

## 귀리 $\beta$ -glucan의 $\alpha$ -amylase를 이용한 정제와 이화학적 특성

박희정 · 강태수<sup>1</sup> · 이회봉 · 김광엽 · 장금일 · 노영희<sup>2</sup> · 정현상\*  
충북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>충북과학기술대학 식품생명과학과, <sup>2</sup>건양대학교 미용학과

### Purification of Oat $\beta$ -Glucan by $\alpha$ -Amylase Treatment and Characterization of Its Physicochemical Properties

Hee-Joeng Park, Tae-Su Kang<sup>1</sup>, Hee-Bong Lee, Kwang-Yup Kim, Keum-Il Jang, Young-Hee Noh<sup>2</sup>, and Heon-Sang Jeong\*

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University  
<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk Provincial University  
<sup>2</sup>Department of Beauty Industry, Konyang University

The effects of purification using  $\alpha$ -amylase (Termamyl 120L) on physicochemical properties of  $\beta$ -glucan from oat bran were studied. Four fractions were selected as fraction A (55°C, 15%, pH 6), fraction B (45°C, 15%, pH 6), fraction C (50°C, 0%, pH 7), and fraction D (50°C, 10%, pH 5) from the result of physiological test, and three consecutive subfractions were obtained by repeated  $\alpha$ -amylase treatments on the each fractions. The contents of  $\beta$ -glucan, protein, and ash after purification were in 81.4-88.2%, 4.1-6.3% and 2.6-6.2%, respectively. The apparent viscosities of purified  $\beta$ -glucan aqueous solutions were similar to those of hydroxy methyl cellulose. Glucose was a major monosaccharide of  $\beta$ -glucan extracts, and xylose and arabinose were also detected as minor constituents on TLC. The average molecular weight ranged  $2.0 \times 10^6$ - $5.1 \times 10^6$  and was decreased after purification. From the result of the differential scanning calorimetry, the melting point ranged 130-140°C with purification step and thermal transition enthalpy was increased. The ratio of  $\beta$ -(1→3) to  $\beta$ -(1→4) linkages were 1:2.22-1:2.52, and increased up to 1:5.50 after purification.

**Key words:** oat  $\beta$ -glucan, purification, average molecular weight,  $\beta$ -(1→4) and  $\beta$ -(1→3) linkages ratio, DSC (differential scanning calorimetry)

## 서 론

귀리  $\beta$ -glucan은 배유 세포벽의 주된 구성성분으로 존재하는 직선상의 비전분 다당류로서, 혈중 콜레스테롤 함량을 낮추고, 식후 당류의 소화 흡수를 지연시키며 insulin의 분비를 조절할 뿐만 아니라 대장암 예방 효과가 있는 것으로 알려져 있다(1,2).

귀리 배유 세포벽층은 매우 얇은 바깥층, cellulose와 glucomannan의 불용성 다당류와 다당류 복합체( $\beta$ -glucan과 arabinoxylan)로 이루어진 중간층 및 주로  $\beta$ -glucan 및 arabinoxylan의 수용성 다당류로 이루어진 내부층 등 3개의 층으로 이루어져 있다(3). 이처럼  $\beta$ -glucan은 세포벽의 안쪽에 깊숙이 자리하고 있을 뿐 아니라 세포벽 내의 다른 성분들과 복잡하고 단단하게 결합되어 있기 때문에(4,5), 추출이 불완전하고 다른 성분이 혼입되어 총 gum 중의  $\beta$ -glucan의 함량비가 감소한다(6-8).

$\beta$ -Glucan의 순도를 높이기 위한 방법에 대한 연구가 계속적으로 보고되어 왔다. 이러한 방법들로는 추출전 시료를 80% 에탄올로 가열하거나(9), 온도 및 pH 등의 추출조건을 조절하여 전분의 오염을 피하거나(7,8), 추출물 중의  $\beta$ -glucan을 isopropyl alcohol이나 ethanol 등의 알코올, 아세톤, 또는 ammonium sulfate 등의 용액 및 염을 사용하여 침전시켜 분리하는 방법이 이용되고 있다(8,10,11). 미정제  $\beta$ -glucan을 정제하는 가장 효과적인 방법은 20-30%의 ammonium sulfate를 사용하여 반복적으로 침전시키는 것으로  $\beta$ -glucan과 arabinoxylan을 분리하여(11), 98%의 고순도  $\beta$ -glucan을 얻을 수 있다고 한다(7). 또한, ammonium sulfate 농도를 조절하면 분자량 분산도가 낮은  $\beta$ -glucan 분획을 얻을 수 있으며 저분자량 분획일수록 고농도의 용액이 요구된다고 한다(11,12). 이 외에 isopropyl alcohol을 침전용매로 이용할 경우에도 pentosan으로부터  $\beta$ -glucan을 효과적으로 분리할 수 있고(13) calcoflour와 congo red의 염색약과  $\beta$ -glucan을 결합시킨 다음 분리하는 경우에도 glucose의 분리도를 높일 수 있다고 한다(13). 혼입된 전분류는 amylase를 사용하여 가수분해하여 제거하고(14,15), 단백질은 추출물의 pH를 조절하여 단백질의 등전점 침전을 유도하여 제거하거나 효소를 이용하여 가수분해하여 제거하는 방법 등이 일반적으로 이

\*Corresponding author: Heon-Sang Jeong, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, 12 Gaesing-dong, Cheongju, Chungbuk 361-763 Korea.  
Tel: 82-43-261-2570  
Fax: 82-43-271-4412  
E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr

용되고 있다(8,15).

