

다슬기에서 추출한 Lipoxygenase의 정제와 특성

신의철 · 김병철 · 이양봉[†] · 양지영 · 장영진*

부경대학교 식품공학과

*부경대학교 양식학과

Purification and Characterization of Lipoxygenase from Melania Snail

Eui-Cheol Shin, Byung-Chul Kim, Yang-Bong Lee[†], Ji-Young Yang, Young-Jin Jang*

Dept. of Food Science and Technology and *Dept. of Aquaculture,
Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Melania snail(*Semisulcopira bensoni*) is used as an ingredient in Korean traditional soup and nutritional foods. Generally, lipoxygenase in several food products may produce off-flavors during their processing and storage. Therefore, the inactivation of lipoxygenase is required to make the better extracts from Melania snail. Also, the quality on freshness of Melania snail may be evaluated by lipoxygenase activity. The lipoxygenase activity was the highest at 40~60% saturation among several concentrations in salting-out saturated solution of ammonium sulfate. The partial purification of lipoxygenase was successfully obtained by Sephacryl S-200 gel chromatography. The first peak among three peaks for protein determination showed the highest activity of lipoxygenase in 13~16 fractions among 100 fractions. The highest peak of lipoxygenase activity by ion exchange chromatography was shown at 0.1M NaCl. In the purification step, the specific activity was 20.8U/mg and activity yield was 19.8%. The optimum pH and temperature were pH6.0~8.0 and 30°C, respectively. Molecular weight of the lipoxygenase was estimated about 35kDa by SDS-PAGE.

Key words: Melania snail, lipoxygenase, purification

서 론

우리나라 식생활 문화에 있어서 어패류와 그 가공식품이 건강식품으로 부각되기 시작하면서 건강식에 대한 수요가 증가하고 있으며 이들 건강식 중 어패류나 해조류에 들어 있는 영양 성분 등에 관한 보고들이 많이 있다(1). 이 중 특히 성인병 예방에 유익한 어패류의 영양성분은 수요자들의 많은 관심을 불러일으키고 있는 추세이다(1). 그 중 한국, 일본, 타이완 등지의 하천이나 호수에 서식하는 다슬기(*Semisulcopira bensoni*)는 그 영양 성분이나 이용 분야에 대한 각종 문헌이나 연구 보고가 매우 적다. Lipoxygenase(EC. 1,13,11,12)는 cis, cis-1, 4 pentadiene구조를 가진 지방산을 산화시키는 효소로서 식물계에 널리 분포되어 있고 특히 두류 중에는 활성이 높은 lipoxygenase가 존재한다고 알

려져 있으며, 고도 불포화 지방산의 함량이 높은 어패류의 내장이나 아가미, 표피에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다(2-9). 어패류가 포획된 후 대체로 조직의 손상을 입고 죽게 됨에 따라 내장이나 아가미, 표피로부터 lipoxygenase와 혈액 중 peroxidase 및 근육 중 microsomal NADH peroxidase 등이 지질 산화를 유발하여 불안정한 과산화물을 생성하고 잇따라 hexanal, 4-heptanal과 2,4-heptadienal로 분해되어 많은 식품에 있어서 변향과 산패취를 가져오게 함으로써 맛과 냄새를 나쁘게 한다. 또한 지질 산화로 인해 생성된 free radical은 생체막의 변화 및 파괴, 노화, 암 등의 원인이 되는 지질과산화물을 생성할 수 있는데 이는 생체내에서 여러가지 활성 산소가 관여하는 비효소화적인 반응에 의하여 또는 cyclooxygenase, lipoxygenase 등의 효소 반응에 의해서도 생성되는 것으로 알려져 있다. 대

[†]To whom all correspondence should be addressed

두의 경우 이러한 lipoxygenase의 활성을 막기 위해 미리 침지시킨 대두를 가열처리 함으로써 lipoxygenase를 불활성화시킬 수 있다고 한다(10). 하지만 어패류에 존재하는 lipoxygenase의 불활성화에 대해서는 아직 구체적인 방안이 모색되지 않은 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 다슬기로부터 lipoxygenase를 분리하여 그 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 다슬기는 양산의 내원사 계곡에서 직접 채취하여 껍질을 제거한 후, 신선한 상태에서 사용하였다. 실험에 곧바로 사용하지 않은 시료는 산화를 방지하기 위해 질소 충전한 후 -60°C 의 심온동결고에서 보관하였다.

