

감자 Lipoyxygenase Isoenzymes의 베타-카로틴 탈색효과

문정원 · 조순영*[†] · 서명자**

부산여자전문대학 가정과

*강릉대학교 식품과학과

**부산대학교 식품영양학과

The Bleaching Effect of Potato Lipoyxygenase Isoenzymes on β -Carotene

Jung-Won Moon, Soon-Yeong Cho*[†] and Myung-Ja Suh**

Dept. of Home Economics, Pusan Women's Junior College, Pusan 614-734, Korea

*Dept. of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

**Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 608-735, Korea

Abstract

The bleaching effect of potato lipoyxygenase isoenzymes on β -carotene was studied. Two lipoyxygenase isoenzymes (LOX-1, LOX-2) from potato tuber were purified by CM-cellulose, DEAE-cellulose ion exchange chromatography. LOX-1 and LOX-2 seemed to have bleaching effect on β -carotene in the presence of linoleic acid, with the decrease in the formation of conjugated dienes. LOX-2 was founded to have a greater pigment bleaching activity than that of LOX-1.

Key words : potato lipoyxygenase, β -carotene bleaching

서론

Lipoyxygenase (EC.1.13.11.12 : linoleate : oxygen oxidoreductase)는 *cis, cis* 1,4-pentadiene 구조를 갖는 불포화지방산을 산화시켜 과산화물을 형성하는 산화 효소로서 대두를 비롯한 두류와 감자, 쌀겨, 사과 등의 식품계뿐만 아니라 미생물, 동물조직에 널리 존재한다는 것이 알려져 있다¹⁻⁴. 또한 이 효소는 2차적인 반응으로 밀가루 반죽내에서 글루텐의 sulfhydryl group을 산화시켜 반죽의 물성에 변화를 초래하고 카로틴, 클로로필 등의 색소를 탈색시킨다고 보고되었다⁵⁻⁷. Lipoyxygenase에 의한 카로테노이드의 cooxidation현상은 lipoyxygenase 활성을 가진 대두가루를 밀가루에 혼합했을 때 밀가루의 카로테노이드 색소가 탈색되는 현상으로써 처음 발견되었으며, 이것은 lipoyxygenase에 의해 기질인 지방산이 산화되는 동안 만들어지는 유리기에 의해 카로테노이드가 함께 산화되기 때문에 일어나

는 현상인 것으로 알려졌다⁸. 특히 lipoyxygenase의 색소 탈색능은 효소의 출처와 isoenzyme에 따라 다른 것으로 보고되었는데 완두, 잠두의 lipoyxygenase와 대두의 lipoyxygenase-2는 탈색능이 크고, 밀가루, 아마, 대두 lipoyxygenase-1의 탈색능은 아주 약하며 감자 lipoyxygenase는 밀가루나 아마의 lipoyxygenase보다 강력한 베타-카로틴 탈색효과를 나타낸다고 보고되었다⁹.

이처럼 감자 lipoyxygenase는 비교적 탈색능이 우수한 것으로 보고되었으나 isoenzyme 각각의 탈색능에 대해서는 보고된 바가 없기에 본 연구에서는 감자에서 두 종류의 lipoyxygenase isoenzyme을 분리 정제하여 각 isoenzyme의 베타-카로틴 탈색능을 실험하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

감자 (*Solanum tuberosum* variety Dejima)는 부산 장전시장에서 구입했으며 사용할 때까지 -18°C 에서 보

[†]To whom all correspondence should be addressed

관했다. Linoleic acid, CM-cellulose, DEAE-cellulose, bovine serum albumin, β -carotene, tween 80은 Sigma 제품, 그외의 시약은 실험용 특급을 사용했다.

Lipoxygenase 활성 측정

효소의 활성은 oxygen electrode와 oxygen monitor (Yellow Spring Instrument Co., Yellow Spring, USA)가 부착되어 있는 밀폐된 용기 내에서 polarographic 방법¹⁰⁾에 의해 측정되었다. 1ml ethanol에 100mg의 linoleic acid를 용해시킨 용액을 stock solution으로 사용했으며 lipoxygenase 활성 측정을 위한 3ml의 반응액은 50mM potassium phosphate 완충액(pH 5.7)에 용해된 효소단백질 10 μ g과 0.167mM의 linoleic acid로 이루어졌다. 반응은 30°C에서 linoleic acid의 첨가로 개시되어 산소소비량이 측정되었다. 효소활성 1unit는 1분당 1 μ mol의 산소소비로 정하였으며, specific activity는 단백질 mg당의 unit로 나타냈다.