정제 시에는 침전물의 재용해를 위한 균질화 및 열처리 공정 등이 반복적으로 이루어지므로,  $\beta$ -glucan이 분해온도가 300°C 인 열에 안정한 물질(16)로 알려져 있을지라도 Wood 등(17)의 정제 시  $\beta$ -glucan 분자량이 작아진다는 보고에서와 같이 미세한 구조적인 변화를 초래하게 될 것이다. 그리고 이러한 변화는 Kang 등(18)의 특성이 다른 crude  $\beta$ -glucan 분획간에 생리활성에 차이가 있다는 보고에서와 같이  $\beta$ -glucan의 생리적 효능을 증가 또는 감소시킬 수 있을 것이다. 그러나  $\beta$ -glucan의 정제에 관한 연구는 순도를 높이기 위한 방법을 탐색한 연구들이 대부분으로 정제 시  $\beta$ -glucan의 특성 변화를 조사한 연구는 찾아보기 어려우므로, 실제 식품산업 현장에서 효율적인 정제공정을 적용하기 위해서는 정제 시  $\beta$ -glucan의 특성 변화를 이해할 필요가 있다.

본 연구에서는 귀리의  $\beta$ -glucan을 건강 기능성 식품소재로 개발하기 위한 연구의 일환으로 생리활성이 우수한 것으로 보고(18)된 바 있는 crude  $\beta$ -glucan 분획의 정제 시 특성변화를 살펴보고자, 열에 안정한  $\alpha$ -amylase를 사용하여 정제하면서  $\beta$ -glucan의 이화학적 특성변화를 조사한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 추출 조건

$\beta$ -Glucan의 추출은 전보(19)와 같은 방법으로 추출온도, 에탄올 농도 및 용매 pH를 조합한 조건 하에서 수행하였다. 본 실험에서는 15개의 분획 중 *in vitro* 실험 결과 항암성이 높았던 분획(B 및 C, 18)과 혈당 저하능이 상대적으로 높았던 분획(A 및 D, not shown) 등 4개의 분획을 선정하여 정제특성을 조사하였다. 각 분획의 추출조건은 A(55°C, 15%, pH 6), B(45°C, 15%, pH 6), C(50°C, 0%, pH 7) 및 D(50°C, 10%, pH 5)이었다.

### $\beta$ -Glucan 정제 시료 조제 및 수율 측정

귀리  $\beta$ -glucan의 정제는 귀리겨(oat bran concentrate, Finland) 500 g을 추출한 후 얻은 원심분리 상등액을 3 등분하여 열에 안정한 전분분해효소인  $\alpha$ -amylase(Termamyl 120 L, 1 mL/100 mL, Novozymes Co., Denmark)을 가하고 95°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 50-60°C 정도로 냉각하고 원심분리하여 1회 정제한 제 1 분획을 얻었다. 나머지 2개의 상등액에 다시  $\alpha$ -amylase(0.5 mL/100 mL)을 가하여 1회 정제 시와 동일하게 처리하여 2회 정제한 제 2 분획을 얻었으며, 마지막 분획에  $\alpha$ -amylase(0.5 mL/100 mL)를 한번 더 처리하여 3회 정제분획인 제 3 분획을 얻었다. 이 후 각 추출물 제 1, 2, 3 분획의 원심분리 상등액을 Jeong 등의 방법(19)에 따라 침전분리한 다음, 95% ethanol(대한주정)을 가해 균질화하여 2회 세척하고 탈수시킨 후 80°C 건조기에서 1-2시간 동안 건조하고 분쇄하여  $\beta$ -glucan 정제시료를 얻었다. 각 정제 단계별로 얻은 시료의 수율은 3회 반복 측정하여 원료에 대한 건물량(%)으로 나타내었다.

### 성분분석

수분 함량은 적외선 수분측정기(FD 600, Kett Electronic Lab., Japan)를 사용하여 측정하였고,  $\beta$ -glucan 함량은 McCleary and Codd의 방법(20)에 준하여 Megazyme  $\beta$ -glucan assay kit(Megazyme Pty. Ltd., Australia)를 사용하여 정량하였으며, 조단백질 함량은 Kjeldahl 법으로 측정하였고, 회분은 직접 회화법으로 측정하였다(21).

### 겉보기 점도 측정

귀리  $\beta$ -glucan 수용액의 점도는 전보에서와 동일한 방법으로 측정하였다(19,22). 즉 온도 jacket과 소량의 시료측정용 adapter가 부착된 점도계(Brookfield DV-II\*, Brookfield Eng. Lab., Inc., Middleboro, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 수용액은 1% 귀리  $\beta$ -glucan(0.2 g/20 mL) 농도로 55-60°C 온도에서 magnetic stirrer를 사용하여 2-3시간 동안 교반하여 용해시켰다. 이 후에는 원심분리(2,000×g, 10 min)하여 불용성 물질을 제거하고 그 상등액 중의 일부를 취하여 점도를 측정하였다. 또, HMC(hydroxy methyl cellulose, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)의 점도를 동일조건에서 측정하여 비교하였다.

### 구성당 분석

구성당은 thin layer chromatography(TLC) 및 HPLC를 이용하여 분석하였다(22).  $\beta$ -Glucan(30 mg)에 2 mol/mL trifluoroacetic acid(TFA) 5 mL를 가한 다음 121°C에서 1시간 동안 가수분해하고 감압농축하여 산을 제거하였다. 잔류물에 증류수 5 mL를 가하여 용해시킨 다음 membrane filter(0.45  $\mu$ m)로 여과하여 0.3  $\mu$ L를 TLC plate에 점적하였다. Acetonitrile-water(85 : 15, v/v)를 전개 용매로 3회 반복적으로 전개하였으며, 발색 시약은 에탄올에 황산 5%,  $\alpha$ -naphthol 0.5%를 용해하여 사용하였고, 전개 후에는 건조하여 spot을 확인하였다. HPLC 분석은 TLC 분석 시와 동일하게 전 처리한 다음 수행하였다. 컬럼은 carbohydrate(3.9×300 mm, Waters)를 사용하였고, 오븐온도는 35°C로 유지하였으며 검출기는 RI(Waters 410 differential refractometer detector), 이동상은 acetonitrile-water(70 : 30, v/v)를 사용하였고, 유속 1 mL/min 하에서 autosampler(Waters 2695, separation module)를 사용하여 주입하였다.

