

大韓衛生學會誌
KOREAN. J. SANITAT
Vol. 1, No. 1, 31~40(1986).

大豆(照射)의 酸酵에 의한 微細構造 變化에 關한 研究

許允行

서울保健專門工學 食品加工科

Studies on the Microstructure of Soybean (Irradiated) During Fermentation

Hur Yun Haeng

Department of Food Technology,
Seoul Health Junior College, Seoul Korea

Abstract

It was observed by electron microscope (transmission electron microscope, Scanning electron microscope) as a study on microstructure of soybean after γ -ray irradiation with the intensity of 5KGy, 7KGy, 10KGy and 15KGy, fermented with the named *Bacillus subtilis* SCF, which newly separated and identified.

According to the progress fermentation, changes of soybean microstructure have been increased, especially irradiated soybeans more increased than non-irradiated them.

Observation of microstructure by electron microscope showed that each protein body became more expanded in the dimension and decomposed, spherosome around the protein body in unit area dispersed and dwindled in the numbers of it.

As the fermentation on progress, changes of soybean microstructure were suitable on fermentation period of 7KGY soybean, 48-72hrs fermentation.

緒論

食品中에서 가장重要的 것 중의 하나로서蛋白質을 들 수 있는데, 오늘날 世界人口의

약 65% 정도가蛋白質의攝取不足狀態이다.

大豆는種實類 중에서도必須아미노산을含有한蛋白質을豐富하게 갖고 있어서營養的인面에서나工業的으로重要的 위치를 차지하고 있으며, 특히動物性蛋白質의攝取가 적은나

라에서는 植物性蛋白質 供給源으로서 매우 중요한 作物이다. 大豆를 酸酵시키면 그 營養의 效率은 더욱 增大되므로 酸酵大豆는 醬類 Koji로 이용되거나 調味熟成시킬때 營養價와 加工適性은 더욱 높아지게 된다.^(1~3) 이와같은 酸酵大豆의 重要性으로보아 大豆의 酸酵에 따른 組織變化의 研究는 意義 있다고 보여진다. 大豆組織의 微細構造에 對한 研究로는 李等⁽⁴⁾ 은 호주의 루핀콩(*Lupinus angustifolius*)과 大豆(*Glycine max*.L.)에서 生大豆와 加熱한 것을 PAS, O_sO₄, Sudan block B 등으로 염색하였을 때 나타난 細胞壁, 세포내간질(Cytoplasmic network), protein body 및 Spherosome의 微細構造를 光學顯微鏡으로 觀察하였고, W. J. wolf⁽⁵⁾는 大豆粉(325-mesh)을 초원심분리하여 2S, 7S, 11S와 15S 大豆蛋白質의 分획을 얻어서 SEM(Scanning electron microscope)로 관찰하였다. 또한 Kyoko Saio et al⁽⁶⁾은 大豆에서 Protein body, lipid grains, cell wall 등을 조사 보고하였고 Sephadex G-200으로 Gel-filteration하여 전자현미경으로 관찰하였다. W. J. wolf et al⁽⁷⁾은 SEM에 의하여 大豆의 CW, PB, S, CN을 관찰하였다. 저자는 근래 酸酵大豆에 대하여 연구한바 있는데, ^(1~3) 일반적으로 곡류가 放射線을 받게 되면 그의 투과력과 높은 에너지에 의하여 組織이 軟化되는 경우가 있는데 ⁽⁸⁾ 大豆에 r-線을 照射하면 組織에 物理化學的인 變化가 있을 것이 예측되어 大豆와 照射大豆를 試料로 하여 別度로 分離選定한 *Bacillus* Sp.로 酸酵시켜 大豆의 組織變化를 調査하였기 이에 報告한다.

材料 및 方法

1. 材 料

實驗材料는 長葉大豆[*Glycin max* L.]는

경기도 이천군소재 남정농장에서 구입하여 供試試料로 하였다.

