Kor. J. Food Hygiene 6(3, 4), 127-131(1991)

보리와 밀 맥아 Amylases의 반응속도론적 연구

김영휘 · 조정일*

조선대학교 병설공업전문대학 식품공업과

*고려대학교 농과대학 농화학과

Kinetic Studies on Amylases from Barley and Wheat Malt

Young-Hui Kim and Jung-Il Cho*

Department of Food Technolgy Technical Junior College, Chosun University, Kwang-Ju 501-759, Korea

**Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea*

ABSTRACT – **α-amylase and β-amylase were extracted from barley and wheat malt, respectively. Their kinetic parameters on gultinous and nonglutinous rice starch were examined. During the germination of barley and wheat, the increaments of ATP levels were significant after 2-day germination and the levels were reduced after 5 days. The dry weights were decreased after 3 days. The activities of amylases were the highest for 6 days in the barley and wheat malt. As for α-amylase, that the substrate affinity of barley malt on nonglutionous rice starch was greater than other cases. The V_{max} values of α-amylase from wheat malt on either type of rice starch showed high, and from barley malt on nonglutinous rice starch were high. The β-amylse from barley malt showed high substrate affinity on the glutinous rice starch, and V_{max} value of the enzyme from wheat malt on glutinous rice starch was higher than other. The substrate efficiency (V_{max}/K_m) of β-amylase on the nonglutinous rice strach was better than other cases.**

Keywords□Amylases, Enzymatic Kinetic, Malt, Substrate Efficiency

맥아에 있어서 저장 물질인 전분은 고분자성 물질이기 때문에 배아 성장의 에너지원이 되기 위해서는 효소에 의해 가용화, 저분자화 되어야 한다. 제맥(malting) 과정에서 보리 또는 밀은 온도, 수분 및 효소의 적당한 공급하에 배아가 배유부의 저장물질을 영양분으로 하여 성장하기 시작하면 곡립의 배에서 지베를린이라는 성장 호르몬이 방출되어 호분층을 자극하면 효소를 생합성 하게 된다.[1)]

초기 발아때에는 원래 함유되어 있던 가용성 전분 대부분이 호흡활성에 의해 이용되고, 이 이후의 에너지는 전분에 작용하는 효소활성에 의존하게 된다.[2)] 따라서 제맥 과정 중에는 첫째, 효소군의 생합성 또는 활성화를 촉진시키고 둘째, 세포벽을 용해하므로서 효소작용을 받기쉽게 하며 세째, 저장물질이 적당히 분해되어야 한다. 효소군 가운데 α-amylase는 발아함에 따라 생합성 되고, β-amylase는 단백질과 결합한 상태로 존재하는데 발아 중에 단백분해효소의 작용을 받아 유리되므로 활성화 된다.

맥아의 대표적 효소인 α-amylase(1, 4-α-D-Glucan glucanohydrolase, E.C 3.2.1.1)는 액화효소로서 전분을 무작위적으로 분해하는 endo형 효소이며 전분용액의 점도를 급격히 감소시킨다. 식물에 있어서 α-amylase의 역할은 곡립이 발아되는 동안에 전분을 환원당으로 변화시켜 준다. 그리고 β-amylase(1, 4-α-D-Glucan maltohydrolase, E.C 3.2.1.2)는 당화효소로서 전분의 α-1, 4-glycoside 결합을 비환원성 말단으로부터 maltose단위로 순차적으로 분해하는

Received for publication 15 October, 1991
Reprint request: Dr. J.I. Cho at above address

exo형 효소이다.[1] 이들 효소는 주로 대맥, 고구마, 발아되지 않은 보리, 콩 등의 식물계에 존재하며, *Bacillus amylosolvens*,[3] *Bacillus sterothermophilus* 등[4]의 미생물 효소에 대해 보고 되고있다. 특히 맥아를 이용한 전통음료 제조시 가장 중요한 효소중의 하나인 amylases의 전분기질에 따른 반응속도론적 고찰은 비교적 적은 실정이다. 따라서 합리적이고 위생적인 전통음료 제조방법의 확립을 위한 기초단계로서 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 α-amylase와 β-amylase의 효소원으로서 보리와 밀의 맥아를 이용하여, 맥아 발아시의 건조중량과 ATP를 정량하였으며, 맥아발아시 α-amylase 및 β-amylase를 추출하여 효소활성을 측정하였다. 찹쌀과 멥쌀 전분 기질에 대한 이들 효소의 K_m, V_{max}값을 측정하였으며, 이를 이용하여 기질 효율성을 계산하였다.

