

현미 도정획분의 Lipoxygenase 활성

김기중 · 이종옥
전남대학교 식품공학과

Lipoxygenase Activity of Milled Fractions from Brown Rice

Ki-Joong Kim and Chong-Ouk Rhee

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

Abstract

Lipoxygenase activity from brown rice varieties (*Tongjinbyeo*, *Kumohbyeo* and *Kanchukbyeo*) was investigated using spectrophotometric method. In all three varieties, there was an increase in the enzyme activity with the reaction time. Enzyme activity was tested at different concentration of the substrate. The V_{max} and K_m values of *Tongjin*, *Kumoh* and *Kanchukbyeo* were 57.89, 19.85 and 31.38 units/mg protein and 0.054, 0.045 and 0.035 mM. The study of lipoxygenase activity at different pH levels showed that all the varieties had maximal activities around pH 7.0~7.6. The enzyme activity and specific activity on milled fractions of different brown rice varieties, fraction II was superior to the other fractions and fraction IV was inferior to the other fractions. As the result of microwave heating for 0, 30, 60 and 90 sec, the enzyme activity and specific activity of all the varieties were decreased by the elapse of heating time.

Key words: brown rice, lipoxygenase

서론

쌀(*Oryza sativa* L.)은 우리나라를 비롯한 아시아, 아프리카와 라틴아메리카 지역의 주식으로 이용되고 있는 것으로 특히 아시아 지역에서는 하루 섭취 열량의 절반 이상을 쌀로부터 섭취하고 있는 것⁽¹⁾으로 알려진 중요한 곡류이다. 쌀알의 구조⁽²⁾를 보면 곡립은 무게비로 16~28%를 껍질이 차지하고 있으며 껍질과 배유의 중간에 두께가 10 μ m 정도되는 종피의 호분층이 씨눈을 둘러싸고 있다. 현미는 최외각층인 껍질만이 벗겨진 것으로서 현미 그 상태로 또는 도정과정을 거쳐 백미로 가공하여 이용되기도 한다.

쌀의 저장이나 가공중 지방질의 존재는 특별한 의미를 갖고 있는 것으로서 저장중 쉽게 가수분해나 산화를 일으켜 불쾌취, 불쾌한 맛을 생성하여 쌀의 품질을 저하시키는 원인이 되고 있다⁽³⁾. 이러한 이취미를 주는 주요 화합물은 휘발성 alcohol류, aldehyde류, ketone류, ester류, amine류 및 phenol류 등으로서 쌀의 저장과정 중에 자동산화와 hemoglobin, myoglobin 등 heme화합

물의 산화촉진제에 의한 산화 및 lipoxygenase의 촉매 작용에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다⁽⁴⁾.

Lipoxygenase (linoleate : oxygen oxido-reductase E. C. 1, 13, 11, 12)는 산소존재시 cis, cis-1,4 pentadiene (-CH=CH-CH₂-CH=CH-)구조를 가진 불포화 지방산에만 작용하는 특이성을 가지고 있는 산화효소^(5,6,7)로서 여러 종류의 식물 열매 및 채소류 등에 분포되어 있으며⁽⁸⁾ lipoxygenase는 lipoxygenase-1(L-1), -2(L-2), 및 -3(L-3)의 isozyme^(9,10)이 있는데 이들 중 L-2와 L-3가 off-flavor의 형성과 가장 밀접한 관계가 있다고 한다^(11,12).

지금까지 행해진 쌀에서의 lipoxygenase에 관한 연구로는 Sekhar 등⁽¹³⁾이 현미에서 추출한 lipoxygenase가 pH 8.0 주위에서 최적활성을 나타냈다고 하였으며, Ohta 등⁽¹⁴⁾은 벼의 발아 과정중 효소활성의 변화를 연구하였는데 싹이 트기전 종자보다 3일이 지난 묘종에서 20배 이상의 효소활성 증가를 보고한 바 있다. Shastri 등⁽¹⁴⁾은 쌀겨에서 추출한 lipoxygenase를 3~5°C에서 저장했을 경우 적어도 15일동안 안정하다고 하였으며, 1 mM의 Cu²⁺와 EDTA에 10분간 침지시 Cu²⁺는 효소를 완전히 불활성화시켰으나, EDTA는 20%이상 효소활성을 증가시켰다고 보고한 것과는 달리 Yamamoto 등⁽¹⁵⁾은 10 mM의 EDTA에 50시간 침지시 40% 불활성

Corresponding author: Chong-Ouk Rhee, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwang-ju 500-757, Korea

화 되었다고 하였다. 또한, Ida 등⁽¹⁰⁾은 배아에서 추출한 lipoxxygenase-3는 2-mercaptoethanol 및 cystein과 같은 물질에 의해 불활성화되었다고 하였다.