2. r-線 照射

韓國 에너지연구소에서 10,000Ci ⁶⁰Co-r線 照射室에서 5KGY, 7KGY, 10KGY 및 15KGY로 常溫照射하였고, 非照射의 蒸煮大豆를 A1, 이 大豆의 48시간 발효시킨 것을 A2, 72시간 酸酵의 것을 A3로 하였으며, 照射大豆群은 5KGY의 蒸煮大豆를 B1, 5KGY의 48시간의 酸酵를 B2, 이의 72시간의 것을 B3로, 7KGY의 증자의 것을 C1, 이의 48시간 및 72시간의 것을 각각 C2, C3로, 10KGY의 증자의 것을 D1 및 이의 48시간과 72시간의 것을 D2, D3로, 15KGY의 증자의 것을 E1, 이의 48시간 및 72시간의 것을 E2, E3로 하였다.

3. 大豆 발효

試料大豆를 水浸後 蒸煮殺菌(121℃/30分)하여 酸酵상자에 넣어 미리 20種에서 純粹分離하여 *Bacillus subtilis* SCF로 記號를 붙인 균주로 제조한 種菌을 40℃에서 72시간 酸酵시켰다.

4. 組織의 試驗

(1) TEM(transmission electron microscope)用試料(specimen)의 製作

1) 固定(fixation)

試料大豆를 razor blade로 적당한 크기로 切斷하여 2.5% glutaraldehyde로 固定시킨다(5時間). 固定된 試料를 다시 1×2×1mm의 크기로 자른다. 다시 2.5% glutaraldehyde로 固定시킨다(2時間). 0.2M NaCl 溶液으로 여분의 glutaraldehyde를 세척한다. 2% Osmium tetroxide[O_sO₄]로 固定(Postfix) 시킨다.(2時間). 다시 0.2

M NaCl로 최종적으로 세척(Washing) 한다.

2) 脱水(dehydration)

脱水過程은 각각의 脱水溶媒로 다음과 같이 ethyl alcohol과 물과 치환하여 組織內水分을 脱水한다. 60% Ethyl alcohol → 70% → 80% → 90% → 95% → 100% Ethyl alcohol(I) → 100% Ethyl alcohol(II) → 100% Ethyl alcohol + Propylene oxide.

3) 染色(Staining)

2% Uranyl acetate에서 6分間 電子染色하고 Lead Citrate에서 12분간 염색한 후 TEM 관찰용으로 하였다.

2. SEM(Scanning electron microscope)用試料의製作

1) 固定(fixation)

TEM의 試料와 同一하게 切斷하여 2.5% glutaraldehyde에서 12時間 固定한 후 2% Osmium tetroxide(OsO_4)에 4時間 固定하였다.

2) 脱水(dehydration)

여러가지 浓度의 Ethanol로 다음과 같이 處理하였다. 50% Ethyl alcohol 40分 → 70% 40分 → 80% 40分 → 90% 40分 → absolute alcohol 40分(2回). 다시 冷凍乾燥機에서 乾燥(-70°C , 10^{-3} torr, 12時間)하였다.

3) Specimen Cleaving

조사 관찰하려는 부위를 쪼갠다.

4) 皮膜(Coating)處理

皮膜試料를 ion sputter로 백금皮膜(platinum Coating)을 700A° 두께로하여 SEM 관찰용으로 하였다.

結果 및 考察

本 實驗은 酵酶經過에 따른 組織의 變化를 TEM과 SEM의 電子顯微鏡을 通하여 觀察한것인데, 大豆는 子葉(Cotyledon)의 斷面

[Cross section]에 long cyindrical cell(Basal cell), 胚軸(hypocotyl)과 중심에 子葉이 있고 外皮(hull)로 되어 있으며 다시 울타리세포(Palisade Cell), hourglass Cell, 軟組織(Subepidermis parenchyma), 호분층(alaurone cells), 壓平세포(Compressed Cell), 子葉表皮(Cotyledon epidermis) 및 子葉細胞로 되어있고, 그 중

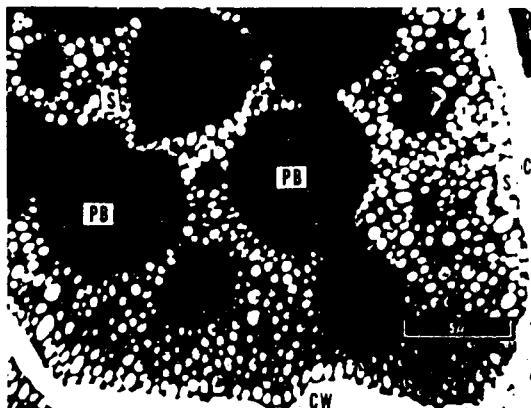


Fig.1. Transmission electron micrograph of Soybean Cotyledon cells after Soaking in water overnight.

