

<報文>

大麥種子の Amylase 生成에 미치는 Gibberellic Acid의 効果

蔡 麟 基

(梨花女子大學校 文理科大學 生物學科)

Induction of Amylase Formation in Barley Seed by Gibberellic Acid

Chai, In Ki

(Dept. of Biology, Ewha Women's University)

ABSTRACT

(1971. 4. 1 접수)

To determine the amylase formation mechanism and the effect of GA. in germinating barley seeds, they were divided into embryo-less seed, isolated embryo, aleurone layer and pure endosperm etc., treated with GA, and cultured separately or in mixed lots. The result obtained are as follows.

- 1) The amylase of barley seed is formed in the aleurone layer under the effect of inducing materials excreted from the embryo.
- 2) The embryonic materials amylase formation could be substituted for by GA.

Therefore it can be presumed that the substance produced by the embryo which induces amylase synthesis is probably GA or material similar to it.

緒 論

材料 및 方法

從來 大麥種子の 發芽에 따른 Amylase 生成部位가 胚의 胚盤이라는 見解가 支配的이 었으나 四方(1958), Paleg (1960, a), Briggs(1964) 등은 胚는 단지 胚乳에서 Amylase를 生成하겠음하는 어떤 要因物質을 分泌할 따름이라고 하였다. 四方(1960), Paleg(1964), Briggs (1964), Yomo and Iinuma(1963, 1964) 등은 나아가 胚乳에서의 Amylase 生成은 거의 糊粉層에 局限되어 있는것 같으며 好氣條件이 必要하다고도 하였다.

한편 Kato and Momotani (1966, 1969) 四方(1960) Paleg(1967), Varner(1964, 1965) 등은 大麥의 除胚種子를 Gibberellic acid(이하 GA.로 적음)로 처리하여 Amylase를 生成시킬수 있다고 하였다.

著者는 上記 여러 報告를 勸案하면서 發芽에 따른 大麥種子에서의 Amylase 生成의 過程을 살피는 한편 이 에 미치는 GA의 作用을 檢討하기 위하여 本研究에 着手하였다. 本研究에기 많은 實驗을 도왔던 李蕙淑媛에게 깊은 謝意를 表하는 바이다.

1) 材料.

大麥種子是 水原 18號(*Hordeum sativum* Jess. var.)

2) 種子の 前處理.

一定量의 種子를 50% H₂SO₄ Sol. 에 넣어 外皮를 溶 除하고 洗滌후 24시간 吸水시킨것을 0.2% 臭素水로 3分間滅菌하였다.

3) 培養方法.

無菌샤베에 滅菌水を 갈고 前處理된 種子 또는 그分 離片을 浸入 23°C에서 4日間 暗培養하였다. 이것은 豫 備實驗의 結果 Amylase activity가 發芽 4日만에 最高 値에 이르렀기 때문이다.

4) GA 이 처리濃度.

大麥種子の Amylase activity를 促進하는 GA의 濃度가 豫備實驗의 結果 5ppm 임이 밝혀져 GA 처리 는 모두 5ppm 濃度에서 하였다.

5) Amylase activity 의 測定

(a) 培養된 種子 또는 種子片의 一定量(乾量3g該當)

을 石英砂 10g 과 함께 敏速히 磨碎하여 粉化한후 冷증류수 100cc 를 넣어 混和하였다.

(b) 混和液을 40°C 의 恒溫槽에 定置하여 잘 저으면서 1시간동안 浸出한후 이것을 여과하여 濾液을 酵素液으로 하였다.

(c) 糖化操作은 2% starch sol. 20cc 와 pH 4.3 Buffer 10cc를 大型 test tube 에 넣고 混合하여 40°C 의 恒溫槽에 安置한후 20분후에 酵素液 0.5cc를 加하여 Amylase 의 作用을 계속시켰다. 30분경과한후 5% NaOH Sol. 5cc.를 加하여 Amylase 의 作用을 中斷시키고 室溫에서 冷却한후 滅菌水를 加하여全體가 100cc,가 되게하였다. 한편 育粒液으로서 酵素液을 加하기 前에 5% NaOH Sol. 5cc를 加한것을 위와같은 方法으로 만들어 보관하였다.

(d) Amylase activity 는 Bertrand 法에 따라 還元糖을 Cu量으로 代置하여 測定하였다.