단백질 정량

효소의 정제 과정에서 있어서의 단백질 정량은

Shimadzu UV-2100 spectrophotometer를 사용하여 spectrophotometer법¹¹⁾ 및 Lowry법¹²⁾을 병용하였다. 이때 표준 물질로서는 bovine serum albumin을 사용하였다. Spectrophotometer를 사용했을 때의 단백질 함량은 다음식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Protein (mg/ml)} = 1.55 \text{ OD}_{280} - 0.76 \text{ OD}_{260}$$

조효소액의 조제

감자껍질을 벗긴후 잘게 썰어서 2mM의 ascorbic acid와 sodium metabisulphite를 함유하는 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 6.8)을 가하여 믹서로 균질화시켜 13,000 \times g에서 15분간 원심분리하여 획득한 상등액을 조효소액으로 했다.

효소 정제

Lipoxygenase는 Kim 등¹³⁾의 방법에 따라 Fig. 1과 같은 과정을 거쳐 감자로 부터 분리 정제하였다. 전 과정은 4°C에서 행해졌다. 순도 검정을 위한 분석은 Laemmli¹⁴⁾의 SDS-전기영동법 및 Kmboh 등¹⁵⁾의 등전점 전기영동법에 따라 행했다.

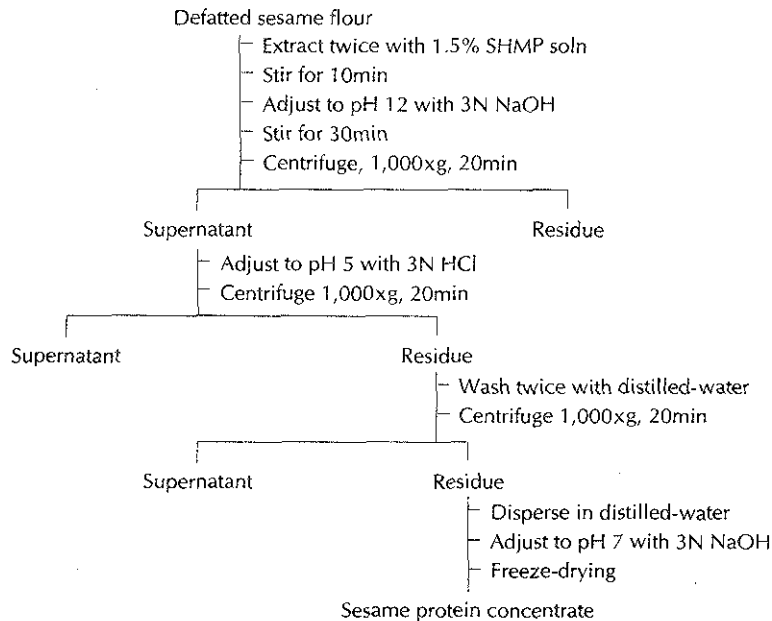


Fig. 1. Procedure for the isolation and purification of the lipoxygenase isoenzymes from potato tuber.

카로틴 탈색능

Lipoxygenase isoenzymes의 카로틴 탈색능은 Ben-Aziz 등¹⁶⁾과 Arens 등¹⁷⁾의 방법에 준하여 spectrophotometric method로 측정되었다.

Carotene stock solution은 25ml의 chloroform에 베타-카로틴 25mg과 tween80 0.1ml를 분산시킨 후 3ml의 카로틴 용액을 진공하에서 증발 건조시켜 그 건조물에 30ml의 증류수를 가하여 용해시켜 제조하였다. 다음 carotene stock solution과 linoleate solution을 최종적으로 50mM potassium phosphate 완충액 (pH 5.7) 3ml에 linoleate, 베타-카로틴 농도가 각각 0.167mM, 3.3 μ M이 되도록 혼합했고 효소 첨가 후 460nm에서의 흡광도 변화를 blank에 대해 측정했다. Blank는 효소 첨가없이 linoleic acid와 베타-카로틴만을 함유한 반응계이다. 카로틴 탈색능은 1분당 흡광도 0.001의 변화를 1unit로 했다. 또한 linoleate-lipoxygenase system과 β -carotene-linoleate-lipoxygenase system에 있어서의 lipoxygenase에 의해 형성되는 공역산(conjugated dienes) 함량은 234nm에서의 흡광도로 측정되었다.

