

콩 生育時期別 Lipoxygenase活性的 變化

金龍昊* · 金奭東* · 洪殷憲*

Change of Lipoxygenase Activity during Soybean Growth

Yong Ho Kim* · Seok Dong Kim* and Eun Hi Hong*

ABSTRACT : Lipoxygenase is involved in the formation of certain undesirable flavors of soybean products. Three isozymes(L-1, L-2 and L-3) of lipoxygenase have been identified in soybean seeds, and the three types of mutants lacking L-1, L-2 and L-3, respectively, were detected in the 1980's. In this paper, lipoxygenase activity was measured to investigate the response of lipoxygenase in organs and tissues during soybean development. There was no tendency according to genotypes between lipoxygenase lacking mutants and normal soybeans in lipoxygenase activity of leaf at V₃ and V₅ stage. Likewise, pod wall lipoxygenase was no difference among genotypes tested at R₆ stage. Seed coat lipoxygenase activity was similar among the lipoxygenase lacking mutants, while normal soybean was lower as compared with that of the lipoxygenase lacking mutants. Embryo and cotyledon lipoxygenase activity in the lipoxygenase lacking mutants was much lower than that of normal soybean, also there was large difference among lipoxygenase lacking mutants. Thus, the lipoxygenase null mutant showed very weak value although the lacking L-3 mutant had a large effect on developing embryo lipoxygenase activity. It was suggested that soybean lipoxygenase isozymes expressed in embryo may be different from those expressed in the pod wall and leaf tissues.

Key word : Soybean, Lipoxygenase activity, Growth stage, Mutant, Embryo

Lipoxygenase는 콩에서 비린내를 유발시키는 효소로 알려져 있으며^{2,13)} 이는 리놀산, 리놀렌산 등 不飽和脂肪酸의 산화에 관여한다^{4,8,10)}. 그동안 lipoxygenase가 작용하는 과정이나 대사산물의 특성 등에 관해서는 많은 결과가 보고되었으나 아직 lipoxygenase가 植物體내에서 어떤 생리적인 작용을 하는지에 관하여는 명확한 보고가 없다. 단지 한가지 이상의 役割을 담당하고 있으리라는 추측을 하고 있을 따름이다. Pfeiffer 등¹⁴⁾과 몇몇 보고^{4,16)}에서는 lipoxygenase가 蟲害 抵抗성에 관여한다고

하였으며, plant senescence, 植物體 조직이 상처를 입었을때 形成되는 'wound hormone' 등과도 관련있다는 報告¹⁶⁾도 있다. Lipoxygenase activity는 種子發芽初期에 급격히 증가하였다가 곧 감소하는 것으로 보아 lipoxygenase는 종자발아에 필요한 저장 蛋白質일 수도 있다는 결과도 보고⁴⁾되었으며, Chapman 등¹⁾은 lipoxygenase activity는 환경의 영향도 받는다고 하였다.

이밖에 lipoxygenase 분리와 정제에 관해서는 많은 결과가 보고^{3,7,10,12,15,17)}되었는데, 콩 種實 lipo-

* 作物試驗場 (Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea)

〈'94. 3. 23 接受〉

xygenase의 3가지 isozyme(L-1, L-2, L-3)은 單純劣性因子에 의해 유전되며, L-1과 L-2는 강하게 연관되어 있는 반면 L-3는 다른 두가지 isozymes와는 달리 獨立的이라고 발표^{10~12)}된 바 있다. 따라서 L-1, L-2, L-3가 모두 缺乏된 系統을 육성하였다는 結果도 報告^{5,6,9)}되었다.

Lipoxygenase는 콩 뿐만 아니라 많은 植物體에 존재하며 동물에도 존재한다^{4,16)}. 그러나 상기한 바와 같이 그 生理的作用에 대해서는 아직 명확히 밝혀진 바 없는데 Kitamura¹³⁾와 Pfeiffer 등¹⁴⁾은 種實 lipoxygenase와 기타 조직에 존재하는 lipoxygenase는 서로 다르다는 報告를 한 바 있다.