본 연구에서는 쌀 저장에 있어서 lipoxxygenase 작용에 의해 생성되는 이취미를 감소시킬 수 있는 방법을 연구하는데 있어 기초자료로 제공하기 위해 품종이 다른 현미에서 lipoxxygenase를 추출한 후 기질농도와 효소반응속도와의 상호관계를 검토하고 최적 pH를 비교 분석하였다. 또한 도정도에 따른 현미 각 부분의 효소활성 및 microwave heating 처리가 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 재료는 전라남도 농촌진흥원에서 1995년 재배된 벼 품종으로서 전남지역에서 장려품종으로 되어 있는 중만생종인 동진, 조생종인 금오, 중생종인 간척벼를 분양받아 전남대학교 농과대학 곡물종합처리 실습장에서 제현기(Model SYTH-88, Ssangyoung Machine Co., Korea)로 왕겨를 제거하여 현미를 얻었고 외관상 이상이 없는 것을 정선하여 $-20 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

도정은 현미 150 g을 정미기(Model SY-88, Ssangyoung Machine Co., Korea)로 1회 도정시에 무게로 4~5% 정도 제거하여 모두 약 17% 정도가 제거되도록 도정을 되풀이 하였으며, 얻어진 각 획분의 도정시간과 수율은 Table 1과 같다.

Microwave heating 처리

Microwave heating 처리는 조 등⁽¹⁶⁾의 방법을 변형하여 실험하였다.

현미 30 g을 petri dish (I.D. 8.0 cm)에 취해 고르게 펴고 뚜껑을 덮어 회전 받침대 위에 놓고 0, 30, 60, 90초동안 microwave로 가열한 다음 시료로 사용하였

다. 이때 가열은 시판된 전자레인지(ER-687SF, 금성사)를 이용하고 2450 MHz에서 최대출력(650W)으로 가열하였다.

조효소액의 조제

현미를 가정용 소형분쇄기(Yongma, Korea)를 사용하여 분쇄한 후 80 mesh 체를 통과시켜 얻은 가루 2.5 g과 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) 10 mL를 shaker (150 rpm/min, 4°C)에서 30분동안 섞은 후 가제(3겹)로 여과하였다. 다음 원심분리기(Model J2-21 Centrifuge, Beckman Instruments Ltd, England)를 사용하여 $10,000 \times g$ 로 4°C 에서 30분동안 원심분리시킨 다음 얻은 상정액을 조효소액으로 하여 4°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다^(13,14).

Lipoxxygenase 활성의 측정

큐벳에 10 mM linoleic acid (Sigma, St Louis, U.S.A.)를 50배 희석한 용액 2.9 mL와 조효소액을 1~10배 희석한 액 0.1 mL를 넣고 반응시켜 생긴 과산화물을 234 nm (Model UV-1201, Shimadzu Co., Japan)에서의 흡광도 변화로 측정하였으며 이때 온도를 25°C 로 하였다. Blank는 큐벳에 기질 2.9 mL와 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) 0.1 mL를 첨가한 것으로 하였으며 분당 0.001의 흡광도 증가를 1 unit로 하였다^(14,17,18).

효소활성 측정용 기질로는 10 mM linoleic acid/0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)를 희석하여 사용하였다. 즉, 50 mL 삼각 플라스크에 linoleic acid를 70 mg 취한 후, 여기에 동량의 Tween 20을 가했다. 이것을 초음파(Bransonic Cleaner, Bransonic Cleaning Equipment Company, Sheiton, U.S.A.)로 균질화 시키면서 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)를 기포가 생기지 않도록 조심스럽게 5회 가해 총량이 25 mL가 되도록 한 다음 vial (1.2 mL)에 1 mL씩 취해 질소 충전하여 냉동($-18^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$) 보관하였다⁽¹⁹⁾.