결과 및 고찰

감자 lipoxygenase isoenzyme의 분리 및 정제

유안분획하여 얻은 조효소액을 CM-cellulose, DEAE-cellulose 이온교환 chromatography를 행하여 2종의 isoenzyme을 분리했다. Fig. 2에서 보는바와 같이 CM-cellulose chromatography 후 protein peak와 비슷한 activity peak를 나타내는 chromatogram을 얻었다. 효소 activity peak는 2개가 나타났으나, peak가 큰 fraction을 모아 DEAE-cellulose chromatography를 행했다. Fig. 3에 나타낸 바와같이 DEAE-cellulose chromatography 후 2개의 isoenzyme으로 분리되었다. 이 isoenzyme은 용출 순서에 따라 F-1, F-2로 나타냈다. F-1, F-2의 activity peak에 해당하는 fraction을 모아 DEAE-cellulose chromatography를 각각에 대해 재차 행했을때 단일의 protein peak와 activity peak가 일치하는 chromatogram이 얻어졌다(Fig. 4, Fig. 5). 정제 단계별 단백질양과 효소의 활성은 Table 1에 나타낸 바와 같다. 2차 DEAE-cellulose rechromatography 후 획득된

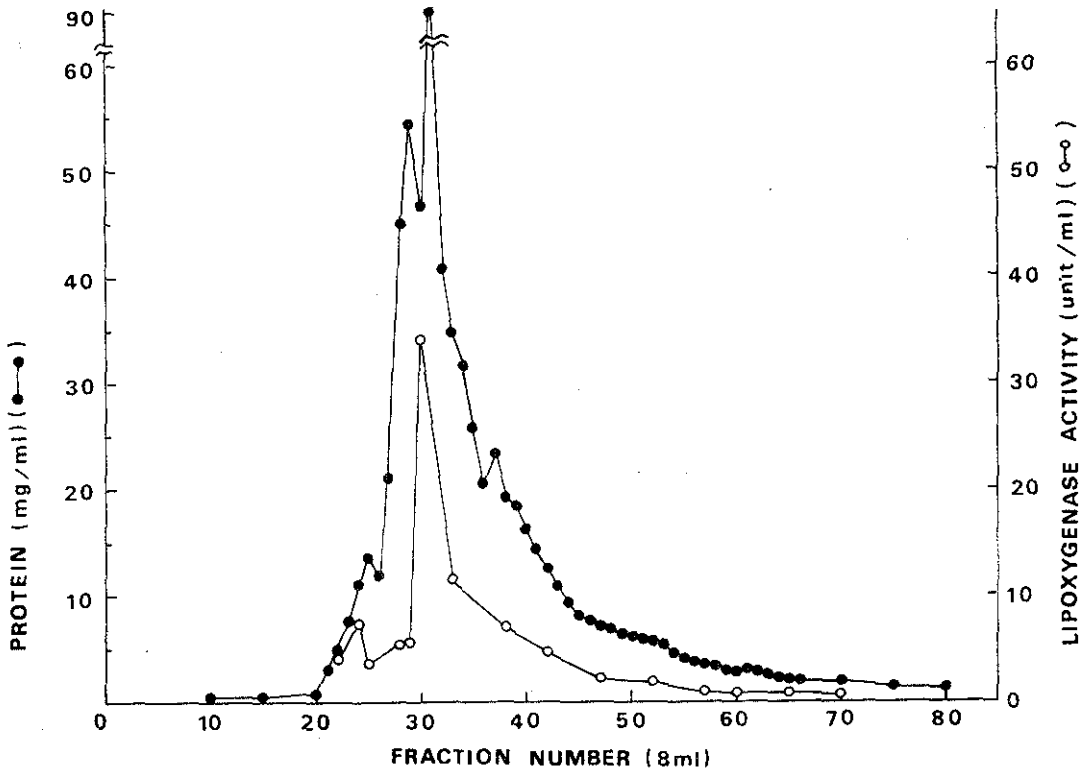


Fig. 2. CM-cellulose chromatogram of potato tuber lipoxygenase. 3472mg of protein precipitated by ammonium sulfate between 30% and 60% was applied to a CM-cellulose column(2.5 x 30cm) which was previously equilibrated with 50mM potassium phosphate buffer of pH 6.8 and eluted with the same buffer.

