

보리의 Phytic Acid 함량과 Phytase 활성도

이원종

강릉대학 식품과학과

Phytic Acid Content and Phytase Activity of Barley

Won - Jong Lee

Dept. of Food Science, Kangreung National University, Kangreung, 210-702, Korea

Abstract

Phytic acid content of 6 varieties of Korean barley ranged from 0.94 to 1.17%. Polishing of barleys greatly reduced the level of phytic acid. Cooking and autoclaving had little effect on phytic acid reduction, while ultrasonic treatment removed 57% of the phytic acid content. Germination decreased barley phytic acid 24% and increased phytase activity 9-fold. Phytase purified by ammonium sulfate precipitation, gel filtration and DEAE-cellulose chromatography showed an optimum pH of 5.0 and an optimum temperature of 40°C.

서 론

Phytic acid(myo-inositol hexaphosphate)는 콩류나 곡류등의 식물종자에 존재하는 화합물로서 단백질, 비타민 및 무기물과 결합하여 영양 결핍을 일으키는 요인으로 알려져있다.¹⁾ Phytic acid 와 아연의 상호작용과 아연의 결핍증이 연구되었고²⁾, Phytic acid가 구리와 망간³⁾, 철분⁴⁾, 마그네슘⁵⁾의 이용률을 저하시킨다고 보고되었다.

곡류와 콩류의 phytate를 조리, 증자, 발아를 통해서 감소시키려는 연구가 되어왔다. 쌀, 밀, 콩등을 4시간 증자했을 때 phytate가 25% 감소했으며⁶⁾, 완두콩을 조리하였을 때에도 phytate가 감소하였다⁷⁾. 콩⁸⁾, 밀⁹⁾이 발아하는 동안에 phytate가 감소되었고, 밀¹⁰⁾, 옥수수¹¹⁾, 완두콩¹²⁾이 발아하는 동안에 phytase의 활성도가 증가하였다.

미국산 맥주맥의 phytate의 함량은 0.97~1.08%이었으며¹³⁾, 맥주맥의 phytate는 제맥과정과 맥주제조과정중에 phytase에 의하여 인과 inositol로 분해되는데, 인과 inositol은 발효과정

중에 효모의 성장에 필수적인 요소로 알려져 있다¹⁴⁾. 또한 맥주의 inositol의 함량이 1l에 10mg이하인 경우에는 발효속도가 느리고 inositol을 첨가 하였을 때 발효속도가 증가하였다¹⁵⁾ 보리의 phytate의 함량을 감소시키려는 연구와 phytase의 활성도에 대해서는 거의 연구가 되어있지 않은 상태이다. 본연구에서는 한국산 보리의 phytate함량조사 및 함량을 감소시키는 방법을 연구하였고 보리의 phytase를 분리정제하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용된 보리품종은 87년도에 수확된 쌀보리(이리4호, 백동, 영산)와 걸보리(강보리, 수원227호, 올보리)로 농촌진흥청에서 분양 받았다. 도정수율이 무게비로 걸보리와 쌀보리를 각각 60% 및 70%가 되도록 Satake test mill로 도정하여 시료로 사용하였다.

Phytic Acid 함량측정

Phytic acid의 함량은 Wheeler 와 Ferrel¹⁶⁾의

방법에 의하여 측정하였다. 시료를 분쇄하여 U.S.No4체를 통과시킨 후 2g의 시료를 Trichloroacetic Acid로 추출한 다음 ferric salt로 침전시켰다. Ferric ion 함량은 Potassium Thiocyanate를 사용하여 측정하였다.

발아

발아는 Banasik¹⁷⁾의 방법을 이용하였다. 시료 10g을 구멍뚫린 플라스틱통에 넣고 16°C의 항온수조에 넣어 수분함량이 45%가 되도록 침지하였다. 침지된 시료는 습도 100%, 온도 16°C로 유지된 발아상에 넣고 5일간 발아시켰다. 녹맥아는 45°C에서 24시간 건조시킨후 65°C에서 6시간 건조시켰다.

