

韓國 在來種 콩集團에서 비린내 없는 콩品種 育成을 위한 Lipoxygenase 缺失因子 變異 研究

權臣漢* · 朴京淑** · 金美英** · 金鳳龍* · 宋禧燮***

Screening for Genotypes Lacking Lipoxygenase from Germplasm Collection of Korean Soybean Land Races

Shin Han Kwon*, Kyung Sook Park**, Mi Young Kim,
Bong Ryong Kim*, and Hi Sup Song***

ABSTRACT : Soybean seeds contain lipoxygenase, which is responsible for the objectionable beany flavors in soybean seeds. The isozymes of lipoxygenase (1×1, 1×2, 1×3) were discovered in United States of America, Japan, and Korea, and the mode of inheritance of the mutant genes was determined. This investigation was conducted to screen lipoxygenase-1, 2, and 3 lacking soybean lines from the Korean soybean land race population.

Two lipoxygenase-1 lacking lines, KAS 610-8 and KAS 621-8 were found in this investigation. In general, lipoxygenase lacking varieties were small in seed size and low in oil content. A severe pod borer damage was observed in the two selected lipoxygenase-1 lacking lines.

Lipoxygenase lacking line was not found in Korean wild soybean population used in this study and the lipoxygenase lacking lines were found only in Kyung-Nam province and the results imply that lipoxygenase lacking mutants were induced recently in cultivars.

Lipoxygenase (linoleate : oxygen oxidoreductase, EC 1. 13. 11. 12)는 植物系에 널리 分布하고 있으며 그 중에서도 大豆 種子에는 多量으로 含有되어 있어 種子의 全 蛋白質 含有量의 약 1%를 차지한다. 種子 내의 不飽化 脂肪酸과 cis-1, 4-pentadiene 구조를 갖는 多重 不飽化脂質의 hydroperoxidation을 觸媒하며 生成된 lipid hydroperoxide와 그 分解生物인 aldehyde,

epoxides, ketones 등은 大豆에서 콩비린내와 같은 不愉快한 맛과 냄새에 關여하는 것으로 보이며^{14,17)} 蛋白質, 아미노산과 lipid hydroperoxide-protein complex를 形成하여 蛋白質을 損傷시키고 食品에 lipid hydroperoxide가 많이 蓄積된 경우 分解과정에서 毒性效果를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁴⁾

大豆 및 大豆食品에서 lipoxygenase 작용을 不

* 경희대학교 농학과 (Dept. of Agron, Kyung-Hee Univ., Suwon 449-701, Korea)

** 성신여자대학교 생물학과 (Dept. of Biology, Sung-Shin Women's Univ., Seoul)

*** 한국 원자력 연구소 (Korea Atomic Energy Res. Inst., Seoul 302-353, Korea)

이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음

〈93. 1. 25 接受〉

活性化시키기 위하여 熱處理,¹¹⁾ 有機溶媒^{12,17)}나 水溶性 알콜에 의한 抽出³⁾ 등의 方法을 使用하고 있으나 加工費用이 더 들고 含有 蛋白質의 變性, 保水性이나 粘着성이 떨어져 加工食品으로서의 重要的 機能을 喪失할 수도 있고 또 完전한 脫臭도 어렵다는 缺點이 있다.

