KOREAN J. SOC. FOOD SCI.
Vol. 14, No. 3, August, 1998

증편 제조시 콩물과 반죽 내의 α-amylase 활성 및 특성에 관한 연구

나한나* · 윤 선 · 김정수 · 김보영
연세대학교 식품영양학과, *연세대학교 영동세브란스병원 영양과

The Activity and Characteristics of α-Amylase Present in Soy Milk and Jeungpyun Batters

Han Na Na*, Sun Yoon, Jung Soo Kim and Bo Young Kim
Department Food and Nutrition, Yonsei University,
**Department Dietetics, Youngdong Sevrans Hospital*

Abstract

The activity and characteristics of α-amylase in soy milk as well as in Jeungpyun batters were determined to investigate the enzyme system related to Jeungpyun preparation. α-Amylase activity was detected in soy milk as well as in Jeungpyun batters. Soy milk had α-amylase activity of 0.79 units/mg protein for gelatinized starch and 0.036 units/mg protein for raw starch. α-Amylase in soy milk showed maximum activities at pH 5.92~6.87 and at 60°C for both gelatinized starch and raw starch. α-Amylase activities of Jeungpyun batters containing soy milk were 25.59 units/mg protein for gelatinized starch and 1.37 units/mg protein for raw starch. Jeungpyun batters without soy milk demonstrated α-amylase activities of 3.37 units/mg protein for gelatinized starch and 0.49 units/mg protein for raw starch. α-Amylase of Jeungpyun batters showed an optimal activity at pH 5.25 and at 60°C for both gelatinized and raw starch. The results demonstrated that Jeungpyun batters with soy milk showed significantly higher α-amylase activity than the ones without soy milk.

Key words: Jeungpyun, Soy milk, α-Amylase, Fermentation

I. 서 론

증편은 쌀가루에 탁주를 첨가하여 발효시켜 만든 떡의 일종[1]으로, 다른 떡에서는 볼 수 없는 해면 상의 조직과 풍미를 가지고 있으며, 소화가 잘되고, 잘 쉬지 않으며, 노화 속도가 느려[2] 저장성이 높은 우수한 전통 식품이다. 이러한 장점에도 불구하고 증편은 발효 기법이 까다롭고 제조 시간이 길어 그 이용도는 오히려 점점 떨어지고 있는 실정이다[3].

증편에 관한 여러 연구들에 의하면, 특히 콩물이 부재료로 쓰일 때 증편의 품질 향상과 노화 지연에 효과가 있는 것으로 나타났다[4,5,6]. 최[6] 등의 연구에 의하면 콩물의 첨가는 증편의 단맛의 정도를 강하게 하고, hardness를 낮춰주며, 4°C 저장시 노화가 지연되는 효과가 있었다.

나[7] 등도 콩물의 첨가가 증편 반죽의 팽창률을 증가시키고 저장 중 질감의 변화를 지연시키는 효과가 있었음을 보고하였다.

또한 증편 제조시 막걸리 대신 대표적인 전분 분해 효소원인 엿기름이나 콩물을 발효 원으로 사용한 것도 볼 수 있는데[8], 이는 증편 제조시 전분 분해 효소 작용이 중요하다는 것을 보여주는 것으로 여겨진다. 그러나 볶은 콩을 절편에 5% 첨가했을 때는 콩 첨가가 노화 지연에 영향을 주지 않았다[9]. 이러한 결과는 증편 제조에 사용되는 콩물은 특히 전분 분해 효소 원으로 작용하여 전분 구조에 변화를 주어 발효 특성과 노화 속도에 영향을 미칠 것으로 추측된다.

이에 본 연구에서는 콩물과 증편 반죽 내에 존재하는 효소들을 탐색하고, 그 특성과 활성을 측정함으로써 증편 발효에 적당한 효소 system을 규명하고자 한다. 이는 증편의 발효 공정을 단축시키고, 품질 관리가 용이한, 대량 생산 체제에 맞는 증편 제조 기법 개발에 중요한 정보를 제공할 것이다.