가열, 증자, 초음파처리

쌀보리(백동 69.8% 도정수율) 10g을 실온의 증류수에 30분간 침지한 후 비이커에 담은 후 14ml의 증류수를 가하여 전기밥솥(금성 RC-122B, 용량 1.2l, 450W)에서 20분간 가열하였고 증자는 같은 시료 10g을 같은 방법으로 처리하여 압력밥솥(풍년, 0.8kg/cm²G, 용량 9l)을 이용하여 20분간 행하였다. 초음파처리는 시료를 30분간 침지한 후 초음파처리기(대원 50Hertz, 15×25×10cm)에 증류수 1l와 함께 10분간 행하였다.

Phytase 활성도 측정

분쇄한 시료를 U.S.No4체를 통과시킨 후 2g을 20ml 0.1M sodium acetate buffer(pH 5.0)와 혼합하고 30분간 실온에서 교반한 후 13,000×g에서 20분간 원심분리한 상정액을 효소액으로 이용하였다. 효소 반응액은 4.5ml의 0.1M sodium acetate buffer(pH5.0)와 0.5ml 효소액, 1.0ml의 2mM phytate용액을 섞어 40°C에서 30분간 반응시킨 후 15분간 가열하고 인의 증가량을 Chen¹⁸⁾의 방법에 의하여 측정하였다.

Phytase의 분리정제

100g의 보리(사천 6호)를 500ml의 0.1M sodium acetate buffer(pH 5.0)와 함께 Waring blender로 분쇄하였다. 13,000×g으로 2°C에서 원심분리한 후 상정액을 분리하여 조효소액을

얻었다. 조효소액에 (NH₄)₂SO₄를 천천히 교반하면서 가하여 50%포화용액이 되게 한 후 30분간 방치하였다. 13,000×g으로 2°C에서 원심분리한 후 상정액을 분리하였다. 다음에 (NH₄)₂SO₄를 위와 같은 방법으로 첨가 70%포화용액이 되게 한 후 30분간 정치시킨다음 원심분리하여 침전물을 0.05M sodium acetate buffer(pH 5.0)에 용해시켜 같은 완충용액중에서 18시간동안 투석하였다. 투석한 조효소액을 0.05M sodium acetate buffer로 평형시킨 Sephadex G-100 column(2.5×60cm)에 주입한 후 20ml/hr의 유속으로 5ml씩 분취하였다.

효소활성이 강한 분획을 모아서 (NH₄)₂SO₄를 가하여 침전시키고 13,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 침전물을 소량의 25mM Tris-HCl 완충용액(pH8.5)에 녹인 후 18시간동안 같은 완충용액중에서 투석하였다. Gel여과에서 얻은 효소액을 25mM Tris-HCl 완충용액(pH8.5)으로 평형시킨 DEAE-cellulose column (1.5×4.5cm)에 주입시키고 25mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.5)을 포함하는 0~0.5M sodium chloride 용액을 linear gradient 로 30ml/hr의 유속으로 5ml씩 분취하였다.

통계처리

모든 data는 건물량(dry weight basis)으로 나타내었다. 각 시료는 4번 반복, 측정하였으며 평균치는 SNK 방법¹⁹⁾을 이용하여 비교하였다.

결과 및 고찰

Phytic Acid 함량과 Phytase 활성도

한국산 보리 여섯품종의 phytic acid의 함량은 Table 1과 같다. phytic acid함량은 품종간에 유의적인 차이가 있었다. 이리4호는 평균치가 1.17%로 다른 품종보다 현저히 높았으나 다른 품종들은 0.94~1.02%의 범위에서 큰 차이를 보이지 않았다. 한국산 보리의 phytate acid함량은 이미 보고된 바 있는 쌀의 phytate함량 0.10~0.14%²⁰⁾, 콩 0.90%²¹⁾보다 높았으나 미국산 맥주 맥 0.97~1.07%²²⁾, 밀 0.62~1.33%²³⁾과 거의 비슷한 값이었다.

Table 1. Phytic acid content of six barley varieties

Variety	Polishing Yield(%)	Phytic Acid(%) ^{a)}	
		Before Polishing	After Polishing
Naked barley			
Iri-4	70.0	1.17 ^a	0.39 ^b (23%)
Baikdong	69.8	1.02 ^b	0.42 ^a (29%)
Youngsan	70.3	0.99 ^b	0.35 ^c (25%)
Husked barley			
Kangbori	60.0	1.00 ^b	0.34 ^c (20%)
Suwon-227	60.4	0.95 ^b	0.34 ^c (22%)
Olbori	60.8	0.94 ^b	0.27 ^d (17%)

^{a)}Data expressed on dry weight basis. Each value is the mean of four replication. Means within the same letters are not significantly different at 0.05 level of probability.