가용성 단백질 정량

조효소액을 증류수로 2~8배 희석하여 $12,900 \times g$ (Model J2-21 Centrifuge, Beckman Instruments Ltd., England)로 3분간 원심분리하여 상정액의 가용성 단백질을 Lowry 법으로 정량하였다^(20,21,22).

결과 및 고찰

반응시간에 따른 효소활성의 변화

세 품종의 현미에서 추출한 조효소를 0.2 mM

Table 1. Milling time and average yield of milled fractions from brown rice

Fraction	Milling time (sec)	Yield (%)		
		Tongjinbyeo	Kumohbyeo	Kanchukbyeo
I	60	4.2	4.5	4.4
II	70	4.4	4.6	4.2
III	95	4.3	4.1	4.2
IV	130	4.2	4.4	4.5
Residual kernel		82.9	82.4	82.7

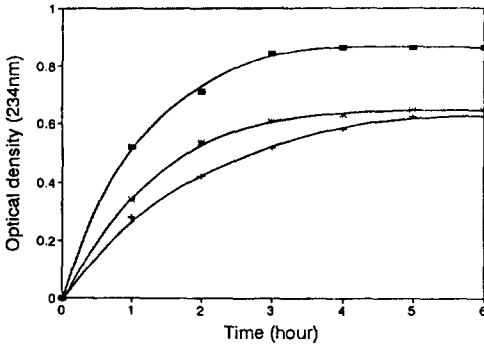


Fig. 1. Changes of lipoxygenase activity on the reaction time of brown rice varieties at pH 7.0. ■—■: Tongjinbyeo, +—+: Kumohbyeo, *—*: Kanchukbyeo.

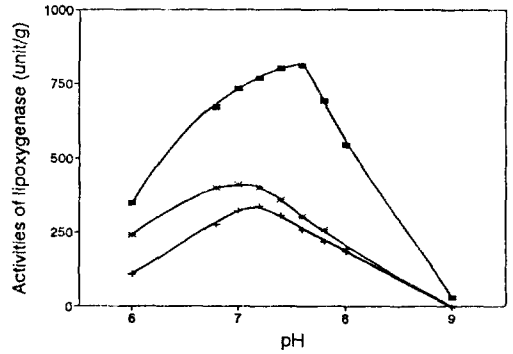


Fig. 3. Variation of lipoxygenase activity as a function of pH in brown rice varieties. ■—■: Tongjinbyeo, +—+: Kumohbyeo, *—*: Kanchukbyeo.

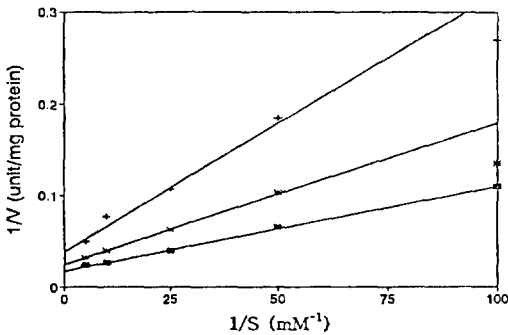


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of the reaction of lipoxygenase in brown rice varieties. ■—■: Tongjinbyeo, +—+: Kumohbyeo, *—*: Kanchukbyeo.

linoleic acid/0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)와 반응시킨 결과 Fig. 1에서와 같이 동진은 3시간까지 효소활성이 증가하였으며 금오는 5시간, 간척벼는 4시간까지 효소활성이 증가하였다.

기질의 농도와 효소와의 반응속도

0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.1 mM의 linoleic acid를 기질로 하여 기질과 효소와의 반응속도를 Michaelis-Menten equation으로 표시하였다. 이것을 Lineweaver-Burk plotting (Fig. 2)으로 해석하여 속도상수 V_{max} 와 K_m 을 구한 결과 동진, 금오 및 간척벼의 V_{max} 와 K_m 은 각각 57.89, 19.85, 31.38 units/mg protein과 0.054, 0.045, 0.035 mM이었다. 이는 Shastry 등⁽¹⁴⁾이 쌀겨에서 얻은 K_m 값 0.35 mM보다 낮은 값을 나타내었으며, Tappel 등⁽²³⁾이 콩에서의 K_m 값이 1 mM 이라는 보고와, Pinsky 등⁽²⁴⁾이 밀의 경우 K_m 값이 5 mM이라는 보고와 비교하였을 때 상대적으로 매우 낮은 값을 나타내었다.

