韓國營食誌 10 (1), 47 ~ 52, 1981 J. Korean Soc. Food & Nutr. 10 (1), 47 ~ 52, 1981

食品中의 窒酸塩 및 亜窒酸塩에 關한 研究(第2報)

大豆発芽過程中 窒酸鹽 및 亜窒酸鹽과 Ascorbic Acid 含量変化에 關하여

尹衡植, 權重浩

慶北大學科 農化學科

Studies on Nitrate and Nitrite in Foods (II)

Relationship between Nitrate, Nitrite Contents and Nitrate Reductase Activity during Soybean Germination

Joong-Ho Kwon, Hyung-Sik Yoon

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

Abstract

Changes of nitrate and nitrite contents in various parts (cotyledon, hypocotyl, root) of germinating soybean were studied in relation to activities of nitrate reductase (NR).

The optimal pH and temperature of the NR were around pH 6.5 and 30°C, respectively. The stable pH range of the enzyme was between pH 4.0 to 6.5. The enzyme was stable at 40°C.

Activities of NR in each part of germinating soybean increased in order of root, hypocotyl and cotyledon.

Hypocotyl and root were maximum activity around 10 days after germination, and cotyledon around 9 days.

Relationship between nitrate contents and NR activities was observed except the middle period of germination, and that of nitrite contents and NR activities was partially observed.

I. 緒 論

窒酸鹽은 窒酸還元酵素나 還元細菌 등의 作用에 의해 亞窒酸鹽으로 還元된다.[1,2] 植物體의 窒酸還元 mechanisn은 Evans, Nason, and Nicholas[3,4] 에 의해 確立되었으며, 窒酸同化의 첫단계로서 代謝에 중요한 意義를 지니고 있다. 本酵素는 induced enzyme 으로서 植物體의 잎, 뿌리등의 細胞質內에 많이 存在하며[5] 共同因子로써 FAD와 molybdenum (M_o^{6+})을 含有하여 electron transport system을 거쳐 NO_3^- 를 NO_2^- 로 還元시킨다고 알려져있다.[6,7] 이 還元段階의 中間産物인 亞窒酸鹽은 各種 中毒症狀과 nitrosamine의 前驅物質이 되는데, 이는 植物體에서 酵素의 作用으로 生成되어 攝取되거나 窒酸

鹽을 多量 含有한 食品을 直接 攝取했을 경우 吸收된 다음 消化官內에서 還元細菌에 의해 亞窒酸鹽으로 還元되기도 한다.[8] 前報[9]에서와 같이 各種 危害要因이 될 수 있는 窒酸鹽은 施肥量, 水分, 溫度等의 外的條件과, 草種, 器官部位, 生育期, 酵素系等의 內的條件에 의해 植物體內에 蓄積되지만[10,11] 적당한 環境條件과 酵素系의 원활한 作用으로 還元되어 질 수 있다고 본다.

이와 관련하여 窒酸鹽 蓄積에 影響을 미치는 여러가지 外的條件에 대한 報告[12]와, 食品의 貯藏 및 加工條件에 따른 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽의 變化에 關한 硏究는 많이 되고 있으나,[13,14] 酵素的 關係等에 대한 檢討는 거의 없는듯 하여 本人等은 우리나라 食品 중 그 攝取가 많고, 比較的 形態的으로 分化된 組織을 지닌 soybean 種子를 利用하여 發芽成長過程 중 各部位別 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽의 含量을 調査하여 이들의 變化와 酵素活性과의 상관관계를 檢討하였던 바 그 結果는 다음과 같다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 實驗材料

供試用 大豆는 豆芽用 種子로써 前報[9]에서와 같은 方法으로 發芽栽培하면서 cotyledon, hypocotyl, root의 3部分으로 나눠 試料를 採取하였다.

