

# 찰보리 전분 추출에 있어서 $\beta$ -Glucanase 처리 효과

배재석<sup>1</sup> · 이의석<sup>1</sup> · 정용선<sup>1</sup> · 김정원<sup>1</sup> · 이미자<sup>2</sup> · 홍순택<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 식품공학과, <sup>2</sup>국립식량과학원 벼맥류부

## $\beta$ -Glucanase-assisted extraction of starch from glutinous barley

Jae-Seok Bae<sup>1</sup>, Yong-Sun Jeong<sup>1</sup>, Jeong-Won Kim<sup>1</sup>, Eui-Suk Lee<sup>1</sup>, Mi-Ja Lee<sup>2</sup>, Soon-Taek Hong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Chungnam National University, DaeJeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>National Institute of Crop Science, wintercereal and forage crop research division, Suwon 411-857, Korea

Received on 17 September 2012, revised on 24 September 2012, accepted on 25 September 2012

**Abstract** : In the present study,  $\beta$ -glucanase-assisted extraction of starch from glutinous barley(Hinchal ssalbory) was investigated.  $\beta$ -glucanase was added to a coarse starch suspension obtained after wet milling in the starch extraction process. It was found that in the isolated starch with enzyme treatment, protein content was lower by 0.03%, compared to that with non-enzyme treatment. More importantly it was observed that the extraction yield of starch from enzyme treatment was found to be about 12% higher than the one from non-enzyme treatment (enzyme treated: 90.56%, non-enzyme treated: 78.46%). In order to elucidate this finding, the mass-balance determination of starch in each extraction step was carried out and found that the enzyme treatment might influence on the insoluble residues(R3 and R4 fractions) to hydrolyze  $\beta$ -glucan and other materials (e.g., mucilages etc.), thereby facilitated the separation of starch from it and a next filtration process. With a phase-contrast microscope it was observed that the isolated starch with enzyme treatment contained small starch granules more than the one with non-enzyme treatment and this might result in higher extraction yield observed with the former. In order to confirm this hypothesis, further experiments would be necessary.

**Key words** : Glutinous barley,  $\beta$ -glucanase, Isolated starch, Yield, Phase-contrast microscope

## I. 서론

전분은 식물체내에서 합성되는 아밀로스 및 아밀로펙틴으로 구성된 탄수화물계 고분자이며 생물자원이어서 풍부하고, 다양한 용도에 이용되기에 그 특성측면이 매우 중요하다. 사용분야로는 농후제, 결합제, encapsulating agent, 겔화제, 조직감 조정제 등의 식품 분야(Mauro, 1996)와 제지, 섬유, 의약품, 화학물질의 전구체 등 다양하게 이용되고 있다. 또한 석유 에너지의 대체 가능성이 가장 큰 소재로 태양에너지나 원자력 에너지와 함께 3대 에너지원으로 중요시되고 있다(Lee, 1997). 이에 수요가 점차 늘어 90년도 이후 연평균 10%에 이르는 높은 성장률을 나타내고 있다(Agriculture, Fisheries & Livestock News, 1997).

보리는 재배역사가 가장 오래된 작물로 옥수수, 밀, 쌀과

같이 전분을 공급하는 세계 4대 곡물자원 중 하나이다. 보리는 보통 64%의 전분함량을 가지고 함유하고 있으며, 11%의 단백질과 5% 내외의  $\beta$ -glucan 그 외 수분, 섬유질 등, 기타 성분 20%로 이루어져 있다(Macgregor와 Fincher, 1993). 일반적으로 식물의 배유부 외층의 구성물질은 pectin이 대부분인데 비해 보리의 경우는 70~75%의  $\beta$ -glucan, 20~35%의 arabinoxylan, 3~5% protein, 2% 정도의 mannan 등의 matrix 형태인 치밀한 조직으로 되어 있다(Fincher, 1975). 따라서 전분을 분리하기 위해서는 배유 세포 바깥의  $\beta$ -glucan의 분해를 통해 배유부 세포벽을 제거한 후 단백질 middle-lamella에 싸여있는 전분입자를 노출시켜야하는 어려움이 있다(Palmer, 1972; Palmer, 1975).

