

옥수수의 發芽過程中 AMYLASE活性

崔 國 智

江原大學校 醱酵工學科
(1984년 4월 6일)

A Study on Amylase Activities During Germination of Maize Seeds.

Kook-chi Choi

Department of Fermentation Technology,
Kangwon National University, Chunchon.

ABSTRACT

Changes of starch, soluble sugar and activities of amylase in germinating maize seeds were studied with comparison of germinating barley seeds. The starch in the endosperm was degraded slowly during the course of germination, and starch degradation of maize seeds compared with barley seed was found after 2 or 4 days of seed germination. There was a transient decline of soluble sugar contents in ungerminated seed at early stages, followed by the rapid increase which coincided with the degradation of starch. Activities of amylases were increased with the progress of germination, and maximum activities were founded after 8 days of seed germination. The higher activities of α - and β -amylase were found at Hwang-ok maize and barley, respectively.

緒 論

穀類 및 豆類 등의 澱粉質種子는 發芽時에 貯藏 澱粉을 分解하는 酵素를 生成시키거나 그의 活性을 增加시키며 一部 食品의 製造加工에서는 이들 作用의 利用이 매우 重要하다.¹⁾

麥芽는 發芽 利用의 代表的인 例로서 饴, 甘酒, 식혜等 固有 醱酵食品이나 麥酒의 製造에 널리 利用되고 있다. 麥芽의 食品加工에의 利用은 강한 amylase 活性과 醱酵力이 重要因子이며²⁾ 이 點에서 옥수수는 收穫量이 높고, 栽培가 容易하며 優秀한 貯藏性과 經濟性을 갖는 附加 價値性이 높아

麥芽의 代替原料로서의 可能性이 높다.

現在 發芽 옥수수의 活用은 南美 및 南部수단에 서의 一部 알코올飲料製造,^{3,4,5)} 그리고 南아프리카의 다호메이에서의 麥酒製造⁶⁾에서 찾아 볼 수 있으나, 아직 微微한 實情이며 只今까지의 關聯研究도 Scandalios^{6,7,8)}의 옥수수 amylase isozyme, Chao⁹⁾의 育種과 酵素生成에 關한 研究에 局限하여 corn malt(malted maize) 製造에 關한 定量的 研究의 必要性이 크다.

本 研究에서는 이러한 實情을 감안하여 固有 醱酵食品의 品質向上 및 澱粉質資源의 利用方案研究 一環으로 corn malt 製造의 基礎資料를 얻고자 하였다. 即 2種의 옥수수를 一定條件下에서 發芽시

키고 이 過程에서의 外觀形態, 乾燥重量變化, 澱粉 및 可溶性糖의 變化를 調査하였으며 아울러 發芽中の 重要 品質要素인 α - 및 β -amylase의 經時活性變化를 大麥과 比較하면서 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 試料

本 研究에 使用한 試料은 2種의 옥수수 및 1種의 大麥으로 옥수수는 江原道産의 黃玉 및 日本産의 Jelly pandam이며 大麥은 倍取 1號이다.

2. 發芽

試料의 發芽는 通常法에^{10, 11, 12)} 依하여 다음과 같이 行하였다. 即 各 試料을 18°C의 물에 48時間 浸漬시킨後 1% NaClO溶液中에서 20分間 殺菌한다. 이것을 殺菌수에 적신 가지를 乾 스테인레스 스틸製의 바구니에 담고 18°C의 暗室에서 1日 2回 殺菌水を 噴霧하면서 發芽시켰다.

3. 外觀形態觀察 및 乾燥重量의 測定

外觀形態의 觀察은 14日間 發芽시키면서 一定時間 間隔(48時間)으로 試料을 採取하여 寫眞撮影하여 行하였으며 乾燥重量은 105°C 常法에 依하였다.

4. 可溶性糖 및 澱粉의 定量

1) 可溶性糖: 可溶性糖의 定量은 anthrone-黃酸法¹³⁾에 依하였으며 全糖은 glucose로 定量하였다. 定量을 爲하여 다음과 같은 前處理를 行하였다. 即 發芽中の 試料을 一定時間間隔으로 採取하고 90°C에서 30分間 加熱한 다음 60°C에서 하루 乾燥시킨다. 이것을 粉碎하여 60mesh篩로 걸른 다음 50ml의 遠心分離管에 一定量을 取하여 80%의 뜨거운 에탄올을 加하여 攪拌한 後 3,000rpm에서 10分間 遠心分離하였다. 上澄液은 anthrone 反應이 陰性이 될때까지 뜨거운 에탄올로 反復抽出하고 抽出液을 合하여 分析試料로 하였다.