### 평균 분자량 측정

$\beta$ -Glucan의 평균 분자량은 high-performance size-exclusion chromatography(HPSEC)를 사용하여 측정하였다(11). 컬럼은 Ultrahydrogel™ mixed bed linear column(7.8×300 mm, Waters)을 사용하였고, 오븐온도는 35°C로 유지하였으며 검출기는 RI(Waters 410 differential refractometer detector)를 사용하였다. 시료는 1.5 mg/mL의 농도로 60°C, 120 rpm에서 15시간 동안 sodium nitrate(0.1 M)에 용해시킨 후 0.2  $\mu$ m filter로 여과하고 20  $\mu$ L를 주입하였고 0.7 mL/min의 유속 하에서 0.1 M sodium nitrate를 용매로 사용하여 분석하였다.

### $\beta$ -(1→3) : $\beta$ -(1→4) 결합비 분석

귀리  $\beta$ -glucan 시료 중의  $\beta$ -(1→3) :  $\beta$ -(1→4) 결합비는 Izydorczyk 등의 방법(11)을 변형하여 분석하였다. 즉,  $\beta$ -glucan 전체에서 유리되어 나온 glucose의 양과  $\beta$ -(1→3) 결합이 분해되어 생성된 glucose의 양을 구한 다음 두 양의 차이로부터  $\beta$ -(1→4) 결합 분해 시 생성되는 glucose의 양을 추정하였다.  $\beta$ -(1→3) 결합 유리 glucose 함량은  $\beta$ -glucan(2 mg/mL, 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.5) 용액에 lichenase(4 U, Megazyme Pty. Ltd., Australia)를 가하고 40°C에서 22시간 동안 반응시킨 후 sodium acetate buffer(pH 4.0) 5 mL를 가하여 원심분리(2,000×g, 10 min)한 상등액 0.1 mL를 취해 exo-(1→3)-glucanase(1 U, Sigma Co., USA)를 가하여 반응시킨 후 생성된 glucose 양을 GOPOD(Megazyme Pty. Ltd., Sydney, Australia)로 발색시켜 510 nm에서 정량하였고  $\beta$ -(1→4) 결합 유리 glucose 함량은 lichenase 가수분해 후  $\beta$ -glucosidase(Megazyme Pty. Ltd., Aus-

tralia)를 가하여 생성된 총 포도당량에서  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 결합에서 생성된 포도당량(mg)을 감하여 구하였다.

### 시차주사열량계 분석(DSC)

시차주사열량계(DSC 2910, TA instrument, USA)를 사용하여 귀리  $\beta$ -glucan의 열적특성을 조사하였다. 이 때 온도는 30°C부터 250°C까지 질소기류 하에서 10°C/min의 속도로 가열하였으며 얻어진 흡열 곡선의 면적을 계산하여 엔탈피를 구하였고 개시온도 및 피크온도를 얻었다.

## 결과 및 고찰

### 정제수율

귀리 추출물의 정제과정 중 수율은 Table 1과 같이 정제 공정이 진행될수록 감소하였다. 정제하지 않았을 때 수율은 A, B, C 및 D 분획에서 각각 10.2, 7.1, 17.9 및 11.9% 이었으며, 정제 1 단계에서 각각 1.6, 1.2, 6.4 및 2.4%로 감소하였으며 정제 단계가 높아질수록 계속 감소하여 3 단계 정제 후에는 각각 1.4, 1.1, 2.4 및 1.8%로 나타났다. 분획별로는 정제 전·후 모두 C 분획의 수율이 가장 높았는데, 정제 전에 수율이 가장 높았던 것은 추출온도, 에탄올 농도 및 용매의 pH 등 추출조건에 따라 유의적으로 영향을 받아 전분 등의 함량이 높았기

**Table 1. Yield,  $\beta$ -glucan, protein and ash content (% , d.b.), and apparent viscosity (cP) of various  $\beta$ -glucan fractions with purification steps**

Items	Fraction <sup>1)</sup>	Purification step <sup>3)</sup>			
		None	1st	2nd	3rd
Yield	A	10.2	1.6	1.4	1.4
	B	7.1	1.2	1.2	1.1
	C	17.9	6.4	3.5	2.4
	D	11.9	2.4	2.0	1.8
$\beta$ -Glucan	A	29.6	83.8	84.6	86.0
	B	38.3	80.9	83.6	84.6
	C	22.8	38.1	64.2	81.4
	D	24.5	70.9	85.9	88.2
Protein	A	27.3	5.9	4.4	4.2
	B	25.6	5.7	4.5	3.4
	C	23.6	39.6	19.9	6.3
	D	25.4	15.7	5.0	4.1
Ash	A	6.8	3.0	3.5	3.2
	B	7.9	3.3	3.5	2.6
	C	6.7	5.1	6.1	6.2
	D	6.6	4.6	4.2	4.2
Apparent viscosity <sup>2)</sup>	A	6.6	100.3	100.3	100.1
	B	4.3	99.7	99.8	90.0
	C	2.2	60.3	99.7	99.7
	D	13.6	100.0	100.0	99.7

<sup>1)</sup>A fraction (55°C, 15%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 0%, pH 7), D fraction (50°C, 10%, pH 5). <sup>2)</sup>Apparent viscosity (cP) was measured on 1% aqueous solution at 4°C and the shear rate of 39.6s<sup>-1</sup>. \*The viscosity of HMC(hydroxy methyl cellulose) was 100.1 cP at the same condition. <sup>3)</sup>None:  $\beta$ -glucan fraction without purification, 1st:  $\beta$ -glucan fraction after purification 1st step, 2nd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 2nd step, 3rd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 3rd step.

때문인 것으로 보고되었다(19). C 분획이 정제 단계별로 수율이 높았던 것은 정제 전 높은 전분 함량으로 인하여 효소에 의한 정제효율이 낮았기 때문으로 판단된다.

