

大豆發芽中の Lactic dehydrogenase 活性消長에 關한 研究

劉太鍾·金尙淳*

高麗大學校 農林大學·淑明女子大學校 家政大學

(1970年 1月 10日 수리)

Studies on changes of the lactic dehydrogenase activity during soybean germination

Tae Jong Yu · Sang Sun Kim*

Korea University, Suk. myung Women's University*

(Recieved Jan. 10, 1970)

Summary

In order to study the difference in metabolic efficiency of the cotyledon and seedlings of soybean during germination, the authors assayed lactic dehydrogenase activities in the two tissues for the purpose of comparison, with the following conclusions.

1. The LDH activity in the cotyledon of soybean increases during the 3 days after germination, followed by abrupt decrease during the later 3 days of germination.
2. The LDH activity in the seedlings of soybean increases during the 3 days after germination under fairly good correlation with the variation observed in the cotyledon; but, unlike the cotyledon LDH, the activity remains high through the later 3days of germination.
3. It is, therefore, concluded that the metabolic efficiency in the cotyledon seems to begin to stop at the 3rd day following germination, while the efficiency in the seedlings remains high.

I. 緒 言

Soybean의 성숙한 種子는 이미 형태적으로 고도의 分化를 이룬 胚組織을 가지고 있다. 丙외의 條件이 갖추어지면 이 胚組織은 급속히 發芽成長하는 것인바 이 組織은 高Energy 磷酸化合物의 含量高低에 따라 合成的的器官(幼葉, 幼莖 및 幼根)과 分解的的器官(子葉)의 2部分으로 大別된다⁽¹⁾

合成的的組織에서는 部位와 成長時期에 따라 分裂的乃至는 伸長的成長이 일어나는 것이며 이러한 成長機能의 分化에 對應하여 gas代謝面에서는 각각 呼吸과 有機的醱酵의 兩代謝的 分化를 볼 수 있는 것으로 알려져 있다.

그 成長樣式을 보면 發芽期間中 初期에는 완전한 成長을 하다가 急速한 成長을 거쳐 다시 완전

한 成長期로 轉入되고 뒤 이어 成長치 않는 末期에 이르는 것이며 이를 phase I, II, III, IV로 區分하기도 한다⁽²⁾

Izawa⁽²⁾에 의하면 Soybean의 成長에 따른 重量增加는 주로 水分섭취에 起因하거나 成長初期에 있어서는 polymerized matter 즉 단백질이나 녹말 및 세포막성분 등은 溶解性 물질 즉 당류나 아미노酸 등의 含量增加와 併行하여 증가하나 성장 후기에 있어서는 溶解性 물질의 蓄積이 乾燥重量增加의 要因이 된다는 것이다.

뿐만 아니라 Oota⁽¹⁾에 의하면 이러한 성장기간에 있어서는 胚組織의 呼吸系에 關해서 볼 때 各器官과 子葉과의 사이에는 根本的인 차이가 있다는 것이다.

이를 테면 子葉에는 Citric acid dehydrogenase

의 활성이 전혀 없는 反面 단 器官에는 상당히 活性을 보인다던가 하는 사실이다. 이와 같은 citric acid dehydrogenase의 缺如는 Tricarboxylic acid cycle의 缺如를 의미하는 것으로서 이는 子葉組織에 NADP가 존재하지 아니한다는 사실과 有關하다고 보고 있다.

著자들은 이와같은 Soybean 成長期의 器官에 따른 차이가 子葉과 胚軸 및 幼根 등의 사이에도 있을 것이 豫想되어 본 실험에서 lactic dehydrogenase (LDH)의 活性을 비교해 본 것이다.

일반으로 無機養分의 섭취 器官인 幼根과 有機養分의 形成 器官인 子葉 사이에는 物質의 交流를 통하여 밀접한 共軛關係가 존재하고 있음은 잘 알려진 사실이며 이 共軛關係가 本格的으로 움직이는 것은 獨立營養의 生活 즉 성장함에 따라 有機養分의 공급이 子葉에서의 CO₂ 同化作用에 의하여 이루어지는 본래의 Vegetative stage의 생활이 시작되는 때부터라 할 것이다.

이 Vegetative stage에 이르는 준비 단계로 볼 수 있는 發芽期의 從屬인 영양 조건 하에서는 幼葉과 幼根을 연결하는 一種의 pipe의 존재인 幼莖의 성장이 급한 것이다. 子葉에서 seedling으로 流入되는 貯藏物質의 대부분이 이와 같은 幼莖物質로 轉化한다는 것은 幼莖에서 이루어지는 形成反應은 子葉의 分解의 반응과 좋은 對照를 이룰 것이 틀림없는 것이고 이는 LDH 같은 대표적 대사 中樞의 역할을 감당하는 酵素의 活性에 반영될 것이기에 본 실험을 시행하여 所期의 結果를 얻었기 여기에 발표하는 바이다.