최적 pH

현미의 lipoxygenase활성을 pH 6.0~9.0으로 조성된 0.2 M phosphate buffer를 사용하여 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 동진벼의 경우에는 pH 7.6에서 820.8 units/g로 가장 높게 나타났으며 금오 및 간척벼는 pH 7.2에서 각각 358.4 unit/g, pH 7.0에서 438 units/g으로 세 품종 모두 pH 7.0~7.6 사이에서 최적의 pH값을 나타내었는데 이는 Sekhar 등⁽¹³⁾이 보고한 Randhunipagalu 품종 현미에서의 최적 pH 8.0보다 조금 낮은 값이었다. 이러한 최적 pH의 차이는 다른 환경에서 자란 품종별 차이에서 유래된 것으로 생각된다.

도정도에 따른 효소 활성

시료 현미를 도정한 다음 획분별로(Table 1) 효소활성과 효소의 비활성을 측정 한 결과는 Fig. 4, 5와 같다. 효소의 활성은 동진, 금오 및 간척벼 모두 획분 II에서 7600 unit/g, 4050 unit/g, 4933.2 unit/g으로 가장 높은 활성을 나타내었고, 획분 IV에서 각각 426.7 unit/g, 320 unit/g, 380 unit/g으로 동진, 금오 및 간척벼 모두 가장 낮은 활성을 보였다. 비활성의 경우에는 동진, 금오 및 간척벼 모두 획분 II에서 각각 111.5 unit/mg protein, 59.13 unit/mg protein 77.26 unit/mg protein으로 높게 나타났으며 획분 IV에서 각각 37.77 unit/mg protein, 26.29 unit/mg protein, 30.2 unit/mg protein으로 가장 낮게 나타났다. 이상의 결과로서 효소의 활성과 효소의 비활성은 세 품종 모두 획분 II에서 가장 높게 나타났으며 획분 IV에서 가장 낮게 나타남을 알 수 있었는데 이것은 Monma 등⁽²⁵⁾이 lipoxygenase활성은 가용성 단백질과 관계가 있다고 보고한 바와 같이 획분 II가 가장 높았던 것은 다른 획분에 비해 가장 많은 배아부분이 혼입되어 가용성 단백질 양

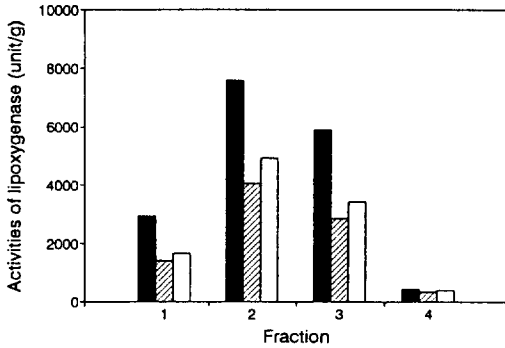


Fig. 4. Lipoxygenase activity on milled fractions of brown rice varieties. ■: Tongjinbyeo, ▨: Kumohbyeo, □: Kanchukbyeo.

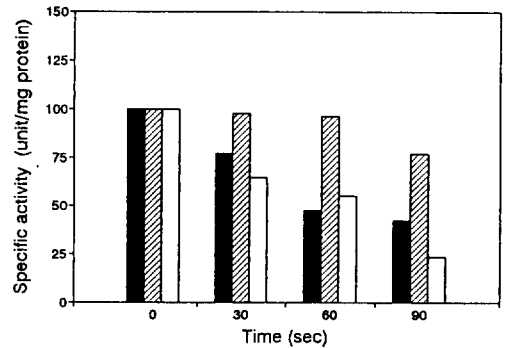


Fig. 7. Specific activity of lipoxygenase by microwave heating in brown rice varieties. ■: Tongjinbyeo, ▨: Kumohbyeo, □: Kanchukbyeo.