II. 재료 및 실험 방법

1. 실험재료 및 증편의 제조

쌀가루는 쌀을 상온에서 2시간 수침한 후 체에 받쳐

표 1. 증편 제조의 recipe

(g)

시료번호	쌀가루	소금	탁주	콩물	설탕	물
T1	100	0.8	20	10	20	40
T2	100	0.8	20	10	10+10*	40
T3	100	0.8	20	0	20	50
T4	100	0.8	20	0	10+10*	50

*2차 발효 후에 첨가

2시간 방치하여 물빼기를 한 후 제분하여 준비하였다. 콩은 횡성産 백태를 물에 불려 껍질을 제거하고 건조중량 3배의 물을 첨가하여 믹서로 30초간 갈고 30초간 쉬는 과정을 5번 반복하였다. 갈은 콩을 체로 받쳐 콩물을 얻었다.

증편의 제조법은 나[7] 등의 방법을 사용하였다.

콩물 첨가의 효과와 설탕 첨가 시기의 영향을 연구하기 위해 두 요인을 조합한 총 4 실험군을 결정하였다.

2. 콩물과 증편 반죽 α-amylase의 특성 측정

(1) 효소의 추출

증편 반죽에서 효소를 추출하기 위하여 발효 시작 후 0시간, 2시간, 4시간, 1차 발효 후, 2차 발효 후, 3차 발효 후에 각각의 시료를 30 g씩 취하고 0.006 M의 NaCl을 포함한 pH 6.9 0.02 M sodium phosphate buffer를 가하여 8,000 rpm에서 30분간 원심 분리하였다. 상층 액을 취하여 70% ammonium sulfate을 서서히 첨가하여 단백질을 침전시키고[10] 원심 분리하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 buffer에 녹인 후 원심 분리하고 상층 액을 취하여 dialysis sacks에 넣고 24시간 투석하였다[11,12]. 염이 제거된 액을 증편 반죽의 조효소 액으로 하였다.

콩물과 막걸리의 조효소 액은 콩물 40 g을 취하여 0.006 M의 NaCl을 포함한 pH 6.9 0.02 M sodium phosphate buffer를 200 ml 가하고 원심 분리한 후 상층 액을 조효소 액으로 사용하였다.

(2) 증편 발효 중의 α-amylase 활성 변화 측정

발효 시작 후 0시간, 2시간, 4시간, 1차 발효 후, 2차 발효 후, 3차 발효 후에 취한 시료로부터 추출한 증편 효소 용액에 대해 α-amylase 활성을 측정하였다[13]. 기질은 생전분과 호화전분을 각각 pH 6.9 0.02 M sodium phosphate buffer를 사용하여 1% 용액으로 하였다. 먼저 효소용액 0.5 ml를 시험관에 넣고 기질과 함께 25°C에서 5분간 반응시킨 후 1 ml의 DNS를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 100°C의 water bath에서 5분간 incubation 한 후 실온으로 식으면 증류수 10 ml를 넣어 잘 섞은 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 반응 sample에 대해 각각의 blank를 만들었으며, blank는 효소 용액에 기질 용액보다 DNS를 먼저 넣어 효소를 불활성화시키는 방법으로 만들었다. 환원당량과 흡광도 간의 표준 곡선은 maltose를 사용하여 작성하였다. 단백질 량은 Bradford 법에 기초한 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하였다. 단백질의 표준 곡선은 BSA(Bovine Serum Albumin)을 이용하여 작성하였다.

(3) 콩물과 막걸리, 증편 반죽 내의 α-amylase 활성 및 특성 측정

생전분과 호화전분을 기질로 하여 콩물과 막걸리, 증편 반죽 내의 조효소 액을 사용하여 α-amylase 활성을 측정하였다.

pH 변화에 따른 α-amylase의 활성 변화는 pH 3-11까지의 buffer 용액을 제조하여 생전분과 호화전분에 첨가한 후 각각의 pH에서 α-amylase 활성을 측정하였다.

온도 변화에 따른 콩물과 막걸리, 증편 반죽의 효소 활성은 pre-incubation과 incubation 동안의 온도를 각각 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C로 다르게 한 후 기질로 생전분과 호화전분을 써서 α-amylase 활성을 측정하였다.

