로부터 단백질을 추출하고 ammonium sulfate 침전방법으로 얻어진 효소 단백질분획에 대하여 몇 가지 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 시료는 경기도 가평군에서 생산된 피잣(hulled pine nut)을 구입하여 겉껍질과 속껍질을 제거한 후 −60℃ 이하에서 보관하면서 사용하였다.

Corresponding author: Jong-Sang Kim, Department of Food Science and Nutrition, Inje University, Kimhae, Kyongnam 621-749, Korea

잣죽의 제조

57.6g의 쌀(추청)을 650 ml의 물에 넣어 실온에서 2시간 침지하고, 14.4g의 잣과 함께 가정용 믹서에서 3분간 분쇄하고 센불로 끓인 다음 약한불에서 5분간 더 가열하여 제조하였다.

조효소의 제조

잣 10g에 100 ml의 sodium acetate buffer(0.02 M, pH 5.4)를 가하여 Waring blender에서 마쇄한 다음, 4℃, 8000×g에서 10분간 원심분리하였다. 지방층을 spatula를 사용하여 제거한 다음, 상등액에 ammonium sulfate를 35% 포화되게 가하고 위와 같은 조건에서 원심분리하고 여기서 얻어진 상등액에 다시 ammonium sulfate를 가하여 55, 65, 75, 및 90% 포화농도로 처리하여 침전되는 단백질 분획을 얻었다.

효소역가의 측정

α-Amylase의 활성은 Bernfeld 등[2]의 방법으로 가용성 전분으로부터 효소에 의해서 유리된 전체 환원당의 함량으로 측정하였다. 즉, 2 ml 0.02 M 초산완충액(pH 5.4)에 5 ml의 0.5% soluble starch 용액, 1 ml 1% NaCl용액, 0.8 ml 증류수를 시험관에 넣고, 75℃에서 5분간 예열시킨 다음, 효소액 0.2 ml를 넣고 10분간 반응시킨 후 방수에 담가 반응을 정지시키고 여과지(Whatman No.1)를 사용하여 침전물을 제거하였다. 여액 1 ml를 취하여 3 ml의 DNS 시약과 혼합하고 끓는 물에서 5분간 반응시키고 상온으로 냉각한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 흡광도 값은 maltose 표준곡선으로부터

maltose 함량으로 환산하였다[3]. 이 때 아밀라제 1 Unit는 분당 1 μmole의 maltose를 유리시키는 효소의 양으로 정의한다.

잣죽의 점도

잣죽의 점도는 Haake Rotovisco viscometer(model RV 20)를 사용하여 측정하였다. 제조한 죽을 60℃로 냉각시킨후 40g을 측정용기(model MV1P)에 넣고, 60℃에서 전단속도를 0~1000(1/s)로 변화시키면서 전단응력을 측정하였다.

쌀가루의 Amylograph 점도

시료 쌀가루의 amylogram은 Medcalf 등[4]의 방법에 따라 Brabender amylograph(model 800200, Germany)를 사용하여 측정하였다. 즉, 50g(14% m.b.)의 쌀가루를 450 ml 증류수에 분산시켜 amylograph bowl에 넣고, 30~95℃까지 1.5℃/min의 속도로 온도를 증가시킨 후, 95℃에서 30분간 유지하면서 amylogram을 측정하였다. 한편 잣 또는 잣에서 분리한 효소가 쌀가루의 amylogram 특성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 쌀가루의 함량은 대조구와 동일하게 유지하고 증류수 대신 쌀가루의 20%에 해당하는 잣 또는 이에 상당하는 잣에서 분리한 효소액(α-amylase로서 28.6U)으로 이뤄진 현탁액을 가하여 amylography를 수행하였다.

반응 산물의 분석

25 mg의 호화전분을 함유하는 0.02 M 초산완충액(pH 5.4)에 잣추출액으로부터 ammonium sulfate(35~55% 포화농도)침전시켜 얻은 α-amylase(3U)를 가하여 75℃에서 24시간 작용시킨 다음, ethanol을 70% 되게 가하여 분해되지 않은 전분과 고분자 물질을 침전 제거하였다. 상등액을 50℃ 이하에서 감압 농축하여 증류수로 일정량으로 정용한 다음, 이온교환수지(Amberlite MB-3)로 처리하여 이온성 물질을 흡착 제거하고 나서 0.2 μ membrane filter에 통과시킨 다음 ion chromatograph(Dionex Bio LC, Carbopac PA1 column 사용)를 이용하여 분석하였다[3].

