

가열방법에 따른 효소저항전분 생성

이신경 · 문세훈 · 신말식*

전남대학교 식품영양학과

초록 : 아밀로오스 함량이 다른 옥수수 전분에 전분과 물의 비율을 1:3.5와 1:9로 조절하고 100°C와 121°C에서 가열-냉각 처리를 4회까지 반복한 후, 효소-중량법과 α -아밀라아제(*Bacillus subtilis*)를 이용한 효소법으로 효소 저항전분을 분리하여 수분함량과 가열-냉각 방법에 따른 효소저항전분의 수율을 비교하였다. 같은 처리를 한 경우에는 효소-중량법이 α -아밀라아제를 사용한 효소법보다 효소저항전분의 분리능이 더 큼을 알 수 있었다. 분리 방법에 상관없이 아밀로오스 함량이 높고, 가열-냉각 처리 횟수를 증가시키면 효소저항전분의 수율도 증가하였으며, 가열온도는 100°C보다 121°C에서, 수분함량은 전분과 물의 비율이 1:9보다 1:3.5의 조건에서 높은 수율을 보였다.(1997년 1월 30일 접수, 1997년 3월 26일 수리)

서 론

효소저항전분(RS, Enzyme-resistant starch)은 전분분해 효소를 이용한 *in vitro* 실험뿐만 아니라 인체의 소장내 효소에 의해서도 흡수되지 않고 남아있는 전분¹⁻³⁾으로 영양생리적인 면에서 식이섬유소처럼 혈중 콜레스테롤이나 지방질의 축적을 저하시켜 동맥경화증이나 고혈압의 예방효과가 있을 뿐만 아니라, 소장에서 흡수되지 않은 부분은 대장에서 미생물에 의해 발효되어 부티릭산과 같은 단쇄지방산을 형성하여 대장암의 억제능력이 크다.^{4,5)} 식품가공적인 면에서는 수분 흡수력이 낮아 씨리얼이나 스낵류에 첨가하면 현재까지 기능성 소재로 사용해 왔던 식이섬유소보다 좋은 식품의 텍스처를 유지함으로써 상품성을 향상시킬 수 있고, 다이어트 식품의 개발도 가능하여 많은 식품에 사용될 수 있는 식품소재로 알려져 있다.^{5,6)}

Tsuge 등⁷⁾은 α -아밀라아제(*Bacillus subtilis*)를 이용하여 전분의 노화도를 신속히 측정할 수 있다고 하여 glucoamylase나 BAP를 이용한 방법보다 바람직하다고 보고된 바 있으며, 노화전분이 효소저항전분 중에 속하는데 α -아밀라아제를 사용하여 측정하는 노화전분과 식이섬유소를 측정하는 AOAC에 의해 분리된 효소저항전분 수율에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

효소저항전분은 사용되는 효소의 종류와 방법에 따라 효소저항전분의 양과 특성에 차이가 난다고 알려져 있는데,^{1,8)} 전보⁹⁾에서는 식이섬유소를 측정하는 방법인 효소-중량법과 전분의 노화도를 측정할 때 사용되는 α -아밀라아제 처리의 두가지 방법으로 옥수수 전분의 효소저항전분의 수율을 비교했을 때 효소저항전분의 분리는 효소-중량법이 α -아밀라아제 처리로 효소저항전분을 분리할 때보다 순도가 높았다.

이러한 효소저항전분의 생성량은 전분의 종류,¹⁰⁾ 아밀로오스 함량,¹¹⁾ 수분함량, 가열온도, 가열-냉각 사이클,^{1,2,12)} 첨

가물질^{13,14)} 등에 의해 영향을 받을 뿐만 아니라, 저장온도, 저장기간, 아밀로오스의 사슬길이에 따라서도 영향을 받는데,^{3,15)} 아밀로펙틴보다는 아밀로오스가 더 큰 영향을 주며, 가열온도나 가열횟수를 증가시킬수록 효소저항전분의 생성율도 증가된다고 보고하였다.²⁾

