

## 효소적 가수분해법에 의한 Gum류의 Gel 유동특성 변화

박 귀 근

경원대학교 공과대학 분자·식품생명공학전공

### Gel-promoting Ability of the Various Gums by the Purified Enzyme

Gwi-Gun Park

Dept. of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 461-701, Korea

#### Abstract

The galactose/mannose ratio of guar gum, guar gum treated with purified  $\alpha$ -galactosidase and locust bean gum were investigated. Gel-promoting property of enzyme-treated guar gum increased when the galactose/mannose ratio was about 1:3.2, which was close to the ratio of 1:3.3 for locust bean gum. And the ratio was obtained when the guar gum was hydrolyzed by the enzyme for 24 hr. It is clear that enzymatic depletion of galactose from guar gum by sunflower seed  $\alpha$ -galactosidase would lead to a significant increase in gelation ability. The mixture of xanthan gum and guar gum, and xanthan gum, guar gum and enzyme-treated copra meal were also investigated in viscosity behavior.

**Key words:** gel-promoting ability,  $\alpha$ -galactosidase, locust bean gum, guar gum

#### 서 론

Gum류는 햄, 소시지, 치즈, 스프, 빵, 아이스크림 등의 식품에서 증점제로 이용 가능하며 연간 사용량은 수천톤에 이르고 있다. Locust bean gum은 guar gum에 비해 높은 가격으로 시판되고 있으며, locust bean gum이 비싼 이유는 다른 다당류와 혼합하는 경우 gel형성이 양호한 때문으로 알려져 있으나 guar gum은 이와 같은 성질을 가지고 있지 않다(1-5). 또한 구조적 차이점으로 locust bean gum은 galactose:mannose=1:4인 반면 guar gum은 galactose:mannose=1:2로 구성되는 유사한 hetero 구조를 하고 있으며 효소적 가수분해법(6-10)으로 galactose잔기의 제거가 가능하여 구조적으로 부가가치가 높은 locust bean gum으로의 유도가 가능하다면 식품산업에서 널리 사용되고 있는 증점제 대체자원으로서의 기대효과가 클 것으로 사료되고 있다. 따라서 본 연구에서는 해바라기씨 유래 효소법에 의한 gum류의 증점효과를 검토하여 경제적 증점제 조제방법의 구축 및 생화학적 방법에 의한 hemicellulose의 효율적 이용법을 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료 및 시약

활성측정 및 효소유도기질로 pNP-Gal(p-nitrophenyl- $\alpha$ -

D-galacto-pyranoside, Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였고, gum류로는 locust bean gum(galactomannan polysaccharide from seeds of Ceratonia siliqua, Sigma Chemical Co.), guar gum(Sigma Chemical Co.), xanthan gum(produced by fermentation of dextrose with *Xanthomonas campestris*, Sigma Chemicals Co., Japan), brown copra meal (47.7% total sugar, fuji oil Co.) 및 white copra meal(49.9% total sugar, Blue Bar Inc., Phillippines)를 사용하였다

##### 단백질 농도 결정

UV-Vis spectrophotometer(Shimadzu Model 1201, Japan)에서 280 nm의 흡광도에서 1 mg/mL의 농도를 1.0이라고 가정하였고, Lowry의 방법(11)에 의해서도 단백질농도를 확인하였다.

##### $\alpha$ -Galactosidase 활성측정

$\alpha$ -Galactosidase의 활성측정은 Kaneko의 방법에 따라 수행하였다(12). 40°C의 수욕상(water bath)에서 2 mM pNP-Gal 0.5 mL 및 McIlvaine buffer(pH 4.5, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 0.1 M citric acid의 혼합액) 0.4 mL를 test tube에 넣고 5분간 preincubation시켰다. 조제한 조효소액 0.1 mL를 가하여 정확히 10분간 반응시킨 후 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 첨가하여 반응을 종결시키고 408 nm에서 흡광도를 측정하였다.