* Courtesy of L.S.Wei, Professor of Illinois university.

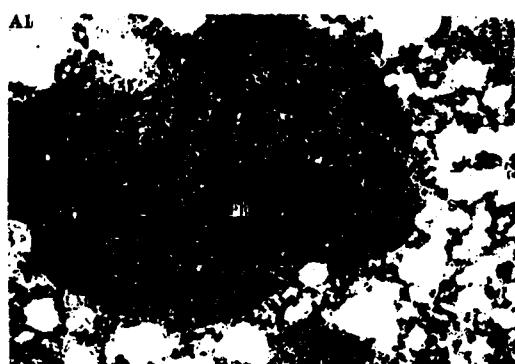


Fig.2.-A1. TEM of Cotyledon Cells, Steam-treated Soybean after Soaking in water(x8,000)

PB: Protein body S:spherosomes
CW: Cell Wall UM:Unit membrane.

에서 外皮(8%), 子葉(90%), 胚乳(2%)로 되어 있는데,⁽⁹⁾ 大豆子葉細胞의 TEM 사진의 Fig.1은 Illinois 大學校 食品工學科의 L.S.wei 教授에 의해서 밝혀진 사진이다. 즉, 전형적인 大豆組織은 세포벽 (Cell wall), 단백질체 (Protein body), Spherosome, Cytoplasmic membrane (Unit membrane), Nucleus, Starch granules,^{(9)~(10)}으로 되어 있다.

Fig.2., A1은 非照射大豆의 水浸한 것을 蒸煮하여 나타낸 組織(Cross section)인데 浸積한 大豆組織과 比較할 때, 蛋白質體는 큰 變化가 없으나 Spherosome에 있어서는 浸積大豆에서는 球狀의 型狀을 나타내지만, A1인 蒸煮大豆에서는 그 모양이 불규칙하였다. 또 A1에서는 Unit membrane이 붕괴된 것을 觀察할 수 있었다. 이것은 蒸煮에 의해서 Unit membrane, Spherosome 및 細胞內間質의 變型을 볼 수 있었다.^{(4)~(8)} 또한 이 Steamed soybean의 細胞의 型態는 H.L.wilcke⁽⁹⁾의 大豆子葉을 TEM에 의해 細胞學的으로 나타낸 그림과 本 實驗의 사진을 比較할 때 組織的인 差異는 없었다. A2는 非照射

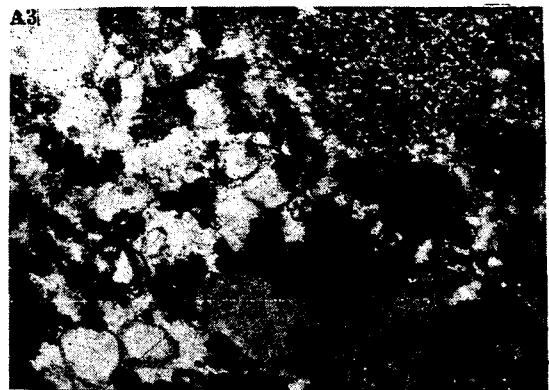


Fig.2-A3. TEM of cotyledon Cells, fermented for 72 hrs. (x 40,000)

大豆의 48 時間 酸酵後의 組織으로서, 蛋白質體의 붕괴현상을 나타냈으며 또한 그의 밀도가 저하되었고 globoid 즉 Crystalloid 가 Protein body 內에 存在하고 있다.⁽⁴⁾ 또한 脂肪粒이 Protein body 쪽으로 離動되어 있음을 볼 수 있었다. Fig.2-A3는 非照射 大豆의 72 時間 酸酵後의 組織인데, Protein body의 붕괴현상이 완만하게 나타났다. 또한 Spherosome의 分解가 현저하였다. Fig.3-

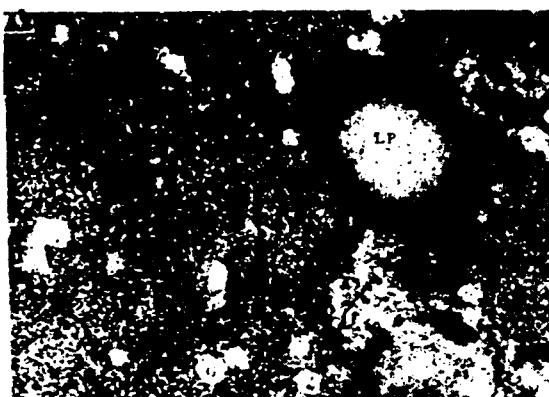


Fig.2-A2. TEM of Cotyledon Cells, fermented for 48 hrs. (x 40,000)