그러므로 본 연구에서는 전보⁹⁾에 이어 가열방법이 효소저항전분의 생성에 미치는 영향을 비교하기 위해 아밀로오스 함량이 다른 옥수수 전분을 이용하여 전분과 물의 비율을 1:3.5와 1:9로 조절하고 100°C와 121°C에서 가열-냉각을 반복처리한 후, 효소-중량법과 α -아밀라아제(*Bacillus subtilis*)에 의한 효소법으로 저항전분을 분리하고 그 생성 정도를 비교하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 옥수수 전분은 전보⁹⁾와 같이 아밀로오스 함량이 다른 옥수수 전분, 찰옥수수 전분인 Amioca, 보통 옥수수 전분인 PFP, 고아밀로오스 옥수수 전분인 Amaizo 5, Amylomaize VII을 American Maize Products Co. (Hammond, IN)에서 구하여 시료로 사용하였으며, 일반성분은 수분과 회분함량이 10.11~10.57%와 0.09~0.17%, 총지방질과 단백질 함량은 0.39~1.03%와 0.14~0.57%였으며, 아밀로오스 함량은 각각 0%, 28.9%, 55.9%, 72.3%였다.

효소는 total dietary fiber assay kit와 *Bacillus subtilis*에서 분리한 α -amylase(No. A-6380)를 Sigma Chemical Co. (Louis, Mo)에서 구입하여 사용하였으며, kit의 효소는 thermostable α -amylase(No. A-3306), *Aspergillus niger*로 부터 분리한 amyloglucosidase(No. A-9913), protease(No. P-3910)였다.

찾는말 : resistant starch, corn starch, various heating methods
*연락처자

효소저항전분의 형성

Sievert와 Pomeranz의 방법²⁾을 변형하여 형성시켰다. 아밀로오스 함량이 다른 옥수수전분과 물의 비율을 1:3.5와 1:9로 조절하여 멸균병에 넣고 100°C와 121°C 멸균기에서 각각 1시간 소화시킨 후에 바로 얼음물에 담가 실온까지 냉각하고 4°C에서 1일간 저장한 다음, 가열-냉각 처리를 4회 까지 반복하고 냉동건조시켰다. 건조된 시료는 100메쉬 입자크기 이하로 마쇄한 다음 데시케이터에 보관하면서 시료로 사용하였다.

효소저항전분의 분리

AOAC에 의한 효소-중량법¹⁶⁾을 변형한 방법과 Tsuge 등에 의한 α-아밀라아제 효소법¹⁷⁾으로 효소저항전분을 분리하였다.

(1) 효소-중량법

시료 1g과 pH 6.0 인산완충용액 50 ml에 thermostable α-amylase 0.1 ml를 넣은 다음 끓는 수조에서 30분간 반응시킨 후 실온으로 냉각시켜 0.275N NaOH로 pH를 7.5로 조정하였다. 이 용액에 50 mg protease를 1 ml의 인산완충용액에 분산시킨 용액 0.1 ml를 첨가하여 60°C에서 30분 동안 흔들면서 반응시켰고, 다시 실온까지 냉각시켜 0.325N HCl로 pH가 4.3이 되도록 조정하고 amyloglucosidase 0.3 ml를 첨가한 후 60°C에서 30분간 흔들면서 반응시켰다. 총 용액의 알코올 농도가 80%가 되게 에탄올을 첨가하여 Whatman No.1 여과지를 사용하여 여과한 후 아세톤으로 세척하고 불용성 잔사를 실온에서 하루 방치하여 건조시켰고 효소저항전분의 생성율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{효소저항전분 생성율 (\%)} = \frac{\text{불용성 잔사의 무게 (g)}}{\text{시료의 무게 (g)}} \times 100$$

(2) α-아밀라아제에 의한 효소법

시료 0.5g과 pH 6.0 인산완충용액 10 ml에 전분 mg당 10 unit의 α-아밀라아제(*Bacillus subtilis*)를 첨가한 다음 37°C 항온수조에서 16시간 반응시킨 후 80%농도가 되게 에탄올을 첨가하여 여과한 다음 불용성 잔사를 실온에서 건조시키고 효소저항전분의 생성율은 위와 동일한 방법으로 계산하였다.

결과 및 고찰

가열온도와 수분함량에 따른 효소저항전분의 생성

가열온도와 수분함량이 효소저항전분에 미치는 영향을 비교하기 위해 가열-냉각 횟수를 1회와 4회 실시하고 효소-중량법과 α-아밀라아제 효소로 분리한 결과를 Fig. 1, 2에 나타내었다. 두가지 방법 모두 100°C보다는 121°C로 가열한 전분으로부터 분리한 효소저항전분의 수율이 모든 시료에서 높은 결과를 보여 가열온도가 증가할수록 수율이 증가함을 볼 수 있었다.