겉보리 및 쌀보리를 각각 도정수율 60%와 70%로 도정한 후 phytate함량을 분석한 결과, 도정후의 phytate함량은 도정전 보다는 훨씬 적게 함유하였다. 쌀보리의 경우 70%수율로 도정한 후의 phytate함량은 0.35~0.42%, 겉보리의 경우 60%로 도정한 후 0.27~0.34%를 함유하였다. 도정과정은 보리에 함유된 phytate acid의 71~83%를 감소시켜 phytate acid의 대부분의 저층에 함유된 것임을 알 수 있다(Table 1).

한국산 보리의 품종별 phytate의 함량은 Table 2와 같다. 품종간에 유의적인 차이가 있어 이리 4호는 다른 품종보다 현저히 많은 양인 51.2units

를 함유하였고, 다른 품종들은 35.3~39.6 units의 범위에서 큰 차이가 없었다. 도정후에도 이리 4호는 현저히 높은 양을 함유하여 36.5 units를 함유하였고 다른 품종들간에는 역시 유의적인 차이가 없었다. 도정과정에서 보리의 phytase는 28~45%가 제거되었다.(Table 2)

가열, 증자, 초음파처리의 효과

쌀보리(백동, 69.8% 도정수율)를 30분간 침지한 후 전기밥솥으로 가열처리 하였을때 phytate의 함량에는 별다른 큰 변화를 보이지 않았다.(Table 3). 압력 0.8kg/cm²에서 20분간 증자시

Table 2. Phytic activity of six barley varieties

Variety	Polishing Yield(%)	Phytase(ug / min / g barley) ^{a)}	
		Before Polishing	After Polishing
Naked barley			
Iri - 4	70.0	51.2 ^a	36.5 ^a
Baikdong	69.8	36.5 ^b	24.4 ^b
Youngsan	70.3	37.2 ^b	21.5 ^b
Husked barley			
Kangbori	60.0	35.3 ^b	25.3 ^b
Suwon - 227	60.4	39.6 ^b	30.3 ^b
Olbori	60.8	38.7 ^b	21.3 ^b

^{a)}Data expressed on dry weight basis. Each value is the mean of four replication. Means within the same letters are not significantly different at 0.05 level of probability.

phytate 함량에는 큰 차이가 없었다. 30분간 침지후 초음파로 10분간 처리후 phytate의 함량을 측정할 결과 처리전 보다 57%가 감소하였다. 이상의 결과에서 phytate의 함량은 전기밥솥이나 압력밥솥으로 가열조리시 거의 감소하지 않았으며 초음파로 현저히 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

Table 3. Effect of cooking, autoclaving and ultrasonic treatment on phytic acid content of barley

Treatment	Phytic Acid(%) ^{a)}
Dry barley	0.37
Soaking	0.33
Cooking	0.34
Autoclaving	0.35
Ultrasonic treatment	0.16

^{a)}Mean of four analyses on dry weight basis.

발아중 Phytate의 함량과 phytase활성도의 변화

한국산 맥주용 보리인 사천 6호는 16℃에서

수분함량이 45%가 되도록 침지한 후에는 phytase의 활성도가 큰 차이를 보이지 않았으나 발아중에는 크게 증가하여 발아 4일후에 최대의 활성도를 나타내다 그후 감소하였다(Table 4). 발아 4일후에는 phytase의 함량은 보리의 9배정도 함유하였다. Srivastava²⁰⁾는 발아4일 후에 보리의 phytase는 3배가량 증가하였다고 보고한바 있다.

발아중에는 phytase가 증가함과 동시에 phytate 함량은 감소하였다.(Table 4). 사천6호의 phytate 함량은 1%이었고 침지중에는 큰 변화가 없었으나 점차적으로 감소하여 5일후에는 24%정도 감소하였다. Lima bean의 경우 3일동안 발아후 28.6~32.9%의 phytate가 감소하였고, 콩의 경우 30.9~33.3%, cowpea의 경우 37.7~40.7% 감소하였다²³⁾.