LP:Lipid granule
G:Globoid

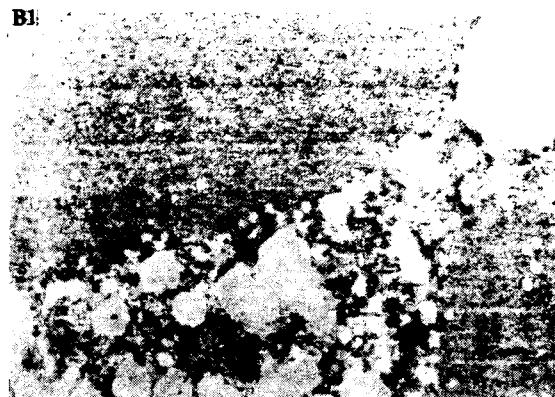


Fig.3-B1. TEM of Cotyledon Cells, steamed, on 5KGY (x40,000)

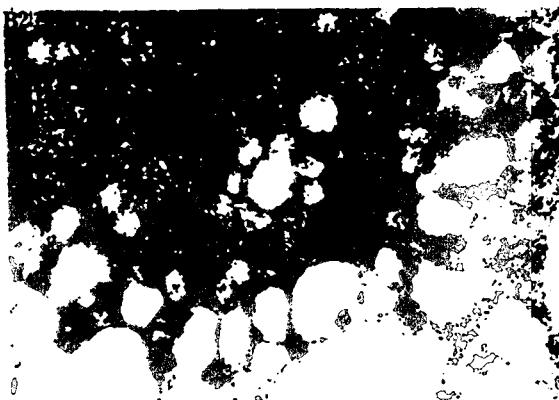


Fig.3-B2. TEM of Cotyledon Cells, fermented for 48hrs, on 5KGY(x40,000)

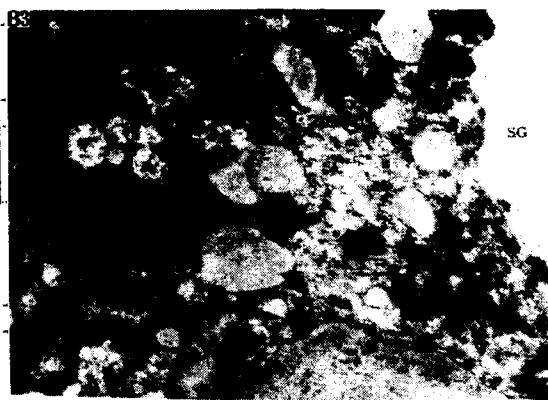


Fig.3-B3. TEM of Cotyledon Cells, fermented for 72hrs, on 5KGY(x20,000)
SG: Starch granule

B1 인 5KGY의 蒸煮大豆의 組織은 非照射大豆의 蒸煮한 것의 組織과 같이 檢고한 狀態였다.

즉, Spherosome, starch granule, protein body 가 모두 전형적인 형태였다. 大豆에 適定線量을 받은 照射區의 酵酵시키지 않은 것 (5KGY의 蒸煮)의 組織과 對照區인 非照射의 것을 比較해도 組織의 差異는 없었다. 이와같이 照射시킨 大豆의 組織이 非照射 것과의 比較에서 變化없이 같은 形態로 나타나는 이유는 Echandi 等⁽¹¹⁾은 生體組織에 1,000Krad 이상의 高線量을 照射시켰을 때 만 紡胞組織의 變化가 發生하고 낮은 線量의 照射로는 紡胞에 거의 變化가 없다는 報告와 同一한 結果였다. Fig.3-B2 인 48 時間 酵酵에서는 蛋白質體의 分解가 非照射 蒸煮의 그 것보다 현저하였고, globoid는 巨大性의 形態로 나타났다.