기존 선행 연구에서 보리 중 전분추출 방법으로 wet-milling(De Haas와 Goering, 1972), 온수 추출법(Fleming와 Kawakami, 1997), autoclave법(Anderson 등, 1978), alkali처리법(Wood 등, 1983; Palmer와 Mackenzie,

\*Corresponding author: +82-42-821-6727

E-mail address: hongst@cnu.ac.kr

1986), perchloric acid 처리법(Ahluwalia와 Ellis, 1984) 등이 있으나, 전분수율 측면에서 보면 60%의 낮은 수준으로 이의 개선이 요구되고 있다. 이에 전분을 효과적으로 분리하기 위해 다른 식물로부터 전분분리 공정에 이용하였던 효소(cellulase, xylanase, protease 등)를 응용하게 되었다(Christophersen 등, 1997; Padmanabhan 등, 1993; Weegels 등, 1992). 이러한 효소의 사용은, 전분 추출을 용이하게 할 뿐 아니라 용액의 점도를 감소시킴으로써 추출공정 시간을 단축시키며 단백질 회수 또한 쉽게 이루어지게 한다고 보고하고 있다. 특히 Zheng과 Bhatt(1998)는  $\beta$ -glucanase와 다수의 효소를 사용하여 보리 시료 중의  $\beta$ -glucan을 효과적으로 제거 하였으며, 전분의 이화학적 성질의 변화 없이 추출수율을 10%가량 증대시켰다. 또한 Seo(1999)도 보리전분 분리를 위해  $\beta$ -glucanase를 사용하였으며, 추가적으로 alkali처리를 통해 순도 높은 전분을 얻을 수 있었음을 보고하였다.

그러나, 이와 같이 보리의 전분추출 공정에  $\beta$ -glucanase를 사용하였을 때 수율 증대 등 긍정적인 효과가 있음이 보고되었으나, 효소의 사용이 각 전분 추출 단계에서 실제적으로 어떠한 영향을 주는지에 대한 연구는 진행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 보리 전분 추출공정 중 각 단계별로 전분 balance를 측정함으로써  $\beta$ -glucanase의 처리 효과를 확인하고, 추출된 전분의 morphology를 조사하여 수율증대의 원인을 규명하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용한 재료는 쌀보리 품종 중 2011년에 생산된 흰찰 쌀보리로 농촌진흥청에서 공급받아 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 효소 Ultraflo L(Novozyme, Denmark)은 열에 안정적인 multi-active  $\beta$ -glucanase로서 *Humicola insolens*에서 얻은 것을 사용했다. Ultraflo L의 unit는 45 FBG/g 이며, 최적 pH 및 온도는 각각 6.5, 45°C이다.

### 2. 전분 추출을 위한 보리의 전처리

추출 전처리 공정으로 보리 시료를 수침하였다. 수침은 시료의 10배의 수돗물을 20°C로 맞춰 10분간 휘저어주며

시행하였으며, 이후 수침 시료를 체에 바쳐 30°C, 80% 상대습도 조건에서 30분간 물을 빼낸 후 roll milling 하였다(Roll mill 간격 : 1 mm, 통과횟수 : 5회). 이렇게 하여 얻은 crushed barley는 저장 중 변질을 방지하기 위해 -20°C 냉동실에 보관하면서 실험에 이용하였다.

### 3. 전분 추출 공정

보리 전분의 추출은 Andersson 등(2001)의 방법을 변형하여 Fig. 1과 같이 추출하였다. 먼저 crushed barley 50 g(wet basis)을 시료의 5배의 침지액에 넣고 45°C 인큐베이터에서 16 hr동안 침지시켰다. 침지액은 crushed barley가 가지는 내부 효소의 활성을 막고자 0.03 M HCl 용액을 사용하였다. 수침이 완료된 sample을 omni-mixer(Omni International, USA)를 이용하여 속도 '3'에서 분쇄하였다. 분쇄액을 75  $\mu$ m filter bag에 넣어 여과한 다음, filter에 남은 잔여물을 재수집하여 5배의 수돗물을 가하여 위

