

Mixed β -D-glucan 분석

이준기

작물과학원

I. 서 언

보리나 귀리 같은 일부 곡류와 효모, 곰팡이 세포벽 구성물질인 β -glucan은 최근 면역학적 조절작용과 관련지어 많은 연구가 진행되고 있다. 효모나 곰팡이의 세포벽 β -glucan은 β -(1 \rightarrow 3)-결합이 backbone을 이루고 작은 β -(1 \rightarrow 3)-결합 분자가 β -(1 \rightarrow 6)-결합으로 분지된 형태를 갖는다(Lowman 등, 2003). 반면에 보리 등 곡류의 것은 β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)-D-glucan 결합체로서 분지가 없고 선형의 random coil 형태로 존재하며 Mixed β -glucan으로도 불린다. 보리에서 β -glucan은 배유 세포벽중 70~75%를 차지하는 Polysaccharide로서 전체 결합중 30% 정도는 β -(1 \rightarrow 3) 결합을 이루고 나머지 70%정도는 β -(1 \rightarrow 4) 결합을 이루며 전체가 β -D-glucopyranose 단위로 되어있다(Wood, 2002).

보리의 경우 β -glucan 함량은 2~8% 정도의 농도를 보이며 사람이 섭취하였을 때 장운동을 촉진시켜 변비를 예방하고 당 흡수를 조절하며 혈청 콜레스테롤 수준 저하 등의 효과를 내는 것으로 보고되어 있다(Klopfestein, 1988). 하지만 보리의 용도에 따라 β -glucan이 불리한 작용을 할 수도 있는데, 사료로 이용할 경우에는 영양소의 흡수를 저해함으로써 증체율을 저하시킬 수 있고 특히 가금류 등에서는 묽은 배설물의 배출로 계란과 계사를 더럽히는 등 심각한 문제를 유발하며, 맥주 제조시에는 당화액과 맥주의 점도를 높여 여과를 어렵게 하는 단점으로 작용할 수 있다. 이렇듯 β -glucan은 인간의 건강을 위해서는 유리한 기능성을 보이거나 사료나 맥주가공 등 용도에 따라 불리한 영향을 미치는 양면성을 지니고 있어서 현재 보리에서는 β -glucan 함량을 높이려는 연구와 낮추고자 하는 연구가 모두 진행되고 있는 실정이다.

β -glucan을 검정할 수 있는 몇 가지 방법이 개발되어 있다. 대표적인 방법으로는 β -glucan 추출용액에 ammonium sulfate를 20~30% 첨가하여 선택적으로 β -glucan을 침강시켜 분석하는 침강법(Preece 등, 1952), β -glucanase 역가를 갖는 효소를 사용 β -glucan만을 특이적으로 가수분해 한 후 유리된 포도당 함량을 측정하여 β -glucan 함량을 계산하는 효소적 방법(McCleary 등, 1985), 고분자 β -glucan에만 특이적으로 결합하는 염색제를 부착시켜 그 발광 농도로부터 β -glucan 함량을 검정하게 되는 Flow-injection analysis (FIA) 방법(Jorgensen, 1988) 등이 있다. 하지만 이들 방법중 효소적 방법과 FIA-Calcofluore 방법만이 European Brewery Convention에 의해 공인된 방법으로 채택되어 있다.

Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6787 (E-mail) lee0ck@rda.go.kr

