

녹두 Lipoxygenase의 정제 및 특성

김성렬·이희수

충남대학교 식품가공학과

Purification and Characterization of Mungbean Lipoxygenase

Seung-Yeol Kim and Hee-Soo Lee

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejeon

Abstract

Mungbean Lipoxygenase was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-sephacel column chromatography and sephadex G-200 gel filtration. The specific activity of purified enzyme was 23.4U/mg protein and the yield was 12%. Optimal activity of the enzyme was observed at pH 8.4 and the enzyme had Km value of 0.25mM for linoleic acid. The enzyme was stable in the range of pH 5.0-7.0 and at temperature below 50°C. The enzyme activity was inhibited by antioxidants such as nordihydroguaiaretic acid and chelating agents.

서 론

녹두(*Phaseolus vidissimus* TENOR)⁽¹⁾는 인도지방이 원산지로서 주로 동양 각국에서 재배 이용되어 왔으며 그의 가공품은 독특한 향미를 지니고 있어 청포(녹두묵), 빈자떡, 떡소, 떡고물 및 녹두죽의 원료로서 널리 이용되어 왔고 녹두나물도 풍미가 양호하여 콩나물과 함께 애용되어 왔다. 녹두중에는 nuclease, amidase, invertase, amylase 및 lipoxygenase가 존재하는 것⁽²⁾으로 알려져 있으나 이들 효소에 대한 효소학적 연구는 거의 찾아 볼 수 없다.

Lipoxygenase (E. C. 1, 13, 1. 13)는 cis, cis-1, 4pentadiene구조를 가진 지방산을 산화시키는 효소로서 식물계에 널리 분포되어 있고 특히 두류중에는 활성이 높은 lipoxygenase가 존재하는 것⁽²⁾으로 알려져 있다. 이 효소는 두취생성⁽³⁾을 유발할 수 있다고 알려짐에 따라 두유를 제조할 때 lipoxygenase의 작용을 방지하여 두취생성을 억제시키는 것이 중요하다고 인정되고 있다. Lipoxygenase에 관한 연구로서는 대두 lipoxygenase⁽⁴⁻⁷⁾를 비롯하여 peas^(8,9), peanuts^(10,11), alfafa⁽¹²⁾ 및 broad bean^(13,14)의 lipoxygenase에 관하여는 육종학적 연구⁽¹⁵⁻¹⁷⁾도 이루어져 머지않아 lipoxygenase를 전혀 함유하지 않은 품종이 개발될 가능성까지 보이고 있다. 이러한 점에 비추어 오래전부터 재배이용되어 왔으나 효소학적 연구가 거의 이루어지지 않은 녹두중의 lipoxygenase를 추출 정제한 후 그의

효소학적 성질을 검토하여 몇가지 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 녹두는 충북 보은지방에서 재배한 재래종 녹두를 구입하여 5°C 내외의 온도에 저장해 놓고 사용하였다.

조효소액의 조제

정선한 시료용 녹두를 wiley mill로 40mesh가 되도록 분쇄한 분말을 10배량의 0.2% triton과 50% PVP를 함유한 0.1M tris-HCl 완충액(pH5.5)에서 60분간 진탕추출하여 cheese cloth로 거른다음 5000rpm으로 15분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다.

Lipoxygenase의 활성도 측정

Surrey⁽¹⁸⁾의 Spectrophotometric method를 사용하였으며 7.5×10⁻³M linoleate 용액을 stock solution으로 하여 실온하에서 (20~25°C) 3ml의 기질용액과 0.1ml의 효소액을 spectrophotometer의 cell 내에서 반응시키면서 234nm에 있어서의 흡광도의 증가를 측정하였으며 1분간에 0.001의 흡광도를 증가시키는데 소요된 효소량을 1unit로 하여 표시하였다.

단백질의 정량

효소의 정제 과정에서 있어서의 단백질 정량은 280 nm에서의 Optical density를 측정 표시하였고 순도를 위한 단백질의 정량방법으로는 spectro-photometer 법⁽¹⁴⁾ 및 Lowry 법⁽¹⁹⁾을 병용 하였으며 spectro-photometer를 사용한 단백질 함량은 다음식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Protein (mg/ml)} = 1.450 \cdot D_{280} - 0.760 \cdot D_{260}$$

효소의 정제

유안분획; 전술한 바와같이 제조된 조효소액을 0~0.75포화의 유안용액중에서 염석한 후 1야간 0.01M tris-HCl 완충액 (pH5.5)중에서 투석 한 액의 효소역가를 측정하여 비교하였다.