충분한 물이 있는 조건에서 가열온도가 높으면 생전분의 호화가 더 잘 일어나 냉각시에 전분 분자의 재결정화 과정

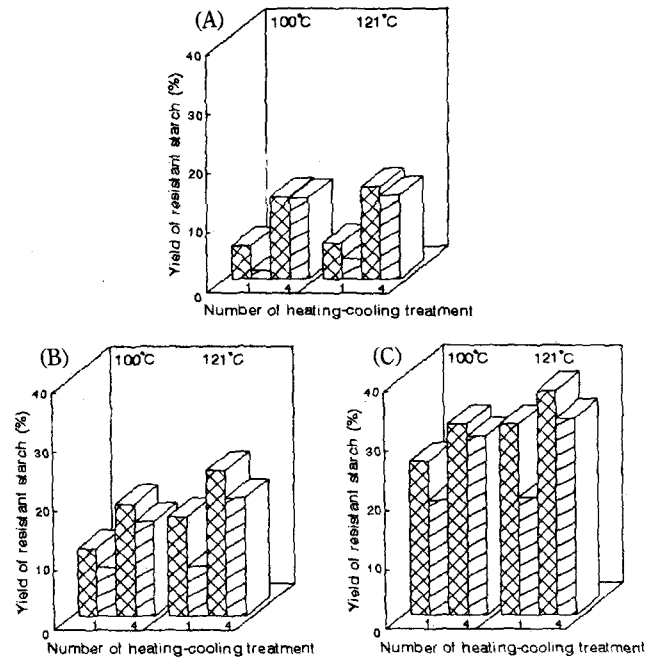


Fig. 1. Yield of resistant starch with heating temperature and starch to water ratio by enzymatic-gravimetric method. ■—■, starch/water ratio=1:3.5; ▨—▨, starch/water ratio=1:9; A: PFP, B: Amaizo 5, C: Amylomaize VII.

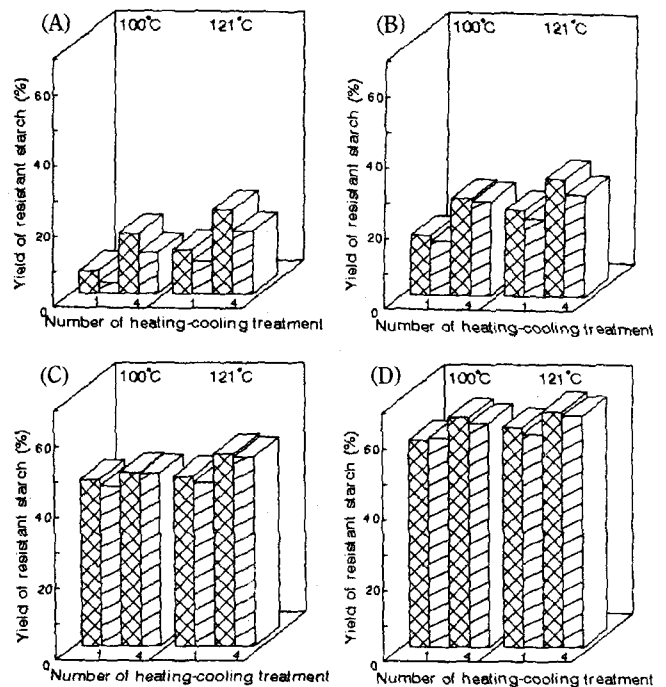


Fig. 2. Yield of resistant starch with heating temperature and starch to water ratio by α-amylase method. ■—■, starch/water ratio=1:3.5; ▨—▨, starch/water ratio=1:9; A: Amioca, B: PFP, C: Amaizo 5, D: Amylomaize VII.

이 더욱 쉽게 일어날 수 있을 것으로 생각한다. Berry¹⁾는 가열온도가 증가할수록 효소저항전분의 수율이 높아지는 것은 높은 온도로 인해 생전분의 구조가 완전히 붕괴하게 되고 생전분에서 지방질이나 아밀로펙틴에 결합되어있던 아밀로오스가 자유로운 상태가 되어 효소반응에 저항을 갖

는 결정형으로의 재결합이 용이하게 되기 때문이라고 하였다. 그러나 Sievert와 Pomeranz²⁾는 온도가 148°C까지 이르면 오히려 효소저항전분의 수율이 감소한다고 하여 가열온도에 따라 효소저항전분의 생성에 차이가 남을 보고하였다.