맥주용보리와 맥아의 phytate 함량

맥주맥에서의 phytate함량과 그 보리를 발아시켜 만든 맥아에서의 phytate의 함량은 Table 5와 같다. 맥아는 보리를 16℃에서 침지하여 45%의 수분을 함유하도록 한 후 16℃에서 4일간

Table 4. Changes in phytase activity and percent phytic acid during germination of Sacheon-6 barley

Germination Period	Phytate (%)	Phytase Activity ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ barley)
Dry barley	1.00	73
Steeped barley	0.97	73
Germinated 1 day	0.95	112
2	0.92	276
3	0.89	344
4	0.86	632
5	0.76	527

Table 5. Phytic acid content of korean malting barley and malt

Variety	Phytic Acid(%)	
	Barley	Malt
Hwangkeumbori	1.11 ^{a)}	0.81 ^{a)} (73 %)
Hyangmaik	1.08 ^{b)}	0.76 ^{a)} (70 %)
Sacheon-6	1.07 ^{b)}	0.83 ^{a)} (78 %)
Doosan-12	1.01 ^{c)}	0.82 ^{a)} (81 %)

^{a)} Mean of four analyses on dry weight basis. Values in parentheses show percent of barley phytic acid.

Table 6. Purification of barley phytase ^{a)}

Purification Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification (fold)
Crude Extract	182	23.5	0.13	1
Ammonium Sulfate	48.6	13.7	0.28	2.2
Sephadex G-100	9.0	3.6	0.40	3.1
DEAE-Cellulose	0.67	2.0	2.99	23

^{a)}Phytase activity is expressed as μ moles of Pi released / min.

발아시킨 후 45°C에서 24시간 건조시킨 후 65°C에서 6시간 더 건조시켜 뿌리를 제거하여 제조하였다. 맥주맥의 phytate 함량은 1.01~1.11%로 식용보리와 비슷한 값이었고 품종간의 유의적인 차이를 나타내황금보리가 1.11%를 함유하여 가장 높은 값을 나타냈다. 맥아의 phytate 함량은 0.75~0.83%로 제맥과정중에 19~30%가 감소되었다. 맥아의 phytate 함량은 품종간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Phytase 정제 및 성질

(NH₄)₂SO₄로 분획하여 얻은 조효소액을 gel filtration과 DEAE-cellulose column chromatography 하여 단백질과 효소역가를 측정된 결과는 Table 6과 같다. 정제한 효소액의 specific activity는 0.91 units/mg 이었다.

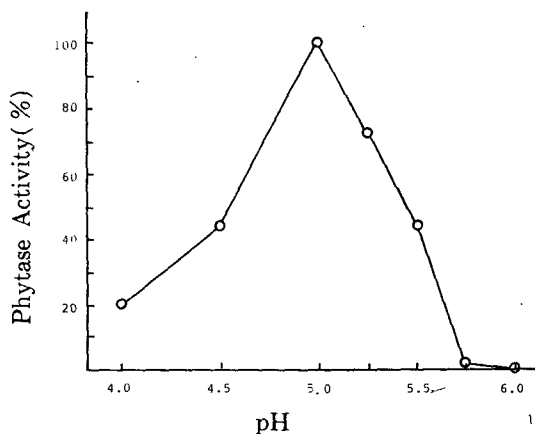


Fig. 1. Effect of pH of barley phytase activity.

보리 phytase는 acetate buffer pH5.0에서 최대 활성도를 나타냈다. 보리 phytase는 좁은 pH에서만 활성도를 나타내 pH 4.0에서 20%, pH 6.0에서는 거의 활성도를 나타내지 않았다.(Fig.1)

보리 phytase에 대한 온도의 영향은 Fig 2와 같다. 활성도는 40°C에서 가장 높았고 온도가 올라감에 따라 활성도는 급격히 감소하였다.

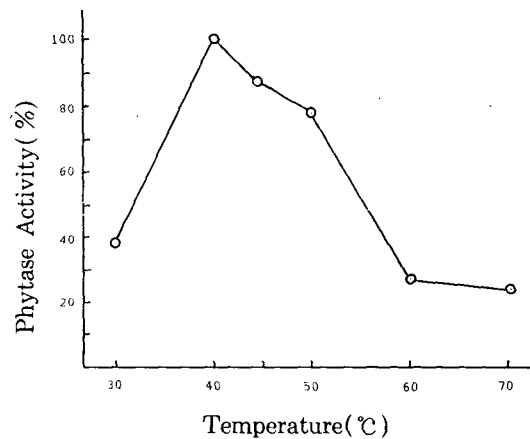


Fig. 2. Effect of temperature on barley phytase activity.

