

식혜의 이소말토올리고당에 관한 연구(I) - 정제 및 구조해석 -

안 용 근

大阪市立大學 理學部 生物學科 酵素化學研究室
日本國 558 大阪市 住吉區 杉本 3-3-138

A Study on Sugars in Korean Sweet Rice Drink "Sikhye" (I) - Sugar Content and Its Composition -

Yong-Geun Ann

Laboratory of Enzyme Chemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Osaka City University,
Sugimoto 3-3-138, Sumiyoshi, Osaka, 558, Japan

Abstract

A Korean traditional sweet rice drink "Sikhye" was produced from the raw material of 20% of rice and 4% of malt supplemented with 2l of tap water, by incubating the mixture at 60°C for 7 hours. The product was found to contain 11.01% of maltose, 5.31% of isomaltooligosaccharides, 1.75% of maltotriose and 0.28% of glucose. Maltose, maltotriose and isomaltooligosaccharides in Sikhye were separated by ethanol (3 volume) precipitation repeated three times, followed by gel chromatography of Toyopearl HW-40S. ¹H-NMR analysis revealed that the products of G₂ and G₃ size had only α -1,4-glucosidic linkage. But isomaltooligosaccharides showed both signal of α -1,4- and α -1,6-glucosidic linkage with its estimation ratio of 5 : 1. Isomaltooligosaccharides were hydrolyzed to produce maltooligosaccharide series from maltose to maltohexaose by pullulanase. These results, suggest that isomaltooligosaccharides were constructed by maltohexaose main chain with maltose or maltotriose and maltotetraose side chain.

Key words : Korean Sikhye, sweet rice drink, isomaltooligosaccharides, limit dextrin.

서 론

식혜는 단일품목으로 음료 시장의 1위를 차지할 정도로 성장하였으나 성장율이 둔화 내지 저하하고 있다¹⁾.

본 연구자는 16종의 시판 식혜가 평균 10% 정도의 설탕을 함유하고, 환원당은 1%에 지나지 않기 때문에 전통식혜로 보기 힘들다고 문제를 제기한 바 있다²⁾. 그에 따라 본 연구자³⁾와 업체의 입장을 대변하는 한^{4,5)}과 논란이 있었다. 그러나 업체는 전통식혜를 개발하거나, 식혜의 가치를 발견하여 소비자들에게 어필할 수 있는 결과를 내놓지 않고 있다.

식혜는 엿기름의 β -아밀라아제(1,4- α -D-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2)와 α -아밀라아제(1,4- α -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1)가 쌀의 전분을 가수분해하여 생성된 말토오스와 한계덱스트린,

가수분해되지 않고 남은 밥알이 주성분으로 알려져 있다. 이들 성분은 구조와 조성상 인체 내에서 비피두스 인자, 식이섬유, 기타 여러가지 유효한 역할을 하게 되지만 보고된 바는 없다.

본 연구는 식혜의 주성분인 말토올리고당, 한계덱스트린 및 밥알의 영양적 가치와 역할을 밝히기 위해 식혜의 당성분을 분리 정제하고, 구조를 분석한 결과이다.

재료 및 방법

1. 식혜 제조

전보의 방법⁶⁾에 따라 쌀 20%, 엿기름 4% 농도로 하여 60°C에서 7시간 당화시켰고, 당화중 1시간마다 샘플을 취해 HPLC 및 TLC 분석하였다.

2. 알코올 침전

원심분리하여 밀리포어로 거른 식혜 20ml에 에틸알코올 60ml를 가하여 4℃에서 12시간 방치한 다음 원심분리하여 상정액은 회전진공증발기로 농축하여 크로마토그래피하였다. 침전은 동결건조하여 한계텍스트린으로 하였다.

3. 밥알

밥알을 걸러 증류수 중에 5시간 침지한 다음 다시 거르는 조작을 10회 반복하여 용해성 당을 제거한 다음 동결건조하여 분말로 분쇄하였다.