pNP 용액의 농도와 408 nm에 있어서의 흡광도([A<sub>408</sub>])의 관계는 pH 4.5에서 [A<sub>408</sub>]×0.1143=pNP(mM/2 mL) (단, [A<sub>408</sub>]

\*E-mail: ggpark@mail.kyungwon.ac.kr

Phone: 82-31-750-5383, Fax: 82-31-750-5383

<0.6)였다. 또한  $\alpha$ -galactosidase가 pNP-Gal을 가수분해하여 생성되는 pNP 양과 반응시간과의 관계는 10분간 반응에서  $[A_{408}]$ 가 0.6이하를 나타낼 때 효소액과 비례적 관계를 나타내었다.

#### Affinity chromatography법에 의한 효소정제

N- $\epsilon$ -aminocaproyl- $\alpha$ -D-galacto-pyranosylamin으로 구성되는 특이적 흡착제의 합성과 sepharose에 대한 ligand의 coupling은 일본 농림수산성 식품종합연구소 분자정보해석연구소에서 Noam 등의 방법(13)에 의해 수행하였고 본 연구실에서는 이의 담체를 공급받아 Park 등(14)의 방법에 의한 affinity chromatography를 수행하여 점도실험에 사용하였다.

#### 점도력 측정

정제효소 처리에 의한 galactomannan의 점도증가를 측정하기 위해 0.1 M sodium acetate buffer 5 mL에 1% galactomannan을 용해 후 40 units의 정제  $\alpha$ -galactosidase를 첨가하여 50°C 항온수조에서 반응시키면서 2, 6, 12, 24시간 반응 후 시료를 채취하였다. 채취한 반응액은 100°C 끓는 물에 5분간 담근 후 상온에서 방냉시켜 gel화하였다.

Gel을 형성한 sample은 Brookfield Viscometer(Model DV-II)에 의해 23.7°C, spindle CP-52, 10 rpm의 조건하에서 점도를 측정하였다.

#### Gum류의 유동성 측정

유동성 측정은 Carri-Med Rheometer(CSL<sup>2</sup>100, TA Instruments Inc., DE, USA)의 cone and plate system(angle=2°, diameter =  $4.00 \times 10^{-2}$  m)을 사용하여 1000.0  $\mu$ m의 gap으로 25°C에서 실험하였으며, 전단속도(shear rate) 0.01~100 sec<sup>-1</sup>의 범위에서 얻은 전단응력(shear stress)으로부터 Power law 모델식에 의하여 유동지수(flow behavior index, n)와 점도지수(consistency index, K)를 구하였다.

$$\text{Power law 모델: } \sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

여기서  $\gamma$ 는 전단속도(sec<sup>-1</sup>),  $\sigma$ 는 전단응력(Pa), K는 점도지수(Pa·sec<sup>n</sup>), n은 유동지수이다. 겔보기점도(apparent viscosity,  $\eta_{a,10}$ )는 전단속도 10 sec<sup>-1</sup>에서  $\eta_a = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$ 로부터 결정되었다.

#### 결과 및 고찰

정제  $\alpha$ -galactosidase 처리시간에 따른 기질의 점도변화 시간별 sample을 Brookfield Viscometer(Model DV-II)를 이용하여 측정된 결과 반응시간이 2시간, 6시간, 12시간, 24시간 증가할수록 240.5 mP·sec, 423.2 mP·sec, 486.3 mP·sec, 911.2 mP·sec로 점도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 1). Guar gum 단독이 갖고 있는 viscosity activity가 효소처리 시간 24시간에서 viscosity activity가 90%로 증가하였음은 효소처리시간의 경과와 함께 guar gum의 구조에서 mannan