本 研究에서는 作物試驗場에서 수행하고 있는 lipoxygenase 缺乏 品種 육성의 일환으로 콩 生育時期別로 lipoxygenase activity를 조사 분석한 바 그 結果를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

獎勵品種이며 lipoxygenase가 缺乏되지 않은 일반콩인 黃金콩과 萬里콩을 대비로 하고 lipoxygenase 결핍계통들의 生育時期別 lipoxygenase activity를 測定하였다. Lipoxygenase 缺乏系統은 作物試驗場에서 보유하고 있는 L-1 결핍, L-2 결핍 등의 1가지 isozyme 결핍계통과 L-1·L-2 결핍, L-1·L-3 결핍, L-2·L-3 결핍 등의 2가지 isozyme 결핍계통, 그리고 L-1·L-2·L-3가 모두 결핍된 계통을 供試材料로 사용하였다. 生育시기는 V₃, V₅, R₆, R₈ 시기로 나누었는데 V₃ 및 V₅ 시기는 葉을 재료로 사용하였으며, R₆ 시기는 莢과 種實을, R₈ 시기는 種實全體의 活力을 測定하는 한편 종자를 種皮, 胚, 子葉으로 구분하여 각각의 活力을 다시 측정하였다.

活力測定方法은 Kitamura의 방법¹²⁾을 따랐다. 粉碎된 시료를 20mM CaCl₂를 포함한 0.05M Tris-HCl(pH 8.0) buffer로 遠心分離(15,000rpm, 5분)하고, 그 상등액에 assay buffer(0.2M Tris-HCl, pH 9.0)와 기질을 첨가한 다음 1분만에 spectrophotometer 234nm에서 흡광치를 측정하였다. 기질은 linoleic acid와 arachidonic acid를

사용하였다. 기질조제는 먼저 degas된 이온수를 질소가스로 다시 30분 동안 bubbling시킨후 linoleic acid나 arachidonic acid를 첨가하여 ultrasonification 시키고, 2N NaOH를 添加하여 완전히 녹인 다음 마지막 用量을 50ml로 맞추어 전체 농도를 10⁻²M로 조정하였다. 만들어진 기질은 -20℃이하에서 보관하면서 分析때마다 一定量을 취하여 사용하였다.

結果 및 考察

Lipoxygenase는 植物體의 여러 조직 및 기관에 존재한다^{4,16)}. 콩에서는 子葉, 배축, 잎 등에서 그 活力이 測定되었는데 특히 잎에서는 chloroplasts와 관련시켜 活力의 높고 낮음이 報告⁴⁾되었고, 기타 조직에서는 cytoplasm과 vacuole이 lipoxygenase가 존재하는 주된 위치로 알려져 있다¹⁶⁾.

表 1은 V₃와 V₅ 시기에 콩 잎을 採取하여 lipoxygenase 활성을 측정된 結果이다.

그런데 두 시기 모두 遺傳子型에 상관없이 lipoxygenase activity는 일정한 傾向이 없었다. 즉 V₃ 시기에서 lipoxygenase isozyme이 모두 缺乏된 계통(lx123)의 活力이 1.56인 반면 isozyme이 모두 존재하는 萬里콩이 0.92를 나타내고 L-1이 결핍된 계통은 1.58을 나타내었다. V₅시기에서는 萬里콩과 lx123이 1.28의 活力을 보인 반면 L-1이 缺乏된 계통은 4.32를 나타내었다. 기질을 linoleic acid 대신 arachidonic acid를 사용한 경우도 마찬가지였지만 arachidonic acid를 기질로 사용하였을 때는 linoleic acid보다 흡광치가 적게 나타나 계통간 비교에는 적합하지 않았다. 그러나 arachidonic acid는 pH 6.8보다 pH 9.0 부근에서 活力이 높게 나타난다는 보고^{10,16)}가 있으므로 기질 사용문제는 좀 더 檢討가 요구된다. 또한 3가지 isozyme L-1, L-2, L-3는 반응을 일으키기에 적당한 기질과 pH가 각각 다르므로¹⁰⁾ 각 isozyme別로 分離 정제하여 活力을 측정하는 경우는 그 方法을 달리하여야 할 것이다. Ramadoss와 Axelrod(1982)는 L-2는 arachidonic acid와, L-3는 linoleic acid와 反應이 잘 일어나며 L-1은 두 기질간 큰 차이가 없다

고 하였다. 또한 V₃와 V₅ 시기를 比較하여 볼 때 V₅ 시기가 V₃에 비해 lipoxygenase 활력이 높게 나타났지만 역시 遺傳子型과는 일정한 傾向이 없었다. V₅ 시기가 V₃ 보다 활력이 높게 측정된 것은 葉의 전개정도에 따른 變化인지 기타 다른 要因이 關與하는지에 관하여는 깊은 檢討가 요구된다. Kar와 Feierabend(1984)는 새롭게 分化되거나 빠르게 生長하는 조직에서는 lipoxygenase activity가 높다고 하였다.