3. 통계처리

각 실험의 결과는 3회 반복 실험을 통하여 얻었고, 효소 활성은 repeated measure ANOVA를 이용하여 처리하였다[14]. 필요한 경우 SNK 다중비교법에 의해 차이를 규명하였다. 모든 분석은 SAS package를 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 콩물 α-amylase의 활성 및 특성

콩물에는 생전분과 호화전분을 기질로 사용하는 α-amylase의 활성이 있음이 밝혀졌다(표 2, 표 3).

표 2. 온도 변화에 따른 콩물 α-amylase의 활성 변화

평균±표준편차, Units/mg protein

기질	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C
호화전분	0.57±0.09	1.07±0.13	1.37±0.20	1.72±0.18	1.87±0.17	1.61±0.04
생전분	0.036±0.41	0.045±1.37	0.075±1.75	0.21±1.06	0.27±0.75	0.20±0.40

표 3. pH 변화에 따른 콩물 α-amylase의 활성 변화

평균±표준편차, Units/mg protein

기질	pH 3.62	pH 5.25	pH 5.92	pH 6.87	pH 7.05	pH 7.41	pH 10.70
호화전분	0.37±0.03	0.46±0.01	0.51±0.01	0.48±0.01	0.47±0.00	0.46±0.02	0.17±0.01
생전분	0.036±0.41	0.045±1.37	0.075±1.75	0.21±1.06	0.27±0.75	0.20±0.40	0.020±0.00

콩물에 존재하는 α-amylase는 호화전분과 생전분을 기질로 하였을 때 활성을 나타냈으며, 호화전분에 대한 α-amylase 활성은 0.79±0.018 units, 생전분에 대한 활성은 0.036±0.004 units이었다. 콩물의 α-amylase 활성은 호화전분을 기질로 사용하였을 때 생전분보다 약 22배 가량 높은 것으로 나타났다. 한편, 콩물을 첨가한 반죽에서의 α-Amylase 활성은 대조군에 비해 생전분 분해력은 3배, 호화전분 분해력은 7.6배이었다. 따라서 콩물의 첨가는 증편 반죽 내의 생전분과 호화전분 분해효소 활성을 증가시킴을 보여주고 있다.

pH 변화에 따른 콩물의 α-amylase 활성변화는 호화전분에 대해서는 pH 5.92 부근에서 최대였으며 생전분에 대한 활성은 pH 5.92-6.87에서 최대였다.

콩물 α-amylase는 기질에 관계없이 60°C 부근에서 최대 활성을 나타냈다.

2. 증편 반죽 내의 α-amylase의 활성 및 특성

(1) 기질에 대한 증편 반죽 α-amylase의 특성

반죽 내의 α-amylase는 4가지 반죽에서 모두 호화전분에 대한 활성도가 높고 생전분에 대한 활성도는 호화전분에 대한 활성도보다 낮았다($p<.05$). 콩물을 첨가한 반죽의 호화전분에 대한 α-amylase 비활성도는 평균 25.59 units/mg protein이었고 생전분에 대한 α-amylase 비활성도는 평균 1.37 units/mg protein이었다. 콩물을 첨가하지 않은 반죽에서의 호화전분과 생전분에 대한 α-amylase 비활성도는 각각 3.37 units/mg protein과 0.49 units/mg protein이었다. 콩물 첨가군의 경우 호화전분에 대한 활성도가 생전분에 대한 활성도보다 약 18.7배 높았고, 콩물을 첨가하지 않은 군의 경우에는 약 6.9배가 높았다. 따라서 콩물은 반죽의 생전분 분해와 호화전분 분해를 촉진시키는 것으로 보인다. 또한, 콩물을 첨가한 반죽과 그렇지 않은 군간에서 생전분 분해효소의 활성도가 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났으며($p<.05$), 따라서 콩물은 반죽 내의 생전분 분해 효소 활성을 증가시키는 역할을 하는 것으로 풀이된다.

(2) 발효 진행 중 증편 반죽 α-amylase의 활성 변화

증편 반죽 내의 α-amylase의 활성은 발효 시간에 대해 일정한 경향을 가지고 있지 않았다(표 4, 표 5). 콩물을 첨가한 반죽의 호화전분에 대한 α-amylase 비활성도는 4가지의 반죽에서 모두 호화전분에 대한 활성도가 높고 생전분에 대한 활성도는 호화전분에 대한 활성도보다 낮았다($p<.05$).