일반적인 전분과는 달리 고아밀로오스 전분은 호화되기 위해 더 많은 물을 필요로 하므로 전분과 물의 비율이 1:3.5정도 필요하였으며 이보다 많은 물의 조건인 1:9보다는 높은 효소저항전분의 수율을 나타내었다. 아밀로오스 함량이 높은 전분과 비교하기 위해 본 실험에서는 1:3.5 조건을 사용하였으나 보통 전분의 경우에는 전분과 물의 비율을 낮게 1:1~1:2로 조절하는 것이 전분의 노화가 잘 일어나는 50~60%의 수분함량을 유지하여¹⁷⁾ 노화를 촉진시킬 수 있는 조건이 될 수 있다. 두가지 분리방법 모두 전분과 물의 비율이 1:9인 것보다 1:3.5인 효소저항전분의 수율이 높은 결과를 나타내었다. Levine과 Slade¹⁸⁾는 수분함량이 90%까지 증가하면 전분의 노화가 억제되는데 이는 물의 희석작용과 가스제로서의 작용에 의한다고 하였다. 생전분과는 달리 호화된 전분은 냉각과정과 저장중에 재결정화가 이루어지며, 재결정화는 완전히 호화된 전분의 무정형 상태에서 결정화에 의해 일어나게 되므로 결정화 과정에 함유된 수분함량이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되었다. 그러나, 아직 효소저항전분의 결정구조가 정확히 밝혀져 있지 않아 노화전분의 B형 결정형을 이루기 위해 물분자가 참여하는 것¹⁹⁾과 같은 경향인지는 알 수 없다. 본 실험조건에서는 가열온도가 121°C, 전분과 물의 비율이 1:3.5인 경우에 전분의 결정화에 의한 효소저항전분의 형성이 잘 일어남을 알 수 있었다.

가열-냉각 처리 횟수에 따른 효소저항전분의 수율

가열-냉각 처리 횟수에 따른 효소저항전분의 수율을 효

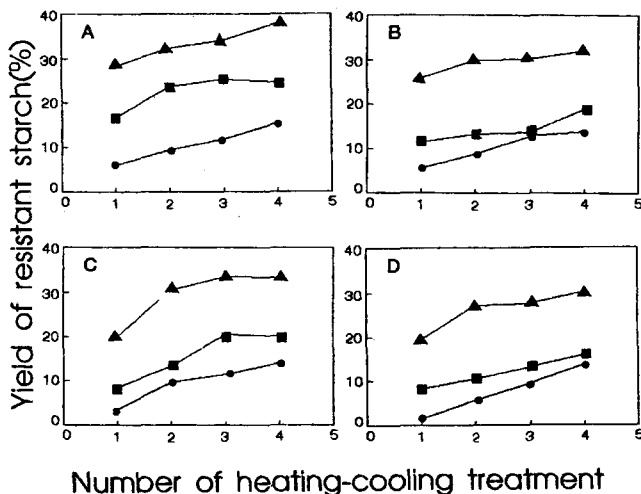


Fig. 3. Changes of resistant starch yield with number of heating-cooling treatment by enzymatic-gravimetric method. A: heated at 121°C with starch/water ratio(1:3.5); B: heated at 100°C with starch/water ratio(1:3.5); C: heated at 121°C with starch/water ratio(1:9); D: heated at 100°C with starch/water ratio(1:9); ●—●, PFP; ■—■, Amaizo 5; ▲—▲, Amylomaize VII.

소-중량법과 α -아밀라아제 효소법으로 분리한 결과를 Fig. 3, 4에 나타내었다.

효소-중량법으로 분리한 수율은 전분의 아밀로오스 함량에 따라 다른 결과를 보였는데 Amylomaize VII보다 아밀로오스 함량이 낮은 PFP와 Amaizo 5의 경우는 1회에서 4회까지 서서히 수율이 증가하였으며 4회 반복하면 14~25%의 수율을 보였다. 그러나 Amylomaize VII은 가열-냉각 횟수를 1회 하였을 때 20~28%로 초기에 급격한 증가를 보였다가 4회 반복 실시하면 30~38%로 그 증가정도는 크지 않았다. 121°C에서 전분과 물의 비율을 1:3.5로 하고 가열-냉각 횟수 1회 실시한 시료의 효소저항전분의 수율은 PFP, Amaizo 5, Amylomaize VII 각각 6.1%, 16.8%, 28.3%였으며 가열-냉각 처리 횟수를 4회 반복했을 때는 각각 15.4%, 25.2%, 37.8%로 Berry,¹⁾ Sievert와 Pomeranz²⁾가 보고한 생성율과 비슷한 수준이었다.

