

## 콩의 Lipoxygenase-1 迅速 檢定方法 確立

조준형\* · 김영미\* · 윤홍태\*\* · 김용호\*\*\* · 김용욱\* · 김명애\*\*\*\*

### Studies on Various Test Conditions and Application of Test Method for Lipoxygenase-1 in Soybean

Joon Hyeong Cho\*, Young Mi Kim\*, Hong Tae Yoon\*\*, Yong Ho Kim\*\*\*, Yong Wook Kim\* and Myung Ae Kim\*\*\*\*

**ABSTRACT:** This study was performed to clarify various conditions on the test of lipoxygenase-1 and to establish the application of new test method for varietal improvement of soybeans in order to decrease beany flavors. Potassium borate and Tris were used as buffer and 0.1M potassium borate solution showed the best result for the lipoxygenase-1 test. In the range of pH 8.5~9.0 of the buffer, 2mM linoleic acid as substrate was effective. For color development, 100 $\mu$ l of two solutions(KI and starch) were added to the half soybean seed, successively. The substrate solution included linoleic acid was stored safely for 10 days at 4 $^{\circ}$ C in refrigerator and for 4 days at room temperature. The best result was as follows : the 1ml of substrate solution[0.1M potassium borate(pH 9.0), 0.1% Tween-20, 2mM linoleic acid] was added to the chipped half soybean seed in 1.5ml plastic tube, waited for 15 minutes, and 100 $\mu$ l of color development solutions(5% saturated KI in 15% acetic acid, 1% starch) were added to the tube, successively. After 4 hours, the purple color was observed in the upper phase of the plastic tube in the presence of lipoxygenase-1 and milky color in absence of lipoxygenase-1. The purple color was stable from 4 to 24 hours. There was no interfering effect by lipoxygenase-2 and -3. The plastic tube should be placed in the tube stand without shaking during the lipoxygenase-1 test.

**Key words :** Soybean, Beany flavor, Lipoxygenase-1 test method.

최근에 콩에 대한 관심사는 용도의 다양화와 각각의 용도에 적합한 품질의 고급화로 전환되기 시작하여 용도에 따른 가공적성의 중요성이 크게 강조되어<sup>8,9,12,18)</sup> 原料의 選擇, 가공전후의 品質管理 등을 위한 빠르고 간편한 검사방법이 品質改良을 위한 기초자료로서 요구되고 있다<sup>8)</sup>. 콩 가공품인

두유나 두부제조시 콩 비린내를 유발하는 것으로 알려진 lipoxygenase를 不活性化하기 위하여 화학 및 가열처리 등을 하게되는데 이러한 처리는 콩 蛋白質의 추출 수율 감소와 콩기름의 질 저하를 가져오므로 lipoxygenase가 존재하지 않거나 활성이 낮은 것이 요구되고 있다<sup>9,12)</sup>. 콩의 lipoxy-

본 논문은 농촌진흥청 농업특정연구사업의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부임.

\* 동국대학교 생명자원과학대학(College of Life Resources Science, Univ. of Dongguk, Seoul 100-715, Korea)

\*\* 농촌진흥청 작물시험장(National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea)

\*\*\* 순천향대학교 자연과학부(Dept. of Biological Resources, Soonchunhyang Univ., Asan 336-745, Korea)

\*\*\*\* 동덕여자대학교 자연과학대학(College of Natural Science, Woman Univ. of Dong Deok, Seoul 136-714, Korea)

〈'97. 8. 21 接受〉

genase는 1974년 Teorell et al.<sup>17)</sup>에 의해 분리된 이후 lipoxygenase 同位酵素가 확인되었고 콩에 함유된 lipoxygenase는 콩 蛋白質의 2% 정도이며 lipoxygenase-1, -2, -3a, -3b 등 4가지 同位酵素가 존재하는 것으로 밝혀져 왔으나 3a와 3b는 구조와 작용이 비슷하여 同一酵素로 취급되고 있다<sup>14,15)</sup>. Lipoxygenase는 不飽和脂肪酸의 이중결합의 酸化作用에 촉매 역할을 하며, 이들 酸化物들이 두취유발의 원인인 휘발성 化合物를 생성하고<sup>6)</sup>, 각 同位酵素들은 적정 pH, 2次 過酸化物 生成反應, 基質特異性, 基質濃도에 따른 反應速度와 酸素發生 등의 기본적인 유사성에도 불구하고 다른 反應에 대한 고찰이 이루어져 왔다<sup>1)</sup>.