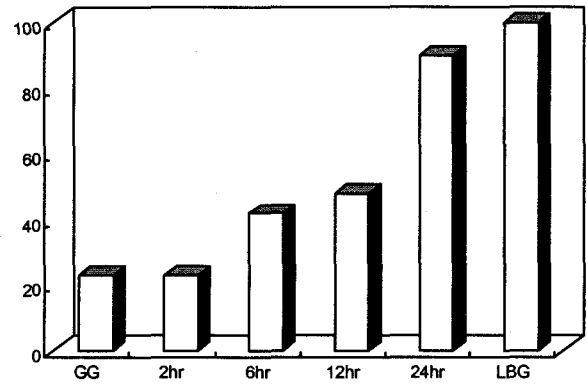


Fig. 1. Effect of enzyme treatment on viscosity of guar gum. GG: guar gum, LBG: locust bean gum. 2 hr, 6 hr, 12, 24 hr: time of enzyme-treatment at guar gum.

골격에 결합하고 있는 galactose를 유리하여 locust bean gum의 기질구조와 유사하게 변형됨으로써 locust bean gum이 나타내고 있는 점도에 상응하는 결과를 나타내는 것으로 사료되어 다음과 같이 효소처리에 의한 가수분해 반응 시간별 gum류를 구성하고 있는 mannose와 galactose의 비율을 확인하였다.

#### 가수분해 반응시간별 mannose/galactose 비율

정제  $\alpha$ -galactosidase로 가수분해한 guar gum을 시간별로 sampling하고, 효소처리하지 않은 guar gum 및 locust bean gum의 mannose/galactose 비율과 비교하였으며 그 결과는 Table 1과 같다. Guar gum 단독에서의 구성당 mannose/galactose의 비율이 1:1.6이었으나 가수분해시간의 경과와 더불어 24시간에서는 locust bean gum의 구성당의 비율 1:3.3과 유사한 1:3.2를 나타내었다. 이와 같은 결과는 정제효소를 처리한 guar gum의 구성당의 비율을 증점제로 사용되고 있는 locust bean gum의 구성당의 비율과 유사한 비율로 유도함으로써 gum류의 구조적 변화에 따른 증점효과의 상승을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

#### Gum류 및 천연유래 galactomannan의 gelation ability 비교 및 gum류의 유동성

Guar gum에 대한 정제효소의 gelation ability를 guar gum 및 locust bean gum과 비교한 결과 정제  $\alpha$ -galactosidase 5 mL(40 units)를 첨가하여 50°C, 24시간 효소처리한 1.0%

Table 1. Galactose/mannose ratio of guar gum treated with  $\alpha$ -galactosidase and locust bean gum

Galactomannan sample	Galactose/Mannose ratio
Guar gum	1 / 1.6
Enzyme treated Guar gum 2 hr	1 / 1.9
Enzyme treated Guar gum 6 hr	1 / 2.2
Enzyme treated Guar gum 12 hr	1 / 2.6
Enzyme treated Guar gum 24 hr	1 / 3.2
Locust bean gum	1 / 3.3

(w/v) guar gum 5 mL의 유동특성은 locust bean gum과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 1). 천연유래 galactomannan인 brown copra meal, white copra meal에 대한 효소처리 효과도 검토하였으나 gel형성능력이 크지 않음을 확인할 수 있었다. 그러나 xanthan gum과 guar gum과의 mixture를 측정 한 결과 효소처리만 된 copra meal점도에 비해 3배 정도의 점증효과를 나타내었다. 따라서 다른 gum류와의 혼합을 통해 식품증점제인 locust bean gum의 대체자원으로서 copra meal의 경제적 기대효과가 있을 것으로 사료된다(Fig. 2~4). 특히 동남아시아에서 생산되고 있는 coconut에서 oil 등을 제거한 copra meal은 가축의 사료 등으로 사용되고 있으나, copra meal 유효활용법의 일환으로 효소처리된 copra meal에 xanthan gum 및 guar gum을 혼합함으로써 copra meal 자신보다도 3배 이상의 증점효과를 나타내는 효소활용기술은 증점대체법으로 매우 유용할 것으로 사료된다.