효소적 방법은 잘 확립되어 있어서 β -glucan의 추출분해와 분해된 glucose를 측정할 수 있는 Kit 형태(Megazyme, Megazyme International Ireland Ltd)의 시약이 상품으로 판매되고 있고, 실제로 β -glucan을 검정하는데 대부분의 연구진들이 이 방법(AACC Method 32-33, AOAC Method 995.16, EBC Methods 3.11.1, 4.16.1 및 8.11.1, ICC Standard Method No. 168)을 사용하고 있다. 본 고에서는 효소적 β -glucan을 측정방법에 대해 상세히 소개하였다. 효소적 β -glucan 측정법을 요약하자면, 먼저 시료내 모든 효소를 불활성화 시키고, 일차로 β -glucan 추출이 용이하도록 Lichenase를 처리하게 되는데, 이것은 β -(1 \rightarrow 4)-결합만을 분해하는 효소로서 그 절단부위는 모든 β -(1 \rightarrow 4)-결합부위가 아니고, β -glucan 분자의 환원말단 쪽으로 β -(1 \rightarrow 4)-결합이 인접되고, 비 환원말단 쪽으로 β -(1 \rightarrow 3)-결합이 인접된 β -(1 \rightarrow 4)-결합만이 해당된다. 따라서 Lichenase의 분해산물은 환원말단에 β -(1 \rightarrow 3)-결합을 갖는 다양한 크기의 β -glucan-oligosaccharide이나 다음 단계에서 처리되는 β -glucosidase에 의해 유리상태의 glucose로 완전 분해된다. 유리상태의 glucose는 Glucose Oxidase/Peroxidase/4-Amino-antipyrine (GOPOD)에 의해 특이적 반응을 이루어 510 nm 파장에서 최대 흡광도를 나타내게 되는데, 이중에는 원래 시료내 들어있던 glucose의 흡광도도 포함되어 있다. 따라서 측정된 glucose 양중에서 원래 시료에 포함되어 있던 유리상태의 glucose 함량을 배제시켜야 하는데, 그러기 위하여 매 시료마다 blank를 두고 β -glucan 분해시료의 흡광도에서 blank의 것을 빼준 흡광도를 적용하여 β -glucan 함량을 산출하게 된다.

II. 분석방법

1. 분석에 필요한 시약 및 시험기기

1) 효소 및 대조시료

- (1) Lichenase [specific, endo-(1,3), (1,4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolase EC 3.2. 1.73] (>1,000 U/ml)
- (2) β -glucosidase [EC 3.2.1.21] (>40 U/ml).
- (3) 보리 대조시료 (β -glucan함량이 알려진 시료)
- (4) 귀리 대조시료 (β -glucan 함량이 알려진 시료)
- (5) Glucose 표준용액 (0.2% benzoic acid 용액 0.1 ml에 100 μ g의 glucose가 들어있음)

2) 측정 시약 및 효소액 조제

- (1) 100 mM Sodium Hydroxide

4.00 g의 Sodium hydroxide (NaOH)를 800 ml 정도의 증류수에 완전히 녹인 뒤 전체 용량을 1 L로 맞춘다.

- (2) Sodium phosphate buffer (20 mM, pH 6.5)

900 ml 증류수에 3.12 g의 sodium dihydrogen orthphosphate dihydrate($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 녹인 뒤 100 mM sodium hydroxide용액을 서서히 첨가하여 pH 6.5로 맞춘다(대략 50 ml 정도가 소요됨). 최종 부피는 1 L 용량으로 맞춘 뒤 4°C 온도 조건으로 냉장 보관한다.

(3) Sodium acetate buffer (50 mM, pH 4.0)

998 ml의 증류수에 1.2 g의 sodium acetate trihydrate를 녹인 뒤 1.9 ml의 진한 초산 (concentrated acetic acid)을 첨가한다. pH를 측정하여 필요시 pH 4로 조정한다. 다음 4°C 온도로 냉장 보관한다.

(4) Glucose Oxidase/Peroxidase/4-Amino-antipyrine 시약 (GOPOD)

β -glucan을 정량하기 위해서는 고 순도를 갖는 glucose oxidase와 peroxidase의 사용이 필수적이다. 그러기 위해서는 MegaZyme Glucose Test Kit 나 다음과 같은 buffer와 함께 Glucose 검정시약(GOPOD)를 사용하는 것이 바람직하다. 이들 시약은 전분, maltosaccharides 및 saccharides를 포함하는 기타 당들의 존재하에도 Glucose만을 정확히 측정할 수 있도록 해준다.