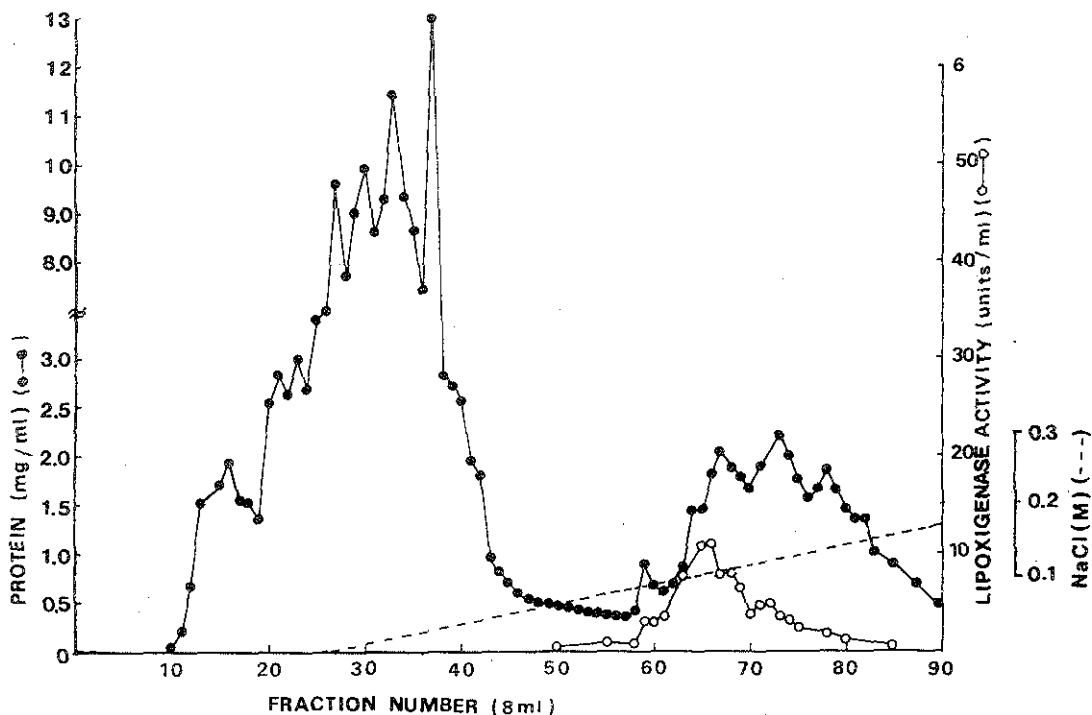


Fig. 3. DEAE-cellulose chromatogram of lipoxigenase.

1434mg of protein obtained from CM-cellulose chromatography was applied to a DEAE column(2.5 × 40cm). The enzymes were eluted with a linear NaCl gradient in 50mM potassium phosphate buffer of pH 6.8.

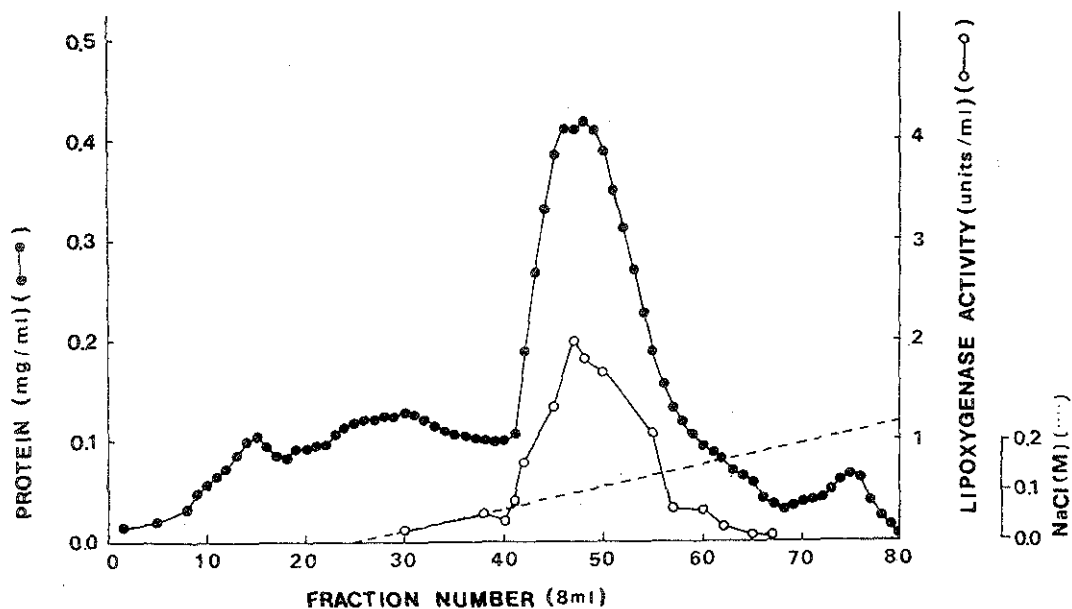


Fig. 4. DEAE-cellulose rechromatogram of lipoxigenase F-1.