大豆種子에는 lipoxygenase-1 (L×1), lipoxygenase-2 (L×2), 그리고 lipoxygenase-3a, -3b(L×3a, L×3b)등 4개의 isozymes이 報告되었으며 L×3a와 L×3b는 아미노산 造成이 類似하여 하나의 isozyme L×3라고 한다¹⁾. Lipoxygenase isozyme은 3개의 다른 遺傳因子 產物로서 L×1, L×2 그리고 L×3의 分子量은 각각 94,038, 97,035, 96,541 daltons이며 amino acid residue는 각각 838, 865, 859로서 L×2의 아미노산 序列과의 類似정도가 L×1은 81%, L×3는 74%이며 L×1과 L×2는 PI도 5.79와 5.85로 아주 類似하다.^{15,16,18)} 이 3개의 isozyme의 null alleles가 發見되었고, 單純 劣性 遺傳子에 의해 支配된다고 報告된 바 있다.^{2,5,6,7,8)} 또한 二重 劣性 遺傳子型인 1×11×11×31×3를 Kitamura 등⁸⁾이 1×21×21×31×3를 갖는 大豆 品種을 Davies와 Nielsen²⁾이 각각 交配 育成하였다. Kitamura 등 (1985)⁹⁾은 L×1과 L×2의 遺傳子 좌위는 강한 聯關關係가 있는 반면 L×3는 다른 두 isozyme와는 獨立的으로 遺傳되어진다고 報告하였다.

Hildebrand와 Hymowitz (1982)⁶⁾는 seed lectin(Le), β -amylase (Sp₁), flower color (W₁)와 lipoxygenase의 遺傳子 좌위는 서로 獨立的으로 遺傳되어짐을 指摘하였다.

Lipoxygenase isozyme 중 L×1 缺乏 大豆 2系統(PI 133226, PI 408251)이 처음 發見된 것은 1980년 일리노이 大學에서였으며⁵⁾ 이 두 系統은 美農務省 保有 6,499 系統을 分析하여 얻었고 또 L×1 缺乏性은 單純 劣性因子에 의해 支配된다는 것을 報告하였다. L×3 缺乏 系統(PI 417458; Wasenatsu, PI 205085; lchigowase)은 日本의 Kitamura 등 (1983)⁸⁾에 의해 報告되었으며 그들은 약 5,000종을 分析하여 2系統을 發見하였으며 또 L×3 缺乏은 單純劣性因子 1×3에 起因한다는 것을 確認했다. 또한 Davies와 Nielsen(1986)²⁾에

의해서 L×2 缺乏 系統 PI 86023이 報告되었으며, Kwon과 Chang(1992)¹⁰⁾은 韓國 在來種 723 系統을 分析하여 2개의 L×3 缺乏 系統 (67, 217)을 發見하였음을 報告하였다.

우리나라는 大豆 栽培歷史가 매우 오래며 多様な 在來種이 蒐集保存되고 있으며, 또한 全國土에 多様な 野生種이 分布되어 있어 大豆 遺傳資源의 世界的 寶庫이다. 이와 같은 여건이 우리나라 在來種 集團에서 lipoxygenase 缺乏系統이 發見될 수 있는 可能性은 매우 높을 것으로 期待된다.

본 研究는 韓國 在來種과 野生種 大豆 系統 集團에서 大豆 加工食品과 콩나물 등에서 難點이 되고 있는 lipoxygenase isozyme의 缺乏 系統과 L×1과 L×2의 聯關關係가 깨어진 系統을 찾아 손쉽게 우리 장려품종에 L×1, L×2, L×3 因子를 함께 組合시킬 수 있는 育種 素材를 提供하려는데 그 目的이 있다.

材料 및 方法

1. 供試材料

본 研究에 使用된 材料는 慶熙大學校 産業大學 農學科 大豆遺傳資源 保存室에 保管되어 있는 中部以南에서 蒐集한 大豆 在來種(*Glycine max*) 1, 874系統과 野生種 63系統이며, Standard로 사용한 PI 408251, PI 133226, PI 86023, PI 417458, PI 205085는 美國 일리노이 大學附設 美農務省 大豆 遺傳資源 研究所에서 提供받았다.

2. Lipoxygenase 抽出 및 處理

30mg의 大豆에 2ml의 蒸溜水를 가하고 하룻밤 放置한 후 4°C에서 homogenization하여 3,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 上層液 10ul을 sample buffer(2% SDS, 10% sucrose, 2-mercaptoethanol, BPB를 含有한 0.06M Tris-HCl buffer)에 3배 稀釋한 다음 100°C에서 5분간 加熱 冷却시킨 후 使用하였다.