2. 實驗方法

1) 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽의 定量

前報와 같이 窒酸鹽은 cadmium column를 通過시켜 還元시킨 다음 亞窒酸鹽의 定量法인 naphthylethylene-diamine에 의한 diazo coupling法[15]을 使用하였다.

2) 酵素 活性度 測定

窒酸還元酵素(Nitrate Reductase, NR)의 活性은 Mulder 等의 方法[16]에 따라 Fig. 1과 같이 測定하였다.

빙냉한 Thunberg 管을 使用하여 2~3 mm로 細切한 試料 一定量과 0.1M K. phosphate buffer (pH 6.5) 5ml을 主室에 넣고, 側室에는 水素供與體로써 0.1M malic acid (pH 7.0으로 조절) 1ml과, 0.1M KNO_3 용액 1 ml을 넣는다. 진공펌프를 利用하여 3分間 脫氣한 다음 試料內에 液이 침투하도록 서서히 空氣를 注入시켜 주고, 다시 3分間 충분히 再脫氣하여 側室의 液을 主室로 混合하였다. 30℃에서 1時間 反應시켜 이 液을 濾過하고, 濾液에 sulfanilamide 용액과 naphthylethylene-diamine 용액

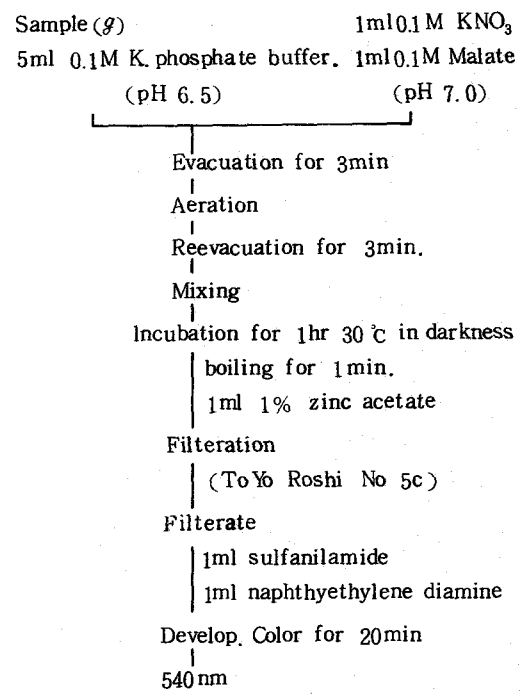

Fig. 1. Determination of Nitrate Reductase Activity

을 加해 20分間 放置한 뒤 540 nm에서 比色하여 生成된 NO_2^- μg을 窒酸還元酵素의 活性으로 나타내었다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 部位別 窒酸鹽및 亞窒酸鹽의 含量變化

大豆發芽過程中 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽의 含量을 調

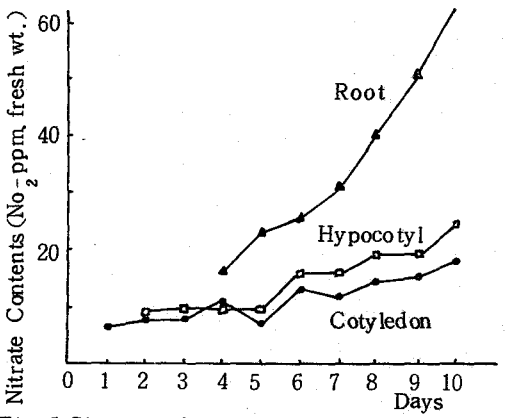

Fig. 2. Changes of Nitrate Contents during Soybean Germination

査해 본 結果 Fig. 2, 3과 같은 變化를 볼 수 있었다. 卽 窒酸鹽의 含量은 점차 增加하는 傾向으로 cotyledon 및 hypocotyl 部分은 거의 類似한 數値를 보였으나 root 部分은 이에 比해 상당히 높은 含量을 나타내었다.