2) 澱粉: 澱粉의 定量은 可溶性糖을 抽出한 殘渣를 試料로 McCready法¹³⁾에 依하였으며 여기에 0.9를 곱하여 澱粉量으로 하였다.

5. 酵素活性의 測定

1) 酵素抽出液의 調製: 發芽시킨 均一한 試料 10粒을 採取하고 4°C로 冷却시키면서 유발로 磨碎

한다. 이것에 10倍量의 0.4M acetate buffer(pH 5.2)를 加하고 4°C의 低溫室에서 磁石攪拌機로 2時間 攪拌한 다음 30分間 遠心分離(4°C, 10,000 rpm)한다. 上澄液을 0.65 μ m의 Millipore filter로 濾過해서 酵素液으로 하였다.

2) α -Amylase活性 測定^{14, 15)}: 0.5% amylose 溶液 1.0ml에 0.016M acetate buffer(pH5.0) 0.5 ml를 加한 後 蒸溜水 6.4ml를 加한다. 이때 β -amylase阻害劑로서 0.2% p-chloromercuribenzoic acid(p-CMBA) 2滴을 滴下시켰다. 이 液을 37°C의 恒溫水槽에서 5分間 豫備倍養시키고 이 溶液에 適當히 希釋한 酵素抽出液 0.1ml를 加하고 混合해서 全體의 反應溶液量을 8ml로 했다. 이 反應液을 37°C에서 30分間 反應시킨後 其中 1.0ml을 0.5M 酢酸 溶液 2.5ml에 加해서 酵素反應을 停止시켰다. 이 反應停止液中 1.0ml을 取해서 3.0ml의 0.0005% 沃素溶液에 混液한 다음 分光光度計로 700nm에서 吸光度를 測定하였다.

α -amylase의 活性度는 다음 式 (1)으로부터 決定하였으며 37°C에서 30分間 反應했을때 1粒의 試料이 blue value를 10% 低下시키는데 要하는 amylose의 mg數로하여 나타내었다.

$$\alpha\text{-amylase活性度} = 0.1785\text{mg} \times \frac{1}{10} \times \frac{D_0 - D_t}{D_0} \times 100 \times \frac{30\text{min}}{t_{\text{min}}} \times 28 \times \frac{1}{\text{grains}} \dots \dots \dots (1)$$

여기서 D_0 및 D_t 는 各各 對照液과 試料液의 吸光度이다.

3) β -amylase活性 測定^{14, 15)}: 1% amylopectin 溶液(0.2M acetate buffer含有 pH 5.4) 1.0ml에 適當히 希釋한 酵素抽出液 1.0ml를 加해 37°C에서 3分間 反應시킨後 2.0ml의 3.5 dinitrosalicylic acid(DNS)液을 加해서 酵素反應을 停止시켰다. 이 反應停止液을 沸騰하는 熱水에서 正確히 5分間 加熱한 後 急冷시키고 이 溶液에 蒸溜水를 加해서 全體를 20ml로 하여 分光光度計로 540nm에서 吸光度를 測定하였다. β -amylase活性度는 다음 式 (2)에 依하여 求하였으며 37°C에서 1分間 反應시켰을때 試料 1粒이 生成하는 maltose의 mg數로 나타내었다.

$$\beta\text{-amylase活性度} = x\text{mg} \times \frac{\text{min}}{t_{\text{min}}} \times \frac{1}{\text{Enz. sol. ml}} \times \frac{a\text{ml}}{20\text{ml}} \times \frac{1}{\text{grains}} \dots \dots \dots (2)$$

여기서 x 는 標準曲線으로부터 求한 maltose의 mg數이고, a 는 反應液의 容量에 따른 希釋係數

이다.

結果 및 考察

1. 外觀形態 및 乾燥重量的 變化

發芽試料의 發育現況을 알아보기 爲하여 14日間 發芽시키면서 一定時間 間隔으로 發芽過程中的 外觀形態를 觀察하였으며 代表的인 例로서 Jelly pandam種의 옥수수의 境遇를 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 發芽時間은 48時間 浸漬 後의 種子를 發芽 0日로하여 나타낸것으로 發芽는 發芽開始

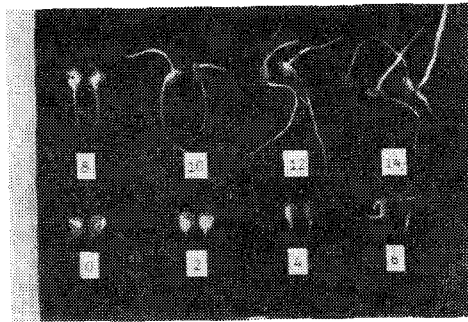


Fig. 1. External Appearance of the Germinating Maize Seeds.

