

## 진도산 흑미의 lipoxygenase의 특성

이유석 · 송선주 · 이종욱  
전남대학교 식품공학과

### Characteristics of Lipoxygenase in Black Rice

You-Seok Lee, Seon-Joo Song and Chong-Ouk Rhee  
Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

#### Abstract

Lipoxygenase(LOX) activity of black rice(Chindo) was measured by spectrophotometric method at 234 nm. Studies at different pH levels revealed that the optimal activity was exhibited at pH 7.0 with 24.97 unit/mg. Enzyme activity was tested at different concentration of the substrate. The apparent  $V_{max}$  and  $K_m$  values were determined from the Lineweaver-Burk plot to be 53.85 unit/mg and 0.21 mM. Enzyme activity due to storage temperature (-40, 4 and 25°C) and period were decreased at all storage temperature. LOX activity of black rice was significantly decreased during the microwave heating.

**Key words :** black rice, lipoxygenase

#### 서론

흑미의 저장이나 가공중 지방질의 존재는 특별한 의미를 갖고 있는 것으로서 가공 처리 중 쉽게 가수분해나 산화를 일으켜 불쾌취, 불쾌한 맛을 생성하여 밥의 품질을 저하시키는 원인이 되고 있다(1). 이러한 이취미를 주는 주요 화합물은 휘발성 alcohol류, aldehyde류, ketone류, ester류, amine류 및 phenol류 등으로서 저장 및 가공 처리 중 자동산화와 hemoglobin, myoglobin 등 heme화합물의 산화촉진제에 의한 산화 및 lipoxygenase의 촉매 작용에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다(2).

지금까지 행해진 쌀에서의 lipoxygenase에 관한 연구로는 Sekhar 등(3)이 현미에서 추출한 lipoxygenase가 pH 8.0 주위에서 최적활성을 나타냈다고 하였으

며, Ohta 등(4)은 벼의 발아 과정중 효소활성의 변화를 연구하였는데 싹이 트기 전 종자보다 3일이 지난 묘종에서 20배 이상의 효소활성 증가를 보고한 바 있다. Shastry 등(5)은 쌀겨에서 추출한 lipoxygenase를 3~5°C에서 저장했을 경우 적어도 15일 동안 안정하다고 하였으며, 1mM의  $Cu^{2+}$ 와 EDTA에 10분간 침지시  $Cu^{2+}$ 는 효소를 완전히 불활성화 시켰으나 EDTA는 20%이상 효소활성을 증가시켰다고 보고한 반면, Yamamoto 등(6)은 10mM의 EDTA에 50시간 침지시 40% 불활성화 되었다고 하였다. 또한, Ida 등(7)은 배아에서 추출한 lipoxygenase-3는 2-mercaptoethanol 및 cysteine과 같은 물질에 의해 불활성화 되었다고 하였다.

본 연구에서는 흑미의 취반 중 lipoxygenase 작용에 의해 생성되는 휘발성 향미의 특성을 분석하기 위한 기초 자료로 제공하기 위해 진도산 흑미로 부터 추출한 조효소액을 시료로 하여 저장시간과 온도에 따르는 효소 활성, 최적 pH, 기질농도와 효소반응속도와의 상호관계를 검토하고 microwave heating 처리에 의한 효소의 불활성화를 비교 검토하였다.

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

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 재료는 전라남도 지역에서 1997년 재배된 진도산 흑미를 사용하고 외관상 이상이 없는 것을 정선하여  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 보관하며 사용하였다.

### 조효소액의 조제

흑미를 sample mill (Model CEMOTEC 1090, Sweden)로 마쇄 후 얻은 가루 10g에 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) 100 mL을 넣고 shaker (150 rpm/min,  $4^\circ\text{C}$ )에서 30분간 추출하여 가제(3접)로 여과하였다. 여액을 취하여 원심분리기(Model J2-21 Centrifuge, Beckman Instruments Ltd., England)를 사용하여  $10,000 \times g$ 로  $4^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 원심분리시킨 다음 상정액을 얻었다(3,5). 상정액에 ammonium sulfate (Sigma, St Louis, U.S.A.)를 30% 포화도로 넣고 shaker에서 30분간 salting out 한 후 원심분리하여 얻은 침전물을 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)로 녹여 조효소액으로 사용하였다(8).

### 기질의 조제

Lipoxygenase 활성 측정용 기질로는 10 mM linoleic acid / 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)를 희석한 용액을 사용하였다. 기질조제를 위해 70 mg의 linoleic acid를 칭량한 후, 여기에 동량의 tween 20을 가하였다. 초음파(Bransonic Cleaner, Model B-221, Branson Cleaning Equipment Company, Sheiton, U.S.A.)로 균질화 시키면서 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 25 mL를 다섯 번에 나누어 기포가 생기지 않도록 조심스럽게 가하였다. 균질화된 기질액을 vial에 1 mL씩 취해 질소 충전하여 냉동( $-18^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ ) 보관하며 실험에 사용하였다(9).