α-amylase의 활성은 콩물을 첨가한 군에서 그렇지 않은 군에 비해 높았으며, 이는 α-amylase의 활성이 거의 콩물에 기인했기 때문인 것으로 보인다. 본 연구 결과, 막걸리 α-amylase의 생전분에 대한 비활성도는 1.37±0.38 units/mg protein이었고, 호화전분에 대한 비활성도는 0.02±0.02 units/mg protein이었다. 따라서, 콩물을 첨가하지 않은 군의 α-amylase 활성은 탁

표 4. 발효 진행에 따른 증편 반죽 α-amylase의 호화전분에 대한 활성 변화

평균±표준편차, Units/mg protein

시료번호	0시간	2시간	4시간	1차 발효 후	2차 발효 후	3차 발효 후
T1	27.12±1.89	20.26±2.86	23.11±1.62	17.53±1.00	19.24±1.03	24.16±1.64
T2	34.61±5.76	31.91±2.43	21.63±2.45	39.47±16.86	22.65±6.01	25.39±6.10
T3	4.21±0.93	1.77±0.86	-	3.86±0.23	2.56±1.84	2.62±1.03
T4	3.30±0.95	3.74±0.93	-	3.75±0.83	4.45±1.65	3.50±1.15

표 5. 발효 진행에 따른 증편 반죽 α-amylase의 생전분에 대한 활성 변화

평균±표준편차, Units/mg protein

시료번호	0시간	2시간	4시간	1차 발효 후	2차 발효 후	3차 발효 후
T1	0.93±0.34	0.77±0.25	0.83±0.01	0.67±0.21	0.80±0.21	1.57±0.01
T2	1.72±0.49	1.38±0.81	0.77±0.54	0.97±0.00	1.47±0.51	1.31±0.93
T3	0.80±0.13	0.52±0.06	-	0.30±0.14	0.09±0.01	0.11±0.04
T4	1.78±1.17	0.32±0.21	-	0.14±0.06	0.12±0.03	0.12±0.10

주에서 기인한 것으로 보이며 탁주는 특히 생전분 분해 효소의 급원이 되고 있음을 볼 수 있다. 강[15]은 쌀가루 1 g당 2.43 units의 α-amylase 활성이 있다고 하였으며 탁주 첨가시 9~17배의 활성 증가가 나타났다고 하였다. 또한 발효가 진행되면서 α-amylase의 활성은 발효 10시간까지 증가하다가 그 이후로는 감소하는 경향을 나타내었다고 보고하였다. 이 결과는, 반죽의 발효 시간과 α-amylase의 활성 변화간에는 뚜렷한 상과관계가 없었던 본 연구의 결과와는 달랐다. 다만, 콩물을 첨가한 군과, 설탕 첨가 분량의 1/2만 처음에 첨가한 군에서 그렇지 않은 군에 비해 α-amylase 활성도가 유의적으로 높았다. 따라서 증편 반죽 내에서의 α-amylase는 specific activity의 크기보다는 긴 반응 시간 동안 충분한 기질이 작용함으로써 효과를 나타내는 것으로 해석된다. 탁주에 존재하는 미생물인 *Aspergillus sp.*나 *Rhizopus sp.*는 당화 효소를 생산해 내는 것으로 알려져 있다[16]. 또한 이런 미생물들은 생전분 분해 활성이 있는 것으로 보고된 바 있다[17,18]. 본 실험의 결과에서 콩물을 첨가한 반죽과 그렇지 않은 반죽에서 추출한 효소 액의 생전분에 대한 활성 차이가 호화전분에 대한 활성 차이보다 적은 것은 이러한 이유에서 비롯된 것이라 생각된다. 한편, 발효 초기에는 설탕이 미생물 증식의 starter가 되고 발효가 진행되면서 α-amylase에 의해 생성된 maltose나 glucose도 미생물의 영양분으로 이용되는 것으로 보인다. α-amylase는 전분 분자 내의 amylose를 분해하여 glucose 6, 7, 8개 정도로 구성된 dextrin류를 형성하며 이 dextrin류는 계속 효소 작용을 받아 곧 maltose, maltotriose와 직쇄 oligosaccharide인 maltotetraose들을 형성한다. 이와 같이 전분 분자의 구조 변화를 일으키는 α-amylase의 활성은 증편의 발효 과정의 이화학적 변화 양상, 증편의 질감 및 저장 중의 품질 변화에도 영향을 미치는 주요 요인이 될 것으로 생각된다.