Imbibed maize seeds were germinated in the incubator at 18°C for days in the figure. Each number shows a germinated days.

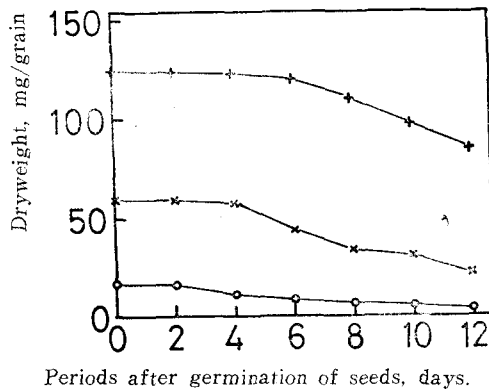


Fig. 2. Changes of dry weight in whole grains which include radicle and plumule in germinating maize and barley seeds.

+--+ Hwang-ok maize
 x-x Jelly pandam maize
 o-o Barley

2日 後부터 發根이 始作되고 4日째부터는 幼芽가 發芽하면서 12日까지 顯著한 發育을 보이고 있다. 그러나 發芽 14日後의 外觀形態는 12日의 發芽와 比較하여 거의 發育이 보이지 않고 있어 12日 以後의 生長은 거의 없는 것으로 判斷하였다.

한편 發芽過程中 種子의 全乾燥重量的 變化를 調査한 結果는 Fig. 2와 같다.

그림에서 볼 수 있는 바와 같이 發芽中 乾燥重量的 變化는 試料에 關係없이 發芽가 進行됨에 따라 조금씩 減少하는 傾向을 보였으나 乾燥重量的 變化程度는 發芽初期와 終期를 比較할 때 옥수수의 境遇 品種間의 差에 關係없이 約 20%의 減少를 보인 反面 보리의 境遇는 約 30%의 減少를 보여서 보리에서 發芽에 따른 重量 損失이 옥수수의 境遇보다 더 큰 것을 보여주었다.

이와같이 發芽의 進行에 따라 乾燥重량이 減少하는 現象은 發芽에 依하여 胚乳部의 貯藏澱粉이 分解되고 生長部의 에너지 및 生合成의 基質로 提供된다는 事實¹⁾과 關聯되는 것으로 보이며 이러한 사실에 立脚하여보면 보리의 發芽는 옥수수의 境遇보다 發芽代謝에 더 큰 에너지 및 生合成의 基質을 要하는 것으로 生覺된다.

2. 澱粉 및 可溶性糖의 變化

發芽過程中 澱粉含量的 經時變化를 測定하고 그 結果를 Fig. 3에 나타내었다.

보리는 發芽 2日까지는 澱粉含量的 變化가 거의 없으나 그 以後 徐徐히 減少하는 傾向을 보이고

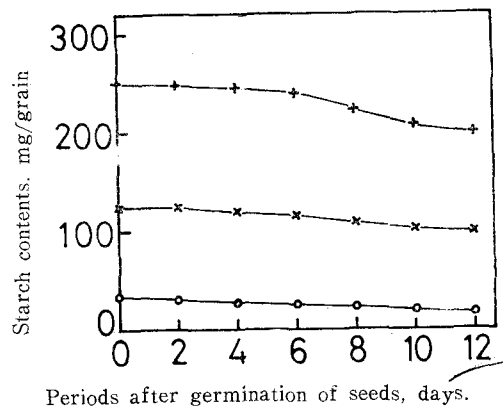


Fig. 3. Changes of starch in germinating maize and barley seeds.

+--+ Hwang-ok maize
 x-x Jelly pandam maize
 o-o Barley

發芽가 進行됨에 따라 澱粉이 分解됨을 나타내었다. 옥수수의 境遇는 보리보다 2~4日 늦게 澱粉含量이 減少하기 始作하였으며 澱粉의 分解程度도 20~30% 낮은 것으로 나타났다.

한편 發芽過程中 可溶性糖의 經時變化는 Fig. 4와 같다.

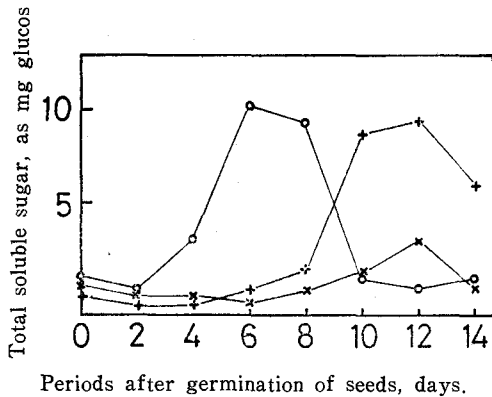


Fig. 4. Changes of soluble sugar in germinating maize.