84mg protein of F-1 obtained from DEAE-cellulose chromatography was applied to a DEAE column(2.0 × 18cm) and was eluted with a linear NaCl gradient in 50mM potassium phosphate buffer of pH 6.8.

lipoxygenase-1 (이하 LOX-1), lipoxygenase-2 (이하 LOX-2)의 최종 specific activity는 각각 9.44, 4.09였고 activity yield는 6.4%와 3.9%였다. 최종 purification fold는 LOX-1과 LOX-2에 대해 각각 19.7, 8.5로서 비교적 수율과 purification fold가 낮았다. 다른 연구에서도 lipoxygenase 정제 결과, 낮은 purification fold와 수율을 보여 주었다¹⁸⁾. 이와 관련하여 Smith와 Lands¹⁹⁾는 대두 lipoxygenase의 경우 자기 촉매적 파괴가 일어나며 그러한 효소의 불활성화는 분리 정제하는 동안 일어날

지도 모른다고 보고한 바있다.

카로틴 탈색능

식물조직에서의 lipoxygenase에 의한 카로테노이드 탈색은 잘 알려져 있으며, Mitchell와 Hauge²⁰⁾은 alfalfa 현탁액에 linoleic acid를 반응시켜서 카로테노이드 분해속도를 측정한 바 있고, 대두 lipoxygenase는 대두 type-1 lipoxygenase보다 type-2 lipoxygenase가 카로테노이드의 cooxidation에 더 영향을 미치며, type-1

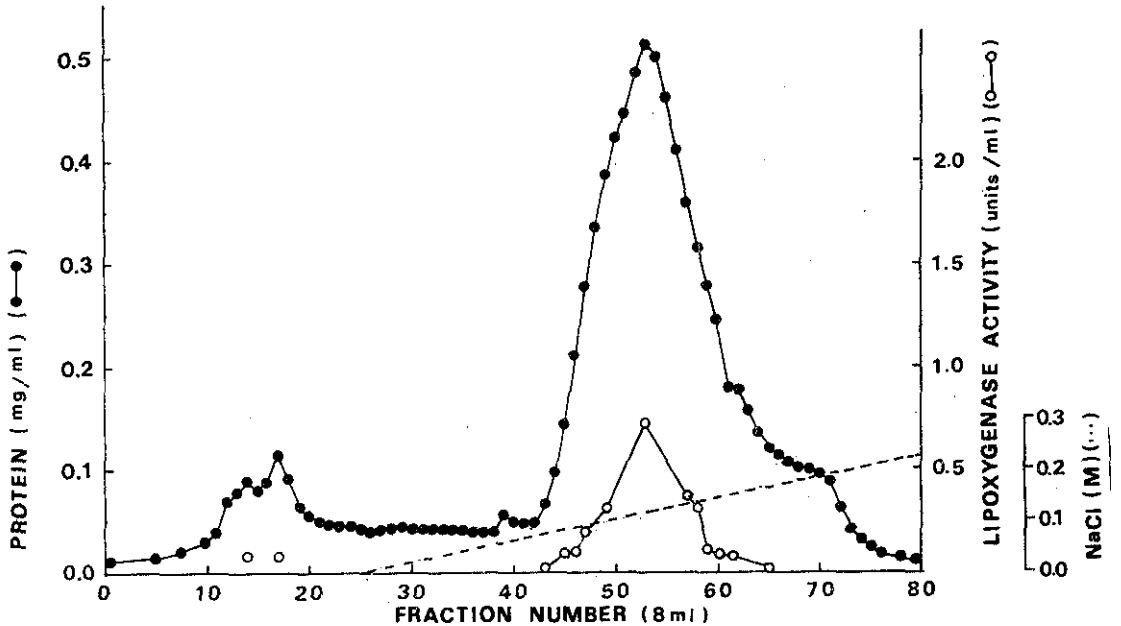


Fig. 5. DEAE-cellulose rechromatogram of lipoxygenase F-2. 185mg protein of F-2 obtained from DEAE-cellulose chromatography was applied to a DEAE column (2.0×18cm) and was eluted with a linear NaCl gradient in 50mM potassium phosphate buffer of pH 6.8.