3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Lipoxygenase isozyme 分析은 gel buffer

Tris-HCl-SDS로 7% SDS-polyacrylamide-gel과 electrode buffer는 Tris-glycine-SDS로 室温에서 3시간 電氣泳動하였다.^{7,8)} 泳動 후 0.3% Comassie Brilliant Blue R-250으로 染色하여 檢出하였다.

結果 및 考察

韓國 在來種 大豆 1,874系統과 野生種 大豆 90系統을 SDS-PAGE로 調査한 結果는 그림 1과 表 1에서 보는 바와 같이 KAS 610-3과 KAS 621-8 두 系統에서만 L×1이 缺乏되어 있고 기타 모든 系統에서는 L×1, L×2, L×3을 모두 갖고 있었으며 野生種에서는 전혀 lipoxygenase 缺乏系統을 發見하지 못하였다. 外國產 栽培 大豆 105系統과 野生種 62系統을 分析한 結果로서는 表 2에서 보는 와 같이 이미 알려진 PI 408251, PI 133226, PI 86023, PI 417458, 그리고 PI 205085등 5系統이 각각 1×1, 1×1, 1×2, 1×3, 및 1×3 遺

傳子型으로 確認되고 새로운 lipoxygenase 缺乏系統은 發見되지 않았으며 이 5系統은 본 實驗에서 lipoxygenase marker로 活用하였다. Kwon과 Chang(1992)¹⁰⁾은 慶南地方에서 蒐集한 763 系統의 在來種에서 carotene bleaching test 方法으로 lipoxygenase 活性 測定하여 lipoxygenase-3이 缺乏된 2 系統을 選拔했다고 報告한 바 있다.

L×1이 缺乏된 PI 408251은 韓國이 原產地로서 인도네시아가 원산지인 PI 133226과 함께 이미 Hildebr and와 Hymowitz(1981)⁵⁾가 美國 農務省 soybean germplasm collection중 6,499系統의 調査 結果로 이미 報告한 바 있는 大豆 系統이며, L×2 缺乏 系統인 PI 86023은 1986년 Davies와 Nielsen²⁾이 報告하였으며 國內에서는 아직 報告된 바 없다. L×3缺乏 系統에 관한 研究는 Japanese germplasm collection과 Northern USDA germplasm collection의 약 5,000 系統에서 Wasenatsu (PI 417458)와 Ichigowase (PI 205085) 2系統이 Kitamura 등⁸⁾에 의해 報告되었고 Davies와 Nielson(1986)²⁾이 1×21×2L×3L