Lipoxygenase-1은 분자량이 94038 Da, 838개의 아미노산으로 이루어져 있으며<sup>13)</sup> 최적 pH는 0.5이며 선택성이 강해서 反應體系 내에 遊離 또는 結合狀態에 있는 linoleic acid를 13-hydroperoxy-cis-9,trans-11-octadecadienoic acid를 만든다고 하였다<sup>15)</sup>. Lipoxygenase-1과 2는 반응 자리에 특이성이 있다고 보고되었고<sup>11)</sup> lipoxygenase-2는 基質로 arachidonic acid를 선호하며 lipoxygenase-3는 酵素농도가 낮을수록 specific activity 증가하나 lipoxygenase-1과 2는 酵素濃도와 specific activity가 비례한다고 보고 하였다<sup>14,15)</sup>.

Hong et al.<sup>5)</sup>은 lipoxygenase 同位酵素들의 total activity를 linoleic acid와 arachidonic acid 등의 基質을 이용하여 측정하였는데 상호간 높은 상관을 보였으나 특정 同位酵素에 대한 基質의 反應도가 다른 것 같고 carotene bleaching test에서 보면 lipoxygenase-1과 -3의 作用基質로는 linoleic acid를, lipoxygenase-2의 경우에는 arachidonic acid를 사용하여 同位酵素들의 존재 여부를 확인할 수 있다고 보고하였다. 분자량 차이를 이용하여 분석하는 SDS-PAGE 방법은 lipoxygenase의 缺乏與否를 확인하는데 좋은 수단이 될 수 있으나 lipoxygenase가 민감하여 종종 실패하는 경우가 있다고 하였다. Lee et al.<sup>12)</sup>은 反應基質로 linoleic acid를 사용하여 pH 7.0에서 lipoxygenase 활성에 대한 품종간 反應차이를 측정하였고 lipoxygenase-3의 缺乏與否를 조

사하기 위하여 基質을 linoleic acid로 하여 carotene을 탈색 시키는 방법으로 분석하였다<sup>10)</sup>. 보다 간편한 lipoxygenase의 檢定方法으로 發色反應의 이용성이 제시되어왔으며<sup>7)</sup>, Hammond et al.<sup>4)</sup>은 基質로 linoleic acid를 이용하여 過酸化物를 생성케 한 후 發色反應으로 전환시켜 lipoxygenase를 검정할 수 있다고 보고하였다.

그러므로 본 실험은 lipoxygenase-1이 콩 種實의 지질을 酸化시킬 때 형성되는 過酸化物의 酸化反應을 發色反應으로 전환시켜 檢定方法에 대한 相關요인을 구명하고 보다 간편하고 효과적인 檢定方法의 활용성을 확립하여 무두취 콩 품종 육성 사업에 도움이 될 수 있는 자료를 얻고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 檢定方法의 要因究明

콩 種實의 上等液은 부광콩 種實 1립을 종피와 배를 제거한 후 칼로 얇게 자른 후 緩衝溶液 1ml을 넣고 2시간 동안 원심분리 시킨 뒤 上等液을 50 $\mu$ l 취하여 lipoxygenase-1 酵素용액으로 사용하였다. 基質溶液[solution 1 ; buffer + 0.1% Tween-20 + linoleic acid]을 1ml 넣고 15분 경과 후 發色시키기 위하여 反應溶液 2[solution 2 ; 5ml saturated KI solution per 100ml of 15% acetic acid]와 反應溶液 3[solution 3 ; 1% starch solution]을 첨가해 주고 4시간 후에 15,000rpm에서 10분 동안 원심분리 시켰고 上等液을 spectro-photometer로 540nm에서 蒸溜水を 표준으로 하여 흡광도를 측정하였으며 처리 내용은 표 1과 같았다.

### 2. 檢定方法의 活用性 確立

檢定方法의 要因究明 실험에서 얻은 결과를 콩 種實에 직접 적용하여 보다 효과적이고 간편한 檢定方法의 활용성을 확립코자 수행하였는데, 종피와 배가 제거된 種實 3립을 칼로 얇게 절단한 후 Hammond et al.<sup>4)</sup>의 방법에 준하여 시험관에 넣고 基質溶液(solution 1 ; 0.1M potassium bo-

Table 1. Conditions for lipoxygenase-1 test

Condition	Treatment
Substrate concentration	linoleic acid : 0, 2, 4, 6, 8, 10 mM
Kind of buffer	Tris, potassium borate
Buffer concentration	0.05 M, 0.1 M, 0.2 M
pH of buffer	8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0
Solution 1	buffer+0.1%(w/v) Tween-20+linoleic acid
Solution 2	5 ml saturated KI solution per 100 ml of 15%(v/v) acetic acid
Solution 3	1%(w/v) starch solution
Storage time of solution 1	0, 2, 4, 6, 8, 10 day
Storage temperature of solution 1	4°C, room temperature(20~25°C)
Amount of solution 2 and 3 for color development	0, 25, 50, 100, 150, 200μl

rate(pH 7.0), 0.1% Tween 20, 2mM linoleic acid)를 4ml 첨가 후 15분 경과한 뒤 反應溶液 2 (solution 2 ; 5ml of saturated KI solution per 100ml of 15% acetic acid)와 反應溶液 3(solution 3 ; 1% starch)를 각각 400μl씩 넣고 4시간과 24시간 경과 후 상층액의 發色정도를 관찰하였다. 콩 種實의 供試材料는 lipoxygenase-1, -2, -3가 缺乏된 진품콩 2호와 lipoxygenase 同位酵素들이 존재하는 부광콩이었다.