Fig. 5에서는 locust bean gum과 정제효소 처리된 guar gum의 점도변화에 대한 유동성을 측정비교한 결과로써 locust bean gum과 정제효소 처리된 guar gum에 대하여 전단속도(sec<sup>-1</sup>)경과와 함께 유사한  $\sigma$ 의 전단응력(Pa)의 pattern

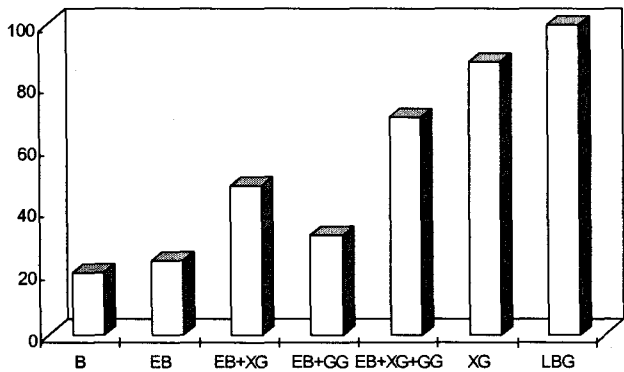


Fig. 2. Effect of enzyme treatment on viscosity of brown copra meal.

B: brown copra meal, XG: xanthan gum, GG: guar gum, LBG: locust bean gum, EB: enzyme-treated brown copra meal.

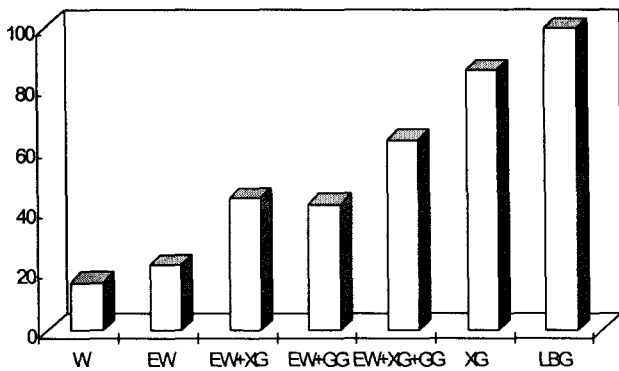


Fig. 3. Effect of enzyme treatment on viscosity of white copra meal.

W: white copra meal, XG: xanthan gum, GG: guar gum, LBG: locust bean gum, EW: enzyme-treated white copra meal.

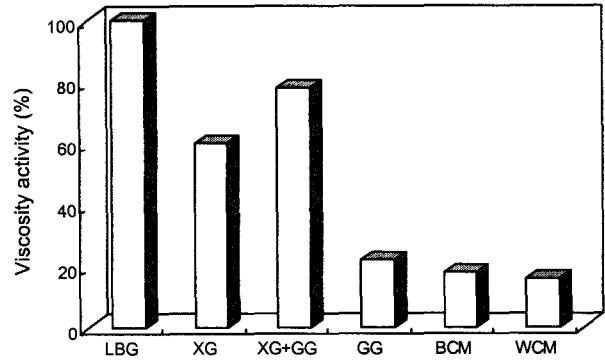


Fig. 4. Comparison of viscosity between only gums and mixture of gums.

BCM: brown copra meal, WCM: white copra meal, XG: xanthan gum, GG: guar gum, LBG: locust bean gum.

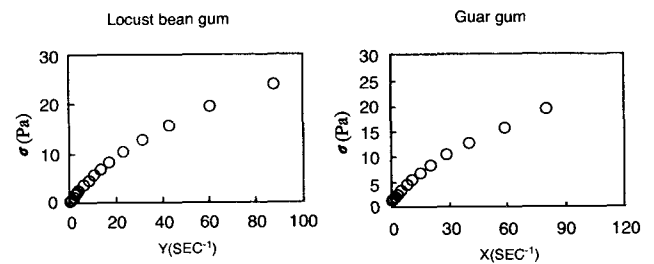


Fig. 5. Gelation change of locust bean gum and guar gum by purified enzyme.