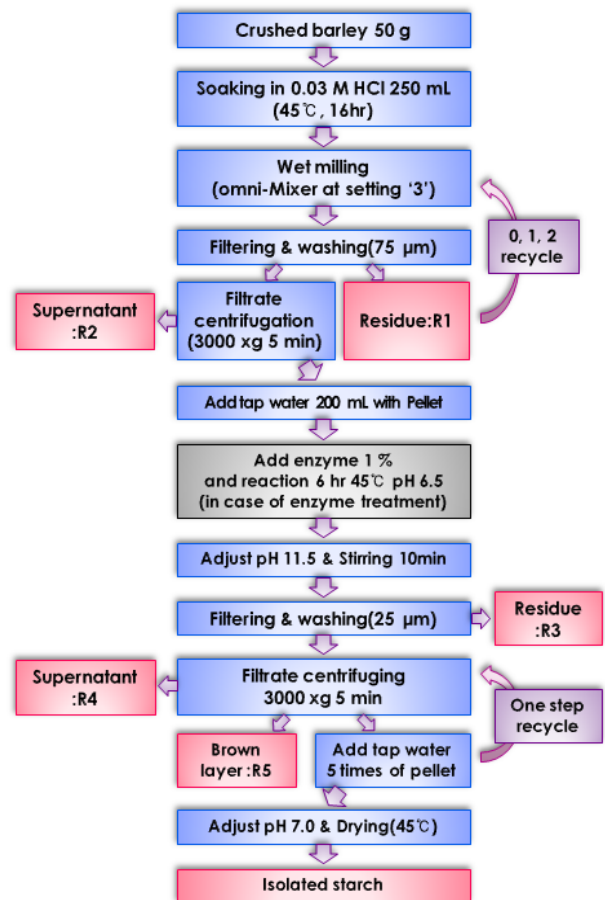


Fig. 1. Starch and by-product isolation procedure.

과정을 2차례 반복하여 추출하였다. filter에 남은 여과잔 여물은 R1(residue 1)으로 하여 보관하였다. Filter를 통과한 여과액은 3000 ×g의 조건에서 원심분리 하여 침전물 및 상등액(R2)을 얻었으며, 이 침전물에 예비실험을 통하여 선정된 반응조건(효소량 1 wt%, 반응시간 6 hr, 가수량 5 배)으로 효소를 첨가하여 반응시켰다. 반응이 완료된 용액은 수돗물을 추가로 첨가하여 총 1 L가 되도록 채워주고, 1 N NaOH를 이용하여 pH 11.5로 조정하여 30분간 교반한 후 25 μm filter bag에 통과시켜 잔여물 R3를 수집하였다. 여과액은 다시 pH 11.5로 맞춘 뒤 10분간 교반한 후 이를 3000 ×g로 원심분리하여 상등액은 R4로 수집하였고, 침전물 중 상층부인 갈색층은 spatula로 긁어내어 R5로 수집하였다. 남은 전분 층은 따로 회수하여 물을 5배 넣고 다시 원심분리를 통해 R4, R5로 재수집하고, 최종적으로 얻은 전분은 45°C 인큐베이터에서 건조하여 분석용 시료로 하였다.

**4. 일반성분, 총 전분수를 측정**

시료의 일반성분 분석은 AOAC 방법(AOAC, 1994)을 이용하였으며, 수분은 상압가열 건조법, 조회분은 직접회화법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백은 Micro-Kjeldahl법으로 측정하였다.

전분수율은 분리된 전분의 순도를 측정하여 순수한 전분 함량으로 계산하였다. 순도를 측정하기 위한 실험 방법으로 AOAC방법의 amyloglucosidase/ $\alpha$ -amylase method를 이용한 kit (K-TSTA, Megazyme International Ireland

Ltd, Bray, Ireland)를 사용하여 분석하였다. 순도를 측정한 후 수율의 계산은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Yield (\% (dry basis))} = \frac{\text{Isolated starch (g)} \times \{1 - (100 - \text{moisture (\%)}) / 100\} \times \text{isolated starch purity}}{\text{Sample (g)} \times \text{barley starch content}}$$

**5. 전분입자 morphology**

전분입자는 추출한 전분을 희석한 뒤 위상차현미경(BX50 3200 WBX PHD, Olympus, Japan)을 이용하여 확대비율 100배, 200배에서 관찰하였다.