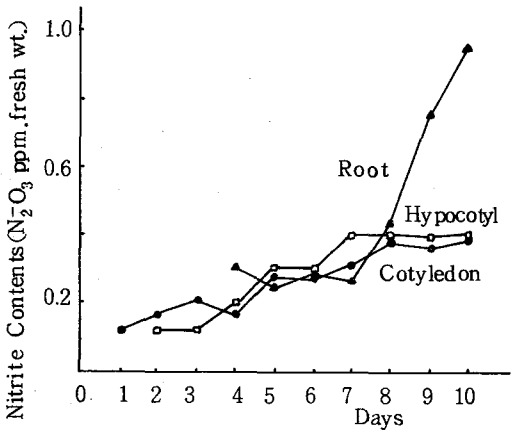

Fig. 3. Changes of Nitrite Contents during Soybean Germination

亞窒酸鹽의 含量은 發芽 후 8일까지는 各部位 모두 類似하게 완만한 增加를 보였으며, 그 以後에는 cotyledon과 hypocotyl은 거의 變化가 없었으나 root 部分은 크게 그 含量이 增加하였다.

2. 本 酵素의 酵素學的 性質

大豆發芽 중 窒酸還元酵素의 活性을 調査하기 위하여 反應 最適條件을 알아 본 結果는 다음과 같다.

1) 最適 pH

本 酵素의 最適 pH를 調査하기 위하여 pH 4.0~7.0에서는 Mcilvaine buffer를, pH 7.0~10.0에서는 Kolthoff buffer를 使用하여 實驗해 본 結果 Fig. 1와 같이 pH 6.5부근에서 最大의 活性을 나타내었다.

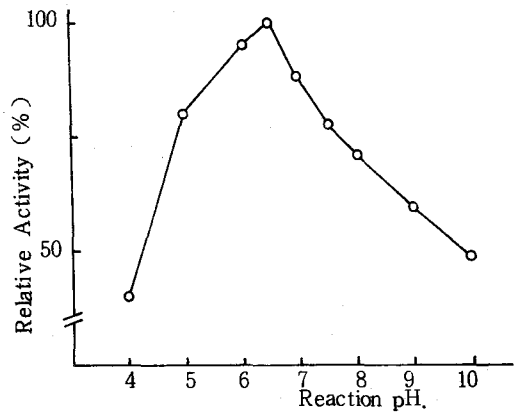

Fig. 4. The Effect of pH on the Enzyme Activities

The enzyme activity was assayed under the standard (in vivo) assay conditions described in the text, except using Mcilvaine buffers between pH 4.0 to 7.0 and Kolthoff buffers between pH 7.0 to 10.0.

The activity at pH 6.5 was assumed as 100.

2) 最適溫度

酵素活性의 最適溫度를 測定하기 위하여 pH 6.5에서 10~50℃까지 調査해 본 結果는 Fig. 5와 같다.

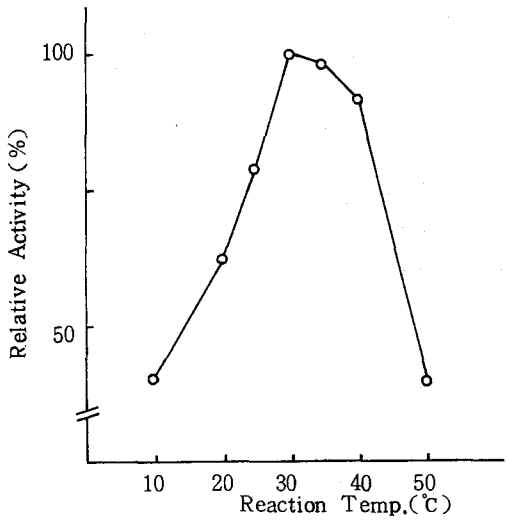

Fig. 5. The Effect of Temp on the Enzyme Activities

Activities were assayed in phosphate butter, pH 6.5 at temperature ranges between 10 to 50℃

The activity at 30℃ was assumed as 100.