그리나 spherosome은 크게 變化하지 않았다. 또한 starch granule도 別變化하였다. Fig.3-B3 인 72 時間 後에는 蛋白質體의 봉괴가 현저하였으며, Unit membrane의 경계 변화가 크게 나타났다. 특히 spherosome이 봉괴되어 넓고 不規則하게 蛋白質體 쪽으로 離動

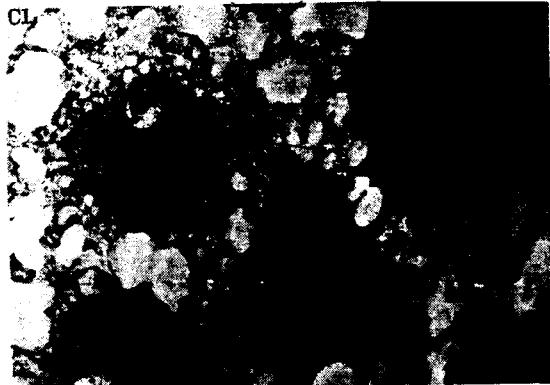


Fig.4-C1. TEM of Cotyledon Cells, Steamed, on 7KGY(x8,000)

되었다. 이러한 결과는 非照射의 72 時間 後의 것과 比較할때 5KGY의 72 時間의 것이 현저한 組織變化를 나타냈다. 이런 점으로 보아 γ 線에 의한 組織의 軟化로 因하여 酵素에 의한 加水分解가 높게 發生한 것으로 보여진다.^(4, 10~16) 7KGY의 蒸煮組織의 形態도 非照射의 그것과 같이 전형적인 紡胞組織을 나타냈다. 즉 蛋白質體와 Unit membrane의

경계가 뚜렷하였다. 李⁽¹³⁾는 쌀에 適定線量 을 照射할 경우 非照射區와 比較할때, 遊離糖, 遊離아미노산의 含量에서 有意差가 없다고 報告하였고, 大豆와 같은 生體에 適正線量의 照射에서도 化學的 成分變化는 없는 것으로 나타났는데, ^(13,14) 組織에서도 同一한 현상으로 보여진다. Fig.4-C2의 7KGY 48時間의 酸酵의 것은 Protein body의 봉피가 현저하였고, Spherosome 層의 배열이 不規則하고

starch granule, globoid 그리고 Protein body 등이 spherosome과 混合되었다. 또한 protein body 内의 globoid의 모양은 微細性으로 分解되어 分散性을 보였으며 Starch granule은 크게 나타난 것들도 보였다. 7KGY의 72時間 後의 組織은 Protein body의 봉피현상이 현저하게 나타났고, Spherosome 등과 Protein body의 경계가 뚜렷하지 않았다. 또한 蛋白質의 分解에 相應하도록 lipid granule, spherosome 等의 分解가 높게 나타났

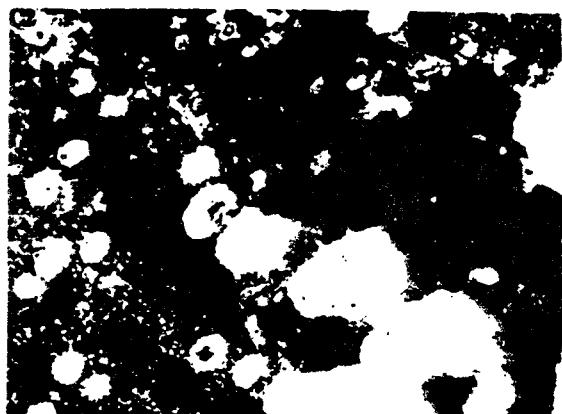


Fig.4-C2. TEM of Cotyledon Cells, fermented for 48hrs, on 7KGY(x 20,000)



Fig.5-D1. TEM of Cotyledon Cells, Steamed, on 10KGY(x 20,000)

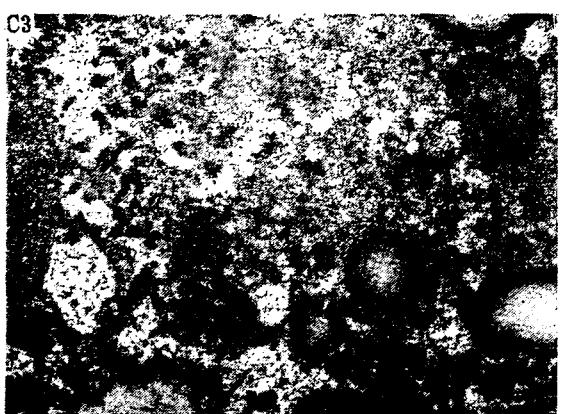


Fig.4-C3. TEM of Cotyledon Cells, fermented 72hrs, on 7KGY(x 20,000)