① Concentrated buffer 용액 조제

a) Mono-potassium orthophosphate	136.0 g
b) Sodium hydroxide	33.0 g
c) Para-hydroxybenzoic acid	15.0 g
d) Sodium azide	2.0 g

※ 위 a, b 및 c 3가지 시약을 실온에서 900 ml 증류수에 저어주면서 용해시킨다. pH 7.4가 되도록 필요시 2 M Hydrochloric acid나 2 M Sodium hydroxide를 첨가하여 조정한다. pH를 측정하여 필요시 재조정한다. 다음 전체 용량을 1 L로 조제한다. 조제된 용액은 광이 차단되도록 갈색 병에 담아 실온에 보관한다. 조제된 시약은 보통 12개월간 안정하다.

② Working Buffer 용액

위와 같이 조제된 Concentrated buffer 용액을 10배 희석하여 사용한다.

즉, Concentrated buffer 용액 100 ml를 취해 1 L 용량플라스크에 넣고 표선까지 증류수를 채운다음 충분히 혼합하여 사용한다.

③ Glucose Oxidase/Peroxidase/4-Amino-antipyrine 시약 (GOPOD)

1 L의 Working buffer 용액에 1 vial의 MegaZyme GOPOD 시약 내용물을 녹인 다음 사용하기까지 4°C에서 보관한다. 본 시약은 조제후 3개월간은 유효하나, 측정시 최대의 역가를 갖도록 냉각된 시약을 미리 분석할 시험관에 넣은 후 40°C 또는 50°C로 incubation 시킨다.

(5) Lichenase 효소용액 (50 U/ml, pH 6.5)

Lichenase [specific, endo-(1,3), (1,4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolase EC 3.2. 1.73] (>1,000 U/ml) 1.0 ml에 20 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)액을 넣어 최종부피가 20 ml가 되도록 조제한다. 다음 5 ml씩 분할하여 사용할 때까지 냉장보관 한다.

(6) β -glucosidase 효소용액 (2 U/ml, pH 4.0)

β -glucosidase [EC 3.2.1.21] (>40 U/ml) 1.0 ml에 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)를 첨가해서 전체부피 20 ml로 조제한다. 다음 5 ml씩 분할을 해서 사용할 때까지 냉장 보관한다.

3) 검정용 시험기구

- (1) Polypropylene tubes : 35 ml 용량의 마개달린 시험관
- (2) Glass test tubes (12 ml 용량)
- (3) 마이크로 피펫 : 100 μ l 와 200 μ l 용량
- (4) Positive displacement pipettor
- (5) Pipettors : 1.0 to 5.0 ml
- (6) 분주기(Dispenser)
 - ① Phosphate buffer 첨가용 : 0~5.0 ml
 - ② 증류수 첨가용 : 0~25.0 ml
 - ③ Glucose oxidase/oxidase(GOPOD) 시약 첨가용 : 0~5.0 ml
- (7) Oven
- (8) 분석저울
- (9) 분광광도계(510 nm)
- (10) Vortex mixer
- (11) 40°C 항온수조
- (12) 초시계
- (13) 여과지(Whatman No 41 filter circles) 또는 원심분리기
- (14) 시험용 분쇄기
- (15) 끓는 수조

2. β -glucan 추출, 분해 및 검정

1) 보리 등 곡류에서의 분석절차

- (1) Tecator Cyclotec mill 등 시험용 분쇄기를 사용해서 0.5 mm체를 통과할 수 있도록 시료를 분쇄한다.
- (2) 수분함량이 측정된 시료를 0.5g 달아 polypropylene tubes에 넣는다.
- (3) 각 시료가 든 tube에 ethanol (50% v/v 수용액) 1 ml를 첨가해서 잘 섞는다. 본 목적은 시료 분산효과와 효소 불활성화 목적이 있음.
- (4) Sodium phosphate buffer 용액(20 mM, pH 6.5)을 5.0 ml 가한 후 vortex mixer를 사용해서 잘 섞는다. 이때 tube의 기벽에 내용물이 너무 튀지 않도록 주의한다.
- (5) 끓는 수조에서 약 2분정도 tube를 담근 후 vortex mixer를 사용 격렬하게 교반하여 다시 끓는 물에 3분간 더 가열한다. 1-2분 가열한 뒤 저어줌으로써 덩어리 형태의 호화물질 형성을 방지 할 수 있다.
- (6) tube를 40°C로 냉각한 뒤 Lichenase 효소용액(50 U/ml, pH 6.5)을 0.2 ml (10 U) 넣고 뚜껑을 막은 다음 잘 흔들어 40°C 수조에서 1시간 동안 incubation 시킨다.
- (7) 각 tube에 증류수를 첨가하여 최종부피를 30 ml로 맞춘다.
- (8) tube의 내용물을 잘 혼합한 다음 Whatman No 41 여과지나 원심분리기(1000 g, 10분)를 써서 고형물을 제거하고 상등액만을 얻는다.