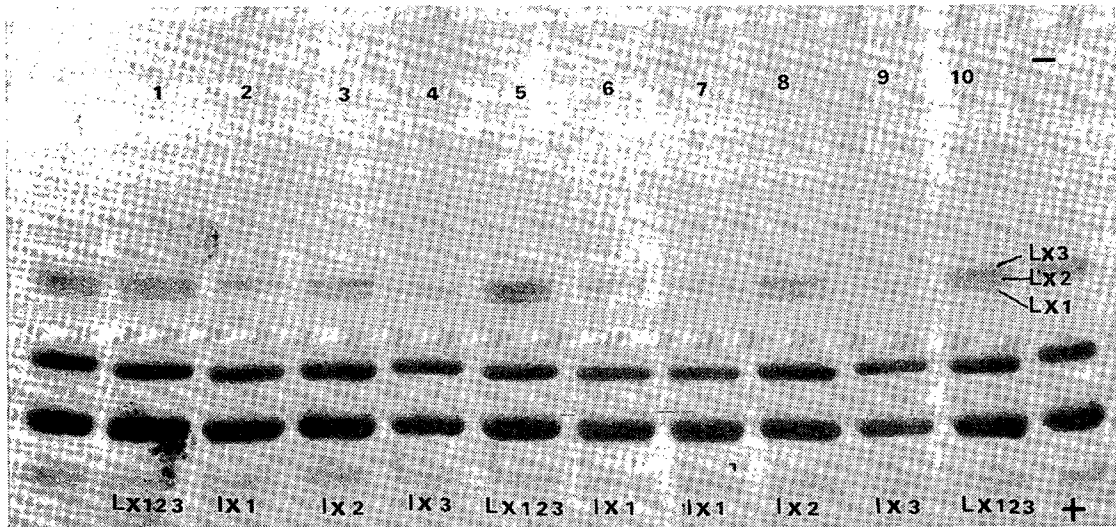


Fig. 1. The lipoxygenase isozymes of soybean seed by the SDS-PAGE.
 1. KAS 100-3 (L×1, 2, 3) 6. KAS 610-3 (1×1/1×1)
 2. PI 408251 (1×1/1×1) 7. KAS 621-8 (1×1/1×1)
 3. PI 86023 (1×2/1×2) 8. PI 86023 (1×2/1×2)
 4. PI 417458 (1×3/1×3) 9. PI 205085 (1×3/1×3)
 5. KAS 100-1-2 (L×1, 2, 3) 10. wild soybean (L×1, 2, 3)

Table 1. Various agronomic characters of two soybean lines lacking lipoxygenase-1 in Korean land race population.

Accession #	location collected	Genotype	Yield (kg/ha)	Seed wt. (g/100seeds)	Flowering (days)	Maturity (days)	Plant height (cm)	Lodging ¹ (1-5)	Seed ² quality (1-5)
KAS 610-3	Kyung-Nam Kosung	1×1	868	9.4	70	146	92	4.4	2
KAS 621-8	Kyung-Nam Sachun	1×1	1,598	8.7	72	132	77	4.5	1

Accession #	Color					Pod ³ borer (1-5)	Protein (%)	Oil (%)	Maturity group
	Seed coat	Hilum	Stem	Flower	Pubescence				
KAS 610-3	Black	Black	Purple	Purple	Tawny	3.3	43.4	14.6	VII
KAS 621-8	Black	Black	Purple	Purple	Tawny	4	40.6	14.9	VI

¹ Lodging : 1(erect) -5(very severe lodging), ² Seed quality : 1(very good) -5(very poor), ³ Pod borer : 1(no damage) -5(very severe damage)

Table 2. Available agronomic characters of lipoxygenase-1, -2, -3 lacking soybean varieties found in the world.

Accession	Origin	Genotype	Maturity Group	Protein (%)	Oil (%)	Seed Weight (g/100seeds)	Color			Growth		Reference
							Seed coat	Flower	Pubescence	Hilum	Tape	
PI 408251	Korea	1×1	V	43.2	17.4	6.0	Black	Purple	Tawny	Black	I	Hildebrand & Hymowitz, 1981, 1982
PI 133226	Indonesia	1×1	VIII				Yellow	White	Gray	L.Brown	I	Hildebrand & Hymowitz, 1981, 1982
PI 86023	Japan	1×2	II	39.6	18.6	16.8	Green	Purple	Tawny	Black	D	Davies & Nielson, 1986
PI 417458	Japan	1×3	0	46.1	15.9	11.3	Yellow	White		Brown	D	Kitamura et al. 1983, 1984
PI 205085	Japan	1×3	1	37.1	13.7	8.5	Yellow	White		Brown	D	Kitamura et al. 1983, 1984
67	Korea	1×3	early	34.8	14.9	16.6	Yellow	White			D	Kwon & Chang, 1992
217	Korea	1×3	early	41.2	20.7	14.8	Yellow	White				Kwon & Chang, 1992

* D : Determinate I : Indeterminate

The data of this table are based on evaluation of USDA soybean germplasm collection studied in Urbana Illinois and Stoneville Mississippi, USA

×3×L×2L×2l×3l×3의 교배로부터 새로운 조합을 얻었으나 1×1과 1×2의 同時缺乏에 관한報告는 없다. L×1과 L×2는 강한 聯關關係가 있다는 Kitamura 등 (1985)⁹⁾의 報告에 의하면 單純한 交配에 의한 遺傳子의 再組合 個體를 얻기는 쉽지 않을 것으로 豫想된다.