**III. 결과 및 고찰**

**1. 일반성분 및 전분 순도**

Crushed barley와 효소의 첨가 유무에 따른 최종 추출 전분의 일반성분은 Table 1과 같다. 찰보리 전처리 과정을 통해 얻은 crushed barley는 30%이상의 높은 수분량을 보유하고 있었으며, 2% 내외의 단백질, 1% 정도의 지방을 함유하고 있었다. 추출된 전분의 일반성분을 보면 효소처리 전분[starch(non-enzyme)]이 효소처리 전분[starch(enzyme)]보다 단백질 함량이 다소 높은(0.03% 정도) 것을 확인할 수 있는데, 이는 효소처리에 의해 단백질과 전분의 분리가 보다 효율적으로 이루어졌음을 나타낸다. Table 1의 찰보리 추출전분의 일반성분은 Kim 등(1999)이 보고

**Table 1.** Approximate composition of crushed barley and isolated starches.

Composition	Crushed barley	Starch (non-enzyme)	Starch (enzyme)
Moisture (%)	32.18±2.74*	11.24±0.38	11.45±0.46
Crude protein (%)	2.09±0.21	0.05±0.02	0.02±0.01
Crude oil (%)	1.09±0.39	0.03±0.01	0.03±0.01
Crude Ash (%)	0.18±0.07	0.03±0.01	0.03±0.01
Carbohydrate (%)	64.46±2.95	88.65±0.41	88.47±0.53
Total (%)	100	100	100

\*All values are mean ± SD of duplicate determinations.

**Table 2.** Starch content of crushed barley and purity (% dry base) of isolated starch

Crushed barley	None-enzyme	Enzyme
64.12±0.54*	96.37±1.18	98.51±0.97

\*All values are mean ± SD of duplicate determinations.

한 결과와 유사한 경향을 보였다.

추출전분의 전분 순도를 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. 효소처리 전분의 순도는 98.51%로 매우 높은 순도를 보였으며, 효소비처리 전분보다 더욱 높은(약 2.14%) 순도의 전분을 추출 할 수 있었다.

### 2. 효소처리에 의한 수율 변화

효소처리 유무에 따른 전분 수율 비교를 Table 3에 나타내었다. 효소를 처리한 경우 수율은 90.56%, 효소를 처리하지 않았을 때의 수율은 78.46%로 효소를 처리할 경우 약 12% 이상 높은 추출 수율 증대를 나타내었다. 따라서, 추출 공정에 있어서 효소를 첨가하지 않을 경우 전분 손실이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 효소 처리에 따른 각 추출단계별 전분 balance는 후술하였다.

### 3. 추출과정 단계별 전분 balance

효소처리에 의한 수율증가 이유를 확인하기 위해 추출과정 중 발생하는 잔여물(R1-R5)을 모두 회수하여 각 잔여물의 무게를 측정하고 전분함량을 구하였다(Table 4, Fig. 2).

Table 4와 Fig. 2에서 관찰한 바와 같이 효소반응을 하기 전 시점의 잔여물인 R1과 R2는 무게나 전분함량이 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 실제 효소 처리가 이루어진 후의 시점인 R3~R5분획 잔여물 중 전분 함량차이가 크게 나타났다(즉, 효소처리의 경우 잔여물 중에는 전분이 거의 남아있지 않음). Andersson 등(2001)은 25  $\mu$ m filter residue(R3)의 대부분이 dietary fiber이며, 특히 찰보리에는 불용성 (1-3),(1-4)mixed linked 다당류인  $\beta$ -glucan이 다량 포함되어 있다고 보고하였다. 즉 R3 구성물이 본 실험에서 사용한 효소에 의해 분해됨으로서 그 함

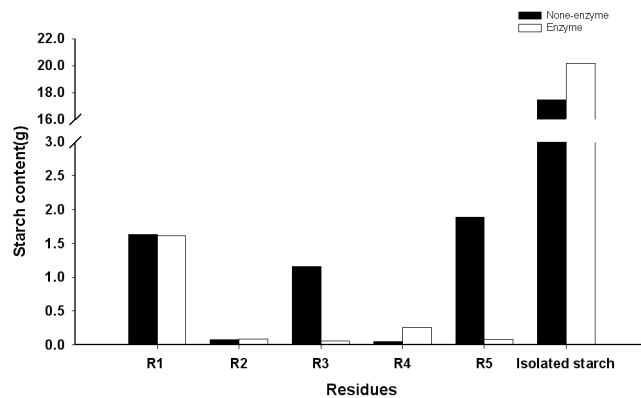
**Table 3.** Extraction yield (% , dry base) according to enzyme treatment.