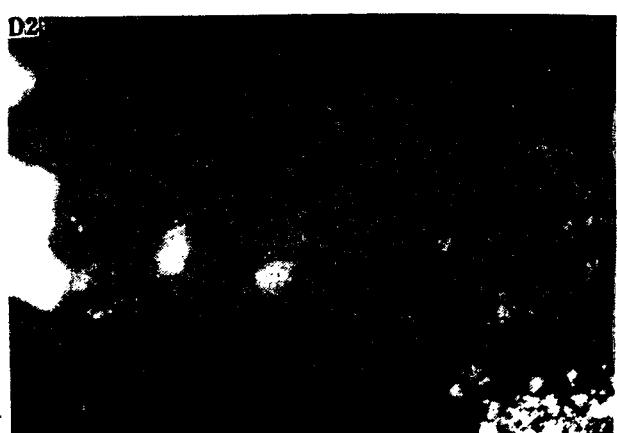


Fig.5-D2. TEM of Cotyledon Cells, fermented for 48hrs, on 10KGY(x10,000)

다. 이러한 점으로 보아 7KGY의 48時間 및 72時間의 酸酵가 5KGY의 試料보다 현저한 변화를 나타냈으며, 10KGY, 15KGY의 組織變化와 거의 같은 分解性을 보였다. 이런 結果로 보아서 7KGY로 照射시킨 것이 酸酵에서 가장 適合하다고 생각된다. 10KGY의 蒸煮組織에서도 다른 試料의 蒸煮組織과 同一하게 細胞의 變化가 거의 나타나지 않았다. 즉 10KGY의 蒸煮에서는 unit membrane 과

Protein body의 경계에서 큰 變化가 없었고, Spherosome이 전형적이었다. 10KGY의 48時間後의 것은 unit membrane의 分解가 나타났고, Protein body의 分解는 크게 發生하지 않았으나 Protein body내에 globoid와 Starch granule 섞여있었다. 10KGY의 72時間後의 酸酵組織에서는 그의 變化가 Fig.4-C3의 72時間의 그것과 유사한 分解를 보였다. 즉, Protein body와 Star-

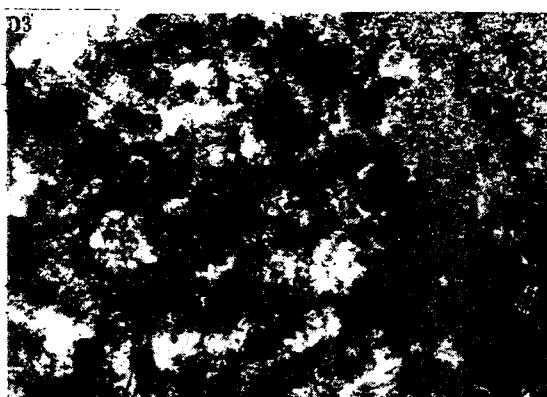


Fig.5-D3. TEM of Cotyledon Cells, fermented 72hrs, on 10KGY(x40,000)



Fig.6-E1. TEM of Cotyledon cells, Steamed, on 15KGY(x10,000)



Fig.6-E2. TEM of Cotyledon cells, fermented 72hrs, on 15KGY(x40,000)

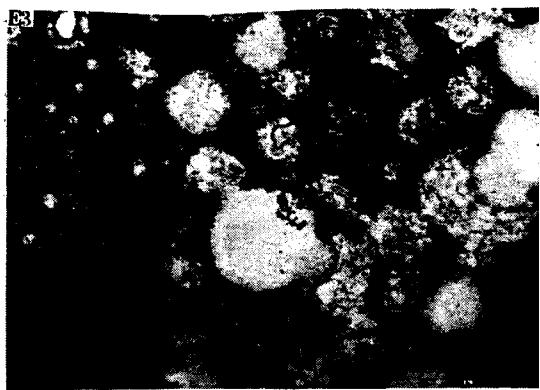


Fig.6-E3. TEM of cotyledon cells, fermented for 72hrs, on 15KGY(x40,000)