### 성분 함량

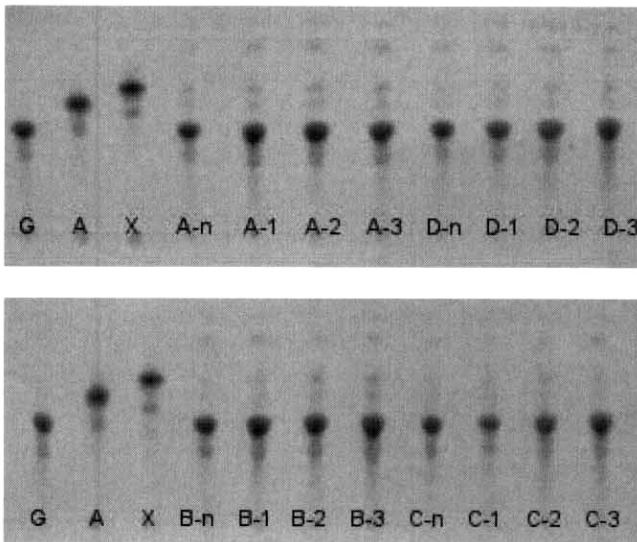
귀리 추출물의 정제과정 중  $\beta$ -glucan, 단백질 및 회분 함량을 조사한 결과 Table 1과 같이  $\beta$ -glucan 함량은 점차 높아졌고, 단백질 및 회분 함량은 감소하였다.  $\beta$ -Glucan 함량은 정제하지 않았을 때 A, B, C 및 D 분획에서 각각 29.6, 38.3, 22.8 및 24.5%였으며, 정제 1 단계에서 각각 83.8, 80.9, 38.1 및 70.9%로 C 분획을 제외한 모든 분획에서 급격히 증가하였다. 이 후 정제 공정이 진행될수록 증가폭은 감소하여 3 단계 정제 후에는 각각 86.0, 84.6, 81.4 및 88.2%의 함량을 보였다. 한편 C 분획은 정제 단계별로 38.1, 64.2, 81.4%로 완만히 증가하는 경향을 보였다. C 분획은 전분함량이 높은 분획으로 정제 전 추출물의 전분함량이 정제 속도를 늦추면서 수율을 증가시키는 것으로 알 수 있었다. 이러한 현상은 전분함량이 두 번째로 높았던 D 분획(25.5%)의 1차 정제시에  $\beta$ -glucan 함량이 70.9%로 다소 낮고, 수율이 2.4%로 높았던 것에서도 확인할 수 있었다.

단백질 함량은 정제하지 않았을 때는 A, B, C 및 D 분획에서 각각 27.3, 25.6, 23.6 및 25.4% 이었다가 정제 1 단계에서는 각각 5.9, 5.7, 22.1 및 15.7%로 감소하였으며 이후 정제 단계가 증가할수록 감소하여 3 단계 정제 후에는 각각 4.2, 3.4, 6.3 및 4.1%의 함량 보였다. 이로부터  $\alpha$ -amylase 처리 공정 중  $\beta$ -glucan으로부터 단백질이 일부 제거됨을 알 수 있었는데 이는 열처리 시 변성된 단백질이 원심분리 과정에서 제거된 것으로 판단된다. 단백질의 침전현상은 실험과정 중에서도 확인할 수 있었으며 C 분획에서 가장 두드러지게 나타났다. 회분 함량도 정제 단계에 따라 감소하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 medium laboratory 규모의  $\beta$ -glucan 추출 및 정제 시에 추출물 중의 주된 혼입물인 전분 및 단백질 성분은  $\alpha$ -amylase 효소나 효소반응을 위한 열처리 조작에 의하여 효과적으로 제거할 수 있음을 알 수 있었다.  $\beta$ -Glucan 정제 시  $\alpha$ -amylase의 이용은 이미 small laboratory scale 일 때 여러 문헌에서 보고된 바 있는 바, 본 문헌에서는 산업적인 규모에서의 활용 가능성을 제안하고자 한다. 그러나 산업적인 규모에서 고순도  $\beta$ -glucan 분획을 얻기 위해서는 정제공정의 반복적인 수행이나 농축공정 등의 보다 더 정교한 작업을 추가하거나 Beer 등(10)의 제안과 같이 알코올 침전법 대신 ultrafiltration 방법을 사용함으로써 전분 및 단백질의 혼입율을 낮추는 것도 고려해 볼 수 있을 것이다.

### 겉보기 점도

귀리 추출물의 정제과정 중 겉보기 점도는 Table 1과 같이 정제공정이 진행될수록 높아졌다.  $\beta$ -Glucan의 점도는 혈중 glucose의 농도를 낮추는 등  $\beta$ -glucan이 나타내는 생리활성의 주요인으로 해석되고 있을 뿐 아니라(1,2) 식품산업에서 식감이 좋은 우수한 증점제로서의 가치도 인정받고 있으므로(15,22,23) 정제과정 중의  $\beta$ -glucan의 점도 변화를 살펴보고자 하였다. 정제하지 않았을 때 점도는 A, B, C 및 D 분획에서 각각 6.6, 4.3, 2.2 및 13.6 cP로 나타났으며, 정제될수록 A 분획은 100.3, 100.3 및 100.1 cP로, B 분획은 99.7, 99.8 및 90.0 cP로, C 분획은 60.3, 99.7 및 99.7 cP로, D 분획은 100.0, 100.0 및 99.7 cP로 각각 증가하면서 유사해졌다. C 분획을 제외한 모든 분



**Fig. 1. Thin layer chromatography of various  $\beta$ -glucan fractions with purification steps.**

G: Glucose, A: Arabinose, X: Xylose. 1) A-n:  $\beta$ -glucan A fraction\* without purification, A-1:  $\beta$ -glucan A fraction after purification 1st step, A-2:  $\beta$ -glucan A fraction after purification 2nd step, A-3:  $\beta$ -glucan A fraction after purification 3rd step. \* A fraction(55°C, 15%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 0%, pH 7), and D fraction (50°C, 10%, pH 5).

