

맥아의 α -Amylase isozyme에 미치는 Red Light의 영향

김진구 · 신승렬 · 김광수 · 손태화*

영남대학교 식품영양학과

* 경북대학교 식품공학과

Effects of Red light on α -Amylase isozymes of the Germinated Barley (*Hordeum distichum* L.)

Jin-Gu Kim, Seung-Ryeul Shin, Kwang-Soo Kim, and Tae-Hwa Shon*

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyongsan, Korea*

* Department of Food Engineering, Kyungpook National University, Taegu, Korea

Abstract

This study carried out to change α -amylase activity and isozymes in barley during germination in the dark and red light. The specific activity of α -amylase increased during the germination in the dark, giving 355.0 and 523.7 units/mg protein at 3 and 5 days, and the activity was increased by the red light up to 48 and 15% at 3 and 5 days of germination, respectively. The ratio of α -amylase I and II was approximately 95 : 5 at both 3 and 5 days of germination in the dark while the different ratio was found by the red light i.e. 60 : 40 and 90 : 10 at 3 and 5 days of germination, respectively.

서 론

맥아의 amylase는 활성이 높아 포도당, dextrin, alcohol 등의 제조, 제빵, 의약품 등에 이용되고 있다.¹⁾

Okamoto와 Akazawa²⁾는 발아 초기단계에서는 α -amylase가 거의 상피세포에서 생합성되고 후기에는 호분층에 우세하다고 하였으며, 四方治五郎^{3,4)}는 α -amylase 합성에 영향을 주는 미지의 활성 인자가 gibberellic acid(GA)임을 밝혔다. Varner⁵⁾와 Gregory⁶⁾는 보리의 무배아 종자에 GA를 처리하였을 때 α -amylase가 호분층에서 de novo 합성된다고 하였으며, Chrispeels과 Varner⁷⁾는 α -amylase 합성에는 GA가 필수적이라고 보고하였다.

Reid와 Clements⁸⁾는 종자 발아시 적색광을 조사하였을 때 GA 합성이 증가한다고 하였으며, Be-

weley 등⁹⁾은 적색광의 조사로 인해 광수용체인 phytochrome이 비활성형인 Pr 형에서 활성형인 Pfr로 전환되는 과정에서 GA 유사물이 증가한다고 보고하였다. 또한 Loveys와 Wareing¹⁰⁾은 밀의 유엽에 존재하는 비활성형 GA는 적색광조사에 의해 활성형 GA로 전환된다고 하였다.

이상의 결과를 고려하여 본 연구자들은 보리 발아시 적색광을 조사하여 α -amylase의 활성과 isozyme에 대한 적색광의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

실험용 보리는 1985년 경남 진주에서 재배 수확한 이조대맥(*Hordeum distichum* L. emend Lamark)을 사용하였으며, 수분함량이 14~15% 정도 되게 건조시켜 저장하면서 사용시 증량법으로 선별·사용하였다.

1988년 9월 2일 수리

Corresponding Author: T.H. Shon

2. 실험방법

1) 발아 및 광처리

이조대맥의 발아조건 및 광처리는 김 등¹¹⁾이 행한 방법에 준하였다. 즉 선별한 시료를 수은 15°C에서 60시간동안 매 6시간 마다 환수하면서 칩맥한 다음 plastic pot (400cm²×5cm)에 여지를 깔고 50g씩 넣어 상대습도 80%, 온도 17°C의 정온실에서 발아시켰다. 적색광 처리는 광원으로 형광등과 백열등을 사용하여 적색광 Filter, Rohm and Haas Plexiglas # 2423을 사용하였다. 이 때 광도는 100 lux, 조사시간은 1일 3시간 조사하여 암소와 비교하였다.