DEAE-Sephacel column chromatography: 투석한 조효소액을 50% polyethyleneglycol용액중에서 농축한 후 0.01M tris-HCl 완충액으로 평형시킨 DEAE-Sephacel column (2.5×20cm)에 주입시키고 0~0.5M sodium chloride용액을 linear gradient로 하여 25ml/hr의 유속으로 6.5ml씩 분취하였다.

Sephadex G-200 filtration

DEAE-Sephacel column chromatography에서 효소활성이 강한 분획을 모아서 탈염·농축시킨 후 0.01M tris-HCl 완충액 (pH5.5)으로 평형시킨 Sephadex G-200 column (1.5×20cm)에 주입하여 25ml/hr의 유속으로 3.5ml씩 분취하였다.

효소학적 성질

기질 특이성; 동일농도(40mg%)의 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, methyl linoleate, methyl linolenate를 기질로 하였을 때의 효소활성을 측정하여 비교하였다.

항산화제의 영향; 95%의 ethanol용액에 용해한 nordihydroguaiaretic acid (NDGA), butylated hydroxytoluene (BHT), propylgallate, ascorbic acid를 첨가한 기질용액을 사용하여 효소활성을 측정하여 비교하였다.

효소작용 억제제의 영향; 기질용액에 sodium cyanide, sodium azide, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), mercuric chloride, sodium arsenite, iodoacetate, potassium ferricyanide를 $0.1 \times 10^{-4}M$ 및 $0.1 \times 10^{-6}M$ 이 되도록 첨가하여 효소활성을 측정하여 비교하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

유안분획하여 얻어진 조효소액을 column chromatography와 gel filtration하여 단백질과 효소역가를 측정 한 결과는 Fig.1 및 2와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 fraction NO. 12~20 ($0.35 \sim 0.4 \times 10^{-2}M$ NaCl) (F₁)과 fraction NO. 26~46 ($0.5 \sim 0.9 \times 10^{-2}M$ NaCl) (F₂) 및 fraction NO. 64~72 ($12 \sim 15 \times 10^{-2}M$ NaCl) (F₃)의 3개의 active peak를 얻었다. soybean lipoxygenase⁽²⁰⁾의 경우 DEAE-Sephacel column chromatography에 의하여 3개의 isozyme을 분리하였다는 보고가 있어 이들 3peak가 isozyme일 가능성이 있다고 생각되나 이들중 peak가 가장 큰 (F₂)를 main lipoxygenase peak로 인정하여 이 fraction을 모아 Sephadex G-200 filtration을 실시한 결과 protein peak와 activity peak가 일치하는 chromatogram을 얻었다.

이상의 정제과정을 요약한 결과는 Table 1에 나타낸 바와 같으며 유안염석, DEAE-Sephacel column chromatography, sephadex G-200 filtration과정을 거쳐 specific activity가 23.4U/mg, activity yield는

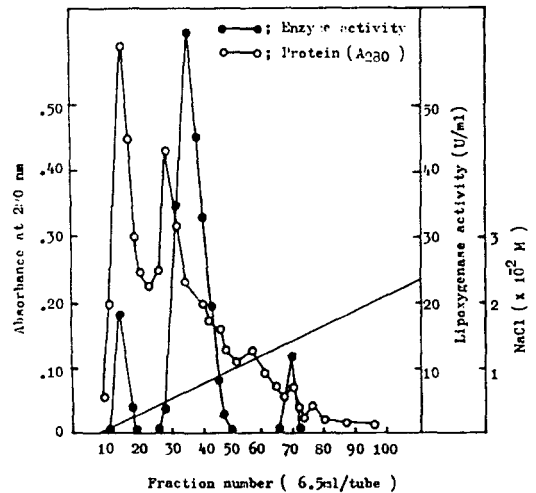


Fig. 1. DEAE-sephacel column chromatography of mungbean lipoxygenase

The column (2.5×20cm) was loaded with 10ml of crude enzyme and eluted with a linear NaCl gradient (0-0.5M) in an elution volume of 500ml) in 0.01M Tris-HCl buffer, pH5.5 at flow rate of 25ml/hr and the fraction of 6.5ml were collected. A unit of enzyme was defined as that amount which produced a change in O.D. of 0.001 per min at 234nm.