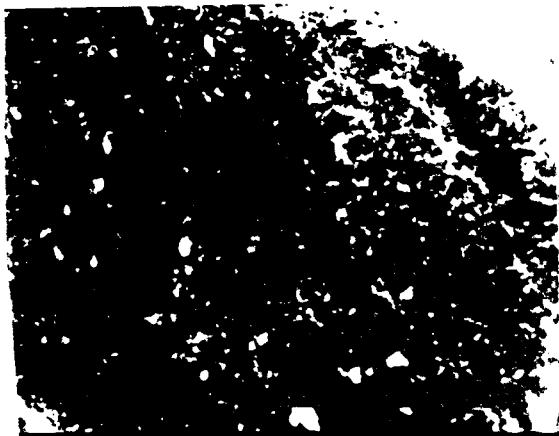


Fig.7-C1. SEM of cytoplasmic membrane,
Steamed, on 7KGY(x5,000)



Fig.7-C2. SEM of cytoplasmic membrane,
fermented for 48 hrs, on 7KGY
(x7,500)



Fig.7-C3. SEM of cytoplasmic membrane,
fermented for 72 hrs, on 7KGY
(x7,500)



Fig.8-C1. SEM of Cross Section, Steamed,
on 7KGY(x2,000)



Fig.8-C2. SEM of Cross Section, fermented
48hrs, on 7KGY(x5,000)

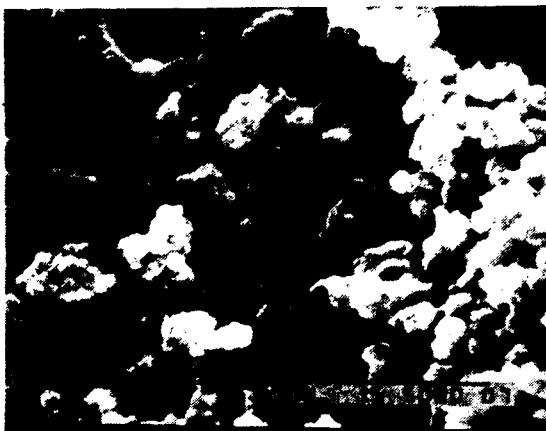


Fig.8-C3. SEM of Cross Section, fermented
72 hrs, on 7KGY(x5,000)

ch granule의 봉괴가 현저하였다. Fig. 6-E1의 15KGY의 烹煮組織은 10KGY의 그것과 比較할때 큰 變化가 없었다. 특히 細胞壁은 거의 變化가 없었으며 Protein body, Starch granule, Lipid granule 等이 典型的 이었고 Spherosome은 한곳에 모이는 群集性을 보였다. Fig. 6-E2의 酸酵組織은 Protein body, Spherosome, starch granule 等의 分解가 顯著하게 나타났다. 이러한 分解現象은 7KGY의 48時間, 72時間과 10KGY의 72時間의 組織分解와 類似性을 나타냈으며 이러한 점으로 보아 γ -線量 增加에 따라 組織分解 等의 變化는 크게 比例하지 않는 것으로 생각된다. (8~9) 15KGY의 72時間의 組織에서는 7KGY, 10KGY의 72時間의 그것보다 分解度에서 큰 變化的 增加를 보이지 않았다. (8~9)

즉, Protein body에 globoid가 섞여있고, starch granule, spherosome이 分解되어 protein body와 混合되어 나타났다. 이런 점으로 보아 大豆가 酸酵할때 作用하는 蛋白質分解酵素의 活性은 7KGY의 72時間과 10KGY와 15KGY의 48時間 및 72時間에서 가장 활발한 것으로 보여지며, 따라서 大豆酸酵는 7KGY로 照射하여 48~72時間 을 酸酵시키는 것이 組織分解에 適合하다고 생각된다. 또한 大豆에 5KGY, 7KGY, 10KGY 및 15KGY를 照射한 非酸酵의 組織은 非照射 大豆의 그것과 比較해도 큰 變化는 나타나지 않았다. 이러한 점은 適定線量의 照射食品으로서 cho et al^(16~18)의 5~7KGY로 照射한 마늘, 양파 등의 一般成分은 非照射區와 差異가 없다는 結果와 比較할때 組織에서도 同一性이 인정되었다. 組織分解率이 顯著한 7KGY 照射大豆의 組織變化를 좀더 상세히 알아보기 위하여 SEM사진으로 한것을 Fig. 7과 같다. 즉 원형질막으로 덮혀있는 蛋白質體의 測面組織의 變化를 본것이다.