획에서 1 단계 정제시 급격히 점도가 증가하여 일정한 수준을 유지한 반면, C 분획은 1 단계 정제 후에는 완만히 증가하다가 2 단계 정제 후에 급격히 증가하여 다른 처리구와 유사해졌다. 즉, 겔보기 점도는  $\beta$ -glucan 함량이 64.2% 이상인 모든 분획에서 100±3 cP 범위에서 유사해지는 것으로 나타났다. 이와 같이 정제될수록 점도가 유사해지는 경향은 ammonium sulfate 정제 후에 추출온도가 다른 처리구간의 내부 점도 차이가 작아졌다는 보고(7)와 일치하는 결과였다. 정제 시 점도 상승의 주요인은  $\beta$ -glucan의 함량증가로 생각되나 C 분획 2차 정제(64.2%) 및 3차 정제 분획(81.4%)의  $\beta$ -glucan 함량이 다소 차이가 있음에도 불구하고 동일한 점도(99.7 cP)를 나타낸 것으로 미루어 볼 때 비교적 저농도일 때는 Krumel과 Sarkar의 보고(23)에서와 같이  $\beta$ -glucan의 농도 이외에 기타 성분이나 분자량 등의 차이에 의하여 점도가 상승하는 것으로 판단된다.

**구성당**

귀리 추출물의 정제 과정 중 구성당을 TLC 및 HPLC로 분석한 결과는 각각 Fig. 1 및 Table 2와 같다.  $\beta$ -Glucan의 구성당을 산가수분해한 다음 TLC를 이용하여 정성한 결과 정제 전·후 모두 대부분의 당이 glucose 인 것으로 확인되었고, arabinose와 xylose는 소량으로 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 arabinose와 xylose 등의 pentosan은 귀리 세포벽에 존재하는  $\beta$ -glucan 이외의 주된 다당류 성분으로 귀리 추출물 중에 쉽게 혼입되는 것으로 알려져 있다. 정제 전·후에 나타난 pentosan의 패턴에 거의 차이가 없는 것으로 보아 정제 후에도 pentosan의 분리가 완전히 이루어지지 않은 것으로 판단된다.  $\beta$ -Glucan 추출물 중 pentosan은 isopropyl alcohol이나 ammonium sulfate를 이용하여 침전하면 효과적으로 제거할 수 있으나 Beer 등(10)의 pilot plant 규모로 ethanol 침전으로 얻은 귀리 gum 중에 pentosan이 1.9% 정도 존재하였다는 보고 및 Woodward 등

**Table 2. Glucose content of various  $\beta$ -glucan fractions with purification steps (unit: %)**

Fraction <sup>1)</sup>	Purification step <sup>2)</sup>			
	None	1st	2nd	3rd
A	39.0	87.5	87.9	89.4
B	54.9	92.7	91.4	91.6
C	47.8	43.3	69.6	87.5
D	50.3	75.2	90.6	90.5

<sup>1)</sup>A fraction (55°C, 15%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 0%, pH 7), D fraction (50°C, 10%, pH 5). <sup>2)</sup>None:  $\beta$ -glucan fraction without purification, 1st:  $\beta$ -glucan fraction after purification 1st step, 2nd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 2nd step, 3rd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 3rd step.

**Table 3. Average molecular weight of various  $\beta$ -glucan fractions with purification steps (unit: × 10<sup>6</sup>)**

Fraction <sup>1)</sup>	Purification step <sup>2)</sup>			
	None	1st	2nd	3rd
A	2.8	3.5	3.3	2.3
B	4.6	4.6	4.5	2.0
C	4.1	4.2	5.1	3.7
D	4.8	4.1	3.8	4.4

<sup>1)</sup>A fraction (55°C, 15%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 0%, pH 7), D fraction (50°C, 10%, pH 5). <sup>2)</sup>None:  $\beta$ -glucan fraction without purification, 1st:  $\beta$ -glucan fraction after purification 1st step, 2nd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 2nd step, 3rd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 3rd step.

(25)의 ethanol 침전으로 얻은 보리  $\beta$ -glucan에서 glucose 98.3%, arabinose 1.1%, xylose 0.6%가 검출되었다는 보고에서와 같이 ethanol 사용으로 인하여 pentosan의 분리가 용이하지 않았던 것으로 판단된다. 그러나 HPLC를 이용하여 구성당을 정량한 결과에서는 정제전·후 모두 glucose 만이 검출되었을 뿐 arabinose 및 xylose는 확인되지 않았는데 이는 arabinose 및 xylose의 함량이 glucose에 비하여 상대적으로 매우 적었기 때문에 검출이 어려웠던 것으로 사료된다. 정제전 분획에서도 glucose만 확인된 것은 혼입된 전분이 산가수분해되어 glucose 함량을 상승시켰기 때문으로 생각된다. Glucose 함량은 산가수분해 시가  $\beta$ -glucan 정량을 목적으로 효소분해한 경우보다 높게 나타났는데 이에 대한 원인으로 Dawkins와 Nanna의 보고(22)처럼 효소보다 산처리에 의해서  $\beta$ -glucan이 더 효과적으로 분해된 것과 산처리시 잔존 전분류로부터 glucose가 분해되어 정량된 것들을 들 수 있을 것이다.

**평균 분자량**

귀리 추출물의 정제 과정 중 평균 분자량을 HPSEC를 사용하여 분석한 결과는 Table 3과 같다. 정제하지 않은  $\beta$ -glucan 분획에서는 용매를 제외한 2개 또는 3개의 peak가 검출되다가 정제가 진행될수록 peak 수가 감소하여 retention time(RT)이 짧은 앞쪽의 peak만이 검출되는 것을 볼 수 있었다. 이 결과를 정제과정 중  $\beta$ -glucan의 함량이 증가하는 것과 관련지어 볼 때 RT가 짧은 peak가  $\beta$ -glucan 분자량 peak로, RT가 긴 peak는 기타 성분들의 분자량 peak로 판단되었다.

