

## 칠틈 뿌리에서 분리한 $\beta$ -amylase의 효소학적 특성

윤상혁 · 심우만\*

(주)농심 연구소, 장안전문대학 식품영양과\*

### Enzymatic Properties of $\beta$ -amylase Isolated from Arrowroot

Sang-Hyuk Yoon and Woo-Man Shim\*

*Institute of Nongshim Co. LTD., Kunpo, 435-030, Korea*

*Dept. of Food and Nutrition, Changan Junior College, Hwasung, 445-756, Korea\**

#### Abstract

$\beta$ -amylase(EC 3.2.1.2) was isolated from the root of arrowroot (*Peuria thunbergiana* Benth) with distilled water and then fractionated with ammonium sulfate. Crude extract was partially purified by ion exchange chromatography and gel filtration.

The enzymatic properties of partially purified  $\beta$ -amylase were as follows, the enzyme was fractionated with ammonium sulfate between 0.2 and 0.4 saturation, and showed the typical reaction properties of  $\beta$ -amylase producing only maltose from starch. Optimum pH and temperature were pH 6.5, 50°C respectively. The activity of the enzyme had proportional relations with enzyme protein concentration below 4mg, and had Michaelis constant of 66.7mg% for soluble starch. The enzyme was inhibited by some metal ions such as silver, cadmium, mercury, aluminum, iron and copper.

Key words :  $\beta$ -amylase, arrowroot

## 서 론

칠틈(*Pueraria thunbergiana* Benth)은 콩과에 속하는 다년생 덩굴성 관목으로 한국, 일본, 만주, 북미 등에서 산과 들에 자생하고 있다. 뿌리는 13~16% 정도의 전분과 소량의 daidzein, daidzin 등의 특수성분을 함유하고 있어서 한방에서는 해열, 감기, 두통, 편도선염 등에 이용된다.<sup>1)</sup> 식품공업에서는 뿌리의 전분이 주로 이용되는데, 일본에서는 연간 300톤 정도의 칠틈전분이 생산되어 과자, 면류, 약의 부형제 등으로 사용되고 있으며<sup>2)</sup>, 우리나라에서는 주로 차의 원료로 사용되고 있다.

칠틈에 대한 연구는 주로 뿌리중의 전분에 관한 것들이며 Suzuki 등<sup>3)</sup>은 칠틈전분의 구조, 화학특성 등을 보고하였으며, Tanner 등<sup>4)</sup>은 새로운 식품의 원료와 에

탄올 발효에의 이용가능성을 검토 하였다. 우리나라에서는 김 등<sup>5)</sup>에 의해 칠틈전분의 이화학적 성질과 이 등<sup>6)</sup>의 칠틈전분의 물성에 관한 연구가 있다. 한편 칠틈의 뿌리에 존재하는 효소에 대한 연구는 Hankins 등<sup>7)</sup>의  $\alpha$ -galactosidase에 대한 연구 외에 거의 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 효소의 급원으로써 칠틈뿌리의 이용 가능성과 효소의 특성을 알아볼 목적으로 연구를 진행한 결과  $\beta$ -amylase를 검색하게 되었고 황산암모늄 분획 및 이온교환 크로마토그래피 및 겔여과법으로 부분정제하고 효소학적 특성을 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 시료는 1995년 2월 서울 소재 경동시장에서 구입한 8~9년된 강원도 칠틈뿌리를 사용하였다.

2. 시약

크로마토그래피용 DEAE-cellulose, Sephadex G-150, G-200 등은 Pharmacia Co. 제품을 사용하였으며 나머지 시약도 일급 및 특급을 사용하였다.

3. 효소의 정제

1) Crude extract의 조제

깨끗이 세척한 칩뿌리의 껍질을 벗긴 후 잘게 썰어 두배의 증류수를 넣어 마쇄하고 cheese cloth로 짜서 착즙액을 5000 r.p.m 으로 10분 냉동 원심분리하여 상등액을 crude extract로 하였다.