Table 1. Summary for purification steps of lipoxygenase isoenzymes from potato tuber

Procedure	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	9823	4754	0.48	100	1.0
30~60% (NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	3472	2710	0.78	57	1.6
CM-cellulose chromatography	1434	1300	0.91	27	1.9
DEAE-cellulose chromatography					
F-1 fraction	84	688	8.19	14.5	17.1
F-2 fraction	185	325	1.76	6.8	3.7
DEAE-cellulose rechromatography					
F-1 fraction	32	302	9.44	6.4	19.7
F-2 fraction	45	184	4.09	3.9	8.5

lipoxygenase와 type-2 lipoxygenase를 혼합하게 되면 상승효과를 나타낸다고 보고되었다²¹⁾. Fig. 6은 linoleate-lipoxygenase system에서의 전형적인 carotene bleaching 변화양상을 보여주고 있는 spectrum이다. 460nm에서의 흡광도 변화율을 볼때 베타-카로텐과 지방산 혹은 베타-카로텐과 효소와의 반응에서는 베타-

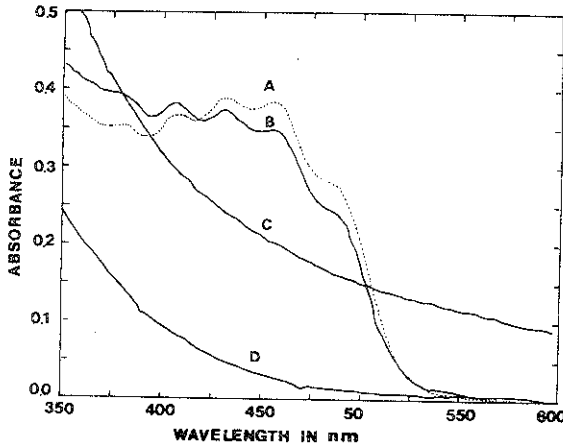


Fig. 6. Spectra of the β -carotene after the bleaching reaction for 60min in the linoleate (LA)-lipoxygenase (LOX) system.

The final concentrations in the reaction mixture were $167\mu\text{M}$ linoleate, $3.3\mu\text{M}$ β -carotene and 0.4% tween 80 in 50mM potassium phosphate (pH 5.7). A: β -carotene + LA; B: β -carotene + LOX-1; C: β -carotene + LA + LOX-1; D: β -carotene + LA + LOX-2

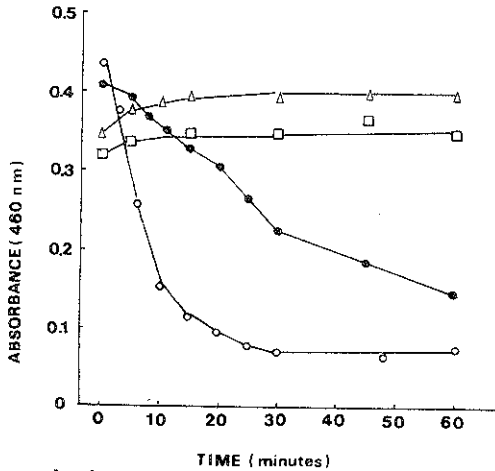


Fig. 7. Bleaching of β -carotene by lipoxygenase-1 (LOX-1) or lipoxygenase-2 (LOX-2) in the presence of linoleate (LA).

The reactants and conditions were the same as Fig. 6.
 ●—● : β -carotene + LA + LOX-1 ;
 ○—○ : β -carotene + LA + LOX-2 ;
 □—□ : β -carotene + LOX-1 ;
 △—△ : β -carotene + LA.