None-enzyme	Enzyme	difference
78.46 $\pm$ 2.12*	90.56 $\pm$ 1.59	12.1 $\pm$ 3.71

\*All values are mean  $\pm$  SD of duplicate determinations.

**Table 4.** Weight (% , dry base) of residues (R1-R5) including isolated starch.

Residues	None-enzyme	Enzyme
	Weight (%)	Weight (%)
R1	13.7	13.5
R2	14.1	14.4
R3	7.0	0.9
R4	6.6	11.9
R5	6.9	0.4
Isolated starch	51.9	58.9
Total	100.0	100.0



**Fig. 2.** Comparison of starch content (dry base) in residues 1-5 (R1-R5) including isolated starch.

량이 크게 줄어들었으며, 그 결과 잔유물 중의 전분함유량도 크게 감소한 것으로 추정되었다. 또한 R3 구성물의 감소는 이후의 filtration 공정을 매우 용이하게 하였다. 한편, 원심분리 상등액 R4는 효소처리에 의해 오히려 건조중량이 증가된 것을 볼 수 있는데, 이는 효소에 의해 세포벽 물질,  $\beta$ -glucan과 기타 mucilage 등이 저분자화 됨에 따라 원심분리에 의하여 침전되지 않고 R4 포함된 것에 기인한 것으로 추정되었다. R5는 원심분리 침전물 중 상층부에 존재하는 갈색층으로 효소비처리의 경우 총량의 6.9%를 점유하며, 상당량의 전분을 함유하고 있었다(Fig. 2). 이곳에는 25  $\mu$ m filter를 통과하는 수용화 되지 못한 단백질, fine-fiber, mucilage와 기타 불용성 물질이 존재하며, 이들은 전분입자 중 small-granules과 matrix를 형성하여 함께 침전된다(McDonald와 Stark, 1988). 또한, McDonald와

Stark(1988)는 Proteinase K와 toluene을 사용하여 24 hr 동안 반응시켜 이들을 분해함으로써 R5에서 순수한 전분을 분리할 수 있음을 보고하였다. 본 논문에서는  $\beta$ -glucanase 효소를 처리한 뒤 R5 잔유물이 0.4%로 크게 낮아진 것을 볼 수 있는데 본 실험공정을 통해 전술한 matrix가 효과적으로 분해·제거 되었으며, 그 결과 전분의 분리가 잘 이루어진 것으로 추정된다.

#### 4. 전분입자 morphology

효소처리 및 효소비처리 전분의 입자 형태를 위상차 현미경을 통해 100, 200배율에서 확인하였다(Figs. 3과 4). 전분입자는 대체로 약 18  $\mu$ m의 둥근 모양의 형태를 띠고 있었으며, 여기에 효소처리 전분의 경우 약 3  $\mu$ m 정도의

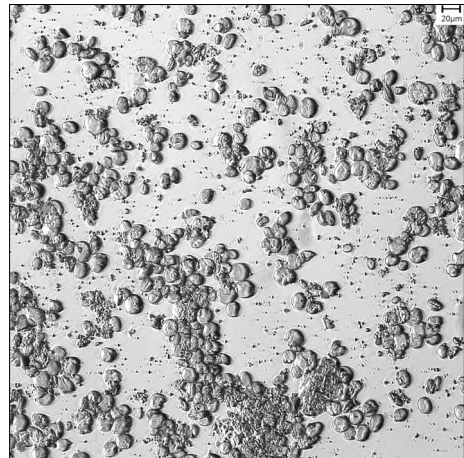
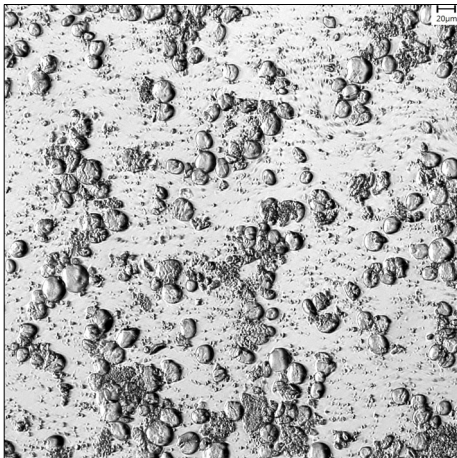