II. 實驗方法

1. Soybean 試料

市販의 大豆를 basket에 넣고 室溫으로 維持된 暗所에서 1주일간 發芽케 하고 1일 6회 이상 水分을 공급하였다.

試料는 發芽以前과 以後 1, 3, 5 및 6일의 5群으로 나누고 各群에서 子葉과 그 밖의 器官(이를 seedling이라 稱하기로 함)으로 區分하여 다음과 같이 處理하였다.

즉 子葉과 seedling 조직을 各群에서 pool하여 0.25M의 Sucrose 용액으로 미리 냉장고에 넣어서 寒冷한 Mortar에서 homogenize시켜 40%(W/V)의 homogenate를 만들었다.

이 homogenate를 3겹의 gauze로 걸른 다음 冷凍室에서 600×g로 10분간 遠心分離하고 다시 殘渣를 前記 sucrose 용액으로 洗滌하여 다시 10,000

×g로 10分間 遠心分離한 다음 그 上澄液을 試料로 하였다.

2. LDH 活性測定

Beckman Model DU spectrophotometer를 사용하여 Neiland의 방식⁽³⁾을 따랐다.

즉 Cuvette에 다음과 같이 反應混合物을 넣고 lactate를 基質로 삼았을 때 LDH의 作用으로 말미암은 NAD의 還元으로 나타나는 NADH가 갖는 340m μ 에서의 optical density를 測定한 것이다.

反應液은 180 μ mole의 glycine-NaOH buffer(pH 10.0)와 50 μ mole의 Na-lactate, 그리고 2 μ mole의 NAD⁺이었으며 0.02mole의 組織 homogenate를 사용하여 반응을 일으켰다.

340m μ 에서의 NADH 生成에 起因하는 optical density의 증가를 NADH의 extinction coefficient로써 計算하여 homogenate 1ml가 1분간 incubation 시킴으로서 생성하는 NADH의 μ mole 數로서 LDH의 活性을 表記하되 매번 triplicated data를 평균하고 6회의 發芽 실험 結果를 統計處理하였다.

本 실험에 사용한 Na-lactate는 市販의 85% lactic acid를 同量의 H₂O로 희석하고 그 10ml에 5N-NaOH를 2ml씩 가하여 phenolphthalein을 indicator로 삼고 Alkali 性이 되도록한 다음 80°C까지 가열하여 inner ester를 가수분해하고 난 다음 94ml까지 희석하여 0.5M의 Na-lactate를 만들어 사용한 것이다.

또한 본 실험에 사용한 NAD⁺는 Sigma Chemical Co. 製品이다.

III. 結果 및 考察

제 1표에 요약한 바와 같이 發芽以前에는 總 LDH 活性은 homogenate ml 당 1.63±0.03 unit 이었으며 그중 약 80% 以上이 子葉에 있는 活性으로서 1.33±0.03 unit 이고 나머지가 seedling의 것으로 0.30±0.03 unit 이었다.

이와같은 子葉과 seedling 사이의 活性分布率은 그대로 흡사히 維持되면서 發芽 3日까지 이르고 있었으니 總活性度는 發芽 1, 3 兩日에는 각각 2.3±0.09 및 9.98±0.42 unit로서 가장 높았던 3일 만에 發芽前의 약 6배 이상의 活性에 도달하였다.

子葉이나 seedling 역시 흡사한 비율로 3일에 이르러 peak value를 보였으니 前者는 1, 3일에 각각 1.73±0.18, 8.83±0.91 unit 이었고 後者는 각각 0.60±0.08 및 1.60±0.12 unit가 되었다.

이와같은 관계 즉 發芽 3日까지 相關性있게 子葉이나 seedling에서 다같이 LDH 活性이 上昇하

Table 1. The changes of LDH activities during soybean germination. (Activities are expressed in terms of $\mu\text{moles} \times 10^2$ of NAD^+ reduced per min per ml of the homogenates.)