Table 1. Purification steps of mungbean lipoxygenase

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U / mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude	3765.0	1600	0.42	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	879.8	600	0.68	1.42	37.5
DEAE-sephacel	44.0	320	7.30	17.38	20.0
Sephadex G-200	8.2	192	23.40	55.71	12.0

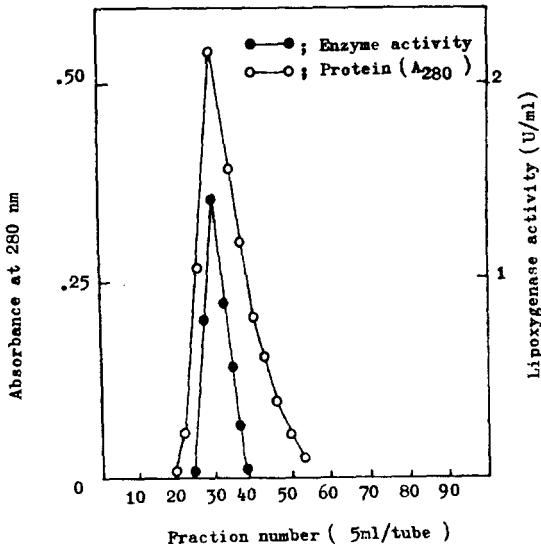


Fig. 2. Gel filtration of mungbean lipoxygenase on Sephadex G-200

12%이었으며 전기영동법에 의하여 정제효소의 순도를 검정하였다.

효소학적 성질

효소활성에 미치는 pH의 영향 : 0.1M tris-HCl 완충액을 이용하여 pH가 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같으며 녹두 lipoxygenase의 최적 작용pH는 8.4이었다. Soybean lipoxygenase⁽³⁾에는 L-1, L-2, L-3의 3isozyme이 존재하며 L-2, L-3의 최적pH는 pH6.5이고 L-1은 pH9.0이었다고 보고된 바 있고 peas lipoxygenase⁽²⁾의 최적작용 pH는 pH6.5, broad bean lipoxygenase⁽¹⁾는 pH6.0, peanut lipoxygenase⁽¹¹⁾는 pH8.5~9.0이었다고 보고된 바 있어 lipoxygenase의 추출원 및 isozyme에 따라 최적작용 pH가 각각 다르다는 것을 알 수 있다.

한편 pH가 효소의 안정성에 미치는 영향은 Fig. 4와 같으며 pH5.0~7.0에서는 비교적 안정하였으나 pH4.0

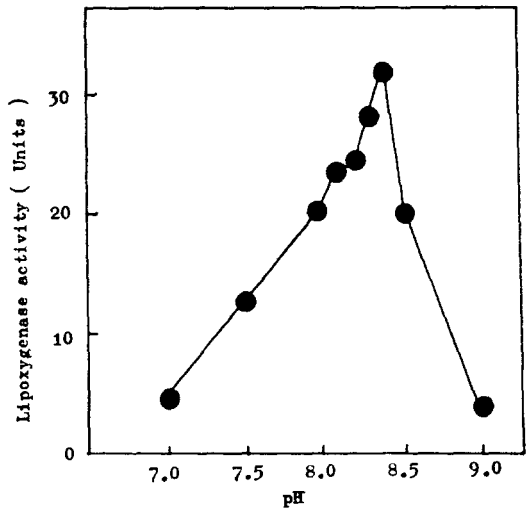


Fig. 3. Effect of pH on the activity of mungbean lipoxygenase

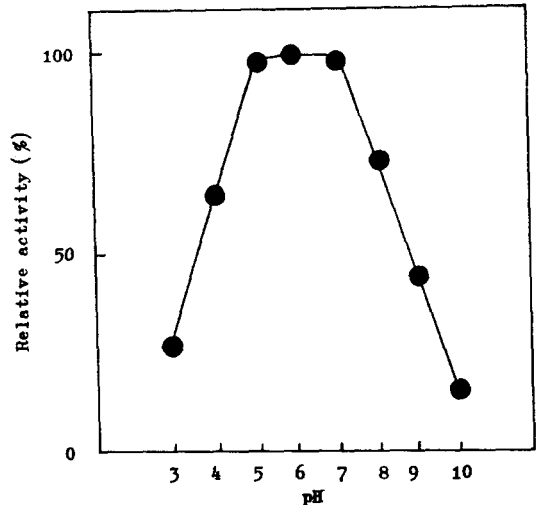


Fig. 4. Effect of pH on stability of mungbean lipoxygenase

The enzyme solution was kept for 30 min in various buffers with pH ranging from 3 to 10 and the remaining activity was assayed. Buffers used were acetate (pH 3-5) and tris-HCl (pH6-10).

및 pH8.0에서는 각각 32% 및 25% 효소활성의 실활을 나타내었다.