2) 황산암모늄 분획

칩뿌리중의  $\beta$ -amylase를 분리하기 위하여 조효소 추출액에 황산암모늄을 첨가하여 Fig. 1과 같은 방법으로 분획하였다. 생성된 침전물은 4℃에서 10분간 냉동 원심분리한 후 visking tube를 사용하여 탈이온수로 충분히 투석시켰고 여기에 잔존하는 불용성 물질을 다시 원심분리하여 제거한 후 투석하였다.

3) DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피

DEAE-cellulose를 알칼리처리, 산처리를 시킨 뒤

phosphate buffer, pH 7.0으로 활성화시켰다. 이것을 직경 2.5 cm, 길이 60 cm 유리 컬럼에 충전시켰다. 시료는 1M NaCl을 함유한 phosphate buffer, pH 7.0을 continuous gradient법으로 분당 0.7 ml의 속도로 유출시켰다.

4) Sephadex G-150, 200 겔 여과

DEAE-cellulose 크로마토그래피에서 얻어진 활성이 높은 획분을 모아 농축시키고 투석한 뒤 미리 팽윤시킨 Sephadex G-150이 충전된 직경 2.5 cm, 길이 60 cm의 컬럼에 주입하여 phosphate buffer, pH 7.0을 이동상으로 하여 분당 0.7 ml의 속도로 유출시켰다. 또한 Sephadex G-200 rechromatography도 같은 방법을 사용하였다.

4.  $\beta$ -amylase의 활성 측정

$\beta$ -amylase의 활성 측정은 시험관에 6% 가용성전분액 2ml, 0.1 M acetate buffer pH 5.0, 7.5 ml, 효소액 0.5 ml 를 넣고 50℃에서 30분간 반응시킨 다음 효소반응을 중지시켰다. 이 반응액을 100배 희석한 후 0.5 ml를 취하여 Somogyi - Nelson 법<sup>8)</sup>에 의하여 생성된 환원당을 정량하였다.  $\beta$ -amylase의 활성은 50℃에서 30분간에 환원당 1  $\mu$ mole이 생성되는 양을 1 unit로 환산하였다.

5. 효소 단백질의 정량

효소단백질의 정량은 UV에 의한 측정법<sup>9)</sup>에 의하여 260 nm, 280 nm에서 측정된 흡광도로 계산하였다.

6. 반응산물의 분석

효소의 반응산물은 HPLC에 의하여 분석하였다. 기기는 Waters Model 600-A U-SIX K를 사용하였고 고정상은 sugar pack carbohydrate 컬럼, 이동상은 deionized water이었으며 유속:1.0ml/min, chart speed : 0.5cm/min, 주입량은 5  $\mu$ l이었다.

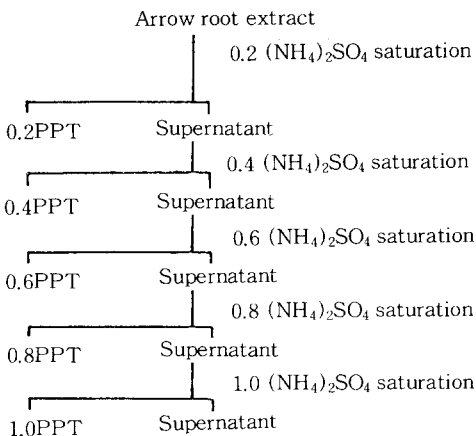


Fig 1. Fractionation of  $\beta$ -amylase with ammonium sulfate

결과 및 고찰

1. 황산암모늄분획 및 이온교환 크로마토그래피  
 황산암모늄을 이용한 분획에서 얻어진 각 획분 중  $\beta$

$\beta$ -amylase 활성을 측정된 결과는 Table 1과 같다.  $\beta$ -amylase 활성은 0.2~0.6 포화획분에서 나타났으며, 0.2 포화획분과 0.4 포화획분에서 총효소 활성의 85% 이상을 함유하며, 비활성도 높기 때문에 본 실험에서는 0.4 이하의 포화획 분을 모아 visking tube로 투석시킨 후 생성된 불용성 물질을 원심분리하여 제거하고 얻어진 상등액을 crude extract로 사용하였다.