보다 효과적이고 간편한 방법을 확립키 위해서 반립의 種實을 가지고 plastic tube(1.5ml)에서 시험이 수행되었는데 배와 종피가 제거된 반립의 種實을 칼로 절단(1mm)한 후, plastic tube에 넣고 基質溶液을 1ml 첨가한 뒤 15분 경과 후 反應溶液 2와 3을 각각 100μl 넣고 4시간 후에 상층액의 發色反應을 관찰하였다. 緩衝劑로는 0.1M, 0.2M, 50mM potassium borate(pH 9.0)와 Tris(pH 9.0)을 사용하였고 공시 품종으로는 진품콩 2호와 부광콩을 재료로 하였다.

### 1) 品種間 反應

본 실험에서 얻은 檢定方法을 적용해서 lipoxygenase 同位酵素의 檢定정도가 다른 황금콩 외 11계통 및 품종을 공시재료로 품종간 反應을 검토 확인하여 본 實驗方法의 활용성을 확립시켜 수행되었다. 실험방법은 1.5ml plastic tube에서 수행되었고 緩衝溶液으로는 0.1M potassium borate(pH 9.0)을 사용하였고 기타는 檢定方法의 확립실험방법과 동일하게 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 檢定方法의 要因究明

#### 1) 基質의 濃度

그림 1은 基質溶液의 pH를 9.0으로 조정 한 후 linoleic acid의 농도 증가에 따른 lipoxygenase-1 同位酵素의 활성화에 의한 發色反應 정도를 조사한 실험 결과인데 lipoxygenase-1이 있는 부광콩 種實의 上等液을 첨가한 처리에서 보면 linoleic acid의 농도가 1mM에서 측정 가능한 發色反應이 나타나기 시작하였고, 基質의 농도와 비례하여 發色程度가 증가하는 경향을 보였다. 부광콩 種實

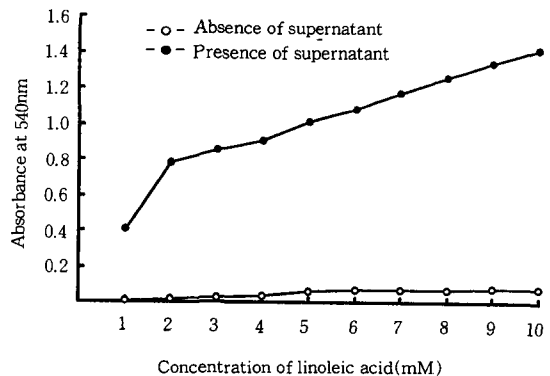


Fig. 1. Variation of absorbance by lipoxygenase-1 at different concentration of linoleic acid.

의 上等液이 첨가되지 않은 처리에서는 실온 상태에서 4시간 경과하여도 基質의 自動酸化에 의한 發色反應이 나타나지 않았다. Hammond et al.<sup>4)</sup>에 의하면 lipoxygenase-1의 검정시 基質의 농도를 1mM로 한 보고내용과 일치하는 경향이며 본 실험결과에 의하면 linoleic acid의 농도를 2mM 정도로 하는 것이 검정가능한 충분한 양으로 판단되었다.

## 2) 基質溶液의 酸度

그림 2는 基質溶液의 적정 pH를 검토하고자 pH 8~10.5 범위로 하여 linoleic acid에 대한 自動酸化와 lipoxygenase-1의 酸化反應에 의한 發色程度를 조사한 결과이다. 自動酸化에 의한 發色反應은 linoleic acid만 처리하여 4일 후에 흡광도를 측정하였고 lipoxygenase-1에 의한 酸化 發色反應은 부광콩 種實의 上等液을 첨가한 후 4시간 후에 흡광도를 측정하였는데 上等液의 첨가 처리에서 보면 pH가 증가할수록 發色程度가 증가하다가 pH 9.0에서 가장 높았고 pH 9.0 이상에서는 發色도가 급격히 낮아지는 경향을 보였다. 이러한 결과는 lipoxygenase-1의 활성은 pH에 특이성이 있고 pH 9.0에서 활성이 가장 높았다는 보고와 일치하였다<sup>4,13)</sup>. 부광콩 種實의 上等液이 첨가되지 않은 처리에서는 自動酸化에 의한 發色反應이 pH 9.5에서 가장 높았다. 그러므로 lipoxygen-