본 實驗에서 選拔된 lipoxygenase-1 缺乏 系統 KAS 610-3은 慶南 固城郡에서 1971년도에 蒐集한 系統으로 百粒重 9.4g, 成熟日數 146일이

며 莖長 92cm로서 比較적 키가 크고 晚熟種으로 百粒重이 매우 작은 特徵을 갖는 系統이다. 蛋白質 含量은 43.4% 脂肪 含量은 14.6%이다. KAS621-8은 慶南 泗川郡에서 1976년도에 蒐集한 系統으로서 역시 1×1 遺傳子型을 갖는 系統으로 判明되었으며 成熟日數는 132日, 莖長은 772cm로서 KAS 610-3과는 매우 相異하나 百粒重이나 脂肪含量이 類似하며 種皮色 臍色(hilum color), 莖색(stem color), 花色(flower color),

毛茸色(pubescence color) 등의 形質은 같았다.

選拔된 이 두 系統은 共通的으로 작고 脂肪含量이 매우 낮으며 供試된 系統中 그 60% 以上이 百粒重이 17-25g 範圍에 속했으며, 脂肪含量도 供試系統의 60% 以上이 17-18% 範圍에 分布되어 있어 脂肪含量이 낮은 系統에 우선 順位를 주어 分析을 시도했으나 lipoxxygenase 缺乏系統을 選拔하지 못하였다. 콩나방(pod borer) 被害度는 다른 系統에 비해 월등히 컸으며 lipoxxygenase 缺乏 系統에서 害蟲 被害가 더 많을 可能性이 있다는 Kitamura(1985)⁹⁾의 報告와 그 類似함에 유의할 만 하다.

본 實驗에서 얻은 結果와 表 2에 提示한 結果를 綜合해 보았을 때 lipoxxygenase 缺乏 系統은 韓國을 위시한 日本 및 인도네시아 등 廣範圍한 地域에서 發見되고 있으며 따라서 成熟群도 0에서 VIII까지 폭넓게 分布되어 있다. 그리고 生育型에서는 無限伸育型과 有限伸育型이 모두 包含되어 있다. 이와 같은 結果는 lipoxxygenase 缺乏 遺傳子型이 다른 각종 農耕 形質과의 關係가 뚜렷하지 않아 lipoxxygenase 缺乏 因子 탐색의 어려움이 豫想된다.

본 實驗에 供試된 韓國 在來種 大豆 1,874 系統과 Kwon과 Chang (1992)¹⁰⁾이 供試한 723系統 등 2,597系統에서 1×1 遺傳子型 2系統, 1×3 2系統 등 4系統이 選拔되었다는 것은 역시 우리나라 在來種에서 lipoxxygenase 缺乏系統을 發見할 수 있는 確率이 다른 나라에 비교해서 높다는 것을 암시해 주고 있다. 그리고 이 4系統이 모두 慶南一帶에서만 發見된 것을 미루어 볼 때 이 두 因子型 突然變異가 일어난 역사는 오래지 않을 것으로 推定된다.

摘 要

Lipoxxygenase는 大豆種實에 많이 包含되어 있어 大豆의 不飽化脂肪質을 酸化시켜 大豆 特有의 不悅한 콩비린내를 나게 함으로서 콩나물을 위시한 많은 大豆食品製造工程에서 어려움을 주고 있다. Lipoxxygenase에는 L×1, L×2, L×3의 3가

지 isozyme가 있는데 그동안 美國과 日本의 學者들에 의해 lipoxxygenase 缺乏(1×1, 1×2, 1×3)突然變異 系統이 發見되었고 또 單純 劣性 遺傳 樣式임이 밝혀짐으로서 lipoxxygenase 問題가 育種 차원에서 解決될 수 있는 展望이 보인다. 본 研究는 우리나라 在來種 集團에서 lipoxxygenase isozyme 缺乏因子를 찾아 加工食品용 大豆品種 開發 素材를 제공하려는데 그 目的이 있다.