Period of germination (days)	0	1	3	5	6
Cotyledon	1.33 ± 0.03	1.73 ± 0.18	8.38 ± 0.91	1.29 ± 0.03	0.45 ± 0.12
Seedling	0.30 ± 0.03	0.60 ± 0.08	1.60 ± 0.12	1.33 ± 0.04	1.31 ± 0.08
Total	1.63 ± 0.03	2.33 ± 0.09	9.98 ± 0.42	2.62 ± 0.06	1.76 ± 0.08

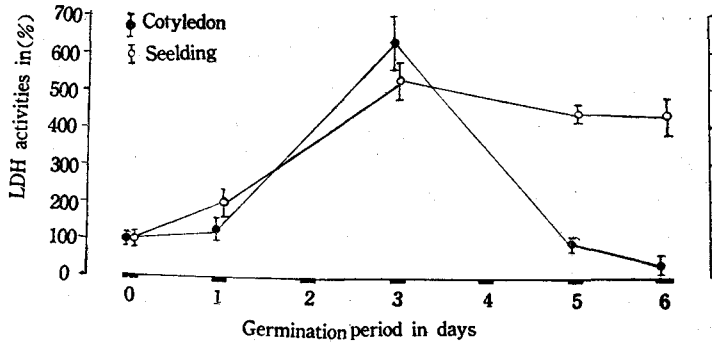


Fig. 1. Changes of LDH activities during soybean germination

는 것은 제 1도에서도 엇볼 수가 있다. 그러나 發芽後 5, 6日間에는 樣相이 달라져서 子葉에서는 각각 1.29 ± 0.03 및 0.45 ± 0.12 unit 로 激減하여 가는 反面 seedling 에서는 1.33 ± 0.04 와 1.31 ± 0.08 unit 로서 3일 때부터 별다른 변화없는 plateau value 를 維持하고 있었다. (제 1 표와 제 1 도)

總活性에서는 減少値를 보이게 되어 각각 2.62 ± 0.06 과 1.76 ± 0.08 unit 로 減少하였다. 그러므로 제 1도에서 알 수 있듯이 子葉은 發芽以前의 약 1/3로 減少한 것을 알 수 있고, 한편 seedling 에서

는 發芽以後 3일째 부터는 계속 以前値의 4~5배의 活性을 維持하면서 큰 변동이 없음을 보았다.

따라서 제 2도에서 분명하듯이 發芽以後 3일간은 子葉과 seedling 이 매우 상관성 있게 增加하였음을 알 수 있다.

한편 發芽期間中の 子葉과 seedling 兩者間의 LDH 活性을 相互比較하여 보면 發芽와 同時에 3일에 이르는 前半期에서는 子葉이 seedling 에서 보다 훨씬 높은 LDH의 活性을 보이나 後半期에 이르러서는 이 關係가 逆轉되어서 子葉보다 seedling 에서 도리혀 많은 活性을 보였으며 이 關係는 제 3

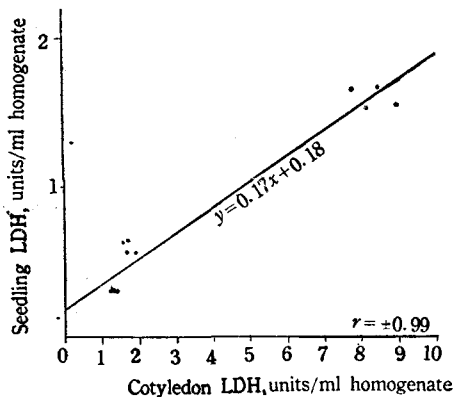


Fig. 2. Correlation of soybean sprout and cotyledon LDH activities for three days of germination

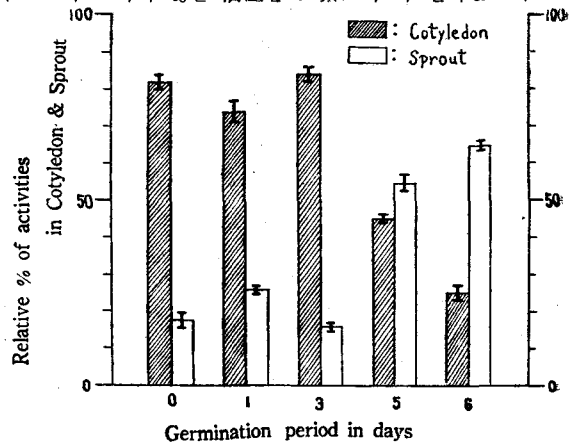


Fig. 3. Comparison of LDH activities in soybean sprout and its cotyledon during germination

도의 histogram에서 뚜렷이 알 수 있다.

이상에서 분명한 것은 發芽前半期에서는 子葉이나 seedling 다 같이 활발히 代謝率이 증가하는 것이나 後半에 이르러서는 前者에서는 점차 減退되는 반면 seedling만은 계속해서 新陳代謝가 왕성함을 엿볼 수 있다.