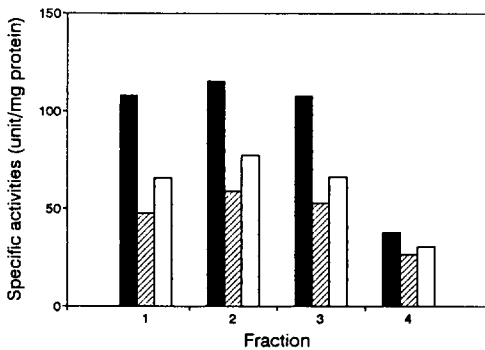


Fig. 5. Specific activity of lipoxygenase on milled fractions of brown rice varieties. ■: Tongjinbyeo, ▨: Kumohbyeo, □: Kanchukbyeo.

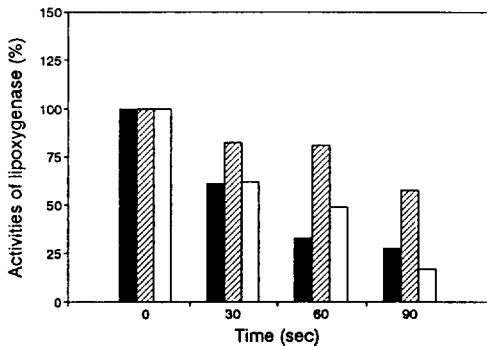


Fig. 6. The effect of microwave heating on lipoxygenase activity in brown rice varieties. ■: Tongjinbyeo, ▨: Kumohbyeo, □: Kanchukbyeo.

을 가장 많이 갖기 때문이라고 생각된다.

Microwave heating의 영향

Microwave로 0, 30, 60, 90초간 가열처리한 시료 현

미의 효소의 활성은 Fig. 6에서 보는 바와같이 동진, 금오 및 간척벼의 경우 90초간 가열처리 했을때 가열 처리를 하지 않은 대조구에 비해 각각 27.4%, 52.2%와 17.1%로 효소활성이 감소됨을 알 수 있었다. Fig. 7은 효소의 비활성값을 나타낸 것으로 효소 활성에서와 같이 90초간 가열처리 했을 때 가열처리를 하지 않은 대조구에 비해 가열시간이 증가함에 따라 효소의 비활성도 동진, 금오, 및 간척벼 모두 42.6%, 76.7%와 23.4%로 낮아지는 경향을 보였다. 이처럼 microwave heating 시간이 증가함에 따라 효소활성과 효소비활성이 감소된 이유는 heating 처리함에 따라 단백질이 변성 침전되기 때문⁽²⁵⁾이라고 사료된다.

요 약

쌀의 저장시 지방질의 가수분해나 산화에 의해 off flavor를 생성하여 쌀의 품질을 저하시키는데 있어 촉매작용을 하는 lipoxygenase 활성을 비색법으로 측정하였다. 기질농도와 효소반응속도와의 상호관계를 검토하고, 최적 pH를 조사하였으며, 도정도에 따른 현미 각 부분의 효소활성을 알아보았다. 0.2 mM의 linoleic acid/phosphate buffer (pH 7.0)와 반응시켰을 때 반응 시간에 따른 효소활성은 동진이 3시간, 금오가 4시간, 간척이 5시간까지 효소활성이 증가하였다. 기질의 농도와 효소액과의 반응속도 관계를 Lineweaver-Burk plotting으로 해석한 결과 V_{max}는 동진, 금오 및 간척벼는 각각 57.89, 19.85, 31.38 unit/mg protein이었고, K_m은 동진, 금오 및 간척벼 각각 0.054, 0.045, 0.035 mM이었다. 현미의 lipoxygenase의 활성은 동진벼의 경우 pH 7.6, 간척벼는 pH 7.0, 금오벼는 pH 7.0에서 최적의 활성을 나타내었다. 도정도에 따른 현미 각 부

분의 효소활성 및 비활성은 동진, 금오 및 간척벼 모두 획분 II에서 가장 높은 활성을 보였으며 획분 IV에서 가장 낮은 값의 활성을 보였다. 세 품종의 현미에 microwave로 0, 30, 60, 90초간 가열처리하였을 때 효소활성 및 효소의 비활성은 대조구에 비해 90초간 가열처리했을 때 효소활성의 경우 동진, 금오 및 간척벼는 27.4%, 52.2%, 17.1%로 감소하였으며, 효소의 비활성도 42.6%, 76.7%, 23.4% 정도로 감소하였다.