### Microwave heating 처리

Microwave heating 처리는 조 등(10)의 방법을 변형하여 실험하였다. 흑미 15 g을 petri dish(I.D 8.0cm)에 취해 고르게 펴고 뚜껑을 덮어 회전 받침대 위에 놓고 0, 20, 40, 60, 80, 100초 동안 microwave로 가열하였다. 이때 가열은 시판된 전자레인지(ER-4320B, 금성사)를 이용하고 2150 MHz에서 200 W출력으로 가열하였다.

### Lipoxygenase 활성의 측정

Lipoxygenase의 활성 측정은 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 측정하며 이때 측정온도는  $25^\circ\text{C}$ 로 하였다. 대조구는 큐벳에 기질 2.9 mL와 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0) 0.1mL를 첨가한 것으로 하였다. Lipoxygenase의 활성은 분당 0.001의 흡광도 증가를 1 unit로 하였다(11).

## 결과 및 고찰

### 최적 pH

진도산 흑미의 lipoxygenase 활성을 pH 6.0~9.0으로 조정된 0.2 M phosphate buffer를 사용하여 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 진도산 흑미 lipoxygenase의 최적 pH는 7.0에서 24.97 unit/mg으로 가장 높게 나타났으며 pH 9.0에서는 활성이 나타나지 않았다. Shastri 등(5)은 쌀겨의 최적 pH는 8.5라고 하였고 Holman(12)은 대두의 최적 pH는 9.4라 하였으며 김 등(13)은 녹두의 최적 pH는 8.4였다고 보고하였는데 이에 비해 진도 흑미는 조금 낮은 pH에서 최대 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

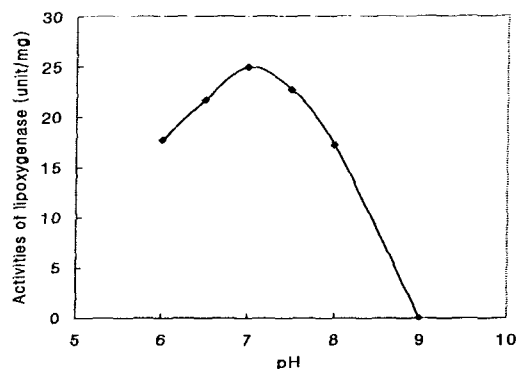


Fig. 1. Changes of lipoxygenase activity by pH.

### Ammonium sulfate의 최적 포화농도

조효소액을 부분적으로 정제하기 위하여 20%~60% 포화농도의 ammonium sulfate를 첨가하여 lipoxygenase의 활성을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 20%와 25% 포화농도에서는 활성이 전혀 나타나지 않았으나 30% 포화농도에서 23.9 unit/mg으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 35% 이상의 포화농도에서는 활성이 감소하였고 40%~60%의 포화농도에서는 거의 비슷

한 활성을 보였다. 신 등(8)에 따르면 다슬기의 lipoxygenase 활성은 40~60% 포화농도 침전물에서 얻어졌으며, 20% 침전물과 80~100% 침전물에서는 활성이 거의 나타나지 않았다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 20% 포화농도에서 활성이 나타나지 않은 본 연구 결과와 일치하였다.

Table 1. Effect of saturation concentration of ammonium sulfate on lipoxygenase activity

Saturation concentration(%)	20	25	30	35	40	45	50	60
Lipoxygenase activity (unit/mg)	0	0	23.9	23.4	19.9	18.4	16.2	15.2

저장온도에 따른 효소활성의 변화

진도산 흑미의 저장온도에 따른 lipoxygenase activity의 변화를 측정하기 위해 조효소액을 vial에 넣고 -4, 0℃, 4℃, 25℃에서 저장하면서 4시간 간격으로 3일간 활성을 측정하였으며 결과는 Fig. 2와 같다. -40℃에서 2일간 저장하였을 때 효소의 활성은 대조구에 비해 94%의 활성을 보여 초기 활성과 별다른 차이가 없었다. 그러나 저장 3일 후 대조구에 비해 62%의 활성을 보여 저장 2일 후 빠른 속도로 활성이 감소함을 알 수 있었다. 이에 반해 20℃에서 저장하였을 때는 저장 4시간까지 활성을 보였으나 4시간 이후에는 전혀 활성이 나타나지 않았다. 4℃에 저장하였을 경우에는 저장 28시간 이후 대조구에 비해 44%의 활성을 보였으며 이러한 활성은 저장 3일까지 유지되었다.