結果 및 考察

1) 胚乳에서의 Amylase 生成에 미치는 胚의 影響

大麥種子를 無菌的으로 有胚部와 無胚部로 兩分하여 各各 四日間 培養하여 그 Amylase 生成을 調査하여본 結果는 Table 1 에서와 같은데, 無胚部에서는 認知할 만한 Amylase activity 가 없었고 有胚部에서는 매우 높은 活性을 나타내었다. 이것은 胚乳에서의 Amylase 生成 내지는 賦活에 胚의 存在가 必須的인것을 알려주는 것이다. 이와같은 結果는 四方(1958, 1962), 및 Paleg (1962)등도 報告하고 있는데, 이것으로부터는 아직도 胚의 구실이 胚乳에서 Amylase 를 生成하게 함인저 既存 Amylase 의 賦活인지는 速斷할수 없다.

Table 1. The comparison of amylase activities in the embryoless half seed and half seed with embryo, after 4 days of culturc at 23°C in the dark.

Part	Amylase activity (Cu.mg/3g dry wt.)
Half seed with embryo	14.99
Embryo-less half seed	0

2) 胚의 영향이 胚乳의 Amylase 生成에 미치는 時間

發芽大麥種子의 胚가 胚乳의 Amylase 生成에 미치는 效果의 時間的經過를 究明하기 위하여 吸水를 開始한후 1, 4, 8, 16, 20, 24, 48時間마다 種子에서 胚를

除去하고 各各 23°C 에서 4日間培養하여 그 胚乳의 Amylase activity 를 測定한바, Fig 1에서 보는바와같이 吸水시작으로부터 20時間만에 胚의 影響이 完全히 胚乳에게 미친다는 것을 알수있었다. 即 胚에서의 어떠한要因이 胚乳의 Amylase 生成을 最大限으로 誘導하는때는 種子의 吸水로부터 最小限約20時間이 所要됨을 알수있었다. 이것은 種子의 最大吸水가 4~5時間을 要하는데 比하면 꽤 많은 時間을 必要함을 나타내는 것인데 胚의 影響을 調査하는데 있어서는 이러한 時間的要因을 考慮하여야 할것이다. 時間的要因의 緣由는 胚에서의 誘導要因의 生成과 그것의 胚乳세포의 浸透에 要하는 時間에 있을것으로 推測된다.

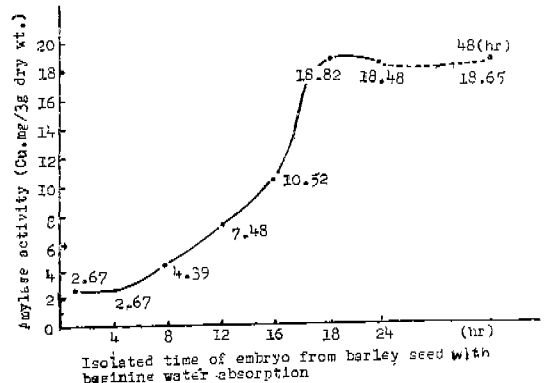


Fig 1. 胚의 영향이 胚乳의 Amylase 生成에 미치는 時間

3) 除胚種子의 Amylase 生成에 미치는 分離胚의 作用 種子에 附着되어 있는 胚의 存在가 胚乳에서의 Amylase 生成에는 必須的인 것인데 種子에서 切取한 分離胚마저 그러한 作用이 있는가를 檢討하기 위하여 다음과 같은 實驗을 하였다. 大麥種子에서 胚만을 分離하여 分離胚와 除胚種子의 두部分으로 나누어 分離胚와 除胚種子를 各各 나누어 培養한것과 그것들을 混合培養한것의 除胚種子의 Amylase activity 를 比較하여본 結果는 Table 2에서와 같다.

Table 2. The effect of isolated embryos on the amylase formation of the embryoless barley seed, after 4 days of culture at 23°C in the dark.

Part	Amylase activity(Cu.mg/3g dry wt.)
Embryo-less seeds (separated from isolated embryo)	0
Embryo-less seeds (mixed with isolated embryo)	12.66

亦是 分離胚도 種子에 附着되어있는 胚와 마찬가지로 胚乳에서의 Amylase 生成을 誘導할수 있었는데 이것은 胚에서의 誘導要因이 培養器底의 滅菌水를 通하여 胚乳에 到達된것으로 보아야 할것이다.