황산암모늄 분획으로 얻은 crude extract를 DE-AE-cellulose를 사용하여 이온교환 크로마토 그래피를 한 결과는 Fig. 2와 같다. 효소의 피크는 크게 3개로 분리되었으며 이들 획분의 효소 활성을 측정할 결과 제일 큰 세번째 피크에 집중되어 있었다. 따라서 이들 획분을 모아 농축한 후 다음 정제과정에 사용하였다.

2. Sephadex G-150, 200을 이용한 겔 여과

이온교환 크로마토그래피에서 얻어진 세번째 피크의 획분을 농축하여 Sephadex G-150으로 겔 여과를 한 후 결과는 Fig. 3과 같다. 이 결과에서는 세개의 피크성분으로 나뉘어 졌는데 이들중 첫번째 피크가 효소 단백질과 효소활성이 매우 높았다. 따라서 이 획분을 모아 Sephadex G-200으로 재차 겔 여과를 시켰다. 그 결과 Sephadex G-200에서 얻어진 Fig. 4의 크로마토그램에서는 하나의 피크만이 나타나 완전히 정제되었다고 단언하기는 어렵지만 하나의 피크를 이룬 상당히 정제된  $\beta$ -amylase를 얻을 수 있었다.

3.  $\beta$ -amylase의 반응산물

침 뿌리에서 분리된 효소가  $\beta$ -amylase임을 확인하

Table 1. Activity of  $\beta$ -amylase in ammonium sulfate fraction

Fraction	Total protein (mg)	Specific activity	Total activity (unit)
0.2	256.4	13.0	3,332.0
0.4	389.0	9.5	3,695.5
0.6	381.9	2.5	970.7
0.9	420.4	0.6	239.9
1.0	181.0	—	—
Supernatant	1,573.5	—	—

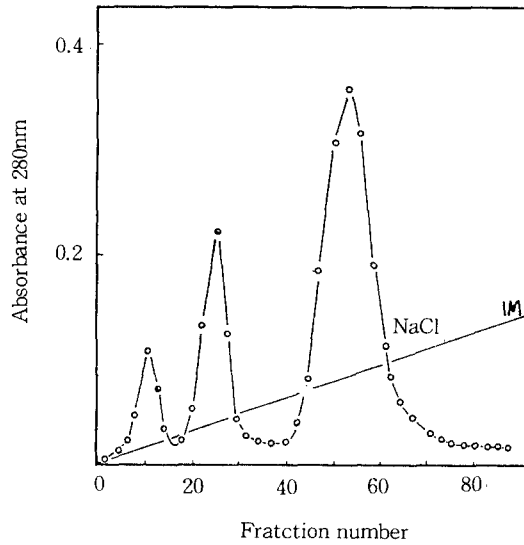


Fig 2. Elution profile of DEAE cellulose ion exchange chromatography.