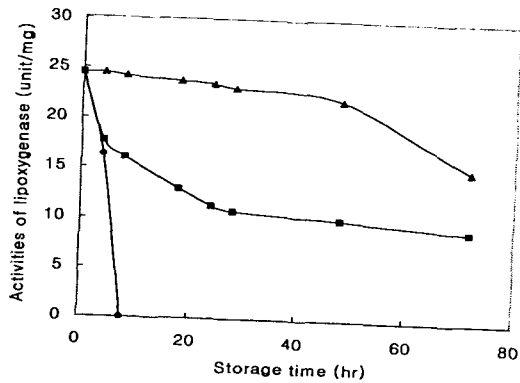


Fig. 2. Changes of lipoxygenase activity by storage temperature. ● : 25°C. ■ : 4°C. ▲ : -40°C.

기질 농도와 효소와의 반응속도

0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mM의 linoleic acid를 기질로

하여 활성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같고 이것을 Lineweaver-Burk plotting(Fig. 4)으로 해석하여 속도상수 Vmax와 Km을 구하였다. 이 결과 진도산 흑미의 Vmax와 Km은 각각 53.85 unit/mg과 0.21 mM로 나타났다. 이러한 결과는 녹두 lipoxygenase의 Km 값이 0.25 mM라고 하였던 김 등(13)의 결과와 거의 일치한다. 또한 동진, 금호, 간척벼의 Km 값이 각각 0.054, 0.045, 0.035 mM 이라고 하였던 김 등(14)의 값보다는 높게 나타났으나 콩의 1 mM(15), 밀의 5 mM(16) 보다는 상대적으로 낮은 값을 나타내었다.

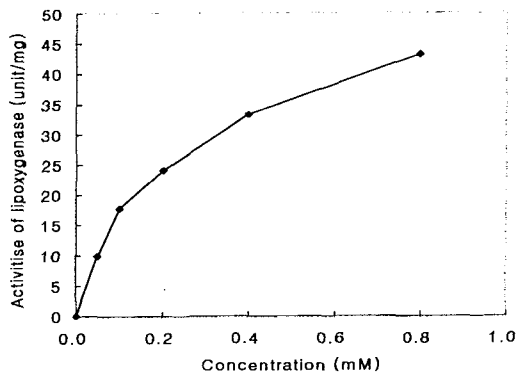


Fig. 3. Changes of lipoxygenase activity by concentration of substrate (linoleic acid).

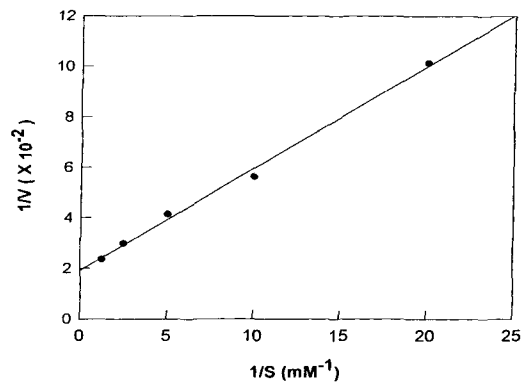


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of the reaction of lipoxygenase.

Microwave heating 처리가 효소활성에 미치는 영향

Lipoxygenase의 불활성화를 위해 microwave로 0, 20, 40, 60, 80, 100초간 가열 처리 하였으며 시료의 활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 효소의 활성은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 100초간 가열하였을 때 대조구에 비해 3.25%의 활성만을 나타내었다. 이와 같이 microwave heating 시간이 증가함에 따라 효소

활성이 감소하는 이유는 heating 처리에 의해 단백질이 변성되어 활성이 감소하는 것이라 사료된다. 김등(14)에 의하면 동진, 금호, 간척벼를 90초간 microwave로 가열처리 하였을 때 대조구에 비해 각각 27.4%, 52.2%, 17.1%로 효소활성이 감소하였다고 보고하였다.

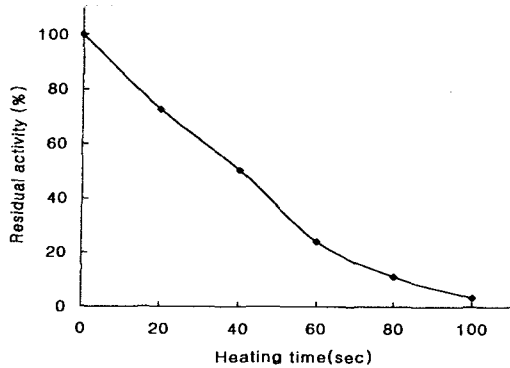


Fig. 5. Effect of microwave heating on lipoxygenase activity.