- (9) 미리 준비한 3개의 시험관에 각각 상등액 0.1 ml씩을 정확히 취한다. 이 때 상등액이 시험관 벽면에 닿지 않고 바닥으로만 떨어지도록 주의해서 떨어뜨린다.
- (10) 3개의 tube중 두개 tube에는 각각 β -glucosidase 효소용액(2 U/ml, pH 4.0)을 0.1 ml 씩 (0.2 U) 넣고, 나머지 한개 tube에는 (blank용) β -glucosidase 효소용액 대신에 acetate buffer용액(50 mM, pH 4.0)을 0.1 ml 넣고, 모두 40°C 항온수조에서 15분간 incubation 한다.
- (11) 각 tube에 Glucose Oxidase/Peroxidase/4-Amino-antipyrine 시약 (GOPOD)을 3.0 ml 씩 첨가한 후 40°C 항온수조에서 20분 동안 incubation 한다.
- (12) 분광분석기의 510 nm 파장에서 각 시료의 흡광도를 측정한다.

2) 맥아 등에서의 분석절차

※ 이들 시료내에는 당 농도가 높고, 효소력도 높기 때문에 이들의 영향을 배제하기 위한 아래와 같은 전처리 과정이 중요하다.

- (1) 1.0 g의 맥아 분쇄물(0.5 mm체 통과물)이나 제맥아 과정중 단계별로 채취하여 동결건조한 보리시료 1.0 g을 취해 5.0 ml의 50% ethanol 용액(aqueous 50 v/v%)를 가한다.
- (2) 끓는 수욕조에서 5분간 incubation한 다음 vortex mixer를 사용 잘 섞은 후 추가로 5.0 ml의 50% ethanol 용액(aqueous 50 v/v%)을 가한다.
- (3) 1000 g 이상에서 10분 동안 원심분리해서 상등액은 제거한다.
- (4) 원심분리 후 밑에 남아 있는 pellet에 추가로 10 ml의 50% aqueous ethanol을 가해 잘 섞은 뒤 원심분리 하여 상등액은 제거한다.
- (5) pellet를 5.0 ml sodium phosphate buffer (20 mM, pH 6.5) 에 분산시킨다.
- (6) 앞에 소개된 3) 보리 등 곡류에서의 β -D-glucan 분석절차에서 (6)번 단계부터 동일한 방식으로 수행한다.

3) 맥즙추출 폐기물(Spent grain)에서의 분석절차

당화후 맥즙을 추출한 부산물로 나오는 맥즙추출 폐기물은 75°C의 뜨거운 물로 한번 세척하여 동결건조 하거나 세척하지 않고 바로 동결 건조하여 0.5 mm체를 통과하도록 분쇄한 가루를 시료로 하여 2)번의 맥아 등에서의 분석절차와 동일하게 수행한다.

4) 당화추출액(Wort)이나 맥주에서의 분석절차

- (1) 수조에서 약 80°C로 가열하여 시료액내의 gas를 날려 보낸 다음 냉각한다.
- (2) 미리 무게를 단 원심분리관에 wort 또는 탈기한 맥주 시료액 5.0 ml를 넣고, 2.5 g의 곱게 분쇄한 ammonium sulfate crystal을 넣는다.
- (3) 파라필름으로 tube를 막은 후 조심스럽게 ammonium sulfate를 녹인다. 거칠게 흔들거나 하지 말아야 한다.
- (4) tube를 4°C에서 20시간 정도 정치한다.
- (5) 1000 g에서 10분동안 원심분리 한다.
- (6) 상등액은 따라내어 제거한다.