4) GA의 처리에 의한 除胚種子에서의 Amylase 生成 胚를 除去하여 Amylase 生成能을 없이한 除胚種子를 GA로 처리하여 그 Amylase 生成與否를 調査한結果는 Table 3과 같다. 即 Control인 GA 無處理 除胚種子에서는 豫想대로 Amylase 生成을 볼수없었으나 GA (5ppm)로 처리된 除胚種子에서는 正常種子の 發芽에서 보다는 더높은 Amylase activity를 볼수있었다.

Table 3. The amylase activity of embryo-less barley seed treated with 5 ppm GA, after 4 days of culture at 23°C in the dark.

Part	Amylase activity (Cu.mg/3g dry weight)
Embryo-less seed (without GA)	0
Embryo-less seed (treated with GA)	29.25

이것은 大麥種子の Amylase 生成에 있어서 GA가 胚의 구실을 代身할수 있음을 나타내는 것으로 胚에서의 誘導要因이 GA 내지는 그類似物質임을 推測하게 하는것이다. 大豆 또는 옥수수 芽生에서 GA가 一種의 植物호르몬으로서 抽出되고 있는事實과 照하여 볼때 위의 假定이 速斷斷은 아닐것 같다.

5) 大麥種子の Amylase 生成에서의 糊粉層의 機能 正常種子를 分離胚와 除胚種子로 나누고, 除胚種子를 다시 糊粉層과 純胚乳로 나누어 全部 세部分으로 하였는데 分離操作上 不可避하여 糊粉層에는 若干씩의 胚乳成分이 附着되어 있다. 이들 세部分에서 分離胚와 糊粉層(胚乳附着)을 混合한것과 分離胚와 純胚乳를 混合한것을 각각培養하여 그 Amylase activity를 測定하였는데 그結果는 Table 4에서와 같다. 分離胚와 純胚乳가 混合된 實驗區에서는 Amylase activity가 거의 없었으나 分離胚와 糊粉層을 混合한 實驗區에서는 매우높은 Amylase activity를 보여주고 있다. 實際 Paleg. et al.,(1964)의 報告에 의하면 糊粉層細胞에는 Mitochondria나 Ribosome과 같은 物質代謝에 關與하는 細胞器官이 많으나 胚乳細胞에는 그러한것이 殆無하며 단지 貯藏養分을 가지고있을 따름이라고 한다. 그렇다면 Amylase와 같은 酵素蛋白質의 合成은 마

땅히 糊粉層에서 이루어져야하며 胚乳에서의 糖化作用은 糊粉層에서 合成된 Amylase의 浸透에 의한것이라고 보아야 할것이다.

Table 4. The comparison of amylase activity in the pure endosperm (without aleurone layer) and aleurone layer of barley seeds by mixed culture with isolated embryo, after 4 days of culture at 23°C in the dark.

Part	Amylase activity (Cu. mg/3g, dry wt.)
Pure endosperm+ isolated embryo	1.02
Aleurone layer+ isolated embryo	32.83

6) 純胚乳와 糊粉層에서의 Amylase 生成에 미치는 GA의 影響

上述한 몇개의 實驗結果를 통하여 보건대 胚乳에서의 Amylase 作用을 誘導하는 胚의 機能은 糊粉層을 거쳐서만 發現될수 있었는데 胚의 Amylase 生成誘導 機能을 代身할수 있었던 GA의 경우도 역시 糊粉層을 거쳐야하는 것인지를 밝히기 위하여 純胚乳와 糊粉層을 各各 GA로 처리하여 培養한후 그 Amylase activity를 測定하여 보았다. 結果는 Table 5에서와 같이 GA도 胚와 마찬가지로 糊粉層에서만 Amylase 生成을 誘導할수 있었다.

Table 5. The effect of GA on the amylase formation in the pure endosperms and isolated aleurone layers of barley seed after 4 days of culture at 23 C in the dark.

