

오이(*Cucumis sativus*)에 함유된 Hydroperoxide Lyase와 Lipoxygenase 효소 활성 및 특성

장미진 · 조일영* · 이시경*

퍼킨엘머 코리아, *건국대학교 농과대학 농화학과

Characteristics of Hydroperoxide Lyase and Lipoxygenase Activity in Cucumber (*Cucumis sativus*) Fruit

Mi Jin Jang, Il Young Cho* and Si Kyung Lee*

Perkin Elmer Korea

*Department of Agricultural Chemistry, Kon Kuk University

Abstract

The objectives of this study were to examine the effect of storage time, temperature, pH, and NaCl concentration on hydroperoxide lyase and lipoxygenase activities, and to establish important informations to the production of typical cucumber flavor. Conditions affecting lipoxygenase and hydroperoxide lyase would be important for cucumber flavor production. Maximum activity was observed at pH 5.0 for hydroperoxide lyase and pH 5.5 for lipoxygenase. Both enzymes were relatively stable at 40 to 50°C for 6 days storage time. Maximum activity of both enzymes was observed with 0.2 M NaCl at pH 5.0. Activities were stimulated with concentrations of NaCl from 0.05 to 0.2 M. Hydroperoxide lyase and lipoxygenase activities were decreased at concentration of NaCl greater than 0.2 M.

Key words: hydroperoxide lyase, lipoxygenase, *Cucumis sativus*

서 론

오이의 물리적 파괴는 내생성 효소에 의한 자기 분해를 초래하여, 지질의 가수 분해와 산화 작용으로 인해 휘발성 물질을 형성하는데, 이 물질들이 오이 향을 결정하며, 때로는 off-flavor를 유도시킨다⁽¹⁾. 이러한 휘발성 물질을 형성하는데 연관된 효소들은 lipoxygenase 외에 hydroperoxide lyase, isomerase 등이 있다⁽²⁾. 산소 존재 하에 *cis*, *cis*-1,4-pentadiene 체계를 가진 불포화 지방산이 lipoxygenase 작용에 의해 9-hydroperoxide와 13-hydroperoxide를 형성하며, hydroperoxide lyase와 isomerase의 작용으로 오이의 풍미를 결정하는 hexanal, *cis*-nonanal, *trans*-2-nonenal, *trans*-2,*cis*-6-nonadienal과 *trans*-2-hexenal을 형성한다(Fig. 1)⁽³⁾. 이들 휘발성 물질은 수초 내에 발생되어 오이의 신선한 향기를 준다⁽⁴⁾. 그러나 식품의 가공 또는 저장의 경우에는 불포화 지방산의 산패로 인한 식품향 변화(off-flavor)의 주원인이 되고 있다. 토마토의 높은 lipoxygenase 활성은

trans-2-hexanal과 hexanal의 형성을 자극하여, 만일 이런 물질이 2 ppm이상일 경우 썩은 토마토 풍미를 주었으며, 저장 중인 완두콩에서도 n-hexanal이 발견되었다^(5,7). 오이 중 지방산은 팔미트산(19.8%), 리놀레산(16.4%), 리놀렌(33.0%)이 주성분이며, 지질은 100g의 신선한 오이에 약 104 mg 들어 있다.

Lipoxygenase는 오이, 사과, 가지, 겨자, 완두콩 등 많은 식물에서 발견되고, 특히 대두의 경우, lipoxygenase는 off-flavor(비린 맛)의 주 요인이라는 것이 많이 연구 보고된 바 있다⁽⁶⁾. Hydroperoxide lyase 경우는 토마토, 바나나, 고추씨 등에서도 발견되는 효소이다^(8,9).