- +-+ Hwang-ok maize
- ×-× Jelly pandam maize
- Barley

試料모두 發芽 0日의 可溶性糖, 即 未發芽 種子에 含有되어 있는 可溶性糖은 물을 吸水하면서 減少傾向을 보이거나 보리에서는 發芽 2日 後부터 急激히 增加하고 發芽中期라 볼 수 있는 4~6日에 最高값에 到達하였다가 그 以後 減少하는 傾向을 보였다. 한편 옥수수의 境遇에서는 보리보다 2~4日 以後에 可溶性糖의 增加를 보였으며 發芽開始 8~10日後에 最高값에 到達하였다. 最高값은 Jelly pandam 에서는 보리에 比하여 훨씬 낮았으나 黃玉은 보리와 거의 비슷한 값을 나타내어 黃玉의 境遇 Jelly pandam보다 發芽에 依한 澱粉의 分解가 더욱 促進됨을 나타내었다.

種子發芽 初期의 可溶性糖의 減少現象은 쌀이나 보리等에서도 觀察되는 現象이며^{1,16)} 이는 發芽 初期의 生理的 變化로 增加되는 呼吸의 基質로서 可溶性 中の 單糖 및 少糖類等이 優先的으로 利用되기 때문인 것으로 判斷된다.¹⁾ 한편 發芽中期의 可溶性糖의 增加現象은 Fig. 3에서 살펴본 澱粉의 經時變化와 關聯지으면 澱粉의 分解에 依한 것으로 生覺된다. 그러므로 發芽 終期의 可溶性糖 減少역시 發芽過程의 進行에 따라 各種 反應의 基質 所要量이 增加되어 澱粉의 分解物을 消費하기 때문이라 볼 수 있다.

3. Amylase活性的 變化

發芽過程中 試料種子の 1粒當 α -amylase活性的 經時變化를 Fig. 5에 나타내었다.

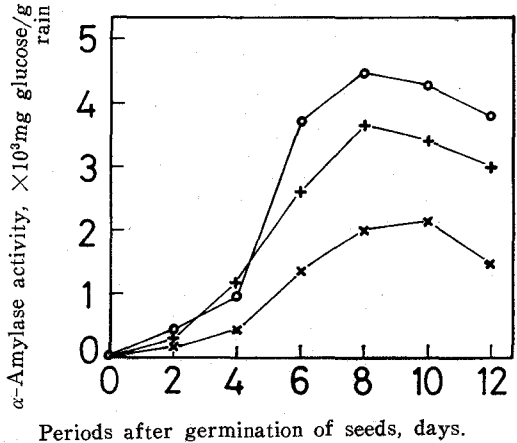


Fig. 5. α -Amylase activity in the extracts of germinating maize and barley seeds.

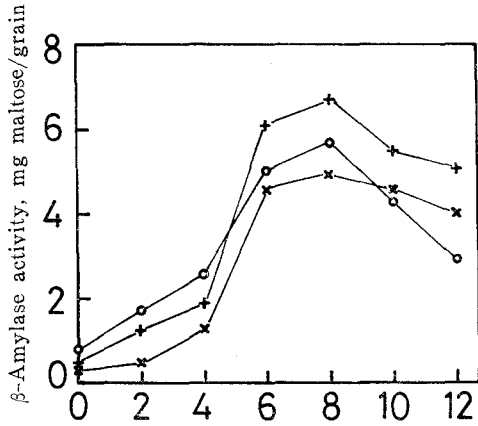
- +-+ Hwang-ok maize
- ×-× Jelly pandam maize
- Barley

發芽初期인 물 吸水直前 即 未發芽 種子の α -amylase活性的은 모든 試料에서 나타나지 않았으나 初期 發芽段階를 지나면서부터 α -amylase의 活性的은 漸次 增加하였으며 8日째 最高의 活性的을 나타내었다.

이는 未發芽 種子에는 α -amylase가 存在하지 않으나 發芽에 依하여 生合成 된다는 事實과^{1,17)} 一致한다. 最高 活性的값은 옥수수 품종간의 顯著한 差異는 있었으나 보리의 境遇가 옥수수보다 높아서 보리의 α -amylase 生合成能이 優秀한 것으로 나타났다.