타-카로텐의 흡광도에 별 변화가 없었으나 linoleic acid-lipoxygenase system에서는 베타-카로텐의 흡광도 감소율이 현저하였다. 이것은 lipoxygenase에 의한 지방산과의 cooxidation에 의해 베타-카로텐의 분해가 일어나고 있음을 나타내는 것이다. LOX-1과 LOX-2에 의한 베타-카로텐의 변화 양상을 시간의 경과에 따른 추이를 나타낸 것이 Fig. 7이다. 460nm에서의 흡광도가 베타-카로텐에 LOX-1이나 linoleate를 첨가했을 때는 전혀 변화되지 않았으나 LOX-1이나 2를 linoleate와 함께 베타-카로텐에 첨가했을때 비로소 탈색이 일어나기 시작했다. LOX-1보다 LOX-2에 의해 흡광도가 더 급격히 감소하였음을 알 수 있다. Table 2에 나타낸 바와 같이 동일한 산화속도를 나타내는 산소소비 1unit당 460nm에서의 베타-카로텐 흡광도 감소량은 LOX-1, LOX-2 각각 0.008, 0.056으로서 LOX-2에 의한 흡광도 감소가 더 큼을 알 수 있다. 즉 LOX-2가 LOX-1보다 탈색능이 훨씬 더 크다는 것을 보여주는 것이다. 또한 lipoxygenase에 의한 공역산 생성은 Fig. 8에 나타낸 바와 같다. 본 실험에서의 LOX-1과 LOX-2에 의한 linoleate 산화는 공역산 생성량에서도 동일하게 일어나도록 조정된 산화계임을 알 수 있다. Linoleate에 대해 비슷한 공역산 생성력을 갖는 lipoxygenase isoenzymes 산화계에 똑같은 양의 베타-카로텐을 각각 첨가하여 반응시킨 결과 공역산 생성이 현저하게 억제되었는데 그 정도는 LOX-1이 더 컸다. 앞의 Fig. 7에서 베타-카로텐의 탈색에 lipoxygenase isoenzymes에 의한 지방산의 산화가 동반되어야 함을 확인했는데, 베타-카로텐 탈색시 공역산으로 변화되기전까지의 산화중간생성물(라디칼들)이 주로 관여하므로서 β -carotene-linoleate-LOX 공존계에서는 공역산이 적게 검출됨을 알 수 있었다. 이와같은 lipoxygenase에 의한 색소탈색의 기구는 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않으나 Grosch²²⁾는 lipoxygenase에 의한 linoleic acid의 과산화과정에서 형성되는 불안정한 중간단계의 peroxide radicals이 카로텐, 클로로필과 같은 lipid와 유사한 double bond를 갖고 있는 화합물을 공격함으로써 색소 탈색 효과가 나타난다고 보고했고, Pist-

Table 2. The bleaching effect of lipoxygenase-1(LOX-1) and lipoxygenase-2(LOX-2) on β -carotene

	β -carotene bleaching	
	$\Delta A_{460}/\text{min}/\text{unit}$	
LOX-1	0.008	
LOX-2	0.056	

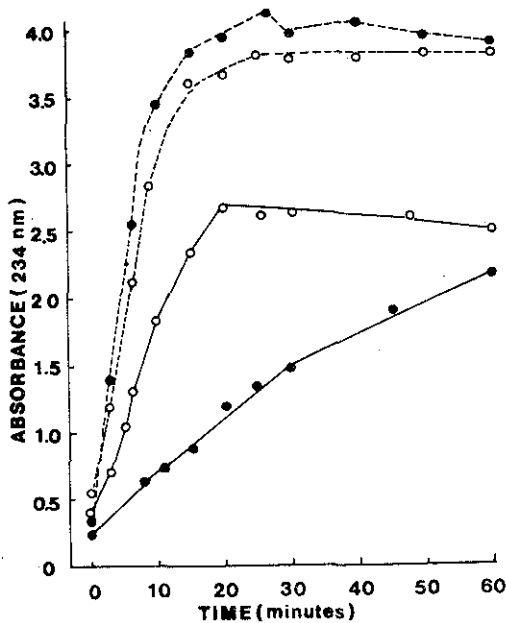


Fig. 8. Formation of conjugated dienes during bleaching process of β -carotene by lipoxygenase-1(LOX-1) or lipoxygenase-2 (LOX-2) in the presence of linoleate(LA). The reactants and conditions were the same as Fig. 6.
 ●---● : LA+LOX-1 ; ○---○ : LA+LOX-2 ;
 ●—● : β -carotene + LA + LOX-1 ;
 ○—○ : β -carotene + LA + LOX-2.

orius²³⁾는 singlet oxygen이 색소 파괴에 관여하며, lipoxygenase isoenzymes간의 카로텐 탈색능의 차이는 활성산소에 대한 linoleic acid와 카로텐간의 경쟁으로 야기된다고 보고했다. 본 연구의 결과로 보아 감자 lipoxygenase에 의한 베타-카로텐의 탈색은 linoleic acid에 대해 lipoxygenase가 작용하는 동안 생성되는 산화지방산 라디칼이 베타-카로텐과 공명체를 형성하여 안정화합물로 변하면서 공역계의 변화에 의해 탈색되는 것으로 관찰되어지나 공역산의 감소가 적은 LOX-2가 LOX-1보다 탈색능이 우수한 사실에 대한 해명은 후후의 연구과제인 것으로 사료된다.