즉 30℃ 부근에서 가장 높은 活性을 나타내었다.

3) pH 安定性

本 酵素의 pH에 대한 安定性을 調査하기 위하여 1N HCl과 1N KOH로 pH를 조절한 후 30℃에서 4時間 前處理하였다. pH를 다시 中性부근으로 재조절하여 反應시켜본 結果 Fig. 6과 같이 pH 4.0~6.5에서 比較的 安定하였다.

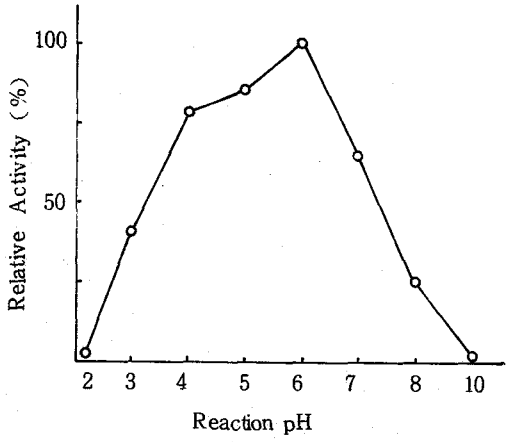

Fig. 6. pH Stability of the Enzyme

The enzyme sample was pretreated for 4 hrs. at 30 ℃ at various pH,s. The produced activities were measured under the standard assay conditions described in the text.

The stable pH range of the enzyme was between pH4.0 to 6.5.

4) 熱에 對한 安定性

本 酵素의 熱에 對한 安定性을 調査하기 위하여 10~60 ℃에서 60分間 전처리 한 다음 最適條件으로 反應시켜 活性度를 測定해 본 結果 Fig. 7과 같이 40 ℃까지는 거의 安定하였고, 45 ℃ 以上의 溫度에서는 급격히 失活되었다.

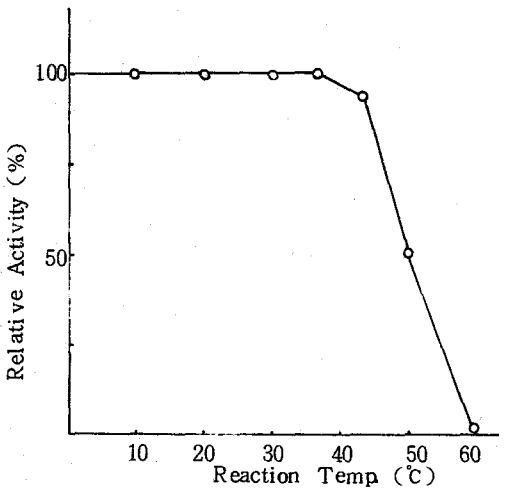

Fig. 7. Thermal Stability of the Enzyme

The enzyme sample was pretreated for 1 hr at 10, 20 to 60 ℃.

The produced activities were measured under the standard assay conditions described in the text.

The enzyme was stable at 40 ℃.

3. 大豆發芽 중 各部位別 窒酸還元酵素의 活性變化

發芽過程 중 各部位別 酵素活性을 調査해 본 結果 그 變化는 Fig. 8과 같다.

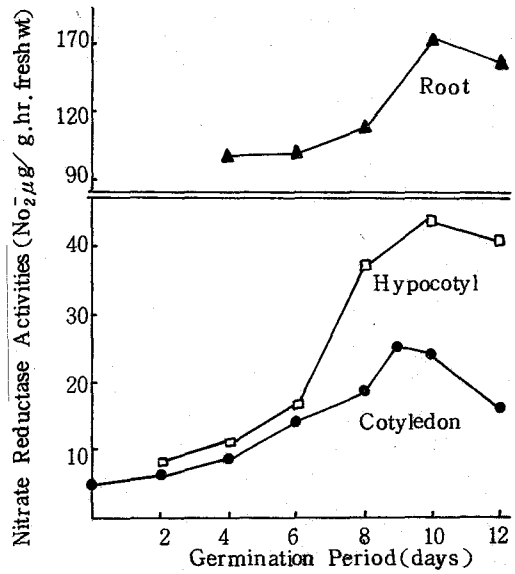

Fig. 8. Changes of Nitrate Reductase Activity during Soybean Germination.