α -아밀라아제법으로 분리한 수율 역시 아밀로오스 함량에 따라 다른 결과를 보였는데, 아밀로오스 함량이 낮은 Amioca와 PFP는 가열-냉각 처리를 1회에서 4회까지 증가시킬수록 수율이 서서히 증가하여 4회 반복하면 12~33%의 수율을 나타내었으나, 아밀로오스 함량이 높은 Amylomaize VII 뿐만 아니라 Amaizo 5까지도 가열횟수를 1회 실시하였을 때 초기에 급격한 증가를 보여 45~62%의 수율을 보였으며 그 이후에는 증가정도가 완만하여 48~66%의 수율을 나타내었다. Miles 등²⁰⁾에 의하면 아밀로오스와 아밀로펙틴으로 이루어진 전분의 노화는 두 단계로 일어나며 초기에 아밀로오스가 배열의 변화를 가져오고 그 이후에 아밀로펙틴의 결정화가 천천히 일어난다고 하여, 아밀로오스 함량이 높은 고아밀로오스 전분인 Amylomaize VII와 Amaizo 5는 아밀로오스의 노화가 초기에 잘 일어나 가열-냉각 초기에 효소저항전분의 수율이 높은 것으로 여겨진다.

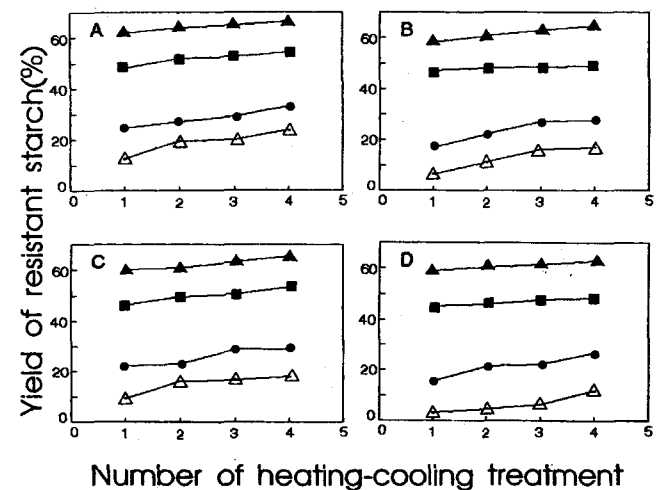


Fig. 4. Changes of resistant starch yield with number of heating-cooling treatment by α -amylase method. A: heated at 121°C with starch/water ratio(1:3.5); B: heated at 100°C with starch/water ratio(1:3.5); C: heated at 121°C with starch/water ratio(1:9); D: heated at 100°C with starch/water ratio(1:9); ●—●, PFP; ■—■, Amaizo 5; ▲—▲, Amylomaize VII.

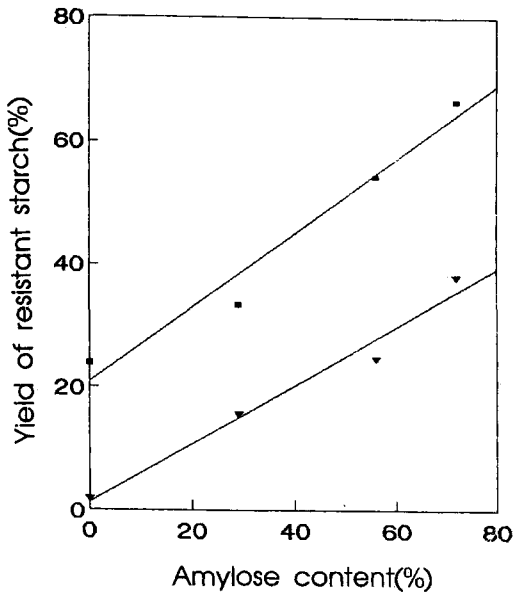


Fig. 5. Effect of amylose content on yield of resistant starch isolated after four heating-cooling treatment at 121°C with starch/water ratio (1:3.5). ▼—▼, enzymatic-gravimetric method; ■—■, α-amylase method.