단백질정량

단백질 함량은 Lowry 방법을 개선한 Peterson의 방법[5]에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

잣의 블랜칭이 잣죽의 점도에 미치는 영향

잣죽 제조중 점도감소가 전분분해효소의 작용에 의한 것인지 알아보기위하여 죽을 제조하기전 잣을 별도로 열처리하였다. Fig. 1에 보인 바와 같이 잣의 블랜칭 시간이 길수록 잣죽의 점도가 증가하는 것이 관찰되었다. 즉, 잣을 100℃ 수욕조에서 0, 5, 및 30분 처리하여 잣

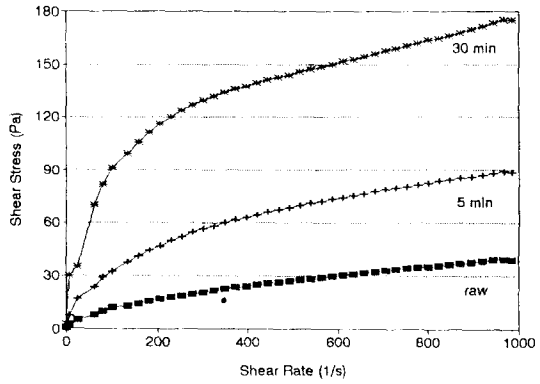

Fig. 1 Viscosity of pine nut's porridges prepared with pine nut blanched in boiling water for 0, 5, 30 minutes

죽을 제조하였을 때, 전단속도 800 s $^{-1}$에서의 점도는 각각 35, 82, 및 164 Pa이었다. 이러한 결과는 잣에 고온에서 활성을 나타내는 아밀라제가 존재한다면 설명될수 있는 현상이다. 전통적으로 잣죽은 쌀 또는 쌀가루를 먼저 넣고 끓는 상태에서 마쇄한 잣 현탁액을 가하여 제조하거나, 미리 물과 함께 간 잣을 방치하여 상등액만 취하여 가열한 다음, 그 위에 쌀 및 나머지 잣 고형물을 가하여 제조하였다[6]. 이는 잣과 쌀을 함께 넣고 가열하면 점도가 지나치게 감소하여 죽으로서 적절한 점도를 유지하기 어렵기 때문에 고안된 조리법이 아닌가 생각된다. 한편 쌀만으로 제조한 죽에 고온에서 활성이 높은 시약급 thermostable amylase(Termamyl, Sigma)를 가하였을 때, 점도 감소 뿐만 아니라, 층분리 현상이 관찰되었는데, 이는 호화전분이 나타내는 특성의 하나인 보수력이 amylase의 작용에 의해 감소하여 나타나는 현상으로 생각된다. 이렇듯 잣에 고온에서 작용하는 α-amylase가 존재한다면 비슷한 현상이 일어날 것으로 예상된다. 실제로 한[1]은 잣함량이 증가할수록 잣죽의 점도가 감소하는 현상을 관찰하였으며 장기 저장시 층분리현상이 나타남을 보고하였다.

조효소의 특성

잣의 수용성 추출물을 ammonium sulfate로 분획한 결과, 35~55% 포화용액에서 침전하는 단백질분획이 가장 높은 α-amylase 역가를 나타냈으며 이때 효소의 specific activity는 0.55 U/mg protein으로 다른 식물체의 것에 비하여 낮은 수준이었지만[3,7,8], 잣에는 비교적 고온에서도 활성을 갖는 아밀라제가 존재하는 것이 확인되었다. 잣으로부터 분리한 조효소의 가용성전분 분해력을 온도와 pH를 달리하여 조사한 결과 Fig. 2와 3에서 보였듯이 최적 작용조건은 pH 5.4, 75℃ 이었다. 또한 90℃에서도 최대효소역가의 40%가 잔존하며, 95℃ 이상에서도 amylase 효소활성을 일부 갖고 있기 때문에 충분한 열처리가 수반되지 않는다면 잣죽의 점도 감소를