- (7) 1.0 ml의 50% ethanol을 가해 vortexing 함으로써 pellet를 분산시킨 후 추가로 10 ml의 50% aqueous ethanol을 가해 tube를 반전시키면서 잘 혼합한다.
- (8) 1000 g에서 5분동안 원심분리 하여 상등액은 제거한다.
- (9) step 7-8을 반복 수행한다.
- (10) pellet를 sodium phosphate buffer(20 mM, pH 6.5)에 분산시킨다. 이때 sodium phosphate buffer 첨가량은 wort의 경우 4.8 ml, 맥주의 경우 1.8l ml 첨가한다.
- (11) Lichenase 효소용액(50 U/ml, pH 6.5)을 0.2 ml (10 U) 첨가한 후 40°C에서 5분간 incubation 한 다음 1000 g에서 10분간 원심분리하여 1) 보리 등 곡류에서의 분석절차의 9번 단계 이후와 동일하게 수행한다.

3. β -glucan 함량의 계산

분광분석기 510 nm에서 측정된 흡광도를 아래와 같은 식에 대입하여 β -glucan 함량을 계산한다.

- 1) 보리 등 곡류, 맥아 및 맥즙 폐기물에서의 β -glucan 함량

$$\beta\text{-glucan, \%} = \Delta E \times F \times 300 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = 27 \times \Delta E \times F/W$$

- 2) 맥즙에서의 β -glucan 함량

$$\beta\text{-glucan, \%} = \Delta E \times F \times 10,000 \times 1/1000 \times 5/5 \times 162/180 = 9 \times \Delta E \times F$$

- 3) 맥주에서의 β -glucan 함량

$$\beta\text{-glucan, \%} = \Delta E \times F \times 10,000 \times 1/1000 \times 2/5 \times 162/180 = 3.6 \times \Delta E \times F/W$$

각 식에서

ΔE	: 시료의 흡광도 - 공시료(blank)의 흡광도
F	: 100 μ g glucose/100 μ g glucose의 흡광도(흡광도를 μ g으로 환산하기 위한 계수)
1/1000	: μ g을 mg으로 환산하기 위한 계수
162/180	: 유리상태 glucose 분자량로부터 β -glucan 분자와 같이 무수상태의 glucose 분자량으로 전환하기 위한 계수
300	: 부피 보정계수(30 ml로부터 0.1ml가 취해져서 측정되었기 때문임)
W	: 시료중량(mg 단위)
100/W	: 시료중량에 대한 퍼센트로 전환하기 위한 지수
5/5	: wort에서의 부피 보정계수
10,000	: 부피보정계수(0.1 ml 시료액에 대한 β -glucan 함량을 1 L 시료액에 대한 β -glucan 함량으로 나타내기 위한 계수).

4. 측정결과외 검증

본 방법을 사용할 경우 분석기술도 중요하지만 분석기술이 아무리 뛰어나더라도 효소역가가 제대로 발현되지 않을 경우에는 정확한 측정치를 얻기 어렵다. 따라서 β-glucan 함량 검증실험이 제대로 수행되었는지 검증이 필요한데, 보통 β-glucan 함량을 미리 알고 있는 시료를 매 시험마다 포함시켜 동일 조건으로 측정된 후 얻어진 함량과 시료가 원래 가지는 함량을 비교하여 시험의 정확성을 판정하게 된다. MegaZyme법에서는 제공되는 분석시약 Kit내에는 β-glucan 함량이 밝혀진 표준시료가 같이 포함되어 있다. 따라서 이 표준시료를 매 시험마다 같이 분석하여 측정된 β-glucan 함량과 제공되어진 실제함량과 대비해 보면 시험수행의 적정성을 판단할 수 있을 것이다.

5. 분석 예

다음 결과는 보리와 귀리에서의 β-glucan 함량을 분석한 예이다.