4. 겔 크로마토그래피

동결건조한 식혜 알코올침전 상정액 377mg을 1ml의 물에 녹여 Toyopearl HW-40S(3.5 × 85cm) 컬럼에 가하여 증류수로 5ml씩 분취하였다. 분취액의 당함량은 페놀-황산법⁷⁾으로 측정하였다. 각 당 피크는 TLC와 HPLC로 확인하여 균일한 부분을 모아 NMR 분석하였다.

5. 한계텍스트린의 pullulanase 가수분해

Pullulanase는 일본 아마노제약(天野製藥) Enzyme CK-20L (1,000unit/ml)을 0.05M 아세트산 완충액(pH 5.5)에 10배 희석하여 사용하였다. 효소액 0.5ml에 한계텍스트린 2% 용액 0.5ml를 가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 다음 끓는 물에서 3분간 효소를 변성시킨 후 원심분리하여 상정액을 분석하였다.

6. ¹H-NMR

시료 2mg을 D₂O 1ml에 녹여서 JEROGX-400 NMR spectrometer로 40℃, 400MHz에서 분석하였다. 표준물질로 sodium-4,4-dimethyl-4-sila-pentane sulfonate를 사용하여 화학적 시프트를 측정하였다.

7. HPLC

당분석에 사용한 HPLC 펌프는 Shimadzu LC-6A, 적산기는 Shimadzu Chromatopak G-R3A, 검출기는 글질올 검출기 Knauer 98.00, 컬럼은 Shimpack SCR 101N, 컬럼오븐은 Shimadzu CTO-6A를 사용하여 유속 1ml/min, 60℃에서 증류수를 용매로 분석하였다.

8. TLC

실리카겔 유리판(20 × 20cm)에 당 시료 1~5 g을 찍어서 n-butanol : ethylacetate : ether(7 : 1 : 2)

용매로 37℃에서 세 시간 전개시킨 다음 1% orcinol을 함유한 50% 황산 용액을 분무하여 100℃에서 5분간 발색시켰다.

9. 총당 및 단백질 함량

총당은 밥알 분말 2% 현탁액을 희석하여 페놀-황산법⁷⁾으로 정량하였다.

단백질 함량은 밥알 분말을 0.1N NaOH 용액에 2% 현탁하여 100℃에서 3분간 가용화시킨 다음 희석하여 Lowry-Folin법⁸⁾으로 측정하였다. 단백질 표준품으로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 식혜 제조

쌀 20%, 엿기름 4%를 사용하여 7시간 당화시킨 식혜는 Fig. 1 및 2와 같이 3시간까지 당이 직선적으로 증가하였으나 그 후는 약간 완만하게 증가하였다. 가장 많이 생성된 당은 말토오스이고, 그 다음 한계텍스트린, 말트트리오스, 글루코오스의 순을 나타냈다. TLC로 한계텍스트린은 말토옥타오스 이상의 크기를 나타냈다 (Fig. 1, 2).

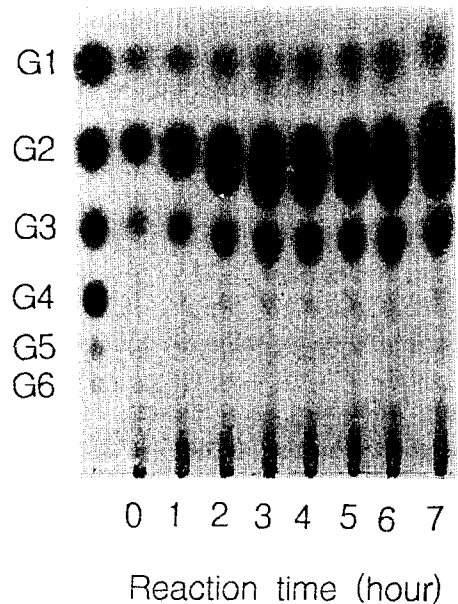


Fig. 1. TLC of sugars in Sikhye. Reaction mixture contained 20% rice and 4% malt. The reaction mixture was incubated at 60℃ for 7 hour, the samples were taken out at one hour intervals as indicated, and applied TLC plate.