효소들의 작용에 의해 오이 특유의 풍미가 형성되며, 이런 신선한 오이 향기는 오이를 가공할 때 향기나 세품의 품질을 결정하는 주된 요인이 되므로 좋은 향을 더 형성시키면서 off-flavor를 유도하는 물질의 형성을 억제하기 위해 이 효소들의 특성을 연구하는 것이 중요하다. 특히 오이 저장이나 가공시 효소들의 최적 조건을 유지시키거나 억제시키면 장기간 저장을 하거나 좋은 풍미를 주는 가공식품을 만들 수가 있으

Corresponding author: Si Kyung Lee, Department of Agricultural Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-710, Korea

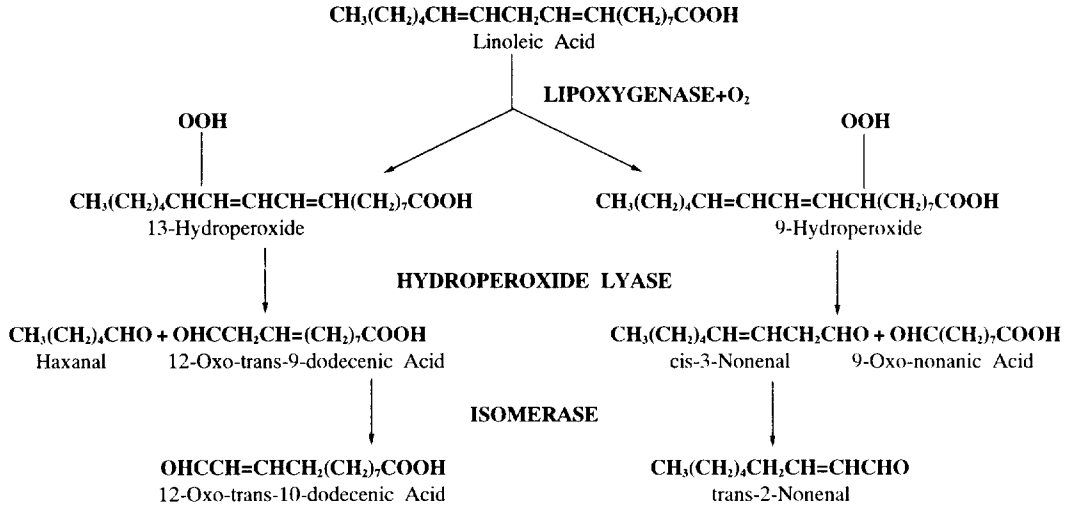


Fig. 1. Enzymatic formation of aldehydic fragments from linoleic acid.

므로, 이를 뒷받침하기 위한 연구를 하였다.

본 연구에서는 오이의 내생 효소인 hydroperoxide lyase와 lipoxygenase 활성 변화를 저장 기간, 온도, pH, NaCl 농도에 따라 UV-VIS spectrophotometer와 산소 전극으로 측정하였고, 효소의 기질로는 리놀렌산과 hydroperoxide를 사용하였으며, 또한 두 효소의 특성을 비교, 조사하였다.

재료 및 방법

조효소 추출

신선한 오이(*Cucumis sativus*)를 구입하여 깨끗이 세척 후 폴리에틸렌 비닐 용기에 넣고 영하 20°C에서 효소 추출시까지 저장하였다. 효소 추출은 Jang 등의 방법^(2,3)에 따라 하였다. 즉, 오이 10 g을 0.5 cm³ 크기의 입방체 단면으로 잘라서 20 ml의 citrate-phosphate 완충 용액(pH 6.5)에 넣은 후 20초동안 균일화 시킨 다음, 10분간 10,000 rpm으로 원심 분리하여, 그 상등액을 효소원으로 사용하였다^(1,3). 완충 용액은 4 mM dithiothreitol과 0.2% Triton X-100을 함유한 혼합물이다^(1,3,7,9,10).

리놀렌산 기질 용액

리놀렌산 0.15 mL를 0.15 mL Tween 20과 먼저 잘 혼합한 다음 0.5 mL 1 N NaOH와 탈염수를 넣었고, 용액이 잘 현탁될때까지 음과 과쇄시켰으며, pH를 7.0으로 조절하고 최종 부피를 50 mL 되게 만들었다. 리놀렌산 기질 용액은 위의 방법으로 만든 리놀렌산

용액 1 mL를 10 mL의 0.05 M 2-[N-morpholin]ethane sulfonic acid 완충 용액 (pH 5.5, 16 mM CaCl₂ 함유)과 혼합하여 준비하였다. 이 용액은 빛에 노출되지 않도록 알루미늄 호일로 감싼 후 사용할 때까지 4°C로 보관하였다.

