

## 풀루라나아제

### Pullulanase

정의 이 품목은 *Bacillus acidopullulyticus*, *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus licheniformis*, *Pullulanibacillus naganoensis*의 배양물, *Bacillus deramificans*의 풀루라나아제 유전자가 삽입된 *Bacillus subtilis*의 배양물, *Bacillus deramificans*의 풀루라나아제 유전자가 삽입된 *Bacillus licheniformis*의 배양물, *Bacillus acidopullyticus*의 풀루라나아제 유전자가 삽입된 *Bacillus subtilis*의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

이 품목은 풀루란, 아밀로펙틴, 글리코젠 등의  $\alpha$ -1,6-글리코시드 결합을 가수분해하여 풀루란에서는 말토트리오스를 생성하고, 아밀로펙틴 등에서는 아밀로오스 형태의 직쇄 다당류를 생성한다.

성상 이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.

확인시험 이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

순도시험 (1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 4.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈

마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(3) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 살모넬라균 시험법에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

### 활성시험법(역가)

분석원리 : 본 역가시험은 pH 5.0, 온도 50℃에서 pullulan의  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합을 가수분해하여 생성된 환원당인 maltotriose를 디니트로살리실산과 반응시켜 흡광도측정법으로 측정하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체를 물에 녹여 다음의 시험방법에 따라 시험할 때, 흡광도 값이 0.2~0.5범위에 들도록 시험용액을 조제한다.

시험조작 : 17×1.5cm 시험관을 효소시험용으로 하여 기질용액 1mL를 넣는다. 이를 50℃의 수욕조에서 5분간 정치하고, 시험관에 시험용액 1mL를 가해주고 나서 정확히 10분간 반응시킨 다음 3,5-디니트로살리실산시액 2mL를 가하여 반응을 정지시킨다. 별도의 효소공시험용 시험관에 기질용액 1mL 및 3,5-디니트로살리실산시액 2mL를 넣고, 이에 시험용액 1mL를 가해준다. 시험관 모두를 끓는 수욕조에서 5분간 끓여주고 신속하게 냉각시킨 후 물 10mL를 가해주고 잘 흔들어 준다.

효소공시험용액을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 540nm에서 효소 시험용액의 흡광도를 측정한다.

검량선의 작성 : 맥아당(표준품) 1g을 정밀히 달아 물을 가하여 100mL로 한 다음 이 액 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0mL를 각각 취하고 이에 물을 가하여 20mL씩으로 한 것을 표준용액으로 한다. 시험용액 1mL 대신에 표준용액 1mL와 물 1mL를 각각 사용하여 시험용액과 동일조작을 행한다. 물을 사용한 것을 대조액으로 하여 각각의 흡광도를 측정하고 표준용액의 농도(mg/mL)에 대한 흡광도로 검량선을 작성한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(units/mL)} = C \times \frac{1,000}{\text{시험용액의 농도(mg/mL)} \times 10}$$

C : 검량선에서 얻어진 효소시험용액의 맥아당농도(mg/mL)

10 : 반응시간

역가의 정의 : 1 Pullulanase unit는 상기시험조건 하에서 분당 무수맥아당 1mg에 상당하는 환원당을 생성하는 효소의 양이다.

시 액

기질용액 : 풀루란(Pullulan)표준품 1g에 물 70mL를 가하여 5분간 가열하고 식힌 다음 이에 1M 초산·초산나트륨완충액(pH 5.0) 10mL를 가해주고 나서 물을 가하여 100mL로 한다.

1M 초산·초산나트륨완충액(pH 5.0)

A 액 : 초산 60g을 물에 녹여 500mL로 한다.

B 액 : 초산나트륨(무수) 82g을 물에 녹여 500mL로 한다.

A 액 148mL와 B 액 352mL를 혼합하고 A 액 또는 B 액을 사용하여 pH 5.0으로 조절하고 물을 가하여 전량을 1,000mL로 한다.

3,5-디니트로살리실산(3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS)시액 : DNS 1g을 취하여 10% 수산화나트륨용액 16mL를 가하여 녹여 주고 이에 주석산칼륨나트륨(4수화물) 30g 및 물 50mL를 넣고 가열하여 녹인 다음 물을 가하여 100mL로 한다. 이 액은 5°C에서 보존하고 5일 이내에 사용한다.

### 보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.