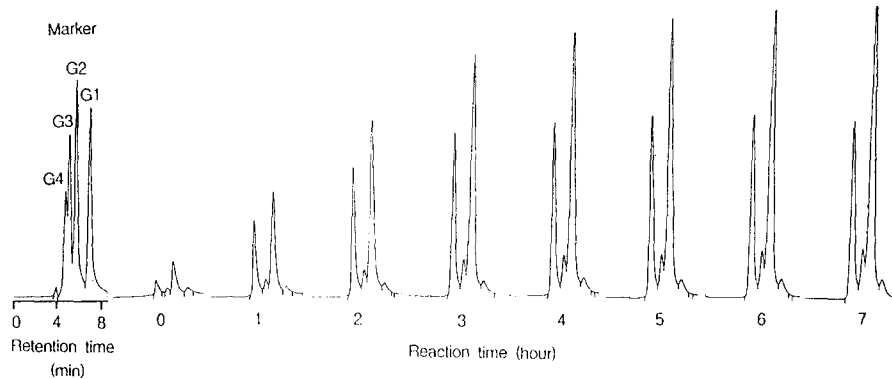


Fig. 2. HPLC of sugars in Sikhye. Reaction conditions were the same as in Fig. 1.

Table 1. Changes of sugars in the product of Sikhye with time of reaction

Sugar	Time	(unit : %)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
G ₁		0.09	0.10	0.15	0.20	0.23	0.25	0.27	0.28
G ₂		0.86	3.25	6.10	8.00	9.26	10.0	10.76	11.01
G ₃			0.48	0.91	1.20	1.40	1.44	1.64	1.75
Limit dextrin		0.32	1.95	3.40	4.40	4.74	5.13	5.19	5.31
Total		1.27	5.78	10.56	13.80	15.63	16.78	17.86	18.35

7시간 당화시킨 식혜는 Table 1과 같이 말토오스 211.01%, 한계덱스트린 5.31%, 말트트리오스 1.75%, 글루코오스 0.28%를 나타냈다. 엿기름의 당함량을 빼면 당화되지 않고 남은 밥알은 2.51%이지만 엿기름의 가수분해되지 않은 거성분까지 합하면 약 3.5%가 고형분으로 남은 것으로 계산되며, 밥알의 총당은 33.4%, 단백질 함량은 3.5%가 고형분으로 남은 것으로 계산되며, 밥알의 총당은 33.4%, 단백질 함량은 30.8%를 나타냈다(Table 1).

한편, 본 연구자는 같은 조건에서 5시간 당화하여 만든 식혜의 총당은 17.1%, 환원당은 11.2%, 단백질은 0.34mg/ml, 아미노산은 4.7 μ mol/ml로 보고한 바 있다⁶⁾.

엿기름만으로 만든 식혜의 환원당은 사용 재료량에 따라 다르지만 문 등⁹⁾이 12.38%, 13.62%, 최¹⁰⁾가 15.53%, 최 등¹¹⁾이 11.98%, 김 등¹²⁾이 8.91%, 이 등¹³⁾이 23%, 박¹⁴⁾은 찹쌀로는 24.6%, 멥쌀로는 19.5%를 보고하였다.

그러나 각 당의 조성별 함량을 보고한 결과는 없다. 환원당 정량법으로는 글루코오스, 말토오스 및 말토올리고당을 구분하여 정량할 수 없기 때문이다.

한계덱스트린이나 밥알의 조성에 대한 보고도 없다.