Hydroperoxide lyase 기질 용액

Hydroperoxide lyase 기질 용액은 2.45 mL의 0.1 M potassium phosphate 완충 용액(pH 6.4)에 0.53 mL의 hydroperoxide 용액을 가한 후 25°C에서 30분 혼합하여 준비하였고, 빛에 노출되지 않도록 알루미늄 호일로 감싼 후 사용할 때까지 4°C로 보관하였다. 리놀렌산의 산화시 형성되는 hydroperoxide 용액은 0.4 mL의 대두 lipoxygenase 용액[1 mg lipoxygenase/10 mL 0.05 M borate 완충 용액, pH 9.0 (Sigma)]과 0.2 mL의 리놀렌산을 10 mL 탈염수와 혼합하여 30°C에서 30분을 유지시켰다⁽⁴⁾. 리놀렌산에서 유도된 hydroperoxide는 234 nm에서 초기와 최종 흡광도를 측정하여 hydroperoxide가 형성되었음을 입증하였다.

Lipoxygenase 활성 측정

산소 전극을 사용하여 lipoxygenase에 촉매작용에 의한 산소 소비량을 측정하였다. 2.9 mL 기질 용액을 30°C에서 산소와 포화시킨 다음, 0.1 mL 효소 추출물을 서서히 기질 용액에 첨가하여 산소 소비량을 기록하였다. 활성 속도는 직선형 반응 기간에서 계산하였다⁽⁵⁾. Lipoxygenase 활성은 신선한 오이(g)가 시간당 소비하는 산소량(μg 산소 소비량/분)으로 나타내거나 또

는 대조구나 최대 활성에 대한 퍼센트로 나타내었다.

Hydroperoxide lyase 활성 측정

효소 추출물 0.02 mL에 2.98 mL의 hydroperoxide lyase 기질 용액을 가하여 가능한 빨리 섞었다. 효소 측정에는 Galliard 등⁽¹⁰⁾의 분석 방법을 수정하여 사용하였다. Hydroperoxide lyase 활성 측정은 UV-VIS spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 2)를 사용하여 234 nm에서의 흡광도의 감소량을 측정하였는데 직선성을 보이는 반응 기간만을 이용하여 흡광도를 계산하였다. Hydroperoxide 기질 용액이 234 nm에서 흡광도를 알아보기 위해 가열시킨 효소 추출물을 기질 용액에 넣고 흡광도의 변화를 측정하였다. Hydroperoxide lyase의 활성은 0.2 mL의 추출물이 시간당 변화되는 흡광도의 양 ($\Delta A_{234}/\text{min}$)으로 나타내거나 또는 대조구나 최대 활성에 대한 퍼센트로 나타내었다.

기질 용액의 pH가 효소 활성에 미치는 영향

Hydroperoxide lyase와 lipoxxygenase 기질 용액의 pH가 이들 효소의 활성에 미치는 영향을 보고 또한 최대 활성치를 주는 기질 용액 pH를 선정하고자 행하였다. 우선, 두 효소의 기질 용액의 pH를 0.02 M citric acid와 0.04 M Na_2HPO_4 를 사용하여 pH 3.0 부터 8.0까지 변화시켜 30분간 유지시킨 후 빙수욕으로 냉각하고 두 효소의 활성을 측정하였다.

조효소 추출물의 저장 안정성

오이에서 추출한 효소는 희석하지 않고 4°C에 저장하였다. Hydroperoxide lyase의 안정성을 보기 위하여 4°C에서 20일까지 보관하였고, lipoxxygenase는 4°C에서 16일까지 보관하고, 두 효소의 활성을 측정하여 보관 기간에 따른 활성의 변화를 관찰하였으며, 활성 변화를 관찰하여 효소 추출물을 본 연구에 사용하는 기간을 설정하기 위해 이 실험을 행하였다. 결과에 따라 5일마다 효소를 재추출하여서 본 연구를 하였다.