Sievert와 Pomeranz²⁾는 아밀로오스 함량이 70%인 옥수수 전분을 가지고 가열-냉각 처리 횟수를 1회부터 20회까지 반복 실험했는데 4회까지 실시하면 효소저항전분의 수율이 30% 정도로 급격히 증가하다 그 이후에는 40%까지의 완만한 증가를 나타냈다고 보고하였고, Kingman과 Englyst²¹⁾도 가열-냉각 처리 횟수가 증가하면 효소저항전분 수율이 증가한다고 보고한 바 있다. 가열-냉각 처리 횟수는 효소저항전분을 제조할 때 경제적인 면에서 가격의 상승을 가져올 수 있으므로 가능하면 수율이 비슷하게 유지되는 조건에서 낮은 횟수를 선택하는 것이 바람직하다. 그래서 전분의 종류에 따라 효소저항전분의 수율과 가열-냉각 처리 횟수를 비교하여 최적의 조건을 선정하는 것이 바람직하다고 생각된다.

아밀로오스 함량에 따른 효소저항전분의 생성

효소저항전분의 수율이 높은 조건인 전분과 물의 비율이 1:3.5와 121°C에서 가열-냉각 처리를 4회 반복한 다음 얻은 결과를 아밀로오스 함량에 따라 비교한 결과는 Fig. 5와 같다. 효소-중량법으로 측정된 경우, 잘 옥수수 전분은 다른 조건에서는 0.1% 이하 수준밖에 효소저항전분을 얻을 수 없었지만 가열-냉각 처리 횟수를 4회 반복한 경우에는 1.8%의 효소저항전분을 얻었다. 효소저항전분의 수율은 Amioca, PFP, Amaizo 5, Amylomaize VII 각각 1.8%, 15.4%, 25.2%, 37.8%로 아밀로오스 함량이 증가할수록 증가하였다. 이는 Sievert와 Pomeranz²⁾가 아밀로오스 함량과 효소저항전분의 수율이 양의 상관관계를 보인다는 보고와 같았으며, Escarpa 등²²⁾도 potato amylose와 amylopectin을 조합하여 아밀로오스 함량을 0~100%로 증가시키면 효소저항전분의 수율이 7.61~36.51%로 증가하였다는 보고와 일치하였다. 아밀로오스 함량과 효소저항전분의 수율과의

상관계수 $r=0.988$ 로 높은 정상관계를 보였다. 효소-중량법과는 달리 α-아밀라아제법으로 분리하여 얻은 수율은 Amioca, PFP, Amaizo 5, Amylomaize VII 각각 23.9%, 33.4%, 54.3%, 66.6%였으며, 그 상관계수 $r=0.983$ 으로 효소-중량법에 의한 상관계수와 마찬가지로 높은 정상관계를 나타내었다.

수분함량과 가열-냉각 방법에 따른 효소저항전분의 수율을 효소-중량법과 α-아밀라아제를 사용한 효소법으로 비교한 결과 효소-중량법이 α-아밀라아제를 사용한 효소법보다 효소저항전분의 분리능이 더 크음을 알 수 있었고, 아밀로오스 함량이 높고, 가열-냉각 처리 횟수를 증가시키면 효소저항전분의 수율도 증가하였으며, 가열온도는 100°C보다 121°C에서, 수분함량은 전분과 물의 비율이 1:9보다 1:3.5의 조건에서 높은 수율 보였다.