한편 β -amylase活性的의 經時變化는 Fig. 6에서 보는바와 같이 α -amylase活性的과는 달리 未發芽 種子에서 모두 活性的을 나타내었으며 發芽에 따라 活性的이 增加하여 8日後 最高 活性的을 나타내었다. β -amylase活性的의 增加는 未發芽 種子 中에서 活性的을 나타내지 않는 潛在型 β -amylase가 發芽에 依하여 活性型 β -amylase로 活性化하기 때문인 것으로 생각된다.

β -amylase活性的은 Jelly pandam種 옥수수에서는 보리에 比하여 發芽 後期를 除外하고는 相當히 낮은 傾向이었으나 黃玉種 옥수수는 發芽 4日 以後



Periods after germination of seeds, days.

Fig. 6. β -Amylase Activity in the Extracts of Germinating Maize and Barley Seeds.

+—+ Hwang-ok maize
 ×—× Jelly pandam maize
 ○—○ Barley

부터 보리보다도 높은 β -amylase 활성을 나타내었다.

以上에서 살펴 본 바와같이 옥수수는 부리에 비하여 amylase 활성이 比較的 낮은 편이나 黃玉의 境遇 β -amylase 활성이 보리보다 높으며 胚乳 澱粉의 分解度도 낮으므로 麥芽 代替 原料로서의 可能性에 對한 次後 研究 檢討의 必要性이 높은 것으로 判斷하였다.

抄 錄

Corn malt製造의 基礎研究의 一環으로 發芽 過程中 옥수수의 外觀形態 및 乾燥 重量의 變化, 澱粉 및 可溶性糖의 變化, α - 및 β -amylase의 經時 活性變化를 보리와 比較하면서 調査하였다. 發芽 過程中 胚乳部의 澱粉 分解는 보리에 比하여 옥수수가 2~4日 늦게 進行되었으며 分解速度는 約 20~30% 낮았다. 發芽種子에 存在하는 可溶性糖은 發芽 初期에 一時的으로 減少하는 傾向을 보였으나 Jelly pandam以外的 나머지 試料는 澱粉의 分解가 始作되면서 顯著하게 增加하였다. α - 및 β -amylase 활성은 發芽經過에 따라 增加하여 發芽 8日後에 最大 活性을 나타내었다. Jelly pandam은 낮은 amylase 활성을 나타내었으나 보리와 黃玉옥수수는 거의 비슷한 活性을 나타냈으며 β -amylase 活性은 黃玉이, α -amylase 活性은 보리가 각각 높

았다.

辭 謝

本 實驗을 爲해서 物心兩面으로 積極的으로 援助를 해주신 日本 京都大學 食糧科學研究所長 森田雄平 教授와 相原茂 夫博士 및 山下穗波 技官에게 深甚한 謝意를 表하는 바이다.

參 考 文 獻

1. Kiribuchi, S. and Nakamura, M.: Nippon Nogekagaku, 47 : 333(1973).
2. 山崎道雄 : 酵素利用ハンドブック, 第1章, 地人書店 (1980).
3. Miracle, M.P.: 'Maize in Tropical Africa', Chap. 8, Univ. Wisconsin Press, Madison (1966).
4. Weatherwax, P.: 'Indian Corn in Old America', The MacMillan Co., New York(1954).
5. Inglett, G.E.: 'Corn', Chap. 8, The AVI Publishing Co., Inc. (1970).
6. Chao, S.E. and Scandalios, J.G.: Genetics, 69 : 47(1971).
7. Chao, S.E. and Scandalios, J.G.: Isozyme Bulletin, 4 : 33(1969).
8. Scandalios, J.G.: Planta, 69 : 244(1966).
9. Chao, S.E. and Scandalios, J.G.: Biochemical Genetics, 537(1969).
10. 大塚謙一(編) : 醸造學, p.72, 養賢堂(1981).
11. 森田雄平(編) : 植物酵素蛋白質研究法, p.49, 共立社(1976).
12. Kasugai, A.: Nippon Nogekagaku, 36 : 784(1962).
13. McCready, R.M. Guggolz, J. Silveira, V. and Owens, H.S.: Anal. Chem., 22 : 1156(1950).
14. 赤堀四郎 : 酵素研究法, 1卷, 1章, 朝倉書店 (1955).
15. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.: 'Method in Enzymology', Vol. 1, p.138, Academic Press Inc., New York (1968).
16. Murata, T. Akazawa, T. and Fukuchi, S.: Plant Physiology, 43 : 1899(1968).
17. Shinke, R. and Mugibayashi, N.: Agr. Biol. Chem., 35 : 1391(1971).