재료 및 방법

재료－맥아 제조용 보리(강보리)와 밀(조광)은 1989년 농촌 진흥청(수원)에서 분양 받았으며, 전분 제조용 찹쌀과 멥쌀은 시장에서 구입하였다.

맥아 및 전분 제조－보리와 밀의 발아는 Palmiano 등[5]의 방법에 따라 1% NaOCl 수용액에 20분 동안 침지, 멸균 증류수로 충분히 세척하고 멸균 증류수 5 ml로 적신 여과지에 곡립을 놓고 30℃ 암소에서 발아시켰으며 Dubois[6]의 방법에 따라 알칼리 침지법으로 전분을 제조하였다.

흡수율과 발아율 측정－흡수율은 24시간 침지시킨 후, 발아율은 발아 3일째의 맥아로부터 아래의 수식으로부터 계산하였다.

$$\text{흡수율}(\%) = \frac{\text{24시간 침지 후 중량} - \text{시료의 중량}}{\text{시료의 중량}} \times 100$$

$$\text{발아율}(\%) = \frac{\text{발아 개체수}}{\text{총 개체수}} \times 100$$

건조중량 변화 측정－앞서 제조한 맥아를 날짜별로 건조중량을 측정하여 배젖(endosperm)에 있는 전분의 소실정도를 측정하였다.

맥아로부터 amylases의 추출－α-Amylase, β-amylase의 추출은 Palmiano 등[5]의 방법에 의해 추출하였다. α-amylase는 보리와 밀의 맥아에 0.2 M acetate buffer(pH 5.5)를 가하고, 분쇄기로 마쇄(20,000 rpm, 3 min)하여 원심분리(12,000 rpm, 30 min, 4℃)한 후 상징액을 70℃ 수조에서 15분 처리한 후 원심분리하여 여과(Whatman No. 4)하여 α-amylase의 조효소액으로 사용하였다. β-Amylase는 맥아를 0.01 M thioglycerol이 함유된 0.05 M citrate phosphate buffer(pH 3.0)를 가한 후 마쇄(20,000 rpm, 3 min)하여 원심분리(12,000 rpm, 30 min, 4℃)한 후 상징액을 0℃에서 15분 처리하고 여과하여 조효소액으로 사용하였다.

ATP 정량－맥아를 0℃에서 4시간 동안 0.4 N $HClO_4$에서 침지시킨 후 분쇄기로 3분동안 마쇄하여 원심분리(12,000 rpm, 30 min, 4℃)한 후 상징액을 KOH로서 pH 6.0으로 중화시켜 Whatman No. 1으로 여과하여 상징액의 ATP를 정량하였다. ATP 정량 분석은 phosphoglycerate kinase와 glyceraldehyde phosphate dehydrogenase system를 이용한 Sigma Co.(U.S.A) assay kit를 이용하였다.