Fig. 3. Image of phase-contrast microscope of isolated starch ( $\times 100$ ) (left: enzyme treatment, right: non-enzyme treatment).

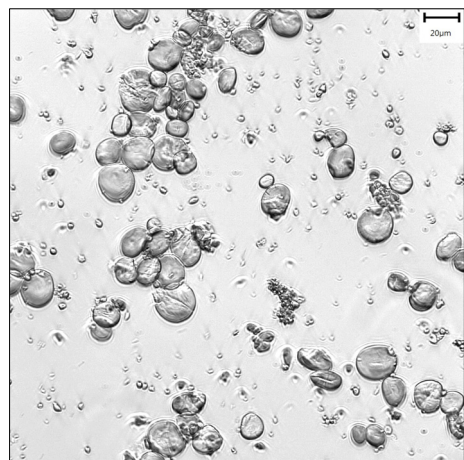
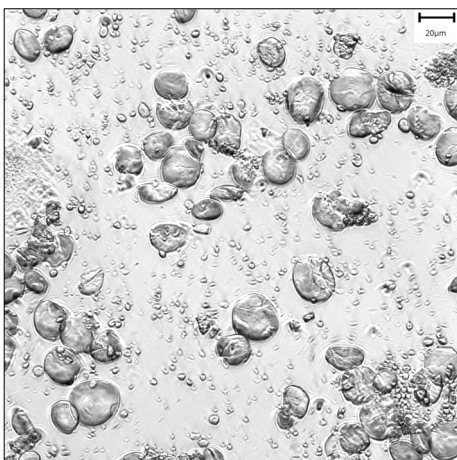


Fig. 4. Image of phase-contrast microscope of isolated starch ( $\times 200$ ) (left: enzyme treatment, right: non-enzyme treatment).

작은 입자들이 효소처리 전분에 비해 다량으로 함께 존재하는 것을 볼 수 있었다. Vasanthan과 Bhatt(1996)는 보리에서 small granule과 large granule을 분리하여 이들의 크기를 측정된 결과 2-10  $\mu$ m의 전분입자를 small-granule, 12-26  $\mu$ m 크기의 입자를 large-granule이라고 보고하였으며, 또한 부드러운 둥근모양의 보리전분입자를 확인하였는데, 본 논문의 조사 결과는 이들의 결과와 매우 유사한 것으로 사료되었다. 따라서 본 실험에서 효소처리의 경우 전분 수율이 크게 증가된 것(12.1% 이상)은 추출 전분 중 small granule 입자가 크게 증가한 것에 기인된 것으로 추정하였다. 즉 효소처리에 의하여 전분 이외의 성분과 matrix를 형성하고 있는 small granule의 분리를 촉진하여 전분 중 이들의 양이 증대된 것으로 생각되었다. 그러나 이는 small-granules과 large-granules의 정량적 분리를 통해 심층 확인해볼 필요가 있다고 생각된다.

#### IV. 결론

본 연구는 찰보리전분 추출에 있어서  $\beta$ -glucanase의 첨가 효과를 연구하였다. 추출 전분의 일반성분 중 단백질 함량은 효소처리 전분이 효소비처리 전분에 비해 0.03% 낮았으며, 추출 수율은 효소를 처리할 경우 90.56%, 효소를 처리하지 않을 경우 78.46%로 전자가 후자에 비해 12.1% 높은 수율을 나타내었다. 이러한 추출 수율의 증가 이유는 효소처리에 의한 세포벽 구성성분인  $\beta$ -glucan과 기타 다당류, 점질물질 등이 분해되어 R3(조전분 현탁액의 25  $\mu$ m filter residue)와 R5(원심분리 침전물 상층의 brown layer) 중의 전분이 효과적으로 분리되었기 때문으로 추정되었으며, 위상차 현미경을 통해 추출전분을 관찰한 결과 수율의 증가를 초래하는 구체적 이유는 small-granules의 분리 증가에 기인한 것으로 추정하였다.