各 部位 모두 거의 類似한 傾向을 보였으며, root, hypocotyl, cotyledon의 順으로 높게 나타났다. cotyledon은 水浸 후 충분한 水分의 吸收로 體內代謝가 활발하여 發芽2日부터 酵素活性이 增加하였으며, 8日까지는 거의 같은 傾向으로 增加하다가 9日을 peak로 하여 그 以後는 급격한 減少를 나타내었다.

hypocotyl 部分은 發芽前半期에는 cotyledon 과 비슷한 活性을 보였으나 發芽6日 以後에는 급격한 活性의 增加를 나타내었고, 8일부터 12일까지는 큰 變化가 없이 活性이 維持되었다. 또한, root 部分은 상당히 높은 活性으로 發芽 10日을 peak로하여 그 以後에는 약간의 減少를 나타내었다. 卽 發芽前半期에서는 cotyledon 및 hypocotyl 다같이 활발하

게 代謝率이 增加하나 後半期에 이러서는 cotyledon 部分은 점차 減退되는 反面, seedling部分은 계속 代謝가 旺盛함을 엿볼 수 있다. 이는 Campbell[17] Radin[18] 등의 soybean에 대한 invitro 實驗結果와 一致하며, 發芽前半期에서는 peak를 나타내지 않고 發芽 10 日頃에 最大의 活性을 보이고 있다.

4. 窒酸鹽 含量과 窒酸還元酵素의 活性

Soybean 發芽中 窒酸鹽의 含量變化와 窒酸還元酵素의 活性을 比較實驗한 結果는 Fig. 9와 같다. 各部位別 窒酸鹽의 含量은 酵素活性과 마찬가지로 root, hypocotyl, cotyledon의 順으로 높게 나타났으며, cotyledon 및 hypocotyl은 發芽 3 ~ 5 日과 7 日 以後에 있어서 窒酸鹽 含量과 酵素活性間에 어느 정도의 相關關係를 볼 수 있으며, 發芽中半期에는 같은 增加의 傾向을 보이고 있다.

한편 root 部分은 酵素活性과 窒酸鹽의 含量이 比較的 높게 나타났으며, 幼根이 發生하는 發芽 4 日에서 7 日까지는 酵素活性과 窒酸鹽 含量間의 相關性이 보여지나 그 以後에는 다같이 增加하였다.

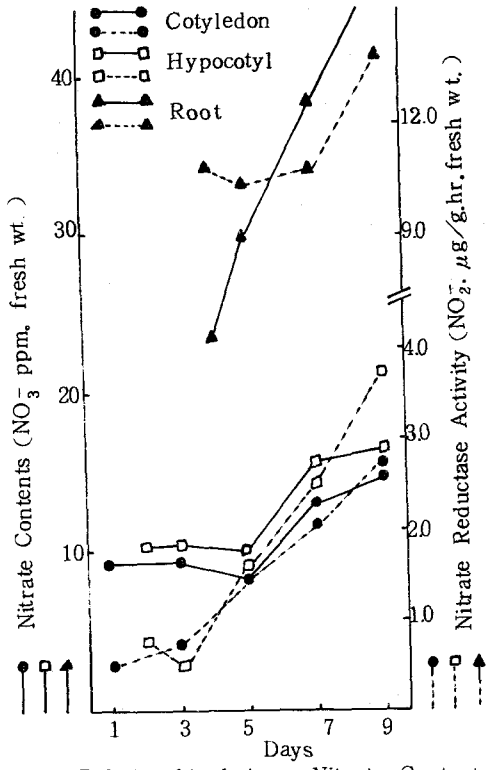

Fig. 9. Relationship between Nitrate Contents and Nitrate Reductase Activity in Soybean Germination