정제하지 않은  $\beta$ -glucan 분획의 평균분자량은 2.8×10<sup>6</sup>-4.8×10<sup>6</sup> 범위로 A 분획이 가장 작았고 나머지 3개의 분획은 유사

**Table 4. DSC characteristics of various  $\beta$ -glucan fractions with purification steps**

Fraction <sup>1)</sup>	Purification step <sup>2)</sup>	Peak 1			Peak 2		
		To (°C)	Tp (°C)	$\Delta H$ (J/g)	To	Tp	$\Delta H$ (J/g)
A	None	92.10	133.17	146.1	218.91	223.33	4.1
	1st	88.89	130.09	213.3	-	-	-
	2nd	89.13	131.42	232.7	-	-	-
	3rd	91.10	133.59	223.1	-	-	-
B	None	87.53	132.43	141.4	219.61	224.16	4.3
	1st	87.32	134.88	191.2	-	-	-
	2nd	95.29	139.06	212.5	-	-	-
	3rd	88.95	137.60	218.0	-	-	-
C	None	82.56	132.28	165.8	221.68	225.79	2.3
	1st	97.47	141.61	130.7	218.41	222.97	3.8
	2nd	99.09	137.61	173.0	218.58	222.79	1.4
	3rd	99.55	140.71	232.9	-	-	-
D	None	99.44	136.34	139.0	219.75	224.07	3.8
	1st	90.92	133.98	172.6	220.53	224.61	0.5
	2nd	87.51	134.08	195.0	-	-	-
	3rd	81.42	130.01	222.9	-	-	-

<sup>1)</sup>A fraction (55°C, 15%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 0%, pH 7), and D fraction (50°C, 10%, pH 5). <sup>2)</sup>None:  $\beta$ -glucan fraction without purification, 1st:  $\beta$ -glucan fraction after purification 1st step, 2nd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 2nd step, 3rd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 3rd step.

한 범위였으며, Wood 등(17)의 HPSEC로 분리한 후 calcoflour 검출하여 얻은 귀리겨의  $\beta$ -glucan 분자량인  $3 \times 10^6$ 과 유사한 결과였다.  $\beta$ -Glucan의 분자량은 추출온도가 높아질수록 증가하며, 저분자량의  $\beta$ -glucan은 고분자량  $\beta$ -glucan 보다 쉽게 추출할 수 있고 고농도의 ammonium sulfate를 이용하여 침전할 경우 분자량이 작은 분획을 얻을 수 있다고 한다(11,12). 본 실험에서는 추출용매인 에탄올 농도는 높고 추출온도는 낮을수록  $\beta$ -glucan의 추출속도가 감소했던 보고(19)와 에탄올 농도가 높았던 분획의 ethanol 침전물이 powder 형태를 나타내는 것을 볼 때 저온 및 고농도 용매를 사용할수록 저분자 형태의  $\beta$ -glucan 분획을 얻을 수 있을 것으로 예상되었으나 분획간의 뚜렷한 경향은 확인 할 수 없었다. 정제 단계별 평균 분자량은  $2.0 \times 10^6$ - $5.1 \times 10^6$ 범위로 나타났으며, 분획간 다소 차이는 있으나 정제가 진행됨에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이는 정제시에 분자량이 감소한다는 결과(17)와 유사하며, 점도를 감소시키지 않는 범위에서 이루어졌다.

#### $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3): $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 결합비

귀리 추출물의 정제 과정 중  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)에 대한  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 결합비의 변화를 조사한 결과는 Table 4와 같다.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 결합은  $\beta$ -glucan 사슬에서 불규칙적으로 등장하여 상대적으로 단단한 리본모양의  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan 구조형성을 방해하여  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucan의 유연성과 불규칙적인 모양을 갖게 하고, 물에서의 용해성도 향상시키므로(24) 수용성  $\beta$ -glucan이 나타내는 우수한 생리적 기능성과 밀접한 관련성이 있을 것으로 생각된다.

정제하지 않았을 때  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)과  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 간의 비율은 A, B, C 및 D 분획에서 각각 2.22, 2.52, 2.48 및 2.20으로 처리구간에 미세한 차이만이 나타났다. 이러한 결과는 Aspinnall과 Carpenter(25)의 oat bran을 산가수분해한 다음 methylation하여 GLC-MS로 분석하여 얻은 결합비인 1.26과 유사한 범위였으나 Fleming과 Kawakami(26)의 보리의  $\beta$ -glucan내의  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)결

합의 인접수는 추출 온도가 높아질수록 더 많아진다는 보고와 같이 추출조건에 따라 미세한 차이가 있을 것으로 판단된다.

정제과정 중 결합비는 A 분획이 정제전에 2.22에서 정제 단계가 높아질수록 4.68, 4.41 및 4.63으로 증가했고 B 분획은 2.52에서 4.27, 4.48 및 4.52로, C 분획은 2.48에서 2.36, 4.25 및 5.16으로 D 분획은 2.20에서 4.44, 5.54 및 5.50으로 각각 현저히 증가하였다. 이는 정제과정 중 열처리 등의 물리적인 조작에 의하여  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 결합이  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)결합보다 쉽게 분해됨을 나타내는 결과이며, 정제 시의 분자량이 감소한 결과와도 관련이 있는 것으로 보인다. 한편 분자량과  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)결합비 간의 관계에 대해서는 Izydorczyk 등(11)에 의해서도 ammonium sulfate의 농도를 30-50%로 달리하여 얻은 분획에서  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)결합비가 높은 분획의 평균 분자량이 작았다고 보고된 바 있다.

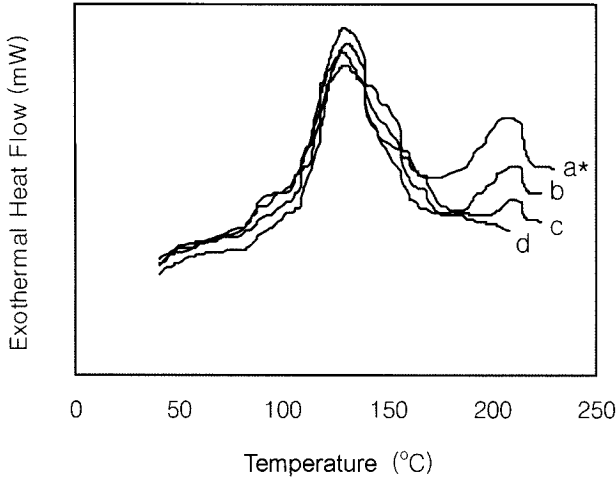
#### 열적 특성

귀리 추출물의 정제과정 중 열적 특성 변화를 DSC를 사용하여 250°C까지 가열하면서 흡열특성과 엔탈피 변화를 조사한 결과는 Fig. 2 및 Table 5와 같다.