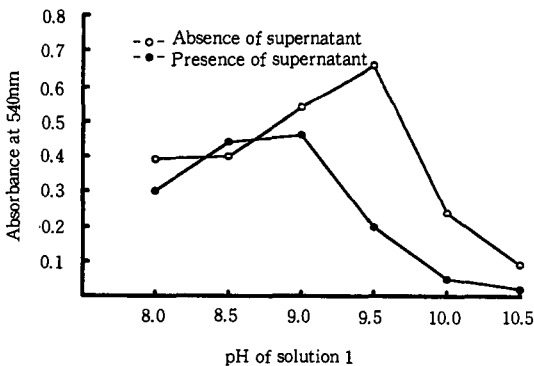


Fig. 2. Absorbance variation of autoxidation of substrate and oxidation of substrate by lipoxygenase-1 activity at various pH levels of solution 1.

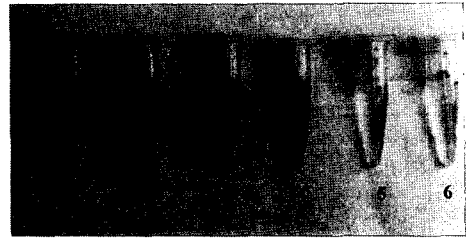


Photo. 1. Color development by lipoxygenase-1 activity at different pH levels of 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 and 10.5 from left to right.

ase-1검정시 基質溶液의 pH를 8.5~9.0 사이로 조정한다면 linoleic acid의 自動酸化에 의한 간섭효과를 피할 수 있을 것으로 판단되었다. 사진 1은 pH가 다른 基質溶液에 부광콩 種實의 上等液을 첨가하여 실온에서 4시간 후에 發色反應 정도를 나타낸 결과인데 그림 2의 결과와 일치하며 pH 9.0에서 發色도 가장 뚜렷하였다.

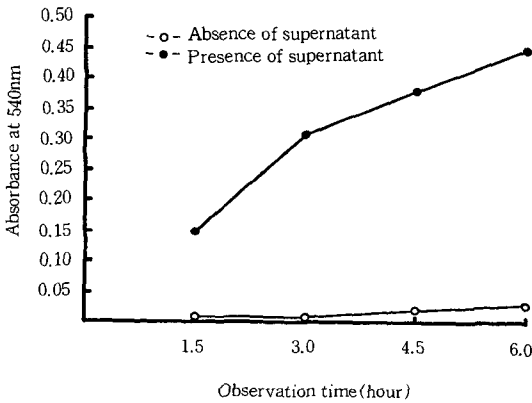
## 3) 緩衝劑의 種類와 濃度

보다 효과가 좋은 緩衝劑의 선발과 농도를 구명코저 0.05M, 0.1M, 0.2M의 Tris(pH 9.0)와 potassium borate(pH 9.0) 緩衝溶液에 linoleic acid를 2mM 첨가 후 1일 간격으로 5일동안 실온상태에서 自動酸化에 의한 發色程度를 측정 한 결과는 표 2와 같다.

potassium borate 緩衝劑 처리에서 보면 0.1M과 0.05M에서 시간이 경과함에 따라 自動酸化 정도가 증가하였고 0.1M에서 다소 안정한 경향을 보였으며 0.2M에서는 發色程度가 일정치 않아 불안정한 것으로 나타났으며 Tris 緩衝劑 처리에서는 0.05M 처리에서 反應의 안정상태가 양호하였다. 그림 3은 0.05M Tris를 緩衝溶液으로 하여 부광콩 種實의 上等液을 첨가하여 lipoxygenase-1의 酸化 觸媒에 의한 發色反應을 조사한 결과인데 식별 가능한 흡광도가 0.4 이상을 나타내는 데는 5~6시간이 소요되었다. 0.1M potassium borate 처리에서는 4시간 정도면 식별 가능한 發色反應을 나타내어(그림 1) 0.05M

**Table 2.** Absorbance variation by autoxidation of linoleic acid in different concentration of potassium borate and Tris buffer for 5 days at room temperature

Buffer (pH 9.)		Time				
		0 day	2 days	3 days	4 days	5 days
0.2M	Potassium borate	0.06	0.72	0.68	0.56	0.54
	Tris	0.25	0.64	0.87	1.06	—
0.1M	Potassium borate	0.22	0.67	1.24	1.30	1.66
	Tris	0.03	0.69	0.66	0.60	0.56
0.05M	Potassium borate	0.19	0.93	1.53	1.68	1.86
	Tris	0.06	0.43	1.39	1.53	1.84



**Fig. 3.** Absorbance variation of oxidation degree of substrate in Tris buffer by lipoxygenase-1 activity at different observation time.

Tris 보다는 0.1M potassium borate를 緩衝溶液으로 사용하는 것이 보다 효과적인 것으로 판단되었다.