#### 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청(과제번호; PJ008242) 연구과제를 수행하는 과정에서 얻은 결과를 바탕으로 작성되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고 문헌

- Agriculture, Fisheries & Livestock News. 1997. *food yearly statistics: Starch*. p. 151. [in Korean]
- Ahluwalia B, Ellis EE. 1984. A rapid and simple method for the determination of starch and  $\beta$ -glucan in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 90: 254-259.
- Anderson MA, Cook JA, Stone BA. 1978. Enzymatic determination of 1,3:1,4- $\beta$ -glucans in barley grain and other cereals. *Journal of the Institute of Brewing*. 84: 223-239.
- Andersson AAM, Andersson R, Åman P. 2001. starch and By-Products from a Laboratory-Scale Barley Starch Isolation Procedure. *Cereal Chemistry*. 78: 507-513.
- Association of Official Analytical Chemists. 1994. *Official Methods of Analysis, 14th ed.*: Washington, DC.
- Christophersen C, Andersen E, Jakobsen TS, Wagner P. 1997. Xylanase in wheat separation. *Starch-Stärke*. 49: 5-12.
- De Haas BW, Goering KJ. 1972. Chemical structure of barley starches. *Starch-Stärke*. 24: 145-149.
- Fincher GB. 1975. Morphology and chemical composition of barley endosperm cell walls. *Journal of the Institute of Brewing*. 81: 116-122.
- Fleming IA, Kawakami K. 1977. Studies of the fine structure of  $\beta$ -D-glucans of barley extracted at different temperature. *Carbohydrate Research*. 57: 15-23.
- Kim YS, Lee YT, Seok HM. 1991. Physicochemical Properties of Starches from Waxy and Non-waxy Hull-less Barleys. *Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 42: 240-245. [in Korean]
- Lee HS. 1997. Status and Prospectives of Food Industry. *Bulletin of Food Technology*. 10: 24-35.
- Macgregor AW, Fincher GB. 1993. Enzymic quantification of (1-3),(1-4)  $\beta$ -D-glucan in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 91: 285-295
- Mauro DJ. 1996. An update on starch. *Cereal Foods World*. 41: 776-780.
- McDonald ML, Stark JR. 1988. A critical examination of procedures for the isolation of barley starch. *Journal of the Institute of Brewing*. 94: 125-132.
- Padmanabhan S, Ramakrishna M, Lonsane BK. 1993. Enzymic treatment of cassava flour slurry for enhanced recovery of starch. *Food Biotechnology*. 7: 1-10.
- Palmer GH. 1972. Morphology of starch granules in cereal grains and malts. *Journal of the Institute of Brewing*. 78: 326-332.
- Palmer GH. 1975. Influence of endosperm structure on extract development. *American Society of Brewing Chemists Proceedings*. 33: 174-180.
- Palmer GH, Mackenzie CI. 1986. Levels of alkali-soluble  $\beta$ -D-glucan in cereal grains. *Journal of the Institute of Brewing*. 92: 461-462.
- Seo HC. 1999. Development of isolation process of barley starch using  $\beta$ -glucanase. *Korean Society of Food & Cookery Science*. 15: 238-243. [in Korean]

- Vasanthan T, Bhatta RS. 1996. Physicochemical properties of small- and large-granule starches of waxy, regular, and high-amylose barleys. *Cereal Chemistry*. 73: 199-207.
- Weegels PL, Marseille JP, Hamer RJ. 1992. Enzymes as a processing aid in the separation of wheat flour into starch and gluten. *Starch-Stärke*. 44: 44-48.
- Wood PJ, Paton D, Siddiqui IR. 1983. Determination of  $\beta$ -glucan in oats and barley. *Cereal Chemistry*. 54: 524-533.
- Zheng GH, Bhatta RS. 1998. Enzyme-Assisted Wet Separation of Starch from Other Seed Components of Hull-less Barley. *Cereal Chemistry*. 75: 247-250.