온도가 효소 활성에 미치는 영향

효소 추출물 10 mL를 시험관에 넣고 5, 10, 15, 20분 간격으로 물 중탕에서 각각 40°C에서 90°C까지 유지하고, 빙수욕으로 냉각 후 효소 활성을 측정하였다. 각 조건에서의 효소 활성은 25°C, 0시간을 대조구로 하여 나타내었다.

NaCl이 효소 활성에 미치는 영향

NaCl 농도에 따른 hydroperoxide lyase와 lipox-

xygenase 활성 변화를 관찰하기 위해, NaCl이 각각 0, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 M씩 들어 있는 8 mL의 0.04 M citrate-phosphate buffer (pH 5.0)에 2 mL의 조효소 추출물을 넣고 활성 변화를 관찰하였다. 각 용액은 25°C에서 1시간 유지 후 분석하였다.

결과 및 고찰

기질 용액의 pH가 효소 활성에 미치는 영향

두 효소의 활성 측정시 기질 용액의 pH에 따라 활성의 차이가 많음을 알 수 있다. Hydroperoxide lyase 활성은 기질 용액의 pH가 5.0일 때 최대치를 나타내었고, 일반적으로 pH 5에서 pH 6 사이가 분석 pH로 관찰되었다(Fig. 2). Galliard⁽¹¹⁾의 실험에서는 hydroperoxide lyase 기질 용액의 최적 pH가 6.4라고 하였는데, 이는 실험 방법간의 차이에서 나온 결과라고 생각된다. 본 실험에서 hydroperoxide lyase 기질로 sodium linolenate에서 유도된 hydroperoxide를 사용하였고, 조효소 추출시 원심 분리된 상등액에서 효소 활성을 측정하였다. Galliard의 경우, NH_4^+ 가 함유한 linolenate와 침전물을 사용하였다. 또한 본 실험에서는 UV-VIS spectrophotometer로 흡광도의 지속적인 변화를 측정하였고, Galliard의 경우는 일정 반응시간 동안에 흡광도를 측정하였다. 이 결과는, hydroperoxide lyase는 오이의 각 부위별 및 생산지에 따라 효소 활성차가 있음을 보여준다. Lipoxxygenase의 실험 결과로 보면 오이 껍질의 효소 함유량은 육질(mesocarp) 이나 속(locule)의 함량보다 많았고⁽¹⁻³⁾ 오이를 분쇄, 원심 분리후에

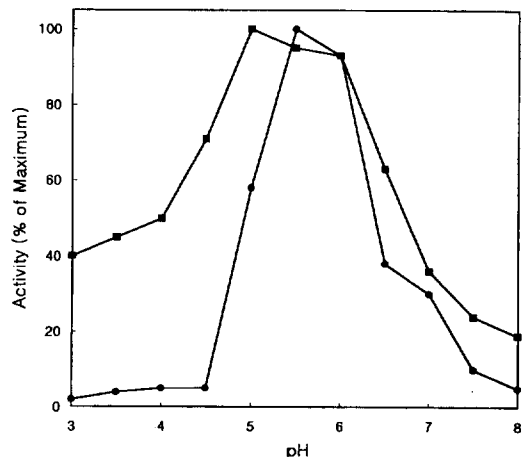


Fig. 2. Effect of pH on hydroperoxide lyase and lipoxxygenase activity in *Cucumis sativus*. ■—■: hydroperoxide lyase, ●—●: lipoxxygenase.

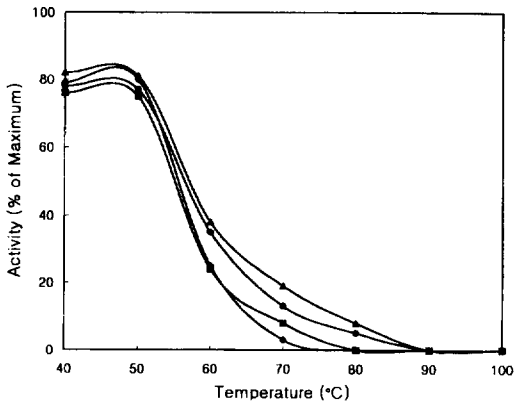


Fig. 3. Effect of incubation times and temperatures on stability of hydroperoxide lyase. ▲—▲: 5 min, ●—●: 10 min, ◆—◆: 15 min, ■—■: 20 min.

hydroperoxide lyase의 농도는 상등액이 침전액보다 더 높았다.