#### 4) 基質溶液의 安定性

基質溶液의 安定性을 구명코저 基質溶液(0.1M potassium borate(pH 9.0), 0.1% Tween-

20, 2mM linoleic acid)를 준비한 후 밀봉상태에서 4℃의 냉장고와 실온(20~25℃)에서 보관하면서 2일간격으로 10일동안 基質의 自動酸化에 의한 발색정도를 조사하였다(표 3). 4℃의 냉장고에 보관할 경우 10일 정도까지는 안정하였고, 실온상태에서는 4일정도까지는 안정하였으나 6일부터는 linoleic acid가 自動酸化되기 때문에 정확한 실험결과를 기대할 수 없을 것으로 판되었다. Hammond et al.<sup>4)</sup>은 基質溶液을 不活性化 gas 처리하여 4℃에서 2주간 안전하게 보관할 수 있다고 보고하였는데, 본 실험결과에 의하면 不活性化 gas를 처리없이도 4℃에서 10일까지 보관하여 안전하게 사용할 수 있었다.

#### 5) 發色溶液의 添加量

基質溶液에 포함된 linoleic acid가 lipoxygenase-1에 의해 酸化되어 過酸化물을 생성하며 이때 反應溶液 2를 첨가하여 주면 KI에서 옥도이온을 방출하여 I<sub>2</sub>가 생성된 후 反應溶液 3에 있는 전분과 결합하여 發色反應이 나타나게 되는데 검정에 적당한 反應溶液 2(5ml of saturated KI per 100ml of 15% acetic acid)와 反應溶液 3(1% starch solution)의 첨가량을 구명코저 첨가량을

**Table 3.** Absorbance variation by autoxidation of substrate solution at different temperatures and storage periods

Temperature	Period					
	0 day	2 days	4 days	6 days	8 days	10 days
4℃	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01
Room temperature	0.01	0.01	0.02	0.07	0.31	0.36

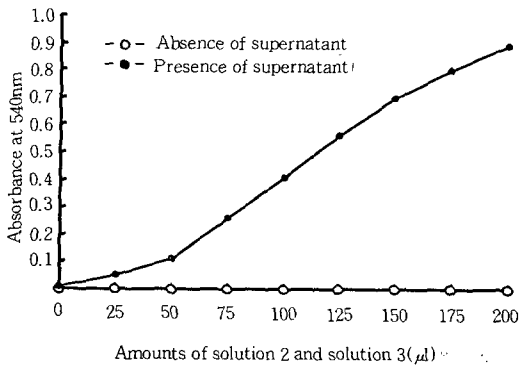


Fig. 4. Tendency of color development at different amount of solution 2 and 3.

달리하여 發色程度를 조사한 결과는 그림 4와 같다. 反應溶液 2와 3의 첨가량이 증가함에 따라 發色程度도 증가하였는데 100 $\mu$ l부터 發色程度가 뚜렷히 증가한 것으로 보아 검정에 필요한 충분한 양으로 판단 되었다. 본 실험결과에 의하면 基質溶液과 反應溶液 2, 3 각각의양이 일정하기 때문에 검정시 부피를 변동시키거나 酵素의 농도를 증가시킬 때 基質溶液과 反應溶液 2, 3의 양을 조절해야 할 것으로 사료되고, 또한 緩衝溶液에 용출된 콩 蛋白質등에 나타나는 우유빛이 원심분리 후에도 남아 있어서 發色反應에 방해작용을 하는 염려가 있으므로 콩 種實을 직접 사용하여 lipo-

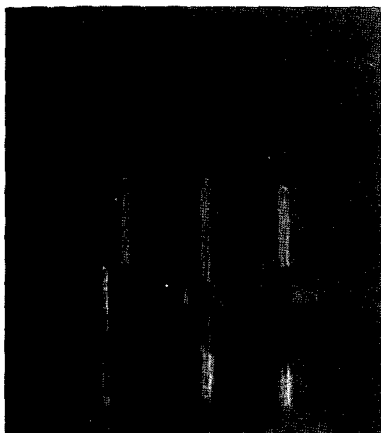
xxygenase-1의 활성을 검정할 때는 검정시료를 흔들림 없이 진행시켜야 할 것으로 사료되었다.