2. 당성분의 분리

Toyopearl HW-40S로 식혜의 알코올침전 상정액을 겔 크로마토그래피하여 G₁, G₂, G₃를 분리 정제하였다(Fig. 3). 이들은 TLC 및 HPLC로 확인한 결과 균일한 것으로 나타났다(Fig. 4). 소량 혼합되어 있던 분자량이 큰 말토올리고당은 시험관 70~90 사이에 유출되어 말토펙타오스 내지 말토옥타오스의 크기를 나타냈다(Fig. 3, 81).

3. 구조 해석

식혜는 α -아밀라아제와 β -아밀라아제가 함께 작용하기 때문에 어떤 말토올리고당이 생성되는지 밝혀진 바 없다. 그래서 생성된 G₂와 G₃가 말토오스 및 말트트리오스인지, α -1,6-결합을 갖는 이소말토오스(G₂)나 이소말트트리오스 또는 판노오스(G₃)인지 밝히기 위해 ¹H-NMR 분석한 결과, G₂와 G₃ 모두 α -1,4-글루코시드 결합의 시그널만 나타내 α -1,4-글루코시드 결합만으로 이루어진 말토오스와 말트트리오스로 밝혀졌다(Fig. 5).

한계덱스트린은 α -1,4-글루코시드 결합 시그널과 α -1,6-글루코시드 결합 시그널 모두 나타났다. α -1,4-글루코시드 결합은 α -1,6-글루코시드 결합의 5배를 나타내 기본적으로 α -1,4-글루코시드 결합 글루코오스 6잔 기 사슬에 α -1,6-글루코시드 결합 결사슬이 하나 결합되어 있는 것으로 분석되었다¹⁵⁾(Fig. 5).

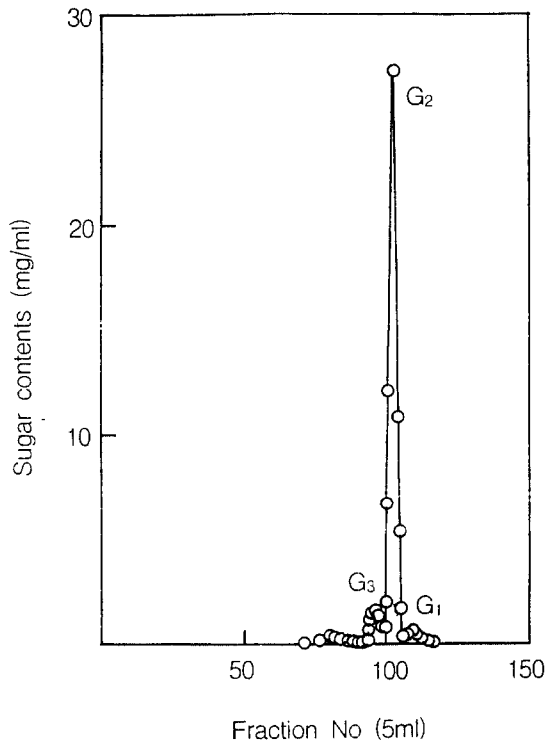


Fig. 3. Gel chromatography of the supernatant from ethanol fractionation of Sikhye on a column of Toyopearl HW-40S. Column size, 3.5 × 85cm ; elute. distilled water.

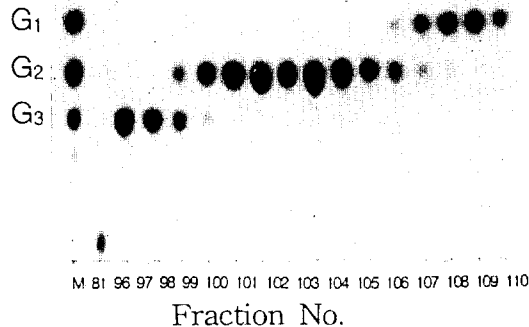


Fig. 4. TLC of sugars fractionated by gel chromatography of Sikhye on Toyopearl HW-40S.