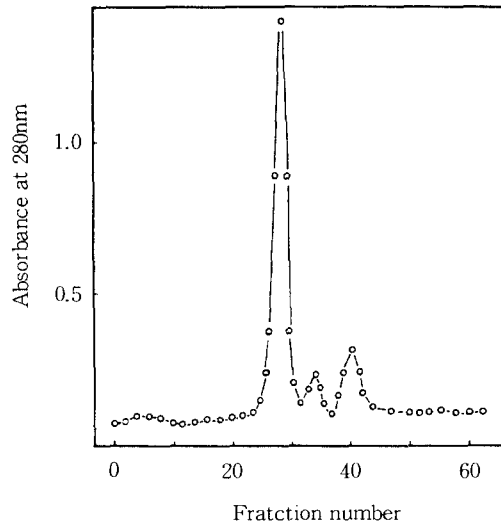
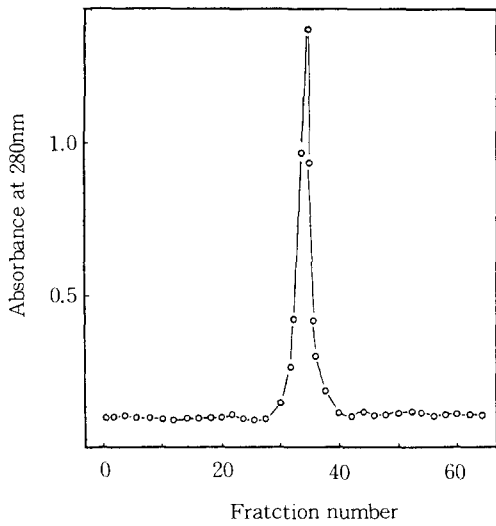


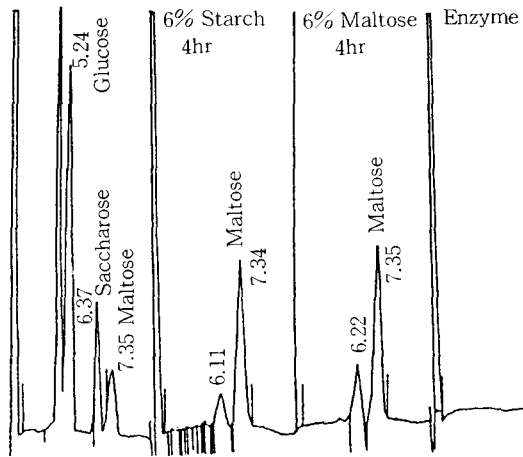
Fig 3. Elution profile of Sephadex G-150 gel filtration.

기 위하여 6% starch를 각각 기질로하여 일정한 시간 반응시킨 후 반응산물을 HPLC로 분석한 결과는



**Fig 4. Elution profile of Sephadex G-200 gel filtration.**

Fig. 5와 같다. 6% 가용성 전분을 기질로 4시간 반응시켰을 경우 maltose가 주로 생성되었고 미지의 당류도 미량 검출되었으나 glucose는 검출되지 않았다. 따라서 본 효소는  $\beta$ -amylase로 추정할 수 있었다. 미지의 당류는 본 실험에서 사용한 당 이외의 성분으로서



**Fig 5. HPLC chromatogram of reaction products from  $\beta$ -amylase.**

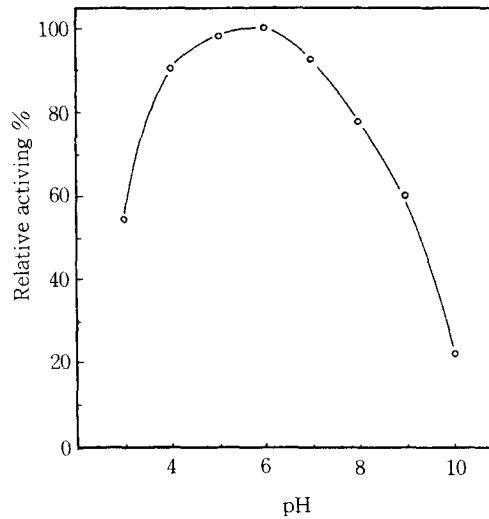
기질에 혼재되어 있는 불순물이거나 혹은 효소액에 혼재되어 있는 다른 효소의 생성물일 것으로 여겨지나 확인되지는 않았다.