2) α-Amylase의 추출

효소추출은 MacGregor 등¹²⁾의 방법에 따라 행하였다. 즉 맥아 100g에 1mM CaCl₂와 1mM thioglycerol을 함유한 0.02M 초산나트륨 완충액(pH 4.8) 150ml를 가하여 10분간 균질화 시켜 miracloth로 여과하였다. 여과액은 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상정액을 활성화시킨 cellulose dialysis tube (through MW cut off 2000)로 동일 완충액내에서 48시간 투석하였다. 투석액을 다시 20,000×g에서 15분간 원심분리시켜, 그 상정액을 조효소액으로 하였다. 효소의 모든 추출조작은 저온(4°C)에서 행하였다.

3) α-Amylase 활성도 측정

α-Amylase의 활성도 측정은 Van Onckelen 등의 방법¹³⁾에 준하여 측정하였다. 즉, 1% 가용성 전분용액 0.5ml와 효소추출에 사용한 초산나트륨 완충액 0.3ml 혼합액을 50°C에서 5분간 안정시킨 후 희석효소액 0.2ml를 가하여 3분간 반응시킨 다음 KI-I₂ 용액(KI 4g과 I₂ 0.25g을 증류수 1l에 녹인 용액) 1ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 효소반응액은 다시 증류수 5ml를 가하여 희석한 다음 550nm에서 흡광도를 측정하였다. α-amylase

의 활성 측정시 β-amylase의 영향을 제거하기 위하여 기질용액에 β-amylase의 저해제인 p-chloro mercuribenzoic acid를 1mM이 되게 첨가하였다. 그리고 α-amylase의 활성도는 50°C에서 3분동안 가용성전분 1mg을 분해하는 효소활성을 1 unit로 하였다.

4) α-Amylase의 분리·정제

효소의 정제는 조효소액 5ml를 0.02M NaCl을 함유한 초산나트륨 완충액(pH 4.8)으로 평형시킨 다음 CM-cellulose column (2×55cm)에 주입하여 그 chamber system으로 용출시켰다. 용출은 0.02~0.8M NaCl concave gradient로 하였으며, 제 1 chamber, 제 2 chamber의 용량은 각각 300ml, 150ml로 하였다. 이때 유속은 0.35ml/min, 20분간격으로 분획하였다. 분획된 효소의 각 분획물을 함께 모아서 Amicon Diaflo system으로 PM-10 membrane filter를 사용하여 N₂ gas 하에서 농축하였다.

농축한 효소액 10ml를 Sephacryl S-200 column (2.6×65cm)에 주입하여 유속 0.35ml/min, 분획간격 20분, 0.02M 초산나트륨 완충액(pH 4.8)으로 분획하였다.

5) 단백질 함량측정

단백질 함량은 Lowry 등¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하였으며, 단백질의 표준품은 Sigma 제 단백질표준용액을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. α-Amylase 활성에 미치는 적색광의 영향

Amylase는 맥주 등 주류공업과 전분당화공업에 이용도가 매우 넓으며, 특히 amylase 원으로서 맥아는 맥주제조에 있어서 품질개선的重要因素인 이 되고 있다.

Table 1은 적색광조사에 따른 α-amylase의 활

Table 1. Changes in α-amylase activity of barley during germination in the dark and red light

Treatments	Germination period (days)	Crude enzyme activity* (units)	Protein content (mg)	Specific activity (units/mg)
Dark	3	711.0	2.0	355.0
	5	1,152.1	2.2	523.7
Red Light	3	856.4	1.7	503.8
	5	1,203.7	2.0	601.9

* units/g malt-fresh weight

정변화를 나타낸 결과이다. 발아일수별 α -amylase의 활성변화는 암소구에서 발아 3일과 5일에 각각 711.0, 1,152.1 units, 적색광조사시에는 856.4, 1,203.7 units로 암소구에 비해 적색광처리구에서 활성이 현저히 높았으며, 발아일수가 경과함에 따라 활성이 다같이 증가하였다. 이는 김 등¹¹⁾의 보고와 유사한 경향이였다. α -Amylase는 대맥에서는 검출되지 않고 발아중에 호분층에서 de novo 합성되며 특히 GA가 α -amylase mRNA의 생합성을 유도한다는 보고¹⁵⁾가 있으며, 종자 발아시 적색광을 조사하였을 때 GA의 함량증가에 대한 다수의 보고^{8,9,16)}가 있다. 이러한 연구 결과와 본 실험에서의 적색광에 의한 α -amylase 활성증가는 적색광조사에 의하여 비활성형인 phytochrome Pr 형이 활성형인 Pfr 형으로 전환됨으로써 GA의 합성이 촉진되고 그 결과 α -amylase의 활성이 증가되는 것으로 사료된다.