表 2는 R₆와 R₈ 시기에 莢과 種子를 採取하여 lipoxygenase activity를 측정된 결과이다. 기질은 linoleic acid를 사용하였다.

Pod wall에서의 活力은 葉에서와 마찬가지로 遺傳子型에 따른 일정한 傾向은 없었다. 萬里콩이 3.80의 흡광치를 나타내고 L-1 缺乏系統이 0.85의 活力을 보인 반면 L-2, L-3 동시 결핍계통과 lx123은 각각 1.68과 7.07을 나타내었다. 그러나 R₆시기의 種子에서는 유전자형에 따라 활력이 어떤 경향치를 나타낼 수 있었다. 즉 lipoxygenase가 모두 존재하는 萬里콩이 0.92를 나타낸 반면 L-1 결핍계통과 L-3 결핍계통은 각각 0.33과 0.77을 보여 lipoxygenase 결핍계통의 lipoxygenase 활력이 일반품종보다 낮음을 알 수 있었다. 이는 2가지 isozyme 이상 결핍계통들의 활력이 한가지 결핍계통보다 낮게 나타나는 것으로 보아도 확연하다. 또한 L-1 결핍계통과 L-3 결핍계통을 비교할 때 L-1

결핍계통의 활력이 낮게 측정되는 것으로 보아 lipoxygenase activity의 강도는 L-1이 L-3보다 더 강한 것이 아닌가 생각된다. 그러나 각 isozyme 간의 activity 강도에 관해서는 각기 상반된 주장들이 있어 앞으로 각 isozyme을 분리 정제한 다음 다시 檢討할 필요가 있으리라 생각된다.

R₈ 시기 種子의 lipoxygenase 活力도 R₆ 시기와 같은 傾向을 나타내었다. 萬里콩이 1.57로 供試材料間 가장 높게 활력이 측정된 반면 L-3 결핍계통은 1.33을 나타내었고 lx123은 0.02로 거의 흡광치가 나타나지 않았다. 따라서 表 1과 表 2를 종합하여 볼 때 種實에 존재하는 lipoxygenase와 잎이나 莢에 존재하는 lipoxygenase는 다른 것이 아닌가 사료된다. 특히 잎이나 莢에서는 種子에서와는 달리 遺傳子型에 따른 lipoxygenase 活力間에 일정한 경향이 없어 이들 기관내에서의 lipoxygenase 作用도 다를 것이라 推定된다. 種子發芽初期에 lipoxygenase 活力이 높았다가 곧 감소되는 것으로 보아 lipoxygenase는 종자내의 貯藏蛋白質 역할을 할지도 모른다는 報告⁴⁾가 있으며, lipoxygenase는 잎의 senescence와 관련이 있고 잎이 상처를 받았을 때 活力이 높아진다는 보고^{4,16)}도 있다. 특히 lipoxygenase는 상처조직에서 cutin形成과 wound hormone 形成에도 關聯된다고⁴⁾ 하며 Pfeiffer 등¹⁴⁾은 pod wall에서의 lipoxygenase는 耐蟲性과도 關聯이 있다고 하였다.

Table 1. Lipoxygenase activity in the leaf extracts of soybeans at V₃ and V₅ stage

Genotypes	Lipoxygenase activity ($\Delta A_{234nm} \text{ min}^{-1} 100\text{mg}^{-1} \text{ fresh wt.}$)		
	V ₃ stage		V ₅ stage
	pH 6.8 ¹⁾	pH 6.8 ²⁾	pH 6.8 ¹⁾
Mallikong (L-1·2·3)	0.92±0.12	0.58±0.01	1.28±0.0
Lacking L-1	1.58±0.23	0.25±0.02	4.32±0.72
Lacking L-3	1.47±0.21	0.60±0.01	3.00±0.28
Lacking L-1·2	1.22±0.27	0.75±0.0	1.95±0.11
Lacking L-1·3	1.15±0.04	0.42±0.02	2.57±0.57
Lacking L-2·3	1.39±0.12	0.55±0.02	3.35±0.18
Lacking L-1·2·3	1.56±0.14	0.92±0.02	1.28±0.15