A: gelation change of locust bean gum.

B: gelation change of guar gum by purified enzyme.

을 나타냄으로써 유동특성의 유사성을 나타내고 있다. 이는 제과제빵, 아이스크림산업 등 식품산업에서 사용되고 있는 증점제의 대체효과를 기대할 수 있으며 특히 경제적으로 가격대가 낮은 증점제조제 대체기술은 파급효과가 매우 클 것으로 사료된다.

### 요 약

Affinity chromatography법에 의해 해바라기씨 유래  $\alpha$ -galactosidase정제를 수행하여 locust bean gum 증점 대체 자원의 개발을 위한 기초연구로서 정제효소처리된 guar gum 과 locust bean gum의 구성당인 galactose와 mannose의 구성비율을 비교 검토하였다. 정제효소처리된 guar gum의 증점효과는 galactose와 mannose비율이 1:3.2일 때 가장 증가 하였다. 이와같은 비율은 효소적 처리시간을 24시간으로 하였을 때 나타내었다. 해바라기씨유래  $\alpha$ -galactosidase처리에 의한 guar gum으로부터의 galactose의 유리가 증점효과에 영향을 미치는 것으로 사료된다. Xanthan gum과 guar gum의 혼합, xanthan gum과 guar gum 및 정제효소처리된 천연 유래 copra meal과의 혼합물에 대한 증점효과도 비교하였다.

### 감사의 글

본 연구는 2001년도 경원대학교 학술연구비 지원을 받아

수행되었기에 이에 감사드립니다.

## 문헌

1. Albersheim P, Nevins DJ, English PD, Karr A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cellwall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res* 5: 340-345.
2. Balasubramaniam K, Dey PM, Pridham JB. 1974. Purification and identification of an  $\alpha$ -galactosidase from the coconut. *Biochem Soc Trans* 2: 1128-1130.
3. Beutler E, Kuhl W. 1972. Purification and properties of an  $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase from the seeds of *Trifolium repens*. *J Biol Chem* 57: 7195-7200.
4. Ciucanu I, Kerek F. 1984. Methylation analysis of oligosaccharides. *Carbohydrate Res* 131: 209-217.
5. Dey PM, Pridham JB. 1969.  $\alpha$ -Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. *J Biol Chem* 113: 49-55.
6. Dey PM, Pridham JB. 1972. *Advanced in Enzymology*. Academic Press, New York. Vol 36, p 91-130.
7. Dey PM, Wallenfels K. 1974. Characteristic features of an  $\alpha$ -galactosidase from mung beans. *Eur J Biochem* 50: 107-112.
8. Ferrero I, Rossi C, Landini MP, Puglisi PP. 1978. Role of the mitochondrial protein synthesis in the catabolite repression of the petite-negative yeast, *K. lactis*. *Biochem Biophys Res Commun* 80: 340-345.
9. Hasimoto H, Katayama C, Goto M, Kitahata S. 1993. Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci Biotech Biochem* 57: 372-377.
10. Kaneko R, Kusakabe I, Yasui T, Sakai YY, Murakami K. 1990. Substrate specificity of  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Agric Biol Chem* 54: 237-242.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Fan AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-271.
12. Kaneko R. 1991. The study of galactomannan hydrolysate. *Master's Thesis*. Tsukuba Univ.
13. Noam H, Harold MF, Nathan S. 1973. Purification of coffee bean  $\alpha$ -galactosidase by affinity chromatography. *BBA* 157: 213-221.
14. Park GG, Kim WD, Park YS, Gang JB, Kobayashi H. 1998. Purification and properties of sunflower seed  $\alpha$ -galactosidase by affinity chromatography. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 26: 316-322.

(2002년 3월 21일 접수; 2002년 5월 20일 채택)