감사의 글

이 연구는 1996년도 보건복지부 보건의료기술 연구과제 (과제번호 HMP-96-F-3-1015)에 의한 결과이며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Berry, C. S. (1986) Resistant Starch : Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *J. Cereal Sci.* **4**, 301-314.
- Sievert, D. and Y. Pomeranz (1989) Enzyme-resistant starch. I. Characterization and evaluation by enzymatic, thermoanalytical, and microscopic methods. *Cereal Chem.* **66**(4), 342-347.
- Eerlingen, R. C., M. Crombez and J. A. Delcour (1993) Enzyme-resistant starch. I. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. *Cereal Chem.* **70**(3), 339-344.
- Englyst, H. N., S. M. Kingman and J. H. Cummings (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* **46**, S33-S50.
- Alexander, R. J. (1995) Resistant starch - New ingredient for the food industry. *Cereal Foods World* **40**, 455, 458.
- Huang, D. P. (1995) New perspectives on starch and starch derivatives for snack applications. *Cereal Foods World* **40**, 528.
- Tsuge, H., E. Tatsumi, N. Ohtani and A. Nakazima (1992) Screening of α-amylase suitable for evaluating the degree of starch retrogradation. *starch* **44**, 29-32.
- Faisant, N., M. Champ, P. Colonna and A. Buléon (1993) Structural discrepancies in resistant starch obtained *in vivo* in humans and *in vitro*. *Carbohydr. Polymers* **21**, 205-209.
- 이신경, 문세훈, 신말식 (1997) 분리방법에 따른 효소저항전

- 분의 수율 비교. 한국식품과학회 **29**(2), 383-386.
10. Russell, P. L., C. S. Berry and P. Greenwell (1989) Characterisation of resistant starch from wheat and maize. *J. Cereal Sci.* **9**, 1-15.
 11. Leloup, V. M., P. Colonna and S. G. Ring (1992) Physico-chemical aspects of resistant starch. *J. Cereal Sci.* **16**, 253-266.
 12. Sievert, D., Z. Czuchajowska and Y. Pomeranz (1991) Enzyme-resistant starch. III. X-ray diffraction of autoclaved amylo maize VII starch and enzyme-resistant starch residues. *Cereal Chem.* **68**(1), 86-91.
 13. Eerlingen, R. C., G. Cillen and J. A. Delcour (1994) Enzyme-resistant starch. IV. Effect of endogenous lipids and added sodium dodecyl sulfate on formation of resistant starch. *Cereal Chem.* **71**(2), 170-177.
 14. Czuchajowska, Z., D. Sievert and Y. Pomeranz (1991) Enzyme-resistant starch. IV. Effects of complexing lipids. *Cereal Chem.* **68**(5), 537-542.
 15. Eerlingen, R. C., M. Deceuninck and J. A. Delcour (1993) Enzyme-resistant starch. II. Influence of amylose chain length on resistant starch formation. *Cereal Chem.* **70**(3), 345-350.
 16. A.O.A.C. (1990) *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Total dietary fiber in foods, enzymatic-gravimetric method, p.1105-1106 Washington, D.C. U.S.A.
 17. Zeleznak, K. J. and R. C. Hosney (1986) The role of the water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. *Cereal Chem.* **63**, 407-411.
 18. Levine, H. and L. Slade (1987) Recent development in industrial polysaccharides. p387-430 Gordon and Breach Science.
 19. Imberty, A. and S. Perez (1988) A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers* **27**, 1205-1221.
 20. Miles, M. J., V. J. Morris, P. D. Oxford and S. G. Ring (1985) The roles of amylose and amylopectin in the gelation, retrogradation of starch. *Carbohydr. Res.*, **135**, 271-281.
 21. Kingman, S. M. and H. N. Englyst (1994) The influence of food preparation methods on the *in-vitro* digestibility of starch in potatoes. *Food Chem.*, **49**, 181-186.
 22. Escarpa, A., M. C. González, E. Mañas, L. García-Diz and F. Saura-Calixto (1996) Resistant starch formation: Standardization of a high-pressure autoclave process. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 924-928.

Effect of Heating Conditions on the Resistant Starch Formation

Shin-Kyung Lee, Sae-Hun Mun, Mal-Shick Shin* (*Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea*)

Abstract : As corn starches with different amylose content were heated at different temperature (100°C, 121°C) with starch / water ratio (1 : 3.5, 1 : 9) and heating-cooling treatment was repeated up to 4 times, the yield of RS(resistant starch) from heated corn starches was investigated by the enzymatic-gravimetric method and the α -amylase treatment. Compared to α -amylase method, enzymatic-gravimetric method was more effective to hydrolyze the amorphous region of heated corn starch. With increasing the amylose content and the number of heating-cooling treatment, the yield of RS increased, regardless of isolation method. Heated corn starches formed at 121°C provided higher yield of RS than those formed at 100°C. Higher RS yield was also observed in the case of starch/water ratio (1 : 3.5) compared to the case of ratio (1 : 9).

Key words : resistant starch, corn starch, various heating methods

*Corresponding author