- 1) towards linoleic acid
2) towards arachidonic acid

Table 2. Lipoxygenase activity in the pod wall and seed extracts of soybeans at R₆ and R₈ stage

Genotypes	Lipoxygenase activity		
	R ₆ stage		R ₈ stage
	Pod wall ¹⁾	Seed ²⁾	Seed ³⁾
Mallikong (L-1·2·3)	3.80±0.81	0.92±0.09	1.57±0.08
Lacking L-1	0.85±0.05	0.33±0.07	ns ⁴⁾
Lacking L-3	2.40±0.67	0.77±0.11	1.00±0.08
Lacking L-1·2	1.05±0.03	0.25±0.01	ns
Lacking L-2·3	1.68±0.12	0.04±0.01	0.07±0.0
Lacking L-1·2·3	7.07±0.95	0.03±0.0	0.02±0.0

- 1) $\Delta A_{234nm} \text{ min}^{-1} 100\text{mg}^{-1} \text{ fresh wt.}$
2) " " $\text{mg}^{-1} \text{ fresh wt.}$
3) " " $\text{mg}^{-1} \text{ meal}$
4) not studied

表 3은 種子를 種皮, 胚, 子葉으로 구분한 다음 각각의 lipoxygenase activity를 측정된 결과이다.

Table 3. Lipoxygenase activity in seed coat, embryo and cotyledon extracts of soybeans at R₈ stage

Genotypes	Lipoxygenase activity ($\Delta A_{234nm} \text{ min}^{-1} \text{ mg meal}^{-1}$)		
	Seed coat *	Embryo	Cotyledon
Hwangkeumkong (L-1·2·3)	0.85±0.03	1.67±0.09	2.05±0.28
Lacking L-3	0.23±0.02	1.76±0.11	0.97±0.02
Lacking L-1·2	1.13±0.01	0.46±0.01	0.90±0.01
Lacking L-1·3	0.12±0.0	1.49±0.17	0.62±0.05
Lacking L-2·3	0.14±0.0	0.89±0.09	0.04±0.0
Lacking L-1·2·3	0.15±0.0	0.03±0.0	0.02±0.0

* Seed coat valuse have been multiplied by 10.

胚와 子葉부분에서의 lipoxygenase activity는 遺傳子型에 따라 活力의 높고 낮음에 일정한 경향이 있었지만, 種皮에서는 傾向을 찾을 수 없었으며 그 값도 대단히 낮았고 단지 lipoxygenase 缺乏系統들이 일반계통 보다는 活力이 낮게 측정되었을 뿐이다. 그러나 胚와 子葉에서는 흡광치가 높게 측정되었으며 역시 lipoxygenase 결핍계통들은 일반 품종인 黃金콩 보다 낮게 나타났다. 특히 lx123 계통은 거의 活力이 측정되지 않아 잎이나 莢, 種皮 등에서 나타난 결과와는 다르게 나타났다. 이와 같은 결과들을 볼 때 種子내에서도 種皮와 胚에서의 lipoxygenase는 각각 다른 遺傳的 지배를 받지 않는가 사료된다. 그리고 表 1,2,3을 종합하여 볼 때 콩의 각 기관이나 조직에서의 lipoxygenase는 각각 다른 蛋白質이 아닌가도 추정된다. 따라서 이에 대해서는 더 깊은 검토가 있어야 하겠고, 나아가 lipoxygenase의 生理的 作用에 대하여도 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

摘 要

Lipoxygenase는 콩 비린내 유발의 主要原因이 된다. 따라서 lipoxygenase 발현 양상을 알아보고자 콩 生育時期別로 재료를 採取하여 lipoxygenase

activity를 측정한 바 그 결과는 다음과 같다.