요 약

황산암모늄분획침전, CM-cellulose, DEAE-cellulose 이온교환크로마토그래피를 이용하여 감자에서 2종의 lipoxygenase isoenzymes(LOX-1, LOX-2)을 분리, 정제하여 isoenzyme 각각의 베타-카로텐에 대한 탈색능을 실험하였다. LOX-1, LOX-2는 linoleic acid 존재하에서 베타-카로텐에 대해 탈색효과를 나타냈으

며 탈색효과는 공역산의 감소와 더불어 일어났다. 베타-카로텐 탈색시 공역산의 감소는 LOX-2에 비해 LOX-1이 더 컸으나 탈색효과는 LOX-2가 더 높았다.

문 헌

1. Tapple, A. L. : Lipoxidase. In "The enzymes" Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrback, K.(eds.), Academic Press, New York, Vol. 8, p.275 (1963)
2. Matsuda, Y., Beppu, T. and Arim, K. : Isolation of lipoxygenase-like enzyme from *Fusarium oxysporum*. *Biocim. Biophys. Acta*, **530**, 439 (1978)
3. Nutgeren, D. H. : Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 299 (1975)
4. Wlodawer, P. and Samuelsson, B. : On the organization and mechanism of prostaglandin synthetase. *J. Biol. Chem.*, **248**, 5673 (1973)
5. Arens, D., Seilmeier, W., Weber, F., Kloos, G. and Grosch, W. : Purification and properties of a carotene co-oxidizing lipoxygenase from peas. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 295 (1973)
6. Holden, M. : Chlorophyll bleaching by legume seeds. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 312 (1965)
7. Logan, J. L. and Learmonth, E. M. : Gluten oxidizing capacity of Soya. *Chem. Ind.*, p.1220 (1955)
8. Stumpf, P. K. and Conn, E. E. : *The biochemistry of plants*. Academic Press, New York, Vol. 4, p.132 (1980)
9. Grosch, W., Laskawy, G. and Weber, F. : Formation of volatile carbonyl compounds and co-oxidation of β -carotene by lipoxygenase from wheat, potato, flax and beans. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 456 (1976)
10. Berkeley, H. and Galliard, T. : Measurement of lipoxygenase activity in crude and partially purified potatoes extracts. *Phytochem.*, **15**, 1475 (1976)
11. Dunn, M. J. : Ultraviolet spectrophotometry. In "Protein purification method" Harris, E. L. V. and Angal, S.(eds.), p.11 (1989)
12. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randali, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
13. Kim, Y. M., Lee, C. W. and Park, K. W. : Purification and thermal inactivation of two lipoxygenase isoenzymes from potato tubers. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**(5), 397 (1987)
14. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)
15. Kmboh, M. I., Ferrell, R. E. and Sepehrnia, B. : Genetic studies of human apolipoproteins. IV. Structural heterogeneity of apolipoprotein (β_2 -glycoprotein 1). *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 452 (1988)
16. Ben-Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I. and Budowski, P. : Carotene bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by spectrophotometric method. *Phytochem.*, **10**, 1445 (1971)

17. Arens, D., Seilmeier, W., Weber, F., Kloos, G. and Grosch, W. : Purification and properties of a carotene co-oxidizing lipoxygenase from peas. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 295 (1973)
18. Christopher, J., Pistorius, E. and Axelrod, B. : Isolation of an isoenzyme of soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **284**, 54 (1972)
19. Smith, W. L. and Lands, W. E. M. : The self-catalyzed destruction of lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 846 (1970)
20. Mitchell, H. L. and Hauge, S. M. : Enzymic nature of the carotene destroying system of alfalfa. *J. Biol. Chem.*, **163**, 7 (1946)
21. Kahl, G. : *Biochemistry of wounded plant tissue*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, p.174 (1978)
22. Grosch, W. : Reaktionsweg zur enzymatischen bildung fluchtiger aldehyde in Erbsen(*Pisum sativum*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **139**, 1 (1968)
23. Pistorius, E. : Studies on isoenzymes of soybean lipoxygenase. *Ph. D. Dissertation*, Purdue University, West Lafayette, Indiana (1974)

(1993년 9월 25일 접수)