**4. pH에 대한 영향**

$\beta$ -amylase의 pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 0.01 M acetate buffer 0.01 M phosphate buffer 0.01 M carbonate buffer 사용하여 pH 3 에서 pH 10까지의 각각의 pH에서 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 6과 같다. pH 5~6에서 최대의 활성을 보였으며 pH 4와 7에서는 90% 이상의 활성을 보인 반면 pH 4 이하 및 pH 8 이상에서는 효소활성이 현저히 저하되었다. 이와 같은 결과는 고구마  $\beta$ -amylase<sup>10)</sup> pH 5.5, 대두<sup>11)</sup> 5.2~5.5, 밀<sup>12)</sup> 4.6~6.2의 경우와 비슷한 결과를 나타내었다.

**5. pH의 안정성**

부분정제된  $\beta$ -amylase의 pH 안정성을 조사하기 위하여 효소액에 0.01 M acetate buffer, 0.01 M phosphate buffer, 0.01 M carbonate buffer 등을 각각 2배량씩 가하여 pH를 조절한 후 4°C에서 24시간 정치한 후 탈이온수에서 24시간 투석하고 효소활성을 측정하여 효소의 안정성을 검토한 결과는 Fig. 7과 같



**Fig 6. Effect of pH on the activity of  $\beta$ -amylase.**

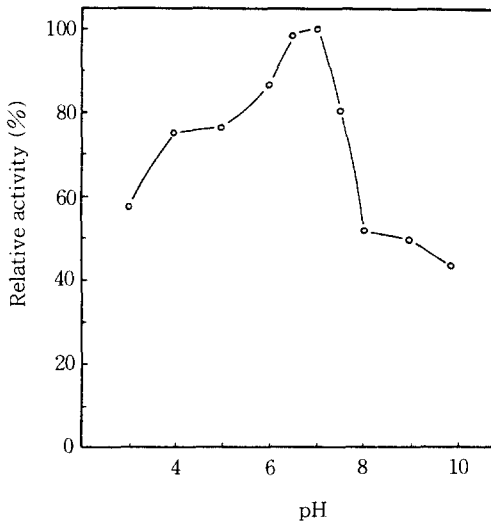


Fig 7. pH stability of  $\beta$ -amylase.

다. 이 효소는 pH 6.5~7.0에서 안정성을 나타내었으며 pH 6 이하와 pH 7이상에서는 활성의 저하를 보였으며 산성쪽에서 보다는 알칼리쪽에서 더 큰 활성저하를 나타내었다. 이러한 결과는 인삼<sup>13)</sup>의 pH 7~8, 대두<sup>11)</sup> 6~9, 밀<sup>12)</sup> 4.5~9.2, 맥아<sup>14)</sup> 4~8과 비교해 볼 때 본 효소는 비교적 좁은 중성부근에서만 안정한 효소임을 알 수 있었다.

#### 6. 온도에 대한 영향

$\beta$ -amylase의 온도에 대한 영향을 알아보기 위하여 효소반응 온도를 각기 달리하여 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 8과 같다. 50℃에서 최대 활성을 보였으며 30, 60℃에서는 각각 80%정도의 활성을 보였으나 그 이하 또는 이상의 온도에서는 활성이 현저히 저하되었다. 이와 같은 결과는 맥아<sup>15)</sup> 55℃와 비슷하였으며 산마<sup>16)</sup> 60℃보다는 낮은 것으로 나타났다.

#### 7. 열 안정성

$\beta$ -amylase의 열 안정성을 조사하기 위하여 기질을 제외한 기타 반응액의 조성을 모두 첨가하고 각 온도에서 30분간 처리한 후 기질을 가해 잔존하는 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. 그 결과 50℃이상

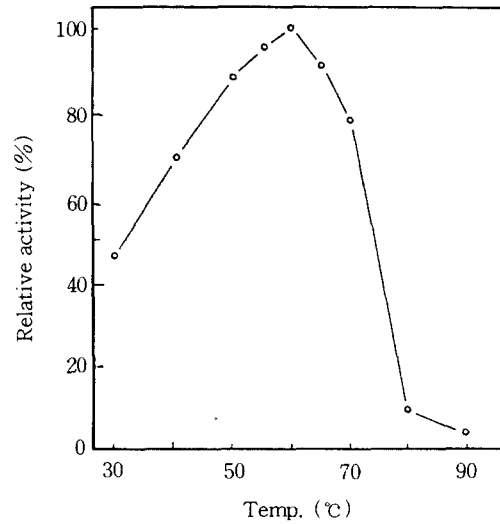


Fig 8. Effect of temperature on the activity of  $\beta$ -amylase.