이 結果는 Hata 等[19]의 報告와 類似한 것 같으며, 特히 本 酵素는 induced enzyme으로 알려져 있으므로 植物體內에 窒酸鹽의 含量이 어느 정도 높아지면 酵素는 nitrate에 의해 induction되므로 그 活性이 커지는 것으로 思料된다.

5. 亞窒酸鹽 含量과 窒酸還元酵素의 活性

大豆發芽過程에 있어서 亞窒酸鹽의 含量變化와 酵素活性을 比較 實驗해 본 結果는 Fig. 10과 같다.

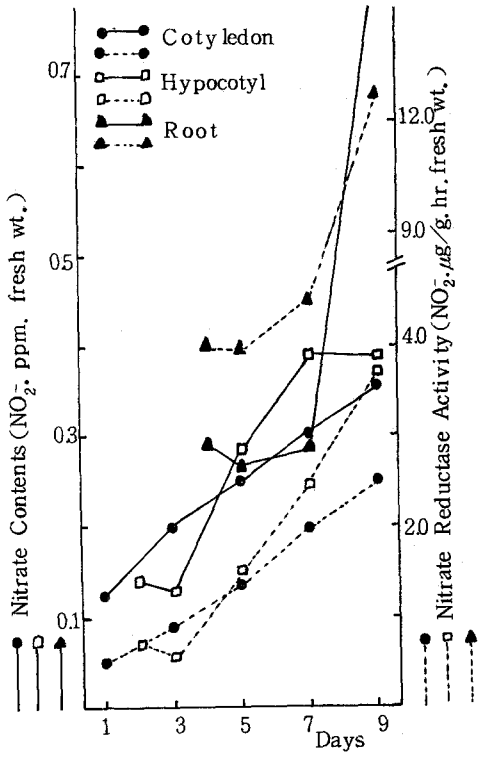

Fig. 10. Relationship between Nitrite Content and Nitrate Reductase Activity in Soybean Germination

Cotyledon 및 hypocotyl 部分의 亞窒酸鹽 含量과 酵素活性은 다같이 增加하였으며, root 部分에 있어서도 같은 傾向을 나타내고 있어 이들의 相互變化에 약간의 連關性을 볼 수 있었다.

以上과 같은 事實은 植物體內의 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽의 還元反應은 相互 밀접한 관계가 있어서 항상 balance를 維持하나 草種, 環境條件등에 따라 多少 달라질 수도 있다는 報告[7,20]와도 有關한 것으로 생각되며, 또한 이에 關與하는 酵素의 作用이 상당한 影響을 주리라 思料된다.

Ⅳ. 要　約

大豆發芽 중 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽의 含量變化와 窒酸還元酵素 活性과의 相關關係를 檢討할 目的으로 大豆를 發芽시켜 成長期間中 各 部位別 이들의 含量과 酵素活性을 測定해 본 結果는 다음과 같다.

1. 大豆發芽中 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽의 含量은 점차 增加하는 傾向이었으며, 窒酸鹽의 含量은 꽤 높았으나 亞窒酸鹽의 含量은 아주 낮았다.

2. 本酵素의 反應最適條件은 pH 6.5, 溫度 30℃였으며, pH 4.0~6.5 부근과 45℃ 以下의 溫度에 對하여 比較的 酵素의 安定性을 보였다.

3. 大豆發芽 過程中 各部位別 窒酸還元酵素의 活性變化는 거의 類似한 傾向으로 root, hypocotyl, cotyledon 의 順으로 높게 나타났으며, hypocotyl과 root 部位는 發芽 10 日에, cotyledon 部位는 9日頃에 最大活性을 보이면서 점차 減少하였다.