(3) 온도 변화에 따른 증편 반죽 α-amylase의 활성 변화

온도 변화에 따른 증편 반죽의 α-amylase의 활성은 호화전분에 대해서는 50~60°C, 생전분에 대해서는 50°C에서 최대 활성을 나타냈다. 호화 전분에 대한 활성은 50°C와 60°C에서 비슷한 값을 나타냈다(표 6). 따라서 한 가지의 효소가 약 10~20°C 범위에서 최대 활성을 나타내고 있는 것인지 혹은 두 가지 효소의 활성이 중첩되어 보여지는 현상인지는 확인하지 못하였으나 증편 반죽에는 콩물의 α-amylase 뿐 아니라 미생물 증식시 생성되는 또 다른 종류의 α-amylase가 있을 것으로 생각된다. 반죽의 발효시의 적정 온도는 많은 실험을 통하여 30~35°C로 나타났으며 이 온도는 α-amylase의 최적 활성 온도와는 많은 차이가 나는 것을 볼 수 있다. 그러나 증편 발효시의 온도는 α-amylase의 활성과 함께 탁주 내 미생물의 최적 생육 온도를 선택하는 것이 중요하며, 발효와 증편 질감 형성에 필요한 반죽 내의 여러 변화들이 고루 잘 일어날 수 있는 온도가 필요하며 그 온도가 30°C이라 할 수 있겠다. 탁주 내의 주요 미생물인 *Aspergillus oryzae* 등의 곰팡이의 최적 생육 온도는 25~30°C로 알려져 있다[19].

(4) pH 변화에 따른 증편 반죽 α-amylase의 활성 변화

콩물을 첨가한 증편 반죽에서 추출한 효소 액의 pH 변화에 따른 α-amylase 활성 변화는 표 7에 나타내었다. 호화전분에 대한 이 효소 액의 최적 pH는 약 pH 5였다. 생전분에 대한 활성 최적 pH는 4.5 정도이며 6.7 부근에서 다시 활성이 높아지는 것으로 나타났다. 두류에서 발견되는 α-amylase의 최적 pH는 5.0~5.5이며 *Asp. oryzae, Asp. niger*의 경우는 4.9~5.2이고 *Rhizopus oryzae*의 생전분 분해 효소의 최적 pH는 4.0~5.0으로 알려져 있다. 이러한 보고들을 볼 때 생전분

표 6. 온도 변화에 따른 증편 반죽 α-amylase의 활성 변화

평균±표준편차, Units/mg protein

기질	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C
호화전분	15.30±0.01	24.03±0.00	36.98±0.01	45.45±0.04	45.72±0.01	23.97±0.04
생전분	0.23±0.03	0.61±0.03	1.42±0.09	2.20±0.20	1.79±0.21	2.02±0.18

표 7. pH 변화에 따른 증편 반죽 α-amylase의 활성 변화

평균±표준편차, Units/mg protein

기질	pH 3.62	pH 5.25	pH 5.92	pH 6.87	pH 7.05	pH 7.41	pH 10.70
호화전분	6.96±0.33	9.92±0.30	9.81±0.10	9.15±2.63	8.30±0.54	7.89±0.11	1.26±0.06
생전분	0.56±0.01	0.59±0.12	0.43±0.01	0.47±0.10	0.51±0.02	0.49±0.09	-

분해 효소는 콩물 뿐만 아니라 탁주에 있는 미생물들에 의해서도 생성되는 것으로 보인다. 따라서 콩물의 α-amylase와는 pH에 대한 활성 특성이 다를 것이기 때문에 본 실험에서와 같이 증편 반죽에 있는 생전분 분해 효소는 pH 변화에 따라 두 개의 peak를 보여주고 있다.