## 2. 檢定方法의 活用性 確立

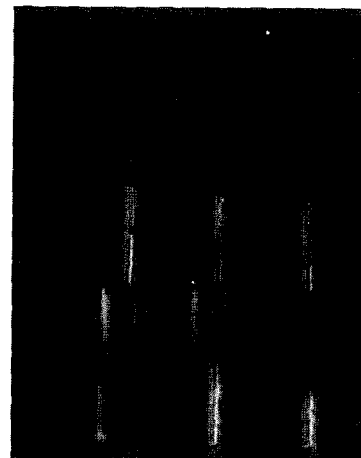
### 1) 檢定方法의 確立

檢定方法의 용인구명 실험에서 얻은 결과를 콩 種實에 직접적용하여 얻은 결과이다. 종피와 배가 제거되고 얇게 자른(1mm) 3립의 콩 種實을 test tube에 넣고 基質溶液(0.1M potassim borate(pH 9.0)을 4ml 첨가시킨 뒤 15분 경과후 反應溶液 2(포화된 KI 용액 5% 함유된 15% acetic acid)와 反應溶液 3(1% starch)을 각각 400 $\mu$ l씩 첨가시키고, 4시간, 24시간 경과 후 상층액의 發色程度의 변화를 관찰하였다. 콩 種實이 들어있지 않은 처리와 진품콩 2호 種實처리에서는 4시간 경과후에 상층액이 보라색으로 發色되지 않았고 lipoxygenase-1이 있는 부광콩 種實의 처리에서는 상층액의 보라색 發色反應을 관찰할 수 있었다(사진 2-A).

사진 2-B에서 보면 24시간 경과후에도 부광콩 種實처리에서 보라색의 發色反應이 유지될 수 있었다. 그러므로 lipoxygenase-1의 유무를 검정하기 위해서는 처리 후 4~24시간 이내가 안전한



A : 4 hours



B : 24 hours

Photo. 2. Color development of lipoxxygenase-1 for check(C), Jinpumkong(1), and Bukwangkong(2) at 4 and 24 hours.

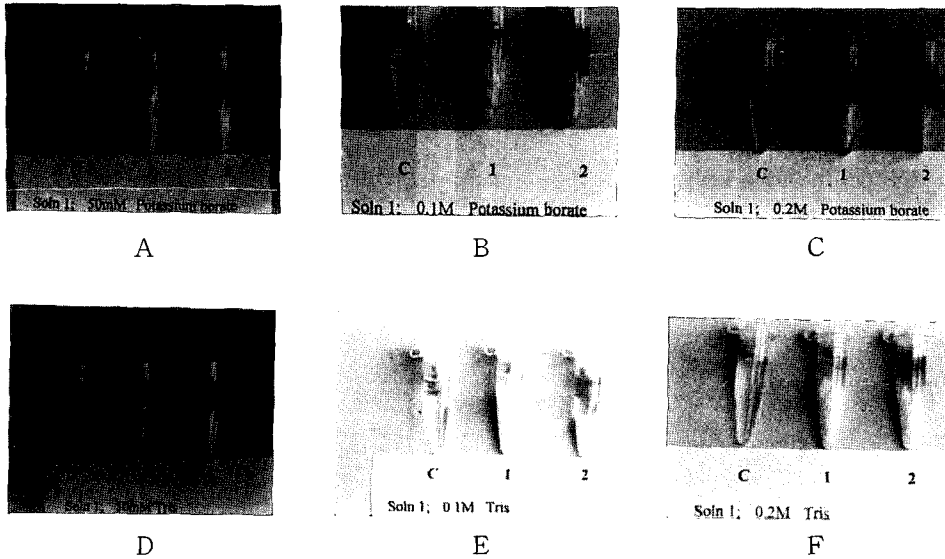


Photo. 3. Color development of lipoxxygenase-1 at different buffer solution. C, 1 and 2 indicate control, Jinpumkong and Bukwangkong, respectively.

것으로 판단되었다. Hammond et al.<sup>4)</sup>에 의하면 4~20시간 정도가 안정하고, 20시간 이후 부터는 發色程度가 약해져서 안전한 검정이 어렵다고 보고하였는데 이러한 원인은 基質의 농도, 種實 量 차이에 의해서 기인한 것으로 사료되지만 대체로 일치하는 경향있다.

檢定方法을 효율적으로 간편하게 하기위해서 반립의 種實을 재료로 하여 plastic tube(1.5ml)에서 수행되었는데, 緩衝劑로는 0.05M, 0.1M, 0.2M potassium borate와 Tris를 사용하였고 종피와 배가 제거된 반립의 種子를 면도칼로 얇게 자르고(1mm) plastic tube에 넣고 基質溶液(buffer(pH 9.0), 0.1% Tween 20, 2mM linoleic acid)를 1ml 첨가 후 15분 후 反應溶液 2와 3을 각각 100 $\mu$ l씩 첨가 시키고 4시간 경과후에 상층액의 發色反應이 관찰되었다(사진 3-A, B, C, D, E, F). Lipoxxygenase-1이 있는 부광콩의 種實처리에서 두 緩衝劑의 어느 농도에서나 보라색 發色反應을 보였다. 3수준의농도처리에서 대체로 Tris 보다는 potassium borater가 發色程度가 좋았고, Tris 緩衝劑 處理에서 보면 0.2M과 0.05M이 다소 양호 하였다(사진3-D). 이상의 실험 결과에 의하면, lipoxxygenase-1검정시 plastic tube

에서 간편하게 검정될 수 있을 것으로 판단되며, Tris와 potassium boratedm 3수준의 농도에서도 lipoxxygenase-1의 유무검정이 가능하나 Tris 보다는 potassium borate가 효과적이고 그중에서 0.1M potassium borate가 가장 좋았다(사진 3-B).