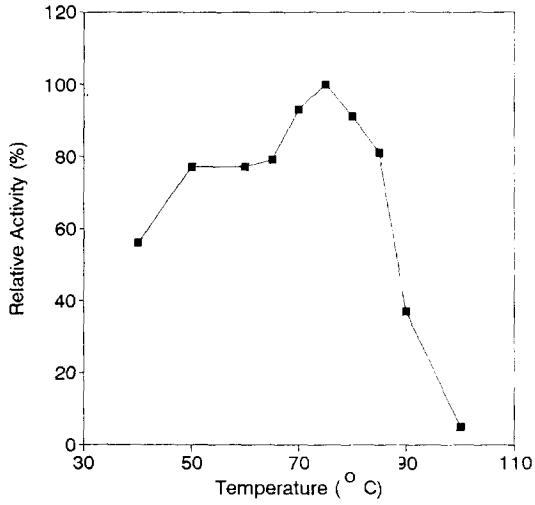

Fig. 2 Temperature dependence on amylase activity

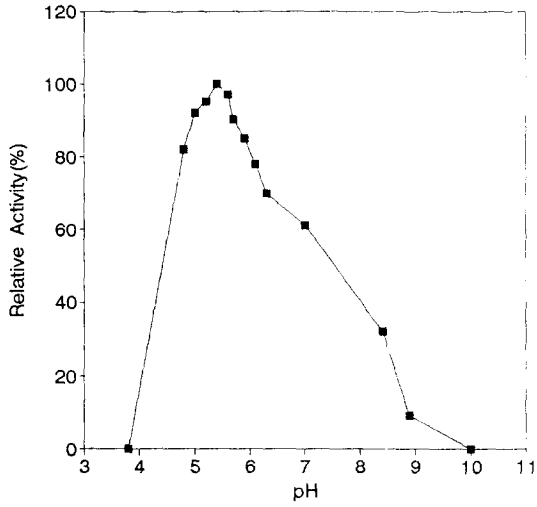

Fig. 3 pH dependence on amylase activity

완전히 억제하기는 쉽지 않을 것으로 사료된다. 한편 잣으로부터 제조한 조효소를 5 mM Ca^{2+} 존재하에 60 ℃에서 60분간 처리하였을 때, α-amylase의 효소활성은 무처리구의 90%의 활성을 유지하는 것으로 나타나 비교적 열에 안정한 효소로 생각된다. 그러나 Ca^{2+}으로 전처리하지 않고 동일조건하에서 열처리한 조효액의 α-amylase 효소활성은 무처리구의 40%로 낮아졌다. 이렇듯 Ca^{2+}이 효소의 열안정성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. α-Amylase는 생물계에 널리 분포하며 지금까지 밝혀진 대부분은 분자량이 50,000이며, 분자당 1개의 Ca(II)을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[9]. 동물의 α-amylase는 적정작용 pH가 6.0~7.0, *B. subtilis*는 5.6~6.0, 맥아는 4.8~5.4로 알려져 있는데, 잣의 효소는 맥아의 것과 비슷한 것으로 나타났다. 이 효소가 다른 식물체에서 확인된 것들과 같이 생전분을 분해하는 능력이 있는지 여부는 향후 조사되어야 할 과제다. 지금까지 알려진 내열성 아밀라제는 주로 미생물에서 분리 동정 되었으며[10-16] 산업적으로 유용하게 사용되고 있다.

Table 1. Reaction products from 24-hr hydrolysis of soluble starch with crude α-amylase isolated from pine nut.

Oligosaccharide	Percent of original substrate converted to each oligosaccharide
Glucose	5.9
Maltose	17.0
Isomaltose	1.2
DP3	6.8
DP4	4.6
DP5	10.3
DP6	21.2
DP7	10.3
Total	77.3

Crude enzyme (3U, 0.55 U/mg protein) was incubated with 5 mL of 0.5%(w/v) soluble starch in 20 mM acetate buffer at pH 5.4, 1 mL 1% NaCl. After 24 hr incubation at 75℃, an aliquot was removed from the reaction mixture and mixed with 2 volumes of absolute ethanol to stop enzyme reaction and to precipitate unreacted starch and large oligosaccharides. The supernatant was concentrated by vacuum evaporation below 50℃, and then the final volume was adjusted to 10 mL. The reaction mixture was passed through ion exchange column (Amberlite MB-3) and filtered through 0.2 μm filter prior to applying to ion chromatograph (Dionex Bio LC) equipped with Carbopac PA1 column. Maltooligosaccharides with degree of polymerization (DP) 1 to 7 from Sigma Chem. Co. were used as external standards for quantitation.