2. α -Amylase의 분리·정제

적색광조사가 α -amylase isozyme에 미치는 영향을 검토하기 위하여 CM-cellulose를 이용한 ionexchange column chromatography로 α -amylase를 분리한 결과는 Fig. 1과 같다. 암소와 적색

광조사구 다 같이 fraction No. 24~46에서 α -amylase가 분획되었으며, 암소에서는 1개의 peak 적색광조사구에서는 2개의 peak로 분리되었다.

Fig. 2는 CM-cellulose로 분획한 α -amylase의 활성분을 PM-10 membrane filter를 사용하여 Amicon Diaflo System으로 농축한 다음 Sephacryl S-200을 사용하여 분획한 결과이다. α -Amylase 활성은 fraction No. 46~50과 51~54에서 2개의 peak로 나타났다. Koshiba와 Minamikawa¹⁷⁾는 *Vigna mungo* 종자에서 3개의 α -amylase isozyme을, Tkachuk와 Kruger¹⁸⁾는 밀에서 4개의 isozyme을 분리하였고, Momotani와 Kato¹⁹⁾는 무배아 보리에 GA를 처리하였을 때 3개의 isozyme이 존재한다고 하였고 Palmer와 Bathgate²⁰⁾는 맥아의 α -amylase 활성과 isozyme의 수는 수확시기 저장상태 및 발아조건 등도 깊은 관계가 있다고 하였다.

본 실험에 있어서 조효소액으로부터 CM-cellulose와 Sephacryl S-200에 의한 gel filtration 법으로 α -amylase를 분리·정제한 결과는 Table 3과 같다. 비활성도는 조효소에서 526.0 units/mg·protein이었으며, CM-cellulose에서 3,009.2units/mg·protein, Sephacryl S-200에서 α -amylase I 이