α-Amylase 활성 측정－α-Amylase의 활성은 Baun 등[7]의 방법을 일부 변경하여 측정하였다. 0.01 M $CaCl_2$가 포함된 0.2 M acetate buffer(pH 4.8) 100 ml에 가용성 전분 2g을 녹인 용액 1 ml에 적당히 희석한 효소액 1 ml을 혼합하여 30℃에서 반응시키면서 5분 간격으로 반응액 0.5 ml을 취한 후 요오드 용액 1 ml을 가하여 반응을 중지시켰다. 요오드 용액[8]은 요오드액(16g KI+600 mg I_2/ml D. W) 1 ml을 0.05 N 염산용액 100 ml에 첨가하여 사용하였다. 반응을 중지시킨 후 증류수 5 ml을 첨가하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

α-Amylase의 활성은 다음식으로부터 산출하였다.

$$\text{α-Amylase 활성} = (\log E_1 - \log E_2)/(t_2 - t_1)$$

E_1=t_1일 때의 흡광도
E_2=t_2일 때의 흡광도
t_1=처음 반응 시간(분)
t_2=나중 반응 시간(분)

β-Amylase의 활성 측정－β-Amylase의 활성은 Banu 등[7]의 방법으로 측정하였다. 적당히 희석한

Table 1. The rate of imbibition and germination on barley and wheat

Rate Classification	Imbibition rate (%)	Germination rate (%)
Barely	47.1	87.2
Wheat	39.7	85.4

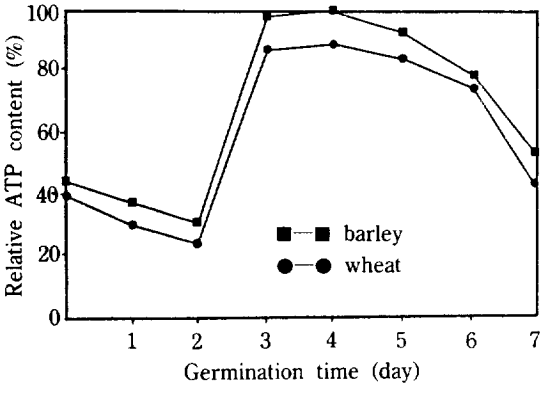

Fig. 1. Change of ATP content in germinating barley and wheat.

효소용액 0.5 m*l*을 0.016 m*l* acetate buffer(pH 4.8) 100 m*l*에 가용성 전분 1g을 용해하여 만든 전분용액 0.5 m*l*과 혼합하여 20℃에서 3분간 반응시킨 후 Miller 등[9]의 방법에 따라 Dinitrosalicylic acid(DNS) 용액 3 m*l*을 넣고 15분 끓여 발색시킨 후 당생성의 정도를 640 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 환원당의 양을 말토오스로 환산하였고 1분동안 1 μg의 말토오스를 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다.

K_m과 V_{max}측정—보리와 밀 맥아의 α-amylase와 β-amylase의 찹쌀과 멥쌀전분에 대한 K_m, V_{max}는 Lineweaver-Burk ploting 방법에 따라 결정하였다. 기질효율성은 K_m과 V_{max}값을 이용하여 다음식으로부터 계산하였다.[10]

$$\text{기질 효율성} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

결과 및 고찰

흡수율과 발아율 측정—보리와 밀의 맥아제조시 흡수율과 발아율을 측정한 결과 Table 1에서 보듯이 보리가 밀에 비해 발아율과 흡수율이 높게 나타내었다.

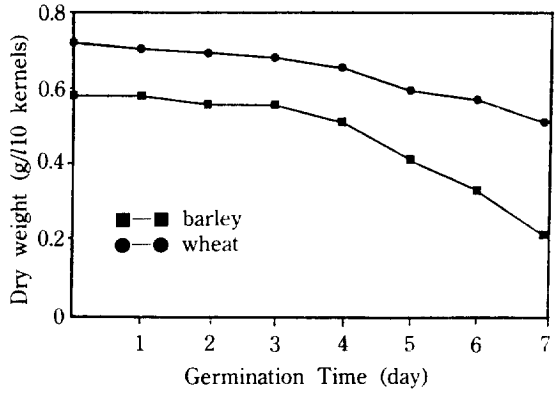

Fig. 2. Change of dry weight in germinating barley and wheat.