그림에서 보는 바와 같이 Fig. 7의 C1은 원형질막으로 덮여있는 典型的인 parencyal cell의 모양을 볼 수 있었다. 이것은 H. L. wilcke 等^(18, 19)의 Freeze-fraction한 大豆子葉의 원형질막과 組織의 型態 比較에서 큰 相異點이 없었다. 또한 48時間 酸酵後의 원형질막은 거의 分解되었고, 蛋白質體와 spherosome의 分裂現象이 나타났다. 특히 cytoplasmic network의 分離가 顯著하였고 Spherosome은 分裂離脫되어 蛋白質體의 一部를 덮고있다. 또 72時間 酸酵後에는 蛋白質體의 分裂이 顯著하였다. 즉, 蛋白質體와 Spherosome이 分解되어 서로 섞여 있었다. Fig. 8은 試料를 斷面으로 切斷(cross section)하였을 때의 組織變化이다. 그림에서 보는 바와 같이 Fig. 8-C1은 蛋白質體, lipid granule, spherosome 等에서 典型的 형태였다. 48時間 酸酵後에는 cytoplasmic network는 分解되지 않았으나 72時間 後에는 parenchylal cell이 顯著하게 分解되었으며 蛋白質體, Starch granule 및 spherosome이 섞여서 分解性이 顯著히 높았다.

結論

大豆의 微細構造는 酸酵에 의해서 그 組織學의 形態에 깊은 영향을 미쳤으며 특히 γ -線 照射大豆의 경우가 더욱 顯著하였다. 즉, 非照射 酸酵大豆에 比하여 5KGY, 7KGY, 10KGY, 15KGY로 照射한 酸酵大豆는 照射線量에 比例하여 組織의 形態變化가 높게 나타났다. 또한 大豆酸酵의 微細構造에서 大豆는 照射線量과 酸酵時間이 增加함에 따라 蛋白質貯藏所인 Protein body는 그 크기가 顯著하게 평창, 分解하였고 Protein body 사이에 散在해 있던 Spherosome은 分散되었으며 그 數는 減少하였다. 照射大豆의 酸酵에 따른 組織의 變化는 7KGY의 48~72時間 酸

酵에서 適合性을 나타냈다.

参考文獻

1. 許允行, 李尙建, 徐正淑, 서울保健專門大學論文集, 5, 19-31, 1985.
2. 李尙建, 許允行, 徐正淑, 서울保健專門大學論文集, 4, 33, 1984.
3. 徐正淑, 柳明基, 許允行, 韓國食品科學會誌, 15, 4, 1983.
4. 이철호, 김정교, 韓國食品科學會誌, 17(6) 454, 1985.
5. W. J. Wolf, J.of the american oil chemist's society, 47, 107, 1969.
6. Kyoko saio and Tokuji watanabe, Agr. Biol. chem., 30(11), 1133, 1966.
7. W. J. wolf and F.L. Baker, Scanning electron microscopy, 52, 387, 1975.
8. 沈相七, 尹象鉉, 鄭元采, 放射線農學, 鄭文社, 서울, p.32, 1977.
9. Harold L.wilcke, D.T. Hopkins, D. H.waggle, Academic press, p.23, 1979.
10. John R.whitaker, S.R. Tannenbaum, Food proteins, Avl publishing company, INC. p.267, 1977.
11. R. J. Echandi, B. R. chase and L.M. Massey, J.Agr., Food chem., 18(5), 878, 1970.
12. S.R.Lee, Kor. J. Food Tech., 5(3), 188, 1973.
13. Y. Hasegawa and J.H. Moy, IAEM—S M—166/39, 89, 1972.
14. K.Umeda, H.Takano, T.Saito, K. Tot-suka, Y.Takahashi and K.Aso, Food Irrad. Japan, 5(1), 111, 1970.
15. H.O.Cho, M.W.Byun, KAERI, RR-315, 9, 1981.
16. H.O.Cho, KAERI, AR-169, 36, 1983.
17. H.L.Wilcke., D.T.Hopkins. and D. H.waggle, Soyprotein & Human Nutrition, Academic press, p.20, 1979.