흡열곡선은 정제하지 않은 경우 모든 분획에서 2개로 나타났으며, 정제 과정 중에는 정제도가 낮은 시료일 경우 2개의 곡선을 보이다가 정제가 진행됨에 따라 1개로 감소하였다. 따라서 1차 흡열곡선이 Biliaderis 등(27)이 보고한 하나의 성분이 수분의 존재없이 순전히 열에 의해서만 녹는 온도인  $\beta$ -glucan의 true melting point 이고 2차 흡열곡선은  $\beta$ -glucan 외에 다른 미지의 성분이 나타내는 융점으로 판단되어 1차 곡선에 대하여 고찰하였다.

정제하지 않았을 때 융점은 132-136°C 범위로 개시온도(onset)는 82-99°C 범위로 나타났고 융점 및 개시온도 모두 C 분획이 가장 낮았고 D 분획이 가장 높았다. 엔탈피는 139.0-165.8 J/g으로 D 분획이 가장 낮고 C 분획이 가장 높게 나타났다.

정제과정 중 융점은 130-141°C 범위에서 소폭으로 변하여 A



**Fig. 2.** DSC thermogram of various  $\beta$ -glucan subfractions with purification steps in Fraction C.

\*a:  $\beta$ -glucan fraction without purification, b:  $\beta$ -glucan fraction with 1st purification step, c:  $\beta$ -glucan fraction with 2nd purification step, d:  $\beta$ -glucan fraction with 3rd purification step. Fraction C was extracted at 50°C, 0% ethanol concentration and pH 7.

**Table 5.** Analysis of ratio of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) to  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) in various  $\beta$ -glucan fractions with purification steps

Fraction <sup>1)</sup>	Purification step <sup>2)</sup>	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (mg)	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (mg)	Ratio $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)/ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)
A	None	1.92	4.27	2.22
	1st	3.05	14.28	4.68
	2nd	3.07	13.53	4.41
	3rd	3.16	14.62	4.63
B	None	2.29	5.76	2.52
	1st	3.15	13.46	4.27
	2nd	3.14	14.07	4.48
	3rd	3.14	14.18	4.52
C	None	1.14	2.82	2.48
	1st	2.36	5.57	2.36
	2nd	2.51	10.65	4.25
	3rd	2.69	13.90	5.16
D	None	1.60	3.53	2.20
	1st	2.69	11.95	4.44
	2nd	2.72	15.08	5.54
	3rd	2.78	15.31	5.50

<sup>1)</sup>A fraction (55°C, 15%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 0%, pH 7), D fraction (50°C, 10%, pH 5). <sup>2)</sup>None:  $\beta$ -glucan fraction without purification, 1st:  $\beta$ -glucan fraction after purification 1st step, 2nd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 2nd step, 3rd:  $\beta$ -glucan fraction after purification 3rd step.

및 D 분획은 약간 낮아졌고 B 및 C 분획은 증가하는 경향을 보였는데 이는 차 등(16)이 보고한 보리  $\beta$ -glucan의 true melting 온도인 184°C보다는 낮은 결과였다. 개시온도(onset)는 정제할수록 A 및 D 분획은 낮아졌으나 B 및 C 분획은 높아져 정제 시 용점의 변화와 유사한 경향을 보였다. 엔탈피는 정제도가 높아질수록 증가하는 경향을 보였는데 이는 분자량이 작아질수록 엔탈피가 증가한다는 Lazaridou 등(29)의 보고와 일치하고 정제과정 중 평균 분자량이 감소한 결과와도 일치한다. 이처럼 정제 시 용점, 개시온도 및 엔탈피가 다른 것은 김 등(28)의  $\beta$ -

glucan의 농도에 따라 상전이 온도가 다르다는 보고 및 Lazaridou 등(29)의 gel화에 걸리는 흡열속도는 분자량과 (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucan의  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 결합 사이에 존재하는  $\beta$ -glucose의 중합도(degree of polymerization)인 DP3/DP4의 비가 증가할수록 빨라진다는 보고에서와 같이 미세한 구조적인 변화가 일어나는 것으로 예측되나 실험결과 뚜렷한 경향을 찾는 데는 어려움이 있었다.

이상의 결과로부터 본 정제조건에 의하여  $\beta$ -glucan 함량을 80%이상으로 높일 수 있고  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)에 대한  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 결합비는 증가하면서 평균 분자량은 점도의 큰 변화를 일으키지 않는 범위에서 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 미세한 구조적인 변화에 대해서는 충분한 연구가 이루어지지 못하였다. 따라서 정제공정의 실용화를 위해서는 정제시의 DP3/DP4 비율 등 추가적인 구조 분석 및 정제도에 따른 생리활성 연구를 통하여 기초 자료를 확보하여야 할 것이다.