## 2) 品種間 反應

본 실험은 lipoxxygenase 同位酵素의 유무가 다른 계통 및 품종을 가지고 본 실험결과에서 얻은 방법을 적용하여 품종간 發色反應의 차이를 조사함으로써 본 檢定方法의 활용성을 보다 명확하게 하기 위하여 수행되었는데 基質溶液(0.1M potassium borate(pH 9.0), 0.1% Tween-20, 2mM linoleic acid) 1ml을 배와 종피가 제거되고 얇게(1mm) 자른 반립의 種子가 있는 각 plastic tube에 처리하여 주고 15분의 反應시간 후에 포화된 KI가 5% 함유된 15% acetic acid와 1% 전분용액을 각각 100 $\mu$ l씩 첨가한 뒤 실온(20~25 $^{\circ}$ C)에서 4시간 후에 發色程度를 비교한 결과이다(사진 4-A, B, C).

사진 4-A에서 보면 lipoxxygenase-1, 2, 3가 모두 존재하는 부광콩과 lipoxxygenase-1만 존재하

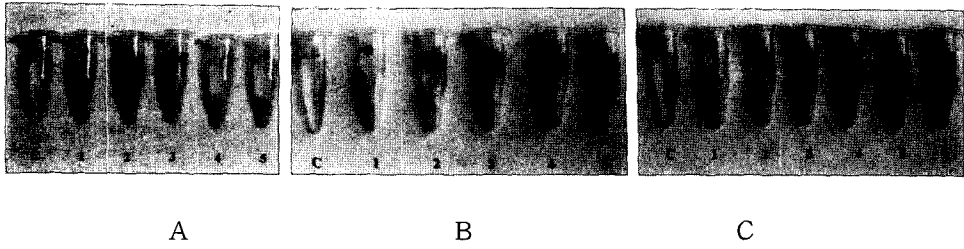


Photo. 4. Color development by lipoxygenase-1 activity of several soybean seeds.

- |                 |                 |                |
|-----------------|-----------------|----------------|
| A : c. Control  | 1. Jinpumkong 2 | 2. Bukwangkong |
| 3. Jinpumkong   | 4. Kedelee      | 5. PI 408251   |
| B : c. Control  | 1. Jinpumkong 2 | 2. Bukwangkong |
| 3. Hangkeumkong | 4. Eunhakong    | 5. Kwangankong |
| C : c. Control  | 1. Jinpumkong 2 | 2. Bukwangkong |
| 3. Namhaekong   | 4. Danyeobkong  | 5. Pureunkong  |

는 진품콩 種子 처리에서는 상층액에 보라색 反應을 보였고, control과 lipoxygenase-1이 缺乏된 진품콩 2호, Kedelee, PI 408251 種子 처리에서는 發色反應을 나타내지 않았다. Lipoxygenase-1, 2, 3가 모두 존재하는 한국재배 품종인 황금콩, 은하콩, 광안콩 種子에서는 發色反應을 나타내었다(사진 4-B). 단백질콩, 남해콩, 단엽콩, 푸른콩 種子 처리에서는 發色反應을 보였다(사진 4-C). 본 실험결과에 의하면 lipoxygenase-2와 3이 缺乏되고 lipoxygenase-1만 존재하는 진품콩 種子에서는 發色反應을 나타내었고, lipoxygenase-1이 缺乏되었으나 -2와 -3이 존재하는 Kedelee와 PI 408251 種子에서는 發色反應을 나타내지 않은 결과로 보아 본 檢定方法을 적용한다면 lipoxygenase-2와 3에 대한 간섭효과 없이 짧은 시간내에 다량의 재료를 효과적이고 안전하게 lipoxygenase-1의 유무를 검정할 수 있을 것으로 판단 되었다.

## 적 요

본 실험은 lipoxygenase-1 酵素 檢定을 위한 關聯要因 究明과 새로운 檢定方法의 活用性을 確立 함으로써 무두취 콩품종 육성사업에 도움이 될 수 있는 자료를 얻고져 수행되었다.

1. 基質溶液의 緩衝劑로서 Tris나 potassium bo-

rate가 효과적이었고 그중 0.1M potassium borate가 lipoxygenase-1의 검정에 있어 가장 효과적이었으며 적정 pH의 범위는 pH 8.5~9.0 이었다.