한계덱스트린은 TLC 분석으로 말토옥타오스 이상 크기를 나타냈으나 pullulanase로 α -1,6-글루코시드 결합을 모두 가수분해한 결과, 말토오스에서 말토헥사오스까지의 분포를 나타냈다(Fig. 6). 그 중 말토헥사오

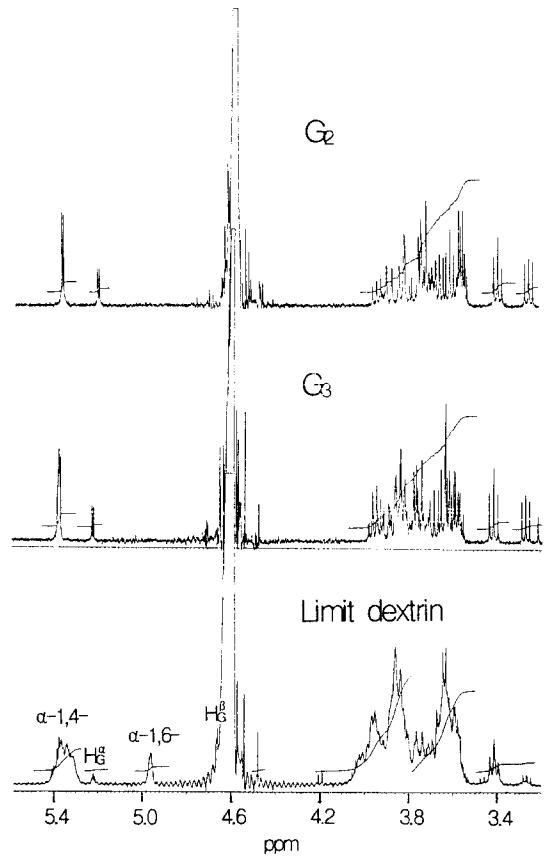


Fig. 5. ³H-NMR analysis of maltose, maltotriose and limit dextrin from Sikhye. The samples were analyzed by JERO-GX-400NMR spectrophotometer operating at 400MHz in D₂O at 40°C. Chemical shifts were measured with sodium-4,4-dimethyl-4-sila-pentane sulfonate (DSS) as an internal standard.

스와 말토트리오스 양이 가장 많기 때문에 NMR 결과를 바탕으로, 평균적으로 말토헥사오스 주사슬 하나에 말토오스에서 말토펀타오스가 두 분자 결사슬로 결합된 구조로 나타난다.

β -아밀라아제 단독 작용으로 만들어진 한계덱스트린은 이보다 분자량이 크고, 인체에서 α -아밀라아제와 α -글루코시다아제의 작용을 받으면 상당히 가수분해된다. 그러나, 식혜의 한계덱스트린은 엿기름의 α -아밀라아제와 α -아밀라아제의 작용을 함께 받아 더 이상 가수분해되기 힘든 상태까지 가수분해되고 남은 토막으로, 이상의 분석 결과 한계덱스트린이라기보다 이소말토올리고당이라고 하는 것이 옳다. 그래서 인체의 아밀라아제가 가수분해하기 힘들기 때문에 소장에서도 소화 흡

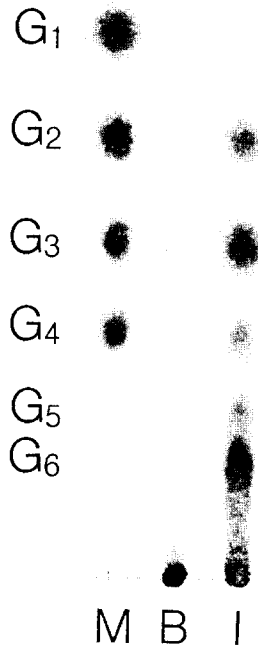


Fig. 6. Hydrolysis of isomaltooligosaccharides from Sikhye by pullulanase. Reaction mixture contained 100units of pullulanase, 2% of isomaltooligosaccharides from Sikhye in 1 ml of 0.5M acetate buffer(pH 5.5). The reaction mixture was incubated at 37°C for 1 hour. M, markers ; B, isomaltooligosaccharide blank ; I, isomaltooligosaccharide + pullulanase.