Table 2. Brabender amylograph indices of rice flour in the presence and absence of pine nut or its crude enzyme

	Control	Pine nut[1)]	Crude enzyme[2)]
Initial pasting temp.(℃)	65	60	62.5
Peak temp.(℃)	94	79	88
Peak height(BU)	540	290	295
Viscosity at 95℃ (BU)	540	30	70
Viscosity after 20 min at 95℃ (BU)	240	18	20

[1)]10g of pine nut was homogenized in Waring blender for 1 minute with 450 mL distilled water. This homogenate replaced distilled water of control in which the slurry was prepared by homogenizing 50g (14% m.b.) rice flour with 450 mL distilled water.

[2)]28.6 U of crude enzyme which is precipitated at 35~55% ammonium sulfate saturation for the crude extract obtained from 10g pine nut was added to the slurry.

한편 잣과 같은 고등식물체에서 70℃ 이상의 최적작용온도를 갖는 아밀라제가 분리된 경우는 드물다. 맥아나 발아된 밀에서 분리한 효소들이 비교적 내열성이 강하며 최적작용온도가 50~70℃로 보고되어 있다[17-19]. 즉, 맥아에서 분리된 α-amylase는 최적 작용온도가 50~55℃이며, 조효소 상태에서는 비교적 내열성이 높지만 분리하게 되면 열안정성이 감소하는 것으로 보고되어 있다[17]. 밀에서도 amylase의 존재가 보고되었으며 발아되면서 내열성이 증가하는 것으로 알려져 있다[18]. 이와같이 이들은 잣에 존재하는 amylase와 비교하여 내열성은 비슷하지만 최적작용온도가 일반적으로 낮다.

한편 잣에서 분리한 아밀라제의 전분분해산물을 분석한 결과 DG2(maltose), DG6의 함량이 높게 나타나(Table 1), Warner 등[3]이 발아중에 있는 옥수수에서 분리한 α-amylase의 반응생성물과 비슷한 양상을 보였다. α-Amylase는 전분의 α-1,4-glucosidic linkage를 무작위로 가수분해함으로 점도를 급격히 떨어뜨리며 I_2에 의한 발색능력을 현저히 감소시키는 것이 특징이다. Amylograph 결과(Table 2)에서 보듯이 잣의 효소는 점도감소효과가 현저하고, 가용성 전분에 효소액을 작용시키면서 일정시간 간격으로 시료를 취하여 I_2용액과 반응시켰을때 청자색(575 nm에서의 흡광도로 평가)의 소실이 빠르게 일어나는 것으로 볼때 잣에 존재하는 amylase가 α-형이라는 것은 확실시 된다. 그러나 α-amylase 이외에 다른 전분분해효소가 포함되어 있는지는 향후 연구되어야할 과제이며 현재 잣으로부터 α-amylase의 순수분리가 진행중이다.

잣에 존재하는 효소가 쌀가루의 amylogram특성에 미치는 영향

잣에서 분리한 효소가 잣죽의 점도감소와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 잣 또는 잣에서 분리한 효소를 첨가한 쌀가루 현탁액의 amylogram과 쌀가루만으로 얻어진 amylogram을 비교하였다. Table 2에 보인 바와 같이 효소나 잣을 첨가한 경우는 점도가 현저히 감소하였다. 즉, 잣이나 효소가 함유된 경우, 쌀가루의 최고점도는 50%로 감소하였으며 95℃에서 20분후 점도는 대조구가 240 BU, 잣 또는 잣에서 분리한 효소를 첨가한 경우에는 각각 18 및 20 BU로서 80℃ 이상에서 효소가 작용하여 쌀가루의 paste의 점도를 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 잣에 존재하는 고온에서 작용하는 amylase가 잣죽의 물성에 영향을 줄 수 있다는 사실을 구체적으로 보여주는 결과로서 산업적으로 잣죽을 제조할 때 점도감소나 층분리 등 제품의 품질저하를 예방할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