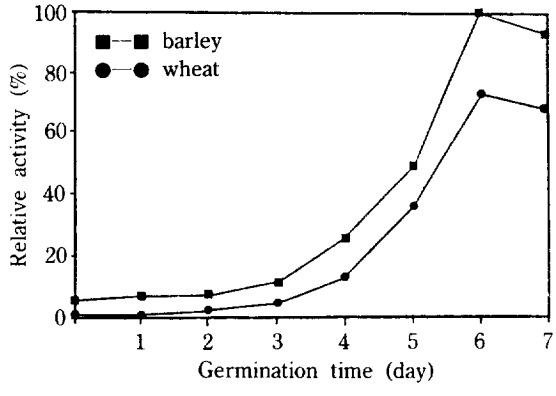

Fig. 3. α-amylases activities of barley and wheat during germination.

맥아의 발아 시간에 따른 ATP와 건조 중량의 변화—맥아 제조시 발아 시간에 따른 ATP의 농도 변화는 Fig. 1에서 보듯이 발아 후 3~4일에서 최대로 나타났다. 맥아 발아시의 건조 중량은 침지 후 2일 동안 거의 변화가 없었으며, 3일 경과 후 감소를 나타냈다(Fig. 2). 이러한 현상은 맥아 발아시 저장전분의 가용성당이 호흡작용에 의해 분해되어 성장에너지인 ATP형태로 변화되면서 효소의 생합성을 유도하는 것으로 보인다.

맥아발아시의 amylase 활성 변화—Fig. 3에서 보듯이 보리, 밀 맥아의 α-amylase의 활성은 발아 후 4일 경과 후에 급격한 활성증가를 나타내었으며 6일 경과 후 최대의 활성을 나타내었다. β-amylase는 미발아 종자에도 활성을 갖고 있었으며 침지 후

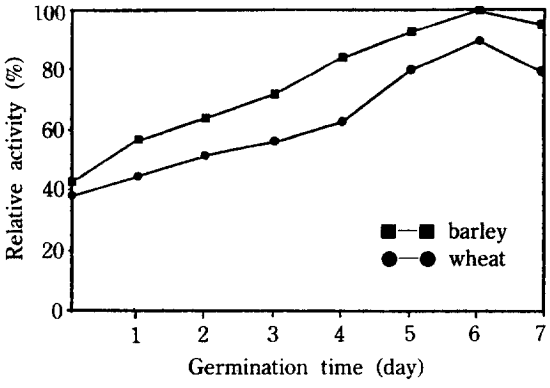

Fig. 4. β-amylases activities of barley and wheat during germination.

Table 2. Michaelis constants and maximum rates values for α-amylase and β-amylase of barley and wheat malt on glutinous and nonglutious rice starch

Source of enzyme	Source of starch	α-amylase		β-amylase	
		K_m (%)	V_{max} (units)	K_m (%)	V_{max} (units)
Barley malt	glutinous rice	61	63	113	124
	nonglutinous rice	55	52	90	95
Wheat malt	glutinous rice	76	63	213	155
	nonglutinous rice	80	63	167	138

서서히 활성증가를 보였으며 6일 경과 후 최대 활성을 나타내었다(Fig. 4). 보리 맥아와 밀 맥아의 amylase 활성을 비교해 볼 때 보리 맥아에서 활성이 높게 나타났다.

반응속도론적 특성－보리 맥아와 밀 맥아의 α-amylase 및 β-amylase에 대한 찹쌀 전분과 멥쌀 전분의 K_m, V_{max}값을 측정하였으며, 이를 이용하여 기질효율성(V_{max}/K_m)를 구하였다.