요약

보리는 0.94~1.17%의 phytic acid를 함유하였다. 쌀보리의 경우 70% 수율로, 걸보리의 경우 60%로 도정한 결과 71~83%의 phytic acid가 감소되었다. 쌀보리를 가열, 증자처리하였을 때, phytic acid는 감소되지 않았으나 초음파로 처리한 결과 57%가 감소하였다. 맥주맥의 발아

시 phytase 활성도는 발아 4일후에 최대치를 나타냈고 phytic acid의 함량은 감소하여 발아 5일후에는 24%정도 감소하였다. 유안염석과 gel 여과 및 DEAE-cellulose chromatography등으로 정제된 phytase는 작용 최적pH가 5.0이었으며 40℃에서 최대활성도를 보였다.

(본 연구는 1987년도 한국과학재단 신진연구비의 지원에 의해 수행된 연구의 일부임)

문 헌

- O'Dell, B.L. : Effect of dietary components upon zinc availability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 22, 1315(1969)
- O'Dell, B.L. and Savage, J.E. : Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103, 304(1960)
- Davis, N.T. and Nightingale, R. : The effect of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc and whole body retention of zinc copper, iron, and manganese in rats. *Br. J. Nutr.*, 34, 243(1975)
- Welch, M.R., House, W.A., and Allaway, W. H. : Availability of zinc from pea seed to rats. *J. Nutr.*, 104, 733(1974)
- Seeling, M. : The requirement of magnesium by normal adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, 14, 342(1964)
- deBoland, A.R., Garner, G.B., and O'Dell, B.L. : Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed product. *J. Agric. Food Chem.*, 23, 1186(1975)
- Beal, L. and Mehta, T. : Zinc and phytate distribution in peas. Influence of heat treatment, germination, pH, substrate, and phosphorus on pea phytate and phytase. *J. Food Sci.*, 50, 96(1985)
- Ferrel, R.E. : Distribution of bean and wheat inositol phosphate esters during autolysis and germination. *J. Food Sci.*, 43, 563(1978)
- Tabekhia, M.M. and Luh, B.S. : Effect of germination, cooking and canning on phosphorus and phytate retention in dry beans. *J. Food Sci.*, 45, 406(1980)
- Peers, F.G. : The phytase of wheat. *Biochem. J.* 53, 102(1953)
- Chang, C.W. : Study of phytase and fluoride effects in germinating corn seeds. *Cereal Chem.*, 44, 129(1967)
- Kuvaeva, E.B. and Kretovich, V.L. : Phytase of germinating peaseeds. *Fiziol. Rast.*, 25, 290(1978)
- Lolas, G.M., Polamidis, N., and Markakis, P. : The phytic acid - total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans, and wheat. *Cereal Chem.*, 53, 867(1976)
- Bradee, L.H. : Some practical aspects of malting and mashing related to yeast nutrition and fermentation. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 7, 37(1970)
- Thompson, C.C., Leedham, P.A., and Lawrence, D.R. : The effect of inositol and nucleic acid base on the fermentation rate of an ale yeast. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 31, 139(1973)
- Wheeler, E. L. and Ferrel, R.E. : A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.*, 48, 312(1971)
- Banasik, O.J., Myhre, D., and Harris, R. H. : A micromalting method for nursery samples. *Brew. Dig.*, 51, 50(1956)
- Chen, P.S., Toshiard, T. Y., and Warner, H. : Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 28, 1756(1956)
- Hicks, C.R. : *Fundermental concepts in the design of experiments*. CBS College Publishing, New York, 88(1982)
- Barber, S. : Milled rice and changes during aging., in "Rice Chemistry and Technology", D.R. Houston, ed., Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN, 215(1972)

21. Srivastava, B.I.S. : The effect of gibberellic acid on ribonuclease and phytase activity of germinating barley seeds. *Canadian J.*

of Botany, 42, 1303(1964)

(Received December 20, 1988)