李等⁽⁴⁾이 밝힌 바도 있지만 大豆는 發芽期間中에 下部로 내려갈수록 keto 酸의 含量이 증가하므로 Amino 基轉移作用이 왕성하여짐을 볼 때 seedling이 계속 높은 LDH 活性을 維持하는 것은 TCA cycle이 없는 子葉에 비할 때 활발한 炭水化物的 代謝가 이루어지고 있음을 알 수 있다.

반면 子葉에서는 이 器官이 Autotrophic system인 soybean에서 分解的代謝를 營爲하여 莖軸을 통해 그 幼莖이나 幼根의 從屬的營養狀態를 뒷 받침하는 저장器官임을 다시 한번 分明히 한 것으로 본다.

즉 蛋白質이나 呼吸率 등의 변화를 보더라도 子葉에서는 發芽前半期인 3일이 지나면 減少함에도不拘하고 幼根, 胚軸等에서는 한결같이 增加乃至는 plateau value를 持續하는 것으로 보아도 알 수 있다⁽¹⁾.

前半期에 LDH 活性이 높아지는 것은 이 시기가 cell division 뿐만 아니라 cell elongation이 왕성한 때이고 특히 non-reducing sugar에 대한 reducing sugar의 비율과 Protein N에 대한 non-Protein N의 비율이 각각 16과 2.5까지 上昇하는 것으로 보아도⁽²⁾이 時期에 얼마나 왕성한 代謝를 영위하게 되는가를 알 수 있다.

그러나 後半에 이르러서는 細胞의 elongation이나 division이 완만한 속도로 떨어질 뿐 아니라 蛋白質도 蓄積되지 아니하고 前記한 non-reducing sugar에 대한 reducing sugar의 비율과 Protein N에 대한 non Protein N의 비율이 각각 32와 4.8에 이르는 것을 볼 때⁽²⁾ 子葉의 代謝活性이 停止되어 감을 알 수 있고, 이것은 본 실험의 LDH 活性에 의해서도 首肯할 수가 있다.

최근 李와 金⁽⁵⁾이 보고한 바에 의하면 前半期の 子葉 LDH는 주로 M-LDH로서 이의 증가가 總活性 增加의 主要原因이라고 한다.

원래 動物組織에서는 H-LDH가 M-LDH에 비해서 많은 心臟같은 臟器와 後者が 많은 骨骼筋같은

臟器가 있는 바⁽⁶⁾ 好氣性組織은 H-LDH를, 그리고 嫌氣性인 組織은 M-LDH를 많이 含有하는 것으로 알려져 있다.

따라서 大豆의 發芽前半期에 M-LDH가 原因이 된 總 LDH의 活性增加는 嫌氣性解糖過程의 代謝가 活潑함을 暗示한다 할 것이다.

뿐만 아니라 子葉에는 NADP의 缺如로 말미암아 TCA cycle의 效率이 무시될 것을 고려할 때 嫌氣性 glycolysis를 통해서 代謝를 營爲하여 發芽에 要하는 energy의 공급을 하게되고 점점 後半에 이르러서는 metabolic dynamo가 도리혀 seedling편으로 기울자 이 器官에는 계속 높은 LDH 活性이 維持되나 子葉에서는 減退되어가는 것으로 思料된다.

VI 要 約

大豆의 發芽期間 6日間に 있어서 子葉 및 seedling 兩組織의 lactic dehydrogenase 活性이 어떻게 변화하며 그 변화가 어떤 相關性을 갖는가를 살펴 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 子葉의 LDH 活性은 發芽後 3일까지의 前半期에는 계속 增加하나 그 後半의 3日間は 激減한다.

2. Seedling의 LDH 活性 역시 發芽後 3日의 前半期에서는 子葉 LDH의 增加와 意義있는 相關下에 增加하나 子葉과는 달라서 後半에서도 그 上昇值를 계속 維持한다.

3. 따라서 大豆 子葉은 發芽後 3일이 되면 代謝效率이 顯著히 減退하나 seedling에서는 계속 代謝效率이 높이 維持됨을 알았다.

Literature Cited

1. Y. Oota; *Science* (Jap); 23, 60 (1953)
2. M. Izawa; *Jap. J. Bot.*, 16, 135 (1958)
3. Neiland, J.B.: *Methods in Enzymology*, ed. by Bayer *et al.*, Academic Press, New York, Vol. I (1955) p. 449
4. Lee, K.Y., Lee, C.Y., Kim, S.W., & Koh, J. H.; *Seoul Univ. J.*, 7, 55 (1958)
5. Lee, K.S. & Kim, S. W.; (In Press), 1969
6. Markert, C.L., & Miller, F.; *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45, 753 (1959)