Hydroperoxide lyase의 활성은 pH 3.0~4.0에서 최대 활성 pH에 비해 43% 정도의 활성을 보이고, pH 8.0에서는 활성의 최소치로 18%가 관찰되었다. 반면에, lipoxygenase는 기질 용액의 pH 5.5일 때 최대 활성을 나타내었고, pH 3.0~4.5인 경우는 최대 활성과 비교시 약 5%를 보여주었다(Fig. 3). pH 6.5에서는 최대 활성의 약 37% 수치를 보였고, pH 7이상에서의 lipoxygenase 활성은 5% 이하였다. 흥미롭게도 hydroperoxide lyase는 pH 3.0~4.0의 산성 pH 조건에서도 높은 활성을 보인다. 이런 pH 조건에서도 43% 정도의 활성을 보이는데, 이 수치가 효소 활성에 의함을 증명하고자 다음과 같은 실험을 행하였다. 효소 추출물을 넣지 않고 기질 용액의 pH를 3.0에서 4.0으로 맞춘 후 hydroperoxide의 acid hydrolysis가 흡광도 변화에 영향을 주는지에 대하여 조사한 결과 흡광도의 변화가 없음을 토대로 볼 때 43%라는 활성치는 hydroperoxide lyase에 의한 것이라 할 수 있다.

반면에 lipoxygenase는 pH 3.0에서 최대 활성의 단지 5% 정도만을 보여줌을 볼 때, hydroperoxide lyase는 기질 용액이 산성일 때도 작용을 함을 알려준다. 이 결과는 Fig. 1에서와 같이 리놀렌산이 lipoxygenase와 산소가 있는 조건에서 difunctional acid (-COOH)로 변하여 산산화 되어도 hydroperoxide lyase는 기질을 분해시켜 휘발성 물질을 형성함을 보여준다.

조효소 추출물의 저장 안정성

오이에서 추출한 hydroperoxide lyase와 lipoxygenase의 저장 안정성은 Table 1과 같다. Hydroperoxide lyase

Table 1. Storage stability of hydroperoxide lyase (HPL) and lipoxygenase (LOX) in cucumber extracts

Storage time (day)	% of total HPL activity	% of total LOX activity
0	100.0	100.0
3	96.9	97.4
6	96.9	90.4
9	85.1	71.2
12	52.5	65.4
16	48.1	45.2
20	-	40.2

Table 2. Effect of incubation times and temperatures on stability of hydroperoxide lyase (HPL) and lipoxygenase (LOX) in cucumber extracts

Temperature (°C)	HPL (min)				LOX (min)			
	5	10	15	20	5	10	15	20
40	83.0	78.7	76.2	78.3	100.0	100.0	93.5	94.7
50	81.9	76.6	73.4	79.3	95.4	92.1	89.8	86.4
60	35.1	28.6	21.4	22.8	68.4	48.2	30.2	25.9
70	15.0	6.9	2.6	0.0	9.8	9.5	8.2	8.9
80	2.3	2.0	0.0	0.0	6.3	5.3	3.6	3.4
90	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	3.5	2.6	2.8

와 lipoxygenase는 4°C에서 6일간 저장하여도 약 3~10%의 활성만 감소하는 등 비교적 저장 안정성을 보여주었다. 6일간 저장 이후에는 두 효소의 활성이 급감하여 16일간 4°C에서 저장하였을 경우 초기와 비교시 약 52%의 활성이 감소되었다. Hydroperoxide lyase는 저장을 오래함에 따라 지속적인 활성의 감소를 보여주었고, 20일간 저장시 40%의 활성만이 남았다.