本 實驗에서 L×1 缺乏系統 KAS 610-3, KAS 621-8이 選拔되었으며 lipoxxygenase 缺乏 系統은 一般的으로 小粒이고, 脂肪含量은 낮았으며, 또 本 實驗에서 選拔된 L×1 缺乏 2系統은 特徵적으로 콩나방 被害가 컸다.

供試系統數는 적었지만 野生種 大豆에서는 lipoxxygenase 缺乏遺傳子型이 發見되지 않았다.

우리나라에서 發見된 L×1 및 L×3가 缺乏된 4 系統이 모두 慶南지역의 在來種에 한정된 것으로 미루어 變異誘起 歷史는 비교적 짧은 것으로 推定된다.

引用 文 獻

1. Axelrod, B., T.M.Cheesbrough, and S. Laakso. 1981. Lipoxxygenase from soybean. *Methods Enzymol.* 71 : 441-451.
2. Davies, C. S., and N.C.Nielsen. 1986. Genetic analysis of a null-allele for lipoxxygenase-2 in soybean. *Crop Sci.* 26 : 460-463.
3. Eldridge, A.C., K. Warner, and W.J.Wolf. 1977. Alchoho treatment of soybeans and soybean protein products. *Cereal Chem.* 54 : 1229-1237.
4. Gardner, H.W. 1979. Lipid hydorperoxide reactivity with protein and amino acids : A. review. *J. Agric. Food Chem.* 27 : 220-228.
5. Hildebrand, D.F., and T. Hymowitz. 1981. Two soybean genotypes lacing lipoxxygenase-1. *J.Am. Oil. Chem. Soc.* 58 : 583-

6. Hildebrand, D.F., and T.Hymowitz. 1982. Inheritance of lipoxygenase-1 activity in soybean seeds. *Crop Sci.* 22 : 851-853.
7. Kitamura, K. 1984. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less, and L-3-less soybeans. *Agr. Biol. Chem.* 48 : 2339-2346.
8. Kitamura, K., C.S.Davies, N.Kaizuma, and N.C.Nielsen. 1983. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.* 23 : 924-927.
9. Kitamura, K., T. Kumagai, and A. Kikuchi. 1985. Inheritance of lipoxygenase-2 and genetic relationships among genes for lipoxygenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean seeds. *Japan J. Breed.* 35 : 413-420.
10. Kwon, J.S., and K.Y.Chang. 1992. Studies on selection, characterization, and utilization of lipoxygenase-3 deficient soybean line. *Korean J. Breed.* 24 : 68-75.
11. Nielsen, A.J., M.P.Steirberg, and L. S. Wei. 1976. Illinois process for preparation of soymilk. *J. Food Sci.* 41 : 57-61.
12. Parrish, D.J., and A.C. Leopold. 1978. On mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiol.* 61 : 365-368.
13. Pfeiffer, T.W., and D.F.Hildebrand. 1991. Test for linkage between 1 x 1 and ln, pc, f, i, r, dt₁, and p₁. *Soybean Genet. Newsl.* 18 : 306-307.
14. Rackis, J.J., D.H.Honig, D.J.Sessa, and R. Steggerda. 1970. Flavor and flatulence factors in soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.* 18 : 977-982.
15. Shibata, D., J.Steczko, H.E.Dixon, M. Hermodsom, R.Yazdanparast, and B. Axelrod. 1988. Primary structure of soybean lipoxygenase-1. *J. Biol. Chem.* 262 : 10080-10085.
16. Shibata, D., J. Steczko, H. E. Dixon, P. C. Andrews, M. Hermodson, R. Yazdanparast, and B. Axelrod. 1987. Primary structure of soybean lipoxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 263 : 6816-6821.
17. Wolf, W.J. 1975. Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.* 23 : 136-141.
18. Yenofsky, R.L., M.Fine, and C.Liu. 1988. Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. *Mol. Gen. Genet.* 211 : 215-222.