효소활성에 미치는 온도의 영향: 본 효소의 온도 안정성을 검토한 결과는 Fig.5에 나타낸 바와 같이 50°C까지는 안정하였으나 60°C에서는 약50%의 실활현상을 나타내었다. Broad bean lipoxygenase⁽¹³⁾ 및 rice lipoxygenase⁽²¹⁾는 60°C까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 매우 불안정한 것으로 알려져 있으며 potato tuber lipoxygenase는 57°C에서는 50%, 75°C에서는 100% 실활하였다고 보고된 바 있다. 이들 보고와 본 실험 결과를 비교하였을 때 녹두 lipoxygenase의 안정성은 다소 약한 편이라고 말할 수 있다.

기질의 농도를 달리하였을 때의 효소의 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot한 결과는 Fig.6과 같으며 본 효소의 Km값은 $2.5 \times 10^{-4} M$ 이었다.

기질 특이성: 본 효소의 기질 특이성을 측정한 결과는 Table2에 나타낸 바와 같으며 cis-1,4-pentadiene구조를 갖지않은 Oleic acid를 기질로 하였을 때는 효소활성이 나타나지 않았다. 한편 barley lipoxygenase⁽²³⁾는 linoleic acid에 비하여 linolenic acid는 64%, methyl linoleate는 40%의 활성을 나타내었고 pea lipoxygenase⁽⁹⁾는 linoleic acid에 비하여 methyl linoleic acid는 50%의 활성을 나타내었으며 corn lipoxygenase⁽²⁴⁾는 linoleic acid에 비하여 linolenic acid는 102%, methyl linoleate는 21%의 활

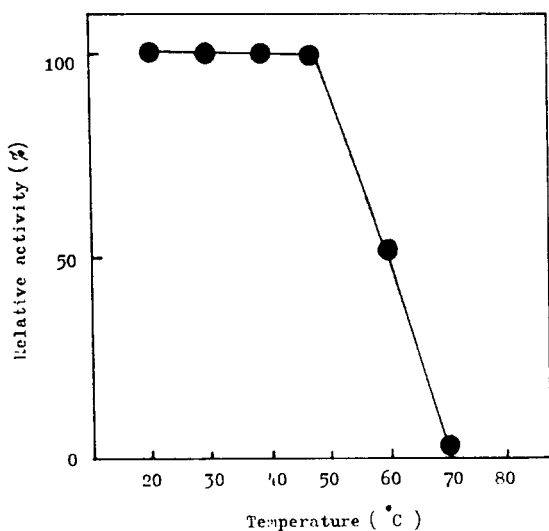


Fig. 5. Effect of temperature on the enzyme activity
The enzyme solution was incubated at various temperatures for 2 min.

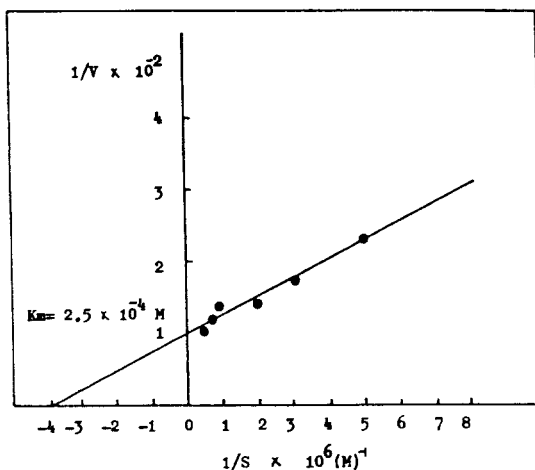


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for the determination of the Michaelis constant for mungbean lipoxygenase

Table 2. Substrate specificities of mungbean lipoxygenase

Substrates	Relative activity (%)
Linoleic acid	100
Linolenic acid	22
Methyl linoleate	44
Methyl linolenate	11
Oleic acid	—

성을 나타내었다고 보고된 바 있다. 이들의 보고와 본 실험결과를 비교하였을 때 녹두 lipoxygenase는 다른 lipoxygenase에 비하여 linolenate에 대한 활성이 비교적 낮은 효소임을 알 수 있다.