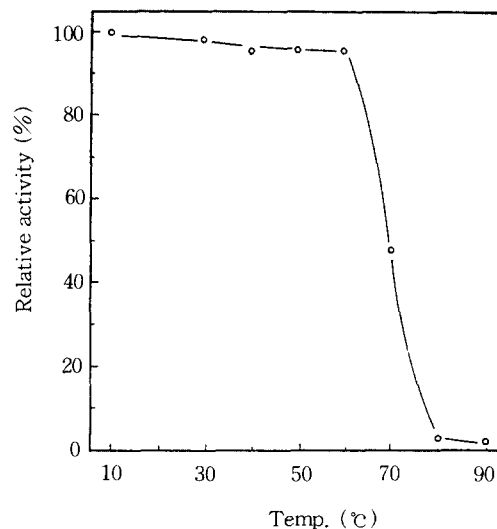


Fig 9. Thermal stability of  $\beta$ -amylase.

의 온도에서는 온도 상승과 더불어 급격히 실활하는 현상을 나타내었다.

이와 같은 결과는 대두<sup>17)</sup> 53℃, 고추냉이<sup>18)</sup> 50℃ 이하에서는 안정하다는 보고와 비슷하였으나, 고구마<sup>10)</sup> 37℃ 이하, 인삼<sup>13)</sup> 35℃ 이하 보다는 높은 열 안정성을 나타내었다.

### 8. 기질농도의 영향

기질인 가용성 전분의 농도를 1~20 mg%의 범위에서 각각 달리하여 효소활성을 측정해본 결과 48 mg% 이하에서 기질농도에 비례하여 효소활성이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 효소활성의 증가가 다소 낮아졌다. 얻어진 데이터를 Lineweaver-Burk plot한 결과는 Fig. 10과 같다. Km 값은 66.7 mg%로서 인삼<sup>13)</sup> 10.52 mg%, 고구마<sup>10)</sup> 0.28 mg%와는 큰 차이를 나타내었다.

### 9. 금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 여러 가지 금속염 용액을 효소용액에 각각 1 ml씩 첨가한 후 효소활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. Ag<sup>+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 등에 의해서 효소의 활성이 저하되었으며, 특히, Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 등의 저해작용은 현저하여 Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>은 1×10<sup>-4</sup>에서도 각각 20, 96% 정도의 저해효과

**Table 2. Effects of metal ions on  $\beta$ -amylase activity**

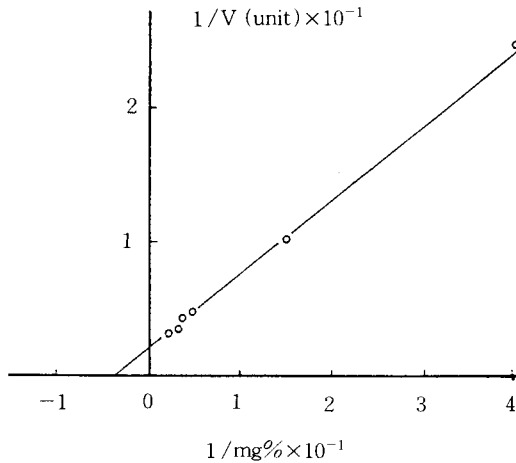
Metal ions	Relative activity(%)
None	100.0
KCl (1×10 <sup>-2</sup> M)	105.8
NaCl ( " )	101.6
AgNO <sub>3</sub> ( " )	3.3
AgNO <sub>3</sub> (1×10 <sup>-4</sup> M)	3.5
AgNO <sub>3</sub> (1×10 <sup>-6</sup> M)	102.1
SnCl <sub>2</sub> (1×10 <sup>-2</sup> M)	94.7
CaCl <sub>2</sub> ( " )	103.2
CdCl <sub>2</sub> ( " )	63.5
CoCl <sub>2</sub> ( " )	104.8
HgCl <sub>2</sub> ( " )	0.0
HgCl <sub>2</sub> (1×10 <sup>-4</sup> M)	0.0
HgCl <sub>2</sub> (1×10 <sup>-6</sup> M)	7.3
MnCl (1×10 <sup>-2</sup> M)	92.1
AlCl <sub>3</sub> ( " )	73.0
FeCl <sub>3</sub> ( " )	79.4
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( " )	98.4
CuCl <sub>2</sub> ( " )	0.5
CuCl <sub>2</sub> (1×10 <sup>-4</sup> M)	78.0