문 헌

- Juliano, B.O.: Production and utilization of rice. In *Rice : Chemistry and Technology*, 2nd ed., Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN., p.1 (1985)
- Juliano, B.O. and Aldama, M.J.: Morphology of *Oryza sativa* Linnaeus, *Philipp. Agric.*, **26**, 1 (1987)
- Webb, B.D.: Criteria of rice quality in the United States. In *Rice : Chemistry and Technology*, 2nd ed., Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN., p.403 (1985)
- Galliard, T.: Rancidity in cereal products. In *Rancidity in Food*, Allen, J.C. and Hamilton, R.J. (Ed.), Elsevier Applied Science, New York, p.141 (1989)
- Holman, R.T. and Bergstrom, S.: Lipoxidase. In *The Enzyme : Chemistry and Mechanisms of Action*, Vol. 2, Part 1, Sommer, J. B. and Myrback, K. (Ed.), Academic Press Inc, New York, p.559 (1951)
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M. and Haakso, S.: Lipoxigenase from soybeans, *Method in Enzymol.*, **71**, 441 (1981)
- Hildebrand, D.F. and Kito, M.: Role of lipoxygenases in soybean seed protein quality, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 815 (1984)
- Pinsky, A., Grossman, S. and Trop, M.: Lipoxigenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables, *J. Food Sci.*, **36**, 571 (1981)
- Ohta, H., Ida, S., Mikami, B. and Morita, Y.: Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination, *Plant Cell Physiol.*, **27**(5), 911 (1986)
- Ida, S., Ohta, H., Mikami, B. and Morita, Y.: Purification and characterization of rice lipoxygenase component 3 from embryos, *Agric. Biol. Chem.*, **50**(12), 3165 (1986)
- Matoba, T., Hidaka, H., Narita, H., Kitamura, K., Kazuma, N. and Kito, M.: Lipoxigenase-2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate, *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 852 (1985)
- Hildebrand, D.F., Hamilton-Kemp, T.R., Loughrin, J.H., Ali, K. and Anderson, R.A.: Lipoxigenase-3 reduces hexanal production from soybean seed homogenates, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1934 (1990)
- Sekhar, B.P.S. and Reddy, G.M.: Studies on lipoxygenase from rice, *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 1160 (1982)
- Shastri, B.S. and Raglavendra, M.R.: Studies on lipoxygenase from rice bran, *Cereal Chem.*, **52**, 597 (1975)
- Yamamoto, A., Fuji, Y., Yasumoto, K. and Mitsuda, H.: Partial purification and study of some properties of rice germ lipoxygenase, *Agric. Biol. Chem.*, **44**(2), 443 (1980)
- 조영훈, 이종욱 : 대두의 phytate 함량에 미치는 microwave heating의 영향, *한국농화학회지*, **39**, 32 (1996)
- 김동만, 백형희, 김길환 : 장러품종 콩의 영양저해인자 및 리폭시게나아제 특성, *한국식품과학회지*, **22**, 393 (1990)
- Ben-Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I. and Budowski, P.: Linoleate oxidation induced by lipoxygenase and heme protein (a direct spectrophotometric assay), *Anal. Biochem.*, **34**, 88 (1990)
- 임효식, 조영훈, 이종욱 : 대두 현탁액의 lipoxygenase의 활성 저해 인자들의 효과, *한국식품과학회지*, **27**, 19 (1995)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein estimation by the Folin-Method, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- Bollag, D.M. and Edelstein, S.T.: *Protein Methods*, Wiley-Liss, U.S.A., p.56 (1991)
- 한국 생화학회 교재 편찬 위원회 : 신평 실험 생화학, 탐구당, 서울, p.256 (1991)
- Tappel, A.L.: Lipoxydase, In *Enzymes*, Boyer, P.D. and Lardy, H. (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 8, p. 275 (1963)
- Pinsky, A., Sporn, J. and Grossman, S.: Lipoxigenase isoenzymes from *Solanum tuberosum*, *Phytochemistry*, **12**, 1051 (1973)
- Monma, M., Sugimoto, T., Hashizume, K. and Saio, K.: Effect of several lipoxygenase inhibitors on lipoxygenase activities in soybean homogenate, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 625 (1990)

(1996년 8월 22일 접수)