1. V₃와 V₅ 시기에 콩 앞에서의 lipoxygenase activity는 遺傳子型에 상관없이 일정한 경향이 없었다.
2. R₆ 시기의 pod wall에서도 遺傳子型에 따른 lipoxygenase activity의 일정한 경향은 없었으나 種子 lipoxygenase는 lipoxygenase 缺乏系統의 activity가 일반품종에 비해 낮았으며 lipoxygenase 缺乏系統間에도 isozyme 결핍 정도에 따라 activity도 다르게 나타났다.
3. 種子를 種皮, 胚, 子葉으로 구분하여 각각의 lipoxygenase activity를 측정된 결과 種皮에서는 遺傳子型에 따른 경향을 찾을 수 없었으나 胚와 子葉에서는 lipoxygenase isozyme 결핍 정도에 따라 activity도 다르게 나타났다.

引用文獻

1. Chapman, G.W., J.A. Robertson and D. Burdick. 1976. Chemical composition and lipoxygenase activity in soybeans as affected by genotype and environment. J. Ame Oil Chem. Soc. 53:54-56.
2. Davies, C.S., S.S. Nielsen and N.C. Nielsen. 1987. Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. J. Ame. Oil Chem. Soc. 64: 1428-1432.
3. Diel, E. and H.J. Stan. 1978. Purification and characterization of two isoenzymes of lipoxygenase from soybeans. Planta 142: 321-328.
4. Galliard, T. and H.W. Chan. 1980. Lipoxygenase. The biochemistry of plants. Vol. 4. Academic press. pp 131-161.
5. 羽鹿牧太·喜多村啓介·異儀田和典. 1990. 放射線種子照射によるリポキシゲナーゼ全次失大豆の作出. 日育雜40(別1):546-547.
6. ———·異儀田和典·中澤芳則. 1992. 리포キシゲナーゼ完全欠失大豆의 無防除栽培下にお

- ける虫害程度. 日育雜42(別1):546-547.
7. Hildebrand, D. and T. Hymowitz. 1993. Lipoxygenase activities in developing and germinating soybean seeds with and without lipoxygenase-1. *Bot. Gaz.* 144(2):212-216.
 8. 洪殷憲·金奭東·金龍昊·成烈圭·金弘植. 1992. 콩 비린내에 關與하는 lipoxygenase 缺乏品種 育成研究. 1. Lipoxygenase 活力 測定 및 isozyme 確認. *農事試驗研究論文集(田·特作)*. 34:47-52.
 9. 異儀田和典·羽鹿 太·中澤芳則. 1992. 리포キシゲナーゼ完全欠失大豆の生育特性. *日育雜42(別1):544-545.*
 10. Kikuchi, A. and K. Kitamura. 1987. Simple and rapid carotene bleaching tests for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds. *Japan J. Breed.* 37:10-16.
 11. 金龍昊·金奭東·李錫河·洪殷憲. 1993. 콩 비린내에 關與하는 lipoxygenase 缺乏品種 育成研究. 2. 콩 種實 lipoxygenase-3의 遺傳分離와 lipoxygenase 缺乏系統의 作物學的 特性. *農業科學論文集(田·特作)* 35:111-115.
 12. Kitamura, K. 1984. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less and L-3-less soybeans. *Agric. Biol. Chem.* 48:2339-2346.
 13. ———. 1991. Genetic variation and improvement of seed components in soybean. Evaluation and classification of plant genetic resources. *Japan Intern. Cooper. Agency.* pp 55-77.
 14. Pfeiffer, T., D.F. Hildebrand and D.M. Tekrony. 1992. Agronomic performance of soybean lipoxygenase isolines. *Crop Sci.* 32:357-362.
 15. Vernooy-Gerritsen, M., J.L.M. Leunissen, G.A. Veldink and J.F.G. Vliegenthart. 1984. Intercellular localization of lipoxygenases-1 and -2 in germinating soybean seeds by indirect labeling with protein A-colloidal gold complexes. *Plant Physiol.* 76:1070-1079.
 16. Vick, B.A. and D.C. Zimmerman. 1987. Oxidative systems for modification of fatty acids: The lipoxygenase pathway. *The Biochemistry of plants*, Vol. 9. Academic press. pp 53-90.
 17. Wang, X.M., G. Bookjans., M. Altschuler., G.B. Collins and D.F. Hildebrand. 1988. Alteration of the synthesis of lipoxygenase in the early stages of soybean cotyledon culture. *Physiol. Plant.* 72:127-132.