온도가 효소 활성에 미치는 영향

온도에 따른 hydroperoxide lyase와 lipoxygenase 활성 변화는 Fig. 3, 4와 같다. 활성은 25°C에서 0분 반응한 것을 대조구로 하여 100%로 표시하였다. Hydroperoxide lyase와 lipoxygenase의 활성은 40~50°C에서 비교적 안정하였다. Lipoxygenase는 hydroperoxide lyase에 비해 온도의 변화에 비교적 안정적인 효소로 관찰되었다. 40°C에서 lipoxygenase 효소를 10분 유지 후 측정하였을 때 활성에 변화는 없었으나, hydroperoxide lyase 활성은 동일 조건에서 약 22% 감소하였다. 50°C~60°C에서는 hydroperoxide lyase는 lipoxygenase보다 활성이 급감하였으며 높은 온도에 대한 민감성을 보였다. 70°C 이상에서는 두 효소 모두 약 10~15% 정도의 낮은 활성을 보였다. 80, 90°C에서는 각각 20, 15분 반응 조건에서는 hydroperoxide lyase 활성은 나타나지 않았으나, lipoxygenase는 약 8~3% 활성을

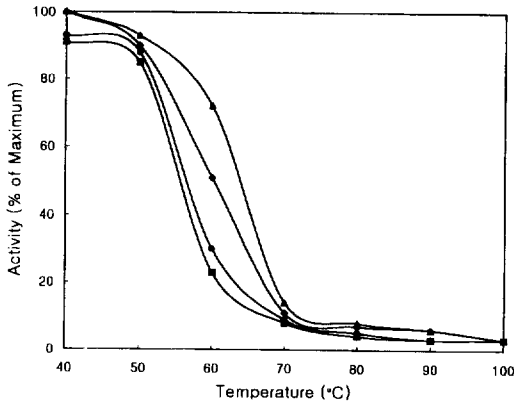


Fig. 4. Effect of incubation times and temperatures on stability of lipoxygenase. ▲—▲: 5 min, ●—●: 10 min, ◆—◆: 15 min, ■—■: 20 min.

유지하였다. Lipoxygenase를 10분간 약 100°C로 끓인 후 측정하였을 때 전혀 활성이 나타나지 않았다. 그러므로 고온에서 약 3~8%의 lipoxygenase 잔존 활성 결과는 실제 이 효소의 활성치임이 증명되었다.

NaCl이 효소 활성에 미치는 영향

실온에서 pH를 5.0으로 고정시킨 후 NaCl 농도의 변화에 따른 hydroperoxide lyase와 lipoxygenase의 활성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 대조구로는 NaCl을 첨가하지 않은 상태에서 두 효소의 활성치를 100%로 놓고 조사하였다. Hydroperoxide lyase와 lipoxygenase의 최대 활성은 NaCl의 농도가 0.2 M일 때로 관찰되었다. NaCl 농도가 1.6 M의 경우 hydroperoxide lyase 활성은 76.0%였고, 3.2 M에서는 41.3%로 급감하였으나, 0.1~0.2 M에서는 대조구 보다 오히려 활성이 더 강화되었다. 이 결과는 0.1~0.2 M NaCl의 농도에서의 lipoxygenase 반응과 같음을 보여준다⁽¹²⁾. 이 효소들은 0.4 M NaCl 농도에서부터 활성이 감소하기 시작하여 높은 농도에서 낮은 효소 활성을 나타내었다.

Lipoxygenase와 hydroperoxide lyase의 온도, NaCl 농도에 따른 활성 변화가 거의 유사함을 알 수 있는데, 이는 오이를 저장하거나 피클 제품을 생산시 효소 활성을 최대화시켜 좋은 오이의 풍미를 발하는 적절한 조건을 설정하기가 가능함을 시사한다.

요 약

오이의 향을 결정짓는 휘발성 물질을 형성하는데 연관된 lipoxygenase와 hydroperoxide lyase는 저장 기

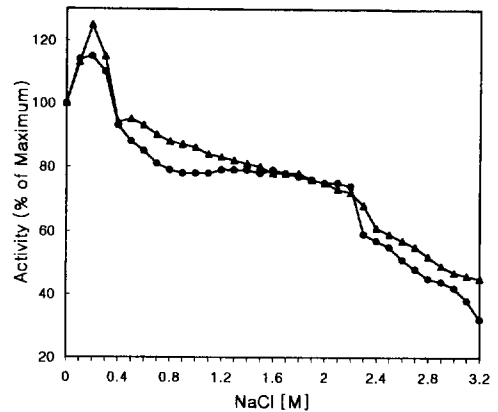


Fig. 5. Effect of NaCl concentrations on stability of hydroperoxide lyase and lipoxygenase at pH 5.0 and 1 hour incubation. ▲—▲: hydroperoxide lyase, ●—●: lipoxygenase.