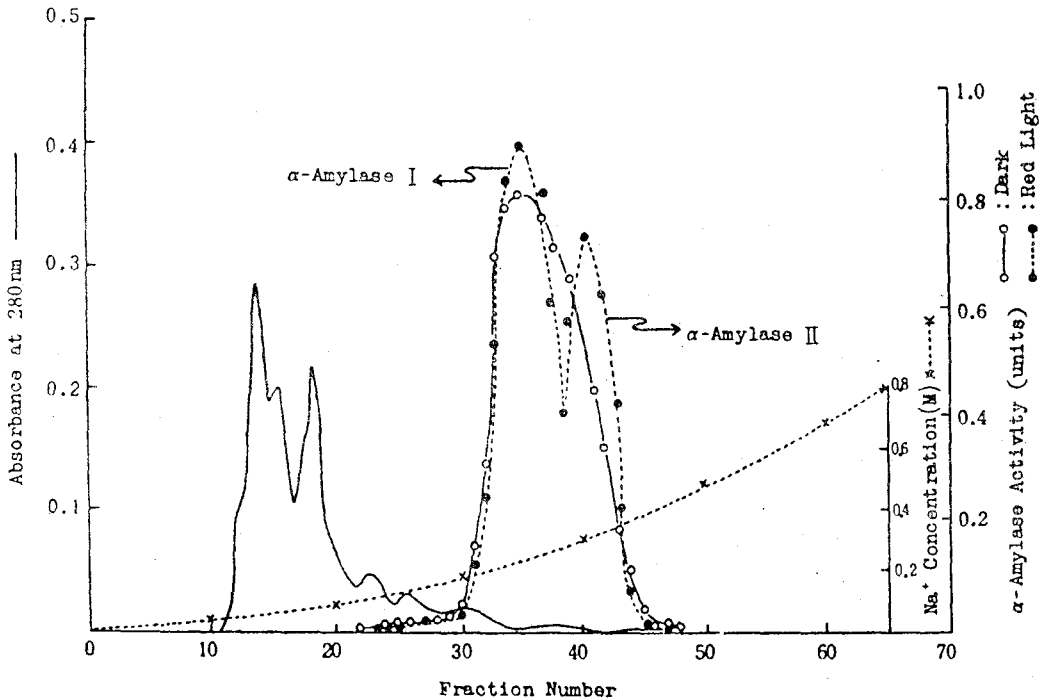


Fig. 1. Chromatogram of α -amylase of barley germinated for 5 days in the dark and red light on CM-cellulose column

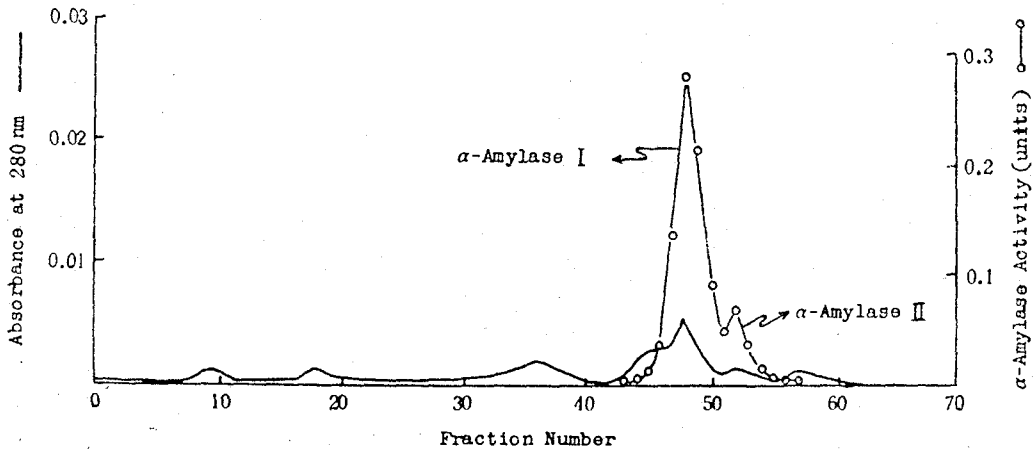


Fig. 2. Chromatogram of α -amylase of barley germinated for 5 days in the dark on Sephacryl S-200 column

Table 2. Purification of α -amylase of barley germinated for 5 days

Purification steps	Total activity (units)	Protein content (mg)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude Extract	5,760.5	10.95	526.0	100.0	1.0
CM cellulose	3,661.0	1.20	3,009.2	62.7	5.7
Sephacryl S-200					
{ α -Amylase I	1,118.8	0.04	27,970.0	19.4	53.3
{ α -Amylase II	0.5	0.01	50.0		

27,970.0 units/mg·protein, α -amylase II가 50.0 units/mg·protein로 CM-cellulose와 Sephacryl S-200에서 각각 5.7배, 53.3배 경제되었고, 이때 회수율은 CM-cellulose와 Sephacryl S-200에서 각각 62.7%, 19.4%였다.

3. α -Amylase Isozyme 활성에 미치는 적색광의 영향

CM-cellulose와 Sephacryl S-200 chromatography로 분리한 α -amylase isozyme의 활성에 미치는 적색광의 영향은 Table 4와 같다. α -Amylase는 2종의 isozyme 중 α -amylase I이 주효소였고, 암소에서 발아 3일과 5일에 α -amylase I과 II의 활성비율이 각각 95.0 : 5.0, 95.6 : 4.4로 발아기간중 거의 변화가 없었다. 그러나 적색광 조사구에서는 발아 3일에 α -amylase I과 α -amylase II의 활성비율이 60.0 : 40.0으로 암소에 비하여 α -amylase II의 비율이 상대적으로 크게 증가하였으며, 발아 5일에는 90.2 : 9.8로 암소에 비하면 α -amylase II의 상대적 활성비율은 오히려 적색광 조사구의 발아 3일보다는 낮았다. 이러