수 되지 않고 대장까지 이르러 비피두스균이 영양원으로 이용하게 된다.

밥알에 함유된 당은 잘 녹지 않아 NMR 분석하지 못하였다.

요 약

쌀 20%, 엿기름 4%를 가하여 7시간 동안 당화시켜 제조한 식혜는 말토오스 11.01%, 이소말토올리고당 5.31%, 말토트리오스 1.75%, 글루코오스 0.28%를 나타냈다. 알코올침전, Toyopearl HW-40S의 겔 크로마토그래피로 식혜의 이소말토올리고당, 말토오스, 말토트리오스를 분리 정제하였다. NMR 분석 결과 말토오스와 말토트리오스는 α -1,4-글루코시드 결합만으로 이

루어졌고, 이소말토올리고당은 α -1,4-글루코시드 결합과 α -1,6-글루코시드 결합이 5 : 1로 이루어진 것으로 나타났다. 이소말토올리고당을 pullulanase 처리한 결과 말토오스와 말토헥사오스까지의 분포를 나타냈다.

알 린

본 연구는 大阪市立大學 理學部 生物學科 酵素化學研究室의 南浦能至 교수와 飯塚勝 교수의 協力과 支援으로 이루어졌다. 당의 구조해석은 飯塚勝교수의 도움을 받았다. 이에 감사드린다.

참고문헌

1. 김상경 : 식혜 음료시장 석권 눈앞, 보건의신문 3025호, 38면 (1995. 12. 7).
2. 안용근, 이석건 : 시판 식혜에 관한 연구, *한국식품영양학회지*, **8**, 165~171 (1995).
3. 안용근, 이석건 : 전통식혜 및 시판식혜의 역사적 고찰 및 정의, *한국식품영양학회지*, **9**, 37~44 (1996).
4. 한역 : 쌀이용 전통음료의 산업화와 발전방향, 전통식품의 현황과 품질개선 심포지움논문집, *한국식품과학회*, 169~196 (1995. 11. 15).
5. 한역 : 소위 설탕물 식혜에 관한 의견, 한국식품개발연구원 (1995. 11. 15).
6. 안용근 : 전통식혜 제조, (주)비락식혜 위탁연구 결과보고서 (1996).
7. Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350~356 (1956).
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
9. 문수재, 조혜정 : 식혜에 대한 조리과학적 연구, *대한가정학회지*, **16**, 43~49 (1978).
10. 최청 : 전통 안동식혜의 제조공정 확립 및 품질개선, 전통식품의 현황과 품질개선, 한국식품과학회 심포지움 발표 논문집, 199~222 (1995. 11. 15).
11. 최청, 석호분, 조영제, 임성일, 이우제 : 전통 안동식혜의 제조공정 확립에 관한 연구, *한국식품과학회지*, **22**, 724~731 (1990).
12. 김복선, 이택수, 이명환 : 식혜의 당화과정중 성분 변화, *한국산업미생물학회지*, **12**, 125~129 (1984).
13. 이효지, 전희정 : 식혜 제조의 과학적인 연구, *대한가정학회지*, **14**, 195~203 (1976).
14. 박성인 : 식혜제조 과정에 있어서의 맥아 효소작용에 대한 효소학적 연구, 고려대학교 식량개발대학원 석사학위 논문 (1986).
15. 飯塚 勝 : 糖質の種類と分布, 糖質の科學, 新家龍, 南浦能至, 北畑壽美雄, 大西正健編, 朝倉書店 p8~24 (1996).

(1997년 3월 12일 접수)