잣죽의 점도를 낮추는 주요원인이 amylase작용에 의한 것임을 증명하기 위하여 잣으로부터 조효소를 분리하고 그 작용특성을 조사하였다. 잣의 초산완충액 추출물에 ammonium sulfate를 가하여 35~55% 포화되도록 하였을 때 침전하는 획분이 가장높은 α-amylase의 specific activity를 나타내었다. 이 효소의 적정 작용조건은 75℃, pH 5.4이었으며 쌀가루에 첨가하여 amylograph 양상을 관찰한 결과 쌀가루의 점도를 크게 낮추는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1993년도 재단법인 인제장학재단 연구비로 수행된 결과로서 이에 감사드립니다. 그리고 자료정리에 도움을 준 인제대학교 식품영양학과 류승아, 김수미양에게 감사를 드립니다.

문 헌

1. 한 억 : 축산물 및 기타 가공식품기술 교재. 한국식품개발원, pp.169-204(1992)
2. Bernfeld, P.: Amylases, and Methods in enzymology, 1, 149(1955)
3. Warner, D.A., Grove, M.J. and Knutson, C.A.: Isolation and characterization of alpha-amylases from endosperm of germinating maize. *Cereal Chem.*, **68**, 383 (1991)
4. Medcalf, D.G. and Gilles, K.A.: Measurement of brabender visco amylogram. *Die Starche*, **4**, 101(1966)
5. Peterson, G.L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346(1977)
6. 한정혜 : 세계요리-한국편. 양우당, p.17(1988)
7. Ziegler, P.: Partial purification and characterization of the major endoamylase of mature pea leaves. *Plant Physiol.*, **86**, 659(1988)
8. Beers, E.P. and Duke, S. H.: Characterization of α-amylase from shoots and cotyledons of pea(*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, **92**, 1154(1990)
9. Whitaker, J.R.: Principles of enzymology for the food sciences. 1st ed., Marcell Dekker, NY pp.442-450(1972)
10. Finlayson, S.D., Bain, F., Berry, D.R. and Johnston, J.R.: Preparation of a nuclease free alpha amylase and its use in DNA purification. *Biotechnol. Tech.*, **6**, 53 (1992)
11. Goldberg, J.D. and Edwards, C.: Purification and characterization of an extracellular amylase from a thermophilic streptomycete. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 712 (1990)
12. Bezbaruah, R.L., Goloi, B.K., Pillai, K.R. and Nigam, J.N.: Amylase production by three *bacillus* strains active at alkaline pH. *J. Basic Microbiol.*, **31**, 13(1991)
13. Sunna, A. and Hashwa, F.: Thermostable amylase from aerobic, gram-negative, non-spore forming thermophilic bacterium. *Biotecnol. Lett.*, **12**, 433(1990)
14. Kobayashi, Y., Motoike, M., Fukujumi, S., Oshima, T., Saiki, T. and Beppu, T.: Heat-stable amylase complex produced by a strictly anaerobic and extremely thermophilic bacterium, *Dictyoglomus thermophilum*. *Agric.*

Biol. Chem., **52**(2), 615(1988)
15. Nakada, T., Kubota, M., Sakai, S. and Tsujisaka, Y.: Purification and characterization of two forms of maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**(3), 737(1990)
16. Kimura, T. and Horikoshi, K.: Purification and characterization of alpha-amylases of an Alkalopsychrotrophic *Micrococcus* sp. *Starch*, **42**, 403(1990)
17. Harris, G.: The enzyme content and enzymic transformation of malt, pp.606-619. In: Barley and Malt: Biology, Biochemistry, Technology. Cook, A.H.(ed.). Academic Press, New York(1962)
18. Kruger, J.E. and Reed, G.: Enzymes and Color, Vol I, pp.442-450. In: Wheat: Chemistry and Technology. Pomeranz, Y.(ed.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN(1988)
19. Kulp, K.: Carbohydrases, pp.65-70. In: Enzymes in Food Processing. Reed, G.(ed.). Academic Press, New York(1975)

(1994년 3월 12일 접수)