Part	Amylase activity (Cu,mg/5g. dry wt.)
Pure endosperm+GA	0
Isolated aleurone layer+GA	37.14

以上の 여러結果를 綜合하여 보건대 大麥種子發芽에서의 Amylase 生成은 胚에서의 어떤 誘導要因에 의하여 糊粉層에서 이루어지며 이것이 胚乳로 浸透되어가서 糖化를 일러키는것으로 생각된다. 그리고 이와같은 胚의 機能은 GA로 代身할수 있으며 따라서 Amylase 生成을 誘導하는 胚에서의 物質은 GA거나 그와 類似한 作用物質임을 推測할수 있다.

摘 要

大麥種子의 發芽에 따른 Amylase 生成의 過程과, 그 에 대한 Gibberellic acid 의 作用을 究明하기 위하여 大麥種子를 分離하여 分離胚, 除胚種子, 糊粉層, 純胚乳 등으로 나누어 隔離 또는 混合培養을 하는 同時에 GA 를 처리하여 그들 各各의 Amylase activity 를 調査하여 보았는데 그結果는 다음과같이 要約할수 있었다.

1) 大麥種子에서의 Amylase 는 胚에서의 誘導物質의 作用을 받아 糊粉層에서 生成되어 이것이 胚乳로 浸透되어 澱粉을 糖化하는 過程을 밟는다.

2) Amylase 生成을 誘導하는 胚에서의 어떤 物質 要因의 作用은 GA로서 代行할수 있다.

3) 따라서 Amylase 生成에 關한 胚에서의 誘導物質 은 Gibberellic acid이거나 그와類似한 作用을 가진 物質일것이 推測된다.

參考文獻

1. Briggs, D.E., 1964. Origin and distribution of α -amylase in malt, J.Inst. Brew., 70:14—24.
2. Kato, J. and Y. Momotani, 1966. Isozymes of α -amylase induced by gibberellic acid in embryoless grains of barley, Plant physiol., 41: 1395—1396.
3. Momotani, Y. and J. Kato, 1967. Hormonal regulation on the induction of ramlase isozymes in the embryo-less endosperm of barley, Plant & Cell physiol., 8:439—445.
4. Paleg, L.G., 1960. Physiological effects of gibberellic acid, I, On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm, Plant physiol., 35:293—299.
5. _____, 1960. Physiological effects of gibberellic acid, II, On starch hydrolyzing enzymes of barley endosperm, Plant physiol., 35: 902—906.
6. Paleg, L.G., et al., 1962. Physiological effects of gibberellic acid. IV, On barley grain with normal, X-irradiated, & exised embryos, Plant physiol., 37: 579—583.
7. _____, 1962. Physiological effects of gibberellic acid, V, Endosperm responses of barley, wheat & oats, Plant physiol., 37: 798—803.
8. _____, 1964. Physiological effects of gibberellic acid, VII, Electron microscopy of barley aleuone cells, Plant physiol., 39: 673—680.
9. Paleg, I.G., et al., 1967. Physiological effects of gibberellic acid, IX, Recovery of gibberellic acid following incubation with endosperm, Plant physiol., 42: 445—449.
10. Varner, J.E., 1964. Gibberellic acid controled synthesis of amylase in barley endosperm, Plant physiol., 39:413—415.
11. Varner, J.E., et al., 1964. Hormonal control of enzymes synthesis in barley endosperm, Proc, U.S. Nat. Acad. Sci., 53:100—106.
12. _____, et, al 1965. Gibberellic acid-con troled synthesis of α -amylase in barley endosp-erm, J.Cell. comp. physiol., 66:55—67.
13. Yomo, H. and H. Inuma, 1962. The modifica- tion of the underminated barley endosperm with gibberellin, Agr. Biol. Chem., 26(3): 201.
14. _____ and _____, 1964. The enzymes of the aleurone layer of barley endosperm, Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 97—102.
15. _____ and _____, 1964. α -amylase pro- duction in the endosperm glinders of ungermin- ated barley treated with gibberellin, Agr. Biol. chem., 28(5): 273—278.
16. 四方治五郎, 1958: 麥芽に關する研究, 醸協誌, 16: 444—448.
17. _____, 1960, アミラーゼ附活物質に關する研究 (第二報), 醸協誌, 18: 494—499.
18. _____, 1960, アミラーゼ附活物質に關する研究 (第四報), 醸協誌, 600—602.
19. " , 1960, アミラーゼ附活物質に關する研究 (第五報), 醸協誌, 18: 603—606.
20. " , 1962. 麥芽アミラーゼの生成について" 醸協誌, 20: 261—264.