1) 시료 분해액 및 Blank액의 흡광도에 따른 β-glucan 함량

시료명	반복	흡 광 도 (Optical density)			β-glucan 함량 (%)
		시료분해액	Blank	차이 (ΔE)	
보리	1	653	36	617	3.95
	2	684	41	643	4.12
	평균	668.5	38.5	630	4.03
귀리	1	1,029	41	988	6.33
	2	1,021	43	978	6.26
	평균	1,025	42	983	6.29

※ Glucose standard(100 μg/ml glucose 용액)의 흡광도 : 843

2) β-glucan 함량의 계산 예

(1) 보리 평균치의 β-glucan 함량

$$\beta\text{-glucan, \%} = \Delta E \times F \times 300 \times 1 \text{ mg} / 1000 \mu\text{g} \times 100\% / W \times 162 / 180 = 27 \times \Delta E \times F / W$$

식에서 ΔE = 630 O.D., W = 0.5 g (= 500 mg), F = 100 μg/843 O.D.이므로

$$\begin{aligned} \beta\text{-glucan, \%} &= 630 \text{ O.D.} \times 100 \mu\text{g} / 843 \text{ O.D.} \times 300 \times 1 \text{ mg} / 1000 \mu\text{g} \times 100\% / 500 \text{ mg} \times 162 / 180 \\ &= 630 \text{ O.D.} \times 0.1 \text{ mg} / 843 \text{ O.D.} \times 100\% / 500 \text{ mg} \times 270 = 4.03\% \end{aligned}$$

(2) 귀리 평균치의 β-glucan 함량

$$\beta\text{-glucan, \%} = \Delta E \times F \times 300 \times 1 / 1000 \times 100 / W \times 162 / 180 = 27 \times \Delta E \times F / W$$

식에서 ΔE = 983 O.D., W = 0.5 g (500 mg), F = 0.1 mg (= 100 μg)/843 O.D.이므로

$$\beta\text{-glucan, \%} = 983 \text{ O.D.} \times 0.1 \text{ mg} / 843 \text{ O.D.} \times 100\% / 500 \text{ mg} \times 270 = 6.29\%$$

3) 실험의 정확도 해석

Megazyme에서는 실험의 정확도가 β -glucan 함량 4.0%인 보리의 경우 측정치가 $4.0 \pm 0.1\%$ 범위를 갖는다고 하였는데, 위의 두 시료의 반복간 측정치가 평균치에서 $\pm 0.1\%$ 범위 이내로 나타나 본 측정결과는 정확도에서 Megazyme이 제시하는 측정오차 범위에 드는 것으로 판단 될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Jorgensen, K. G. 1988. Quantification of high molecular weight (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan using calcofluor complex formation and flow injection analysis. I. Analytical principle and its standardization. Carlsberg Research Communications 53 : 277-285.
2. Klopfenstein, C. F. 1988. The role of cereal β -glucan in nutrition and health. Cereal Foods World 33 : 865-869.
3. Lowman, D. W., D. A. Ferguson, and D. L. Williams. 2003. Structural characterization of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans isolated from blastospore and hyphal forms of *Candida albicans*. Carbohydrate Research 228 : 1491-1496.
4. McCleary, B. V. and M. Glennie-Holmes. 1985. Enzymatic quantification of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan in barley and malt. Journal Institute Brewing 91 : 285-295.
5. Megazyme International Ireland Ltd, (MIIL). 1996. Glucose Assay Procedure. MIIL, Brey business Park, Bray, Co Wicklow, Ireland.
6. Megazyme International Ireland Ltd,(MIIL). 2003. Mixed-Linkage Beta-Glucan Assay Procedure. MIIL, Brey business Park, Bray, Co Wicklow, Ireland.
7. Preece, J. A., and K. G. McKenzie. 1952. J. Inst. Brew., 58 : 353.
8. Wood, P. J. 2002. Relationships between solution properties of cereal β -glucans and physiological effects-a review. Trends in Food Science & Technology 13 : 313-320.

Determination of Mixed β -Glucan in Cereals by Enzymatic Method

Choon-Ki Lee

National Institute of Crop Science, R.D.A., Suwon 441-857, Korea
+82-31-290-6787, lee0ck@rda.go.kr