Table 3. Ratio of purified α -amylase I and II activities of barley during germination in the dark and red light

	Dark germination		Red Light germination	
	3 days	5 days	3 days	5 days
α -Amylase I	95.0	95.6	60.0	90.2
α -Amylase II	5.0	4.4	40.0	9.8

한 결과는 Table 1의 α -amylase 활성도에 미치는 적색광의 조사 효과보다 구체적으로 설명할 수 있겠다. 보리무배아 종자에 GA_3 를 처리하였을 때 발아일수에 따라 3종의 isozyme의 발현시기가 다르고, 각 isozyme의 활성에 특이적으로 작용한다는 보고¹⁹⁾와 관련지워 볼 때 α -amylase II가 적색광조사에 의해 선택적으로 활성이 유도된 것으로 생각된다.

추 록

이조대맥(Hordeum distichum L. emend Lam-

ark)에 적색광을 조사하여 발아일수에 따른 α -amylase의 활성 및 isozymes에 미치는 적색광의 영향을 조사하였다.

α -Amylase는 암소에서 비활성도가 발아 3일과 5일에 각각 355.0, 523.7 units/mg·protein로 발아일수가 경과함에 따라 증가하였으며, 적색광조사에 의해서 비활성도가 발아 3일과 5일에 각각 암소에 비하여 48%, 15% 정도 증가하였다.

CM-cellulose와 Sephacryl S-200에 의해 2종의 isozyme이 분리되었고 그 중 α -amylase I이 주효소였다. α -Amylase I, II의 활성비율은 암소에서 발아 3일과 5일에 다 같이 95 : 5 정도였으나 적색광조사구에서는 각각 60 : 40, 90 : 10으로 현저한 차이가 있었다. 특히 적색광조사에 의해서 발아 3일에 α -amylase II의 활성비율이 현저히 높았다.

참 고 문 헌

1. 小騎道雄 : α -Amylase, 酵素利用ヘンドブック, p.52, 地人書館(1982)
2. Okamoto, K. and Akazawa, T.: Plant Physiol., 63 : 336(1969)
3. 四方治五郎 : 醸協誌, 18 : 494(1960)
4. 四方治五郎 : 醸協誌, 18 : 600(1960)
5. Varner, J.E.: Plant Physiol., 39 : 413(1964)
6. Gregory, C.G.: Carlsberg Res. Commun., 45 : 177(1980)
7. Chrispeels, M.J. and Varner, J.E.: Plant Physiol., 42 : 1008(1967)
8. Reid, D.M. and Clements, J.B.: Nature, 217 : 580(1968)
9. Bewley, J.D., Black, M. and Negbi, M.: Nature, 215 : 648(1967)
10. Loveys, B.R. and Wareing, P.F.: Planta, 98 : 109(1971)
11. 김진구, 김순동, 김광수 : 한국식품과학회지, 17(4) : 237(1985)
12. MacGregor, A.W., Laberge, D.E. and Meredith, W.O.S.: J. Inst. Brew., 48 : 490(1979)
13. Van Onckelen, H.A., Caubergs, R. and De Greef, J.A.: Plant and Cell Physiol., 18 : 1029(1977)
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
15. Muthukrishnan, S., Chandra, G.R. and Elizabeth, S.M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76(12) : 6181(1979)
16. Cooke, R.J. and Saunders D.F.: Planta, 123 : 399(1975)
17. Koshiba, T. and Minamikawa, T.: Plant and Cell Physiol., 22(6) : 979(1981)
18. Tkachuk, R. and Kruger, J.E.: Cereal Chem., 51 : 508(1974)
19. Momotani, Y. and Kato, J.: Plant Physiol., 41 : 1395(1966)
20. Palmer, G.H. and Bathgate, G.N.: Advances in cereal science and technology., ed. by Pomeranz, Y. Amer. Ass. Cereal Chem., Vol. 1., p.108(1980)