2. 基質인 linoleic acid의 적정 농도는 2mM 이었고 基質溶液은 4℃ 냉장고에서 10일 정도 실온 상태에서 4일 정도까지 안전하게 보관하면서 사용할 수 있었다.
3. 콩 種實의 lipoxygenase-1 유무 여부의 확인을 위한 가장 적당한 檢定方法은 종피와 배가 제거되고 얇게 자른 반립의 種子를 1.5ml 크기의 plastic tube에 넣고 基質溶液(0.1M potassium borate(pH 9.0), 0.1% Tween-20, 2mM linoleic acid)을 1ml 첨가해 주고 15분 경과 후 포화된 KI 용액이 5% 함유된 15% acetic acid와 1% 전분용액을 각각 100 $\mu$ l씩 첨가한 뒤 4시간 후에 상층액의 發色反應을 관찰하는 것으로 판명되었다.
4. Lipoxygenase-1이 존재하는 種實의 상층액에서는 보라색 發色反應을 보였고 lipoxygenase-1이 결핍된 種實의 상층액에서는 유유티 나타났으며 lipoxygenase-2와 3의 간섭효과는 없었다. 보라색 發色은 4시간부터 24시간까지 안정하였고 發色溶液(KI와 starch)첨가한 뒤에는 plastic tube를 흔들림없이 유지시켜야 했다.



## LITERATURE CITED

1. Axelrod B, Cheesebrough T.M and Laakso S. 1981. Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol.* 71: 441-451.
2. David J.S. 1981. Biochemical aspects of lipid derived flavors in legumes. *J. Agric. Food Chem.* 27(2): 234-239.
3. Davies C.S, Nielsen S.S and Nielsen N.C. 1987. Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64: 1428-1432.
4. Hammond E.G, Duvick D.N, Fehr W.R, Hildebrand D.F, Lacefield E.C and Pfeiffer W.T. 1992. Rapid screening techniques for lipoxygenase in soybean seeds. *Crop Sci.* 32: 820-821.
5. Hong E.H, Kim S.D, Kim Y.H, Seung Y. G and Kim H.S. 1992. Breeding for soybean with lipoxygenase-deficient seed. 1. Detection of lipoxygenase isozymes in soybean seed. *Res. Rept. RDA(U&I)* 34 (1): 47-52.
6. 김동훈. 1988. *식품화학* 2nd ed. 탐구당.
7. Kenneth survey. 1964. Spectrophotometer method for determination of lipoxygenase activity. *Plant Physiol.* 39: 65-70.
8. Kim Y.H, Kim S.D and Hong E.H. 1995. Present status and perspectives of soybean breeding program for high seed quality in Korea. *Korea Soybean Digest* 12(1): 1-20.
9. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and Kim S.H. 1994. Processing characteristics of soybean genotypes lacking lipoxygenase. *Korean J. Crop Sci.* 39(2): 171-174.
10. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, Lee S.H and Hong E.H. 1993. Breeding for soybean with lipoxygenase-deficient seed. 2. Inheritance of lipoxygenase-3 in soybean seeds and agronomic characteristics in soybean genotypes lacking lipoxygenase. *RDA. J. Agri. Sci.* 35(2): 111-115.
11. Kramer J.A, Johnson K, Dunham W.R, Sands R.H and Funk M.O. 1994. Position 713 is critical for catalysis but not iron binding in soybean lipoxygenase-3. *Biochemistry* 33: 15017-15022.
12. Lee H.S, Park E.H and Ku J.H. 1994. Studies on search for varieties of higher sulfur containing protein with lower lipoxygenase activity and their inheritance and selection efficiency for breeding of good quality soybean cultivar. 2. Variation of lipoxygenase activity and its inheritance with selection efficiency. *Korean J. Crop Sci.* 39(2): 180-186.
13. Scarrow R.C, Trimitsis M.G, Buck C.P, Grove G.N, Cowling R.A and Nelso M.J. 1994. X-ray spectroscopy of the iron site in soybean lipoxygenase-1: changes in coordination upon oxidation or addition of methanol. *Biochemistry* 33: 15023-15035.
14. Shibata D, Steczko J, Dixon J.E, Andrews P.C, Hermodson M and Axelrod B. 1988. Primary structure of soybean lipoxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 263: 6816-6821.
15. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, Hermodson M, Yazdanparast R and Axelrod. B. 1987. Primary structure of soybean lipoxygenase-1 *J. Biol. Chem.* 260: 10080-10085.
16. Survey K. 1964. Spectrophotometer method for determination of lipoxydase activity. *Plant physiol.* 39: 65-70.
17. Theorell H, Holman R.T and Akeson A. 1947. Crystalline soybean lipoxygenase. *Acta Chem. Scand.* 1: 571-576.
18. Wolf W.J. 1975. Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.* 23: 136-141.