4. 窒酸鹽 含量變化와 酵素活性과의 相關關係는 cotyledon 및 hypocotyl 에서는 發芽 3~5 日과 7日 以後에, root 部分은 發芽 4~7 日에 어느정도 나타났으며, 亞窒酸鹽 含量과 酵素活性과의 關係에서도 약간의 連關性이 보이는 듯 하였다.

參 考 文 獻

1) Leonard, B.: Nitrogen metabolism in plants, Edward Arnold, 1st ed., 19-25, 1976.
2) Setsuji Nishizawa, Setsuko Maruyama: Nitrate-reducing bacteria flora and its ability to reduce nitrate in human saliva, J. Food Hyg. Soc. Japan, 0(2), 106-114, 1979.
3) Evans, H.J. Nason, A.: Pyridine nucleotide-nitrate redutase from extracts of higher plants, Plant Physiol., 28, 233-254, 1953.
4) Nicholas, D.J.D., Nason, A.: Molybdenum and nitrate reductase. (II). Molybdenum as a constituent of nitrate reductase, J. Biol. Chem., 207, 353-360, 1954.
5) Hageman, R.H., Lowell Klepper: Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reductase in greeen leaves, Plant Physiol., 48, 580-590, 1971.
6) Frank, B. et al.: Plant Physiology, Wadworth Publishing company, 2nd ed., 192-205, 1976.
7) Kessler, E.: Nitrate assimilation by plants, Ann. Rev. Plant Physiol., 15, 57-72, 1964.
8) Setsuko Maruyama, Koichi Mura matsu: Reduction of nitrate with Bacillus coagulans in human saliva, J. Food Hyg. Soc. Japan, 17(1), 19-26, 1976.
9) 權重浩, 尹衡植 : 食品中의 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽에 關한 硏究 (1), 52, 大豆發芽過程中 窒酸鹽 및 亞窒酸鹽과 Ascorbic Acid 의 含量變化에 韓國營養食糧學會誌. 10(1) : 39 - 45, 1981.
10) Hoff, J.E., Wilcox, G.E.: Accumulation of nitrate in tomato fruit and its effect on detinning, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 95(1), 92-94, 1970.
11) 岡部昭二 : 野菜 および食品中の硝酸鹽をめぐって, 化學と生物, 15(6), 352~359, 1977.
12) Masanori Miyazaki, Schimzo Kunisato: Studies on the accumulation of nitrate in horticultural Products, J. of Japan. Soc. Food Sci. and Tech., 19(9), 429-437 1972.
13) Phillips, W.E.J.: Changes in the nitrate and nitrite contents of fresh and processed spinach during storage, J. Agr. Food Chem., 16(1), 88-91, 1968.
14) Akemi Hata, Kuniyasu Ogato: Nitrate and nitrite in Japanese radish and changes during growing, storage, and pickling process, J. of Japan. Soc. Food Sci. and Tech., 25(5), 280-286, 1978.
15) Motto Harada, Hajimu Ishiwata: Studies on in vivo formation of nitroso compound(I), J. Food Hyg. Soc. Japan, 16(1), 11-18, 1975.
16) Mulder, E.G., Boxma, R. et al.: The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissues, Plant and Soil, 10, 335-354, 1959.
17) Campbell, W.H., Benito, O.I.: Development of NAD(P)H: and NADH: nitrate reductase activity in soybean cotyledons, Plant Physiol., 65, 595-599, 1980.
18) Radin, J.W.: Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings, ibid, 53, 458-463, 1974.
19) Akemi Hata, Kazuo Chachin: Relationship between nitrate content and some enzymetic activities in spinach and squash during storage, J. of Japan. Soc. Food Sci. and Tech., 26(4), 180-187, 1979.
20) Hewitt, E.J.: Assimilatory nitrate-nitrite reduction, Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 73-100, 1975.