## 요 약

생리활성이 우수한 귀리추출물 4개 분획인 A분획(55°C, 15%, pH 6), B분획(45°C, 15%, pH 6), C분획(50°C, 0%, pH 7) 및 D분획(50°C, 10%, pH 5)을 대상으로 산업적인 정제가능성을 조사하기 위하여, 식품용 전분 분해 효소( $\alpha$ -amylase)를 사용하여 정제하면서  $\beta$ -glucan의 특성변화를 조사하였다. 추출물 상등액에  $\alpha$ -amylase를 가하고 95°C에서 1시간 반응하는 과정을 3회 반복하여 각 시료당 3개의 하위분획을 얻었다. 최종 정제 후 81.4-88.2% 순도의  $\beta$ -glucan을 얻었고, 단백질 및 회분 함량은 각각 4.1-6.3% 및 2.6-6.2% 범위였다. 점도는 정제 후 HMC의 점도와 유사해졌고, 구성당은 glucose만이 정량되었으나 xylose, arabinose 등이 TLC상에 소량 확인되었다. 평균분자량은  $2.0 \times 10^6$ - $5.1 \times 10^6$  범위에서 약간 감소하였으며, 열분석결과  $\beta$ -glucan의 피크온도는 약 130-140°C 범위에서 정제도에 따라 증가 또는 감소하였으나 엔탈피는 증가하였다.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)에 대한  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 결합비는 1:2.20에서 정제 후에는 최대 1:5.50까지 증가하였다. 이상의 결과로부터 본 정제조건에 의하여 점도의 변화가 없는 범위에서  $\beta$ -glucan의  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 결합의 분해가 증가하면서 평균 분자량이 감소하는 특성을 가진 80% 이상의  $\beta$ -glucan 분획을 얻을 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Wood PJ, Anderson JW, Bratten JT, Cave NA, Scott FW, Vachon CV. Physiological effects of  $\beta$ -D-glucan rich fraction from oats. *Cereal Food World* 34: 878-882 (1989)
- Vahouny GV, Kritchevsky D. *Dietary Fiber: Basic and Clinical Aspects*. Plenum Press, New York, USA pp. 253-264 (1986)
- Miller SS, Fulcher RG. Oat endosperm cell walls: II. Hot water solubilization and enzymatic digestion of the walls. *Cereal Chem.* 72: 428-432 (1995)
- Forrest IS, Wainwright T. The mode of binding of  $\beta$ -glucans and pentosans in barley endosperm cell walls. *J. Inst. Brew.* 83: 279-286 (1977)
- Miller SS, Fulcher AS, Arnason JT. Oat endosperm cell walls: I. Isolation, composition, and comparison with other tissues. *Cereal*

- Chem. 72: 421-427 (1995)
6. Bhatti RS. Extraction and enrichment of (1→3, 1→4)-β-D-glucans from barley and oat brans. *Cereal Chem.* 70: 73-77 (1993)
  7. Wood PJ, Siddiqui IR, Paton D. Extraction of high-viscosity gums from oats. *Cereal Chem.* 55: 1038-1049 (1978)
  8. Dawkins NL, Nnanna IA. Oat gum and β-glucan extraction from oat bran and rolled oats: temperature and pH effects. *J. Food Sci.* 58: 562-566 (1993)
  9. Henry RJ. A simplified enzyme method for the determination of (1→3)(1→4)-β-glucans in barley. *J. Inst. Brew.* 90: 178-180 (1984)
  10. Beer MU, Arrigoni E, Amado R. Extraction of oat gum from oat bran: Effects of process on yield, molecular weight distribution, viscosity and (1→3)(1→4)-β-D-glucan content of the Gum. *Cereal Chem.* 73: 58-62 (1996)
  11. Izydorczyk MS, Biliaderis CG, Macri LJ, Macgregor AW. Fractionation of oat (1→3)(1→4)-β-D-glucans and characteristics of the fractions. *J. Cereal Sci.* 27: 321-325 (1998)
  12. Wang G, Wood PJ, Cui HW. Preparation characterization of molecular weight standards of low polydispersity from oat and barley (1→3)(1→4)-β-D-glucan. *Food Hydrocol.* 17: 845-853 (2003)
  13. Wood PJ. Structure, location and properties. p. 121. In: *Oats: Chemistry and Technology*. Webster FH (ed). Amer. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN, USA (1986)
  14. Carr JM, Glatter S, Jeraci JL, Lewis BA. Enzymic determination of β-glucan in cereal-based food products. *Cereal Chem.* 67: 226-229 (1990)
  15. Lee YT. Physicochemical characteristics and physiological functions of β-glucans in barley and oats. *Korean J. Crop Sci.* 41: 10-24 (1996)
  16. Cha HS, Kim MO, Koo SJ. A study on the thermal characterization of barley β-glucan [mixed-linked (1→3),(1→4)-β-D-glucan] by differential scanning calorimetry. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 22-27 (1993)
  17. Wood PJ, Weisz J, Blackwell BA. Structural analysis of oat β-D-glucan and rapid structural evaluation of β-D-glucan from different sources by high-performance liquid chromatography (HPLC) of oligosaccharides released by Lichenase. *Cereal Chem.* 68: 31-39 (1991)
  18. Kang TS, Jeong HS, Park HJ, Lee MY, Kong YJ, Jung IS. Biological activities of oat soluble β-glucans. *Korean J. Food Preserv.* 10: 547-553 (2003)
  19. Jeong HS, Kang TS, Park HJ, Jung IS, Lee HY. Characteristics of viscosity and component of soluble extract in oats. *Food Eng. Prog.* 8: 40-46 (2004)
  20. McCleary BV, Homes MG. Enzymatic quantification of (1→3)(1→4)-β-D-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.* 91: 285-295 (1985)
  21. AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Method. 900.02. Association of Official Chemists, Washington, DC, USA (1990)
  22. Dawkins NL, Nnanna IA. Studies on oat gum [(1→3, 1→4)-β-D-glucan]: composition, molecular weight estimation and rheological properties. *Food Hydrocolloid* 9: 1-7 (1995)
  23. Krumel KL, Sarkar N. Flow properties of gums useful to the food industry. *Food Technol.* 29: 36-44 (1975)
  24. Woodward JR, Fincher GB, Stone BA. Water-soluble (1→3)(1→4)-β-D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. II. Fine structure. *Carbohydr. Polym.* 3: 207-225 (1983)
  25. Aspinall GO, Carpenter RC. Structural investigation on the non-starchy polysaccharides of oat bran. *Carbohydr. Polym.* 4: 271-282 (1984)
  26. Fleming M, Kawakam K. Studies of the fine structure of β-D-glucans of barleys extracted at different temperature. *Carbohydr. Res.* 57: 15-23 (1977)
  27. Biliaderis CG, Maurice TJ, Vose JR. Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* 45: 1669-1674 (1980)
  28. Kim SR, Choi HD, Seong HM, Kim SS, Lee YT. Physicochemical characteristics of β-glucan isolated from barley. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1164-1170 (1999)
  29. Lazaridou A, Biliaderis CG, Micha-Serettas M, Steele BR. A comparative study on structure-function relations of mixed-linkage (1→3)(1→4) linear-glucans. *Food Hydrocolloid* 5: 1-19 (2004)

---

(2005년 6월 4일 접수; 2005년 8월 16일 채택)