Ⅳ. 요 약

증편의 발효시 일어나는 이 · 화학적 성질의 변화는 발효 중 생성되는 α-amylase의 활성과 밀접한 관계를 가지고 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 콩물과 발효 시간에 따른 증편 반죽 내의 α-amylase 활성과 특성을 측정하였다.

콩물과 증편 반죽에는 생전분과 호화전분을 기질로 하는 α-amylase가 존재함이 밝혀졌다. 콩물 α-amylase의 호화전분과 생전분에 대한 α-amylase의 비활성도는 각각 0.79 units/mg protein, 0.036 units/mg protein이었다. 콩물의 α-amylase는 호화전분과 생전분에 대해 pH 5.92, 6.87과 60°C에서 최대 활성을 나타내었다. 증편 반죽의 호화전분과 생전분에 대한 α-amylase의 최적 pH는 5.25였고 최적 온도는 50°C였다. 증편 반죽 내의 α-amylase의 활성은 발효 시간에 대해 일정한 경향을 가지고 있지 않았다. 콩물을 첨가한 반죽의 호화전분에 대한 α-amylase의 비활성도는 평균 25.59 units/mg protein이었고 생전분에 대한 α-amylase의 비활성도의 평균은 1.37 units/mg protein이었다. 콩물을 첨가하지 않은 반죽에서의 호화전분과 생전분에 대한 α-amylase의 비활성도는 각각 3.37 units/mg protein, 0.49 units/mg protein이었다. α-amylase의 활성은 기질에 상관없이 콩물 첨가한 군이 그렇지 않은 군보다 유의적으로 높았다($p<.05$).

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 대학 부설 연구소 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. 김상순: 한국전통식품, 숙명여대 출판부 (1985).
2. 윤서석: 한국의 전래 생활, 수학사 (1983).
3. 장귀섭: 쌀을 원료로 한 전통 식품 개발, 식품과학과 산업, 24(4): 52 (1991).
4. 전혜경: 증편의 부재료 및 첨가제에 따른 품질 특성, 숙명여대 박사학위 논문 (1992).
5. 최성은: 전통적 증편 제조의 표준화를 위한 연구, 반응 표면방법에 의한 분석, 이화여대 석사학위 논문 (1993).
6. 최영희, 전화숙, 강미영: 첨가재료에 따른 증편의 관능적, 물성적 특성, 한국조리과학회지, 12(2): 200 (1996).
7. 나한나, 윤 선, 박혜원, 오혜숙: 증편 제조시 콩물과 설탕의 첨가가 반죽의 이화학적 성질 및 저장 중증편의 품질에 미치는 영향, 한국조리과학회지, 13(4): 484 (1997).
8. 손정규: 朝鮮調理 (1940).
9. 정해옥: 콩절편의 소화율, 호화도 및 노화속도, 한국조리과학회지, 12(2): 162 (1996).
10. 안용근: 효소단백질 정제법, 양서각 (1994).
11. Rodney F. Boxer: Mordern Experimental Biochemistry (1993).
12. Sidney P. Colowick, Nathan O. Kaplan: Methods in Enzymology, Academic Press (1971).
13. Worthington Biochemical Corporation: Worthington Enzyme, 173 (1977).
14. 박용규, 송혜향: 반복 측정 자료의 분산분석법 (Repeated Measure ANOVA), 자유 아카데미 (1991).
15. 강명수: 증편의 발효 중 전분 및 단백질의 변화, 효성여대 박사학위 논문 (1994).
16. 이계호: 생전분 분해성 누룩 미생물을 이용한 전통약, 탁주의 고품질화 및 최적화 공정 개발, 한국음식문화연구원논집 (1995).
17. 김찬조, 오만진, 이종수: *Rhizopus oryzae*가 생성하는 생전분 분해 효소의 정제 및 특성, 식품과학회지 18: 288 (1986).
18. Tong K. Park: Biotechnology and Bioengineering, Wiley & Sons Inc., 24: 495 (1982).
19. 유태종 외 2인: 식품미생물학, 문훈당 (1992).

(1998년 7월 16일 접수)