Table 3. Substrate efficiency of α-amylase and β-amylase on nonglutinous and glutinous rice starch

Source of starch	α-amylase		β-amylase	
	Barley malt	Wheat malt	Barley malt	Wheat malt
Nonglutinous rice	0.94	0.78	1.05	0.82
Glutinous rice	1.03	0.82	1.09	0.72

1) α-Amylase와 β-amylase의 K_m, V_{max}측정 : 보리 맥아와 밀 맥아에서 추출한 α-amylase의 찹쌀 전분과 멥쌀 전분에 대한 K_m, V_{max}값을 측정한 결과, Table 2에서 보듯이 보리 맥아로부터 추출한 α-amylase가 멥쌀 전분에 대한 친화력이 가장 높았다. V_{max}는 밀 맥아에서 추출한 α-amylase는 두 가지 전분에서 같게 나타났으며, 보리 맥아의 α-amylase는 찹쌀 전분 보다 멥쌀 전분에서 높게 나타났다. β-amylase의 경우는 보리 맥아로부터 추출한 β-amylase가 멥쌀 전분에 대한 친화력이 가장 높았으며, V_{max}는 밀 맥아 β-amylase가 찹쌀 전분에 대해 가장 높았다.

2) 기질 효율성(Substrate efficiency) : 앞서 측정한 α-amylase와 β-amylase의 두 가지 전분기질에 대한 K_m과 V_{max}값을 이용하여 기질 효율성(V_{max}/K_m)을 계산하였다. Table 3에서 보듯이 보리 맥아의 α-amylase 및 β-amylase가 찹쌀 전분보다 멥쌀 전분을 기질로 하였을 때 반응이 쉽게 진행됨을 알 수 있었다. 따라서 전통음료 제조시에 amylase 효소원으로서 보리, 기질로서 멥쌀을 이용하였을 때 가장 효율적임을 알 수 있었다.

국문요약

보리와 밀 맥아의 α-amylase와 β-amylase의 대한 찹쌀과 멥쌀 전분에 대한 반응속도론적 연구를 수행하였다. 보리와 밀의 발아 과정에서의 ATP 함량은 발아 2일 후에 급격하게 증가하여 5일 후에는 감소하였으며, 건조 중량은 3일 후부터 감소하였다. 보리맥아와 밀맥아의 α-amylase와 β-amylase 모두 6일째에 최대의 활성을 나타내었다. α-amylase의 경우, 보리 맥아에 존재하는 α-amylase가 멥쌀 전분에서 친화력이 크게 나타났으며, V_{max}값은 보리 맥아의 경우 멥쌀 전분에서 밀 맥아의 경우 멥쌀과 찹쌀 전분에서 높게 나타났다. β-amylase의 경우는 보리 맥아의 효소가 찹쌀 전분에 대해 친화력이 크게 나타났으며, V_{max}값은 밀 맥아의 효소가 찹쌀 전분에서 높게 나타났다. 또한 기질효율성은 보리 맥아에서 추출한 β-amylase가 멥쌀 전분에서 가장 우수하였다.

참고문헌

1. 大塚謙一 : 양조학, 養賢堂 p. 72 (1981).
2. Nomura, T., Kono, Y. and Akazawa, T.: Enzyme mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. *Plant Physiol.*, **44**, 765 (1969).
3. Upton, M.E. and Fogarty, W.M.: Production and purification of thermostable amylase and protease of thermomonospora viridis. *Appl. Environm. Microbiol.*, **33**, 59 (1977).
4. Tsukagoshi, N., Ihara, H., Yamagata, H. and Udata, S.: Cloning and expression of thermophilic α-amylases gene from *Bacillus stearothermophilus in E. coli. Mol. Gen. Genet.*, **193**, 58 (1984).
5. Palmiano, E.P. and Juliano, B.O.: Biochemical changes in the rice grain during germination. *Plant Physiol.*, **49**, 751 (1972).
6. Dubois, M.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
7. Baun, L.C., Pamiano, E.P., Perez, C.M. and Juliano, B.O.: Enzymes of starch metabolism in the developing rice grain. *Plant Physiol.*, **46**, 429 (1970).
8. Chrispeels, M.J. and Varner, J.E.: Gibberellic acid enhanced synthesis and release of α-amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, **42**, 398 (1967).
9. Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E. and Burton, A.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Biochem.*, **2**, 127 (1960).
10. Thomas, S.: Studies with GMP synthetase from *Ehrich ascites* cells. *J. Biol. Chem.*, **250**, 7372 (1975).