를 나타내었으며, 수은은 매우 강한 저해작용을 나타내었다.

## 요 약

칠틈(Peuraria thunbergiana Benthams)의 뿌리에서 추출한 조효소액을 황산암모늄으로 분획하고 이온교환 크로마토그래피 및 겔여과에 의해 부분 정제하고 얻은  $\beta$ -amylase의 효소학적 특성을 검토한 결과는 다음과 같다.

칠틈뿌리  $\beta$ -amylase는 황산암모늄 0.4포화 이하의 희분에서 85% 이상의 활성을 나타내었으며, 가용성 전분을 기질로하여 maltose를 생성하여 전형적인  $\beta$ -amylase의 특성을 나타내었다. 또한 최적 pH, 최적 온도는 pH 6.0 및 50℃이었으며 pH 6.5~7.0, 50℃이하에서 안정하였다. 기질농도에 대한 Km은 66.7 mg%이었으며 금속이온은 카드뮴, 알루미늄, 철, 은, 수은, 구리 등의 이온에 의해 효소활성이 저해되었다.



**Fig 10. Lineweaver-Burk plot for the determination of Km of  $\beta$ -amylase.**

### 참고문헌

1. 안덕균 : 한방가정요법대전, 한국도서출판중앙회, p.1045 (1995)
2. 김성곤, 김관, 윤한교 : 한국농화학회지, (4), 245, (1984)
3. Suzuki, A., Hizukuri, S. and Takeda. Y. : Cereal Chem., **58**, 286 (1981)
4. Tanner D. and Shahid S. : *J. Agric. Food Chem.*, **27**(1) (1979)
5. 차환수, 김관, 김성곤 : 한국농화학회지, **27**(4), 252 (1984)
6. 이신영, 김관, 윤한교, 김성곤 : 한국식품과학회지, **18**(2), 114, (1986)
7. Hankins, C. N. Kindinger, J. I. and Shannon, L. M. : Plant Physiol., **65**, 618 (1980)
8. Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
9. Kalcker : *J. Biol. Chem.*, **167**, 19 (1952)
10. Takeda, Y. and Hizukuri, S. : Biochim. Biophys. Acta, **268**, 175 (1972)
11. Gertler, A. and Birk, Y. : Biochim. J., **95**, 621 (1965)
12. Tkachuk. T. and Tipples, K. H. : Cereal Chem., **43**, 62 (1966)
13. 김병목 : 한국식품과학회지, **17**(4), 240(1985)
14. Meyer, K. H., Spahr, D. F. And Fischer, H. : Helv. Chem. Acta, **36**, 1924 (1953)
15. Piguet, A. and Fischer, E.H. : Helv. Chem. Acta, **35**, 257 (1952)
16. Gayashi, Y., Kawabata, M. and Taguchi, K. : Rigaku Kagaku., **23**, 21 (1972)
17. Pronin, S. I. : Biochim. Zerna. Sbornik., **4**, 138 (1958)
18. Kasugai, A : Nippon Nogeikagaku Kaishi., **33**, 1111 (1958)

---

(1996년 3월 11일 수리)