항산화제의 영향: Table 3는 효소활성에 미치는 항산화제의 영향을 검토한 것으로 lipoxygenase의 작용을 특이적으로 저해하는 nordihydroguaiaretic acid에

Table 3. Effects of antioxidants on the activity of mungbean lipoxygenase

Antioxidant	Inhibition (%)	
	Antioxidant conc.	
	$0.1 \times 10^{-4} M$	$0.1 \times 10^{-6} M$
NDGA*	89	86
Ascorbic acid	87	75
Propyl gallate	75	75
BHT*	50	—

* NDGA: Nordihydroguaiaretic acid

* BHT: Butylated hydroxytoluene

Table 4. Effect of chelating agents and thiol reagents on the activity of mungbean lipoxygenase

Inhibitor	Inhibition (%)	
	Inhibitor conc.	
	$0.1 \times 10^{-4} M$	$0.1 \times 10^{-6} M$
Sodium cyanide	55	55
EDTA	50	20
Sodium azide	33	33
Iodo acetate	30	22
Sodium arsenite	11	—
Potassium ferricyanide	11	—
Mercuric chloride	10	10

의해 약 90% 저해율을 나타내었다. Broad bean⁽¹³⁾과 potato tuber⁽²²⁾ lipoxygenase는 NDGA에 의하여 각각 88%, 66%의 저해율을 나타내었다고 보고된 바 있다. 저해제의 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같으며 Siddiqi⁽¹⁴⁾ 등은 $0.1 \times 10^{-4} M$ 의 sodium azide가 broad bean lipoxygenase 활성을 30% 저해하였다고 보고하였고 Grosch⁽²⁵⁾은 EDTA가 사과 lipoxygenase 활성을 54% 저해하였다고 보고한 바 있다.

요 약

유안염석과 column chromatography 및 gel 여과 등으로 비활성이 $23.4 U/mg$ 이 되는 정제된 mungbean lipoxygenase를 12%의 수율로 얻었다. 정제효소의 작용 최적 pH는 8.4이었으며 linoleic acid를 기질로 사용하였을 때 Km값은 $0.25 mM$ 이었다. 정제효소는 pH 5.0~7.0범위와 $50^{\circ}C$ 이하의 온도에서 비교적 안정하였다. 효소의 활성은 항산화제인 NDGA에 의해 현저히 저해되었고 chelating agents에 의해 저해되었다.

문 헌

- Galliard, T. and Chan, H.W.S.: *The bio-chemistry of plants Academic Press* 4, 131 (1981)
- Yoon, S. and Klein, B.P.: *J. Agric. Food Chem.* 27, 955 (1979)
- Grosch, W. and Laskawy, G.: *J. Agric. Food Chem.*

- 23,(4), 791 (1975)
- Hildebrand, D.F. and Hymowitz, T.: *J.A.O.S.* 583 (1981)
- Andrawis, A., Pinsky, A. and Grossman, S.: *Physochem.* 21(7), 1523 (1982)
- Hildebrand, D.F. and Kito Makoto: *J. Agric. Food Chem.* 32, 815 (1984)
- Holman, R.T.: *Biochem.* 15, 403 (1947)
- Haydar, M., Steele, L. and Hadziyer, D.: *J. Food Sci.* 40, 808 (1975)
- Eriksson, C.E. and Svensson, S.G.: *Biochem. Biophys. Acta.* 198, 449 (1970)
- Pattee, H.E. and Singleton, J.A.: *J. Agric. Food Chem.* 27,(2), 216 (1979)
- St. Angelo, A.J., Ory, R.L.: *J. Agric. Food Chem.* 23(2), 216 (1975)
- Wheder, E.L. and Finley, J.W.: *J. Agric. Food Chem.* 29, 912 (1981)
- Al-obaidy, H.M. and Siddiqi, A.M.: *J. Food Sci.* 46, 622 (1981)
- Al-obaidy, H.M. and Siddiqi, A.M.: *J. Food Sci.* 46, 597 (1981)
- Kitamura, K., Davies, C.S. and Nielsen, N.C.: *Crop Sci.* 23, 924 (1983)
- Kitamura, K.: *Agric. Biol. Chem.* 48(9), 2339 (1984)
- Hildebrand, D.F. and Hymowitz, T.: *Crop Sci.* 22, 851 (1982)
- Surrey, K.: *Plant Physiol.* 39, 65 (1964)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
- Christopher, J., Pistorius, E., Axelod, B.: *Biochim. Biophys. Acta.* 198, 12 (1970)
- Yamamoto, A., Fujii, Y., Yasumoto, K., Mitsuda, H.: *Agric. Biol. Chem.* 44 (2), 443 (1980)
- Galliard, T., Phillips, D.R.: *J. Biochem.* 124, 431 (1971)
- Yabunchi, S.: *Agric. Biol. Chem.* 40(10), 1987 (1976)
- Grossman, S., Trop, M., Avtalion, R. and Pinsky, A.: *Lipids.* 7(7), 467 (1972)
- Kim In Sook, Grosch, W.: *J. Agric. Food Chem.* 27(2), 243 (1979)

(1987년 3월 5일 접수)