간, 기질 용액의 pH, NaCl 농도와 온도 변화에 따른 활성을 비교 검토시 매우 유사함이 관찰되었는데, 이는 좋은 오이 향을 최대화하고 유지 보존하는 것이 거의 비슷한 조건이나 환경 안에서 가능함을 시사한다. Hydroperoxide lyase 활성은 pH 5.0일 때 최대치를 보여 주었고, lipoxygenase는 pH 5.5에서 최대 활성을 나타내었다. Hydroperoxide lyase와 lipoxygenase 활성은 40°C~50°C 사이에서 안정하였으며, 60°C에서 5분 유지 후 결과는 효소 활성이 약 65%로 감소되었고, 그 이상의 온도에서는 활성도가 급격하게 감소하였다. Lipoxygenase의 활성은 동일 온도에서 비슷한 특성을 나타내었으나 높은 온도에서도 약 3% 정도의 활성을 유지하였다. 그러나 hydroperoxide lyase의 경우에는 높은 온도에서 수분 안에 아무런 활성도 보이지 않음을 알 수 있다. 두 효소의 최대 활성 NaCl 농도는 0.2 M이고, NaCl을 0.2 M까지 첨가시 오히려 NaCl이 없을 때보다 높은 활성을 보였으며 이는 NaCl이 두 효소의 활성을 자극시킴을 보여준다.

문 헌

1. 장미진, 조일영, 이시경 : 피클용 오이(*Cucumis sativus*)에 함유된 lipoxygenase 효소 활성의 변화와 효소의 분포 특성. 한국농화학회지, **38**, 414 (1995)
2. 장미진, 조일영, 주현규 : 상업적인 pickle products의 oxidant와 antioxidant 로써의 역할. 한국농화학회지, **38**, 408 (1995)
3. Jang, M.: Factors affecting lipoxygenase, hydroperoxide lyase and oxidation in pickling cucumbers and pickle products. Master of Science Thesis, University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas, U.S.A. (1988)

4. Schwimmer, S.: Enzyme involvement in off-flavor from oxidation of unsaturated lipids in nondairy foods or aroma genesis in vegetables. In *Source Book of Food Enzymology*. The AVI Publishing Co., Inc., Westport, Connecticut, p.421 (1981)
5. Eriksson, C.E.: Lipid oxidation catalysts and inhibitors in raw materials and processed foods. *Food Chem.*, **9**, 3 (1982)
6. Bengtsson, B. and Bosund, I.: Lipid hydrolysis in unblanched frozen peas. *J. Food Sci.*, **51**, 1079 (1966)
7. Kazeniak, S.C. and Hall, R.M.: Flavor chemistry of tomato volatiles. *J. Food Sci.*, **35**, 519 (1970)
8. Tressel, R. and Drawert, F.: Biogenesis of banana volatiles. *J. Agri. Food Chem.*, **21**, 560 (1973)
9. Daood, H. and Biacs, P.A.: Evidence for the presence of lipoxygenase and hydroperoxide decomposing enzyme in red pepper seeds. *Acta Alimentaria*, **15**, 307 (1986)
10. Galliard, T., Phillips, D.R. and Reynolds, J.: The formation of cis-3- nonenal, trans-2-nonenal, and hexanal from linoleic acid hydroperoxide isomers by a hydroperoxide cleavage enzyme system in cucumber fruits. *Biochem. Biophys. Acta*, **441**, 181 (1976)
11. Galliard, T. and Chan, H.W.S.: Lipoxygenase. In *Biochemistry of Plants*. Academic Press, New York, p.131 (1980)

(1996년 4월 26일 접수)