### 요약

흑미의 취반과정 중 lipoxygenase 작용에 의해 생성되는 휘발성 향미 성분의 분석을 위한 기초 자료를 제공하기 위해 진도산 흑미의 lipoxygenase activity를 비색법을 이용하여 측정하였다. 20~60% 포화농도의 ammonium sulfate를 첨가하여 활성을 비교한 결과 30% 포화농도에서 23.9 unit/mg으로 가장 높은 활성을 나타내었다. pH 6.0~9.0에서 조효소액의 활성을 측정한 결과 pH 7.0에서 24.97 unit/mg으로 가장 높게 나타났으며 0.05~0.8 mM의 linoleic acid를 기질로 하여 활성을 측정한 후 Lineweaver-Burk plotting으로 해석하여 속도상수  $V_{max}$ 와  $K_m$ 을 구한 결과 각각 53.85 unit/mg과 0.21 mM로 나타났다. 저장온도 -4°C, 4°C, 25°C에서 저장하며 활성을 측정한 결과 -4°C에서 저장 3일 후 활성이 62%까지 떨어졌으며 25°C 저장의 경우에는 저장 4시간 이후로는 활성을 나타내지 않았다. Microwave로 0~100초간 가열처리 후 활성을 측정한 결과 100초간 가열 하였을 때 대조구에 비해 3.25%의 활성만을 나타내었다. 따라서 진도산 흑미의 lipoxygenase activity는 pH 7.0, ammonium sulfate 30% 포화농도, 기질의 농도 0.21 mM에서 측정하는 것이 가장 적합하며 microwave heating 처리에 의해 효소를 불활성화 할 수 있는 것으로 생각되었다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단지정 식품산업기술 연구센터의 지원 지역협력 연구과제인 "흑미의 lipoxygenase 활성에 관한 연구" 결과의 일부로써 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. 김두운, 은종방, 이종욱 (1998) 흑미 혼용밥의 취반조건과 텍스처의 변화. 한국식품과학회지, 30(3), 562-568
2. Galliard, T. (1989) Rancidity in cereal products. In *Rancidity in Food*, Allen, J.C. and Hamilton, R. J. (Editors), Elsevier Applied Science, New York, 141-145
3. Sekhar, B.P.S. and Reddy, G.M. (1982) Studies on lipoxygenase from rice (*Oryza sativa* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 33, 1160-1163
4. Ohta, H., Ida, S., Mikami, B. and Morita, Y. (1986) Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiol.*, 27(5), 911-918
5. Shastry, B.S. and Raglavendra, M.R. (1975) Studies on lipoxygenase from rice bran. *Cereal Chem.*, 52(5), 597-603
6. Yamamoto, A., Fuji, Y., Yasumoto, K. and Mitsuda, H. (1980) Partial purification and study of some properties of rice germ lipoxygenase. *Agric. Biol. Chem.*, 44(2), 443-445
7. Ida, S., Ohta, H., Mikami, B. and Morita, Y. (1986) Purification and characterization of rice lipoxygenase component 3 from embryos. *Agric. Biol. Chem.*, 50(12), 3165-3171
8. 신의철, 김병철, 이양봉, 양지영, 장영진 (1998) 다슬기에서 추출한 lipoxygenase의 정제와 특성. 한국식품영양과학회지, 27(5), 808-812
9. 임효식, 조영훈, 이종욱 (1995) 대두 현탁액의 lipoxygenase의 활성저해 인자들의 영향. 한국식품과학회지, 27(1), 19-24
10. 조영훈, 이종욱 (1996) 대두의 phytate 함량에 미치는 microwave heating의 영향. 한국농화학회지, 39, 32-38
11. Ben-Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I. and Budowski, P. (1990) Linoleate oxidation induced by

- lipoxygenase and heme protein (a direct spectrophotometric assay). *Anal. Biochem.*, **34**, 88-100
12. Holman, R.T. (1947) Crystalline lipoxidase,II, Lipoxidase activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **15**, 403-406
13. 김성렬, 이희수 (1987) 녹두 lipoxygenase의 정제 및 특성. *한국식품과학회지*, **19**(4), 295-299
14. 김기중, 이종욱 (1998) 현미 도정획분의 lipoxygenase 활성. *한국식품과학회지*, **29**(1), 145-149
15. Tapple, A.L. (1963) Lipoxydase. In *The Enzymes*, Vol. 8 Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrback, K. (Editors) Academic Press, New York, pp. 275-285
16. Pinsky, A., Sporn, J. and Grossman, S. (1973) Lipoxygenase isoenzymes from *solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, **12**, 1051-1052

---

(1999년 3월 19일 접수)