방법

조효소액의 조제

채취한 다슬기를 막자사발에 넣어 1차 마쇄를 하였다(11). 이때 온도의 상승을 막기 위해 막자사발에 dry ice를 첨가하여 함께 마쇄하였다. 1차 마쇄가 끝난 다슬기에 0.05M 인산완충액(pH 7.4)을 4배 정도 가하여 homogenizer[Glas-Col, USA]로 균질화시켰다(4,5,12). 이 때에도 온도 상승을 방지하기 위해 얼음을 homogenizer 주위에 둘러싸서 균질시의 온도 상승을 막았으며, lipoxygenase가 금속과 접촉하는 것을 막기 위해 유리봉 homogenizer와 teflon재질의 homogenizer를 이용하여 균질시켰다(13). 균질속도와 시간은(10,000×g)에서 20분간 행하였다. 균질이 끝난 다슬기는 원심분리기를 이용하여 20분간 원심분리(10,000×g)하여 고형분과 액을 분리시켰다. 고형분을 제거하고 남은 상층액만을 취한 후 이 상층액을 여과지(Advantec No. 2)에 여과시켰고 여과를 거친 상층액을 조효소 추출액으로 사용하였다(10,12,14,15).

효소의 정제

일정량의 조효소 추출액에 ammonium sulfate(4,16, 17)를 가하여 20, 40, 60, 80, 100%의 단계별로 포화시켜 20분간 원심 분리(10,000×g)하여 얻은 침전물을 0.05M 인산완충액(pH 7.4)에 용해한 후 투석하였다. 투석은 500ml의 비이커에 투석막(MWCO: 12,000~14,000)을 이용하여 투석하고자 하는 효소액의 40배 정도 buffer를 가하여 24시간 동안 실시하였다(4,18). Ammonium

sulfate 포화로 얻은 조효소액은 농축하여 $3 \times 100\text{cm}$ 크기의 Sephacryl S-200 column에 통과시켜 분리시켰다(16,19,20). 이때 용출속도는 0.3ml/min이었고 5ml씩 분획하여 100개의 획분을 얻었다. 활성획분을 농축하여 DEAE-Sephrose column($3 \times 40\text{cm}$)에 주입한 후 0~0.5 M NaCl의 linear salt gradient로 흡착된 단백질을 용출하였다.

단백질 정량

분리, 정제 과정 중 단백질 측정은 UV/Visible spectrophotometer(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, USA)를 이용하여 280nm에서 측정하였다.

단백질의 정량은 Lowry(21)법을 이용하여 bovine serum albumin을 이용하여 표준 단백질의 검량선을 작성하여 정량 하였다.

Lipoxygenase활성

Lipoxygenase활성은 Surrey(22)법을 이용하여 측정하였다. 이때 기질 stock solution은 4.9mM의 linoleic acid이었고 이 용액 5ml에 0.05M인산완충액 50ml, 20% tween20을 1ml, 탈이온수 44ml를 혼합하여 효소 반응액으로 하였다. 효소 활성을 측정하기 위해 반응액을 충분히 통기시킨 후 3.0ml를 cuvette에 취하여 정제한 효소액 400 μ l를 가하여 30분 동안 반응시켜 흡광도의 증가를 측정하였다. 효소의 활성은 1분간 0.001의 흡광도를 증가시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다(4,6,10).

효소의 pH와 온도에 대한 영향

Lipoxygenase의 특성을 알아보기 위하여 0.05M 인산완충액을 사용하여 pH와 온도를 달리하여 lipoxygenase의 활성을 측정하여 비교하였다.

SDS-PAGE를 이용한 분자량 결정

Lipoxygenase의 분자량을 측정하기 위해 polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 행하였다. Gel 농도는 7.5%로 하여 100V, 30mA의 조건에서 95분간 행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 coomassie blue R-250으로 염색하여 methanol: acetic acid: distilled water=1:1:8의 비율로 조제한 탈색 시약을 이용하여 하룻밤 동안 탈색시켰다(23). 사용된 표준단백질은 BIO-RAD사에서 시판되는 Carbonic Anhydrase(31,000), Ovalbumin(45,000), Serum albumin(66,200), Phosphorylase B(97,000)를 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

먼저 효소 추출액을 ammonium sulfate 포화도로 분리하여 각 분리도의 활성을 측정, 비교한 결과 효소 활성은 대부분이 ammonium sulfate 포화도 40~60% 침전물에서 얻어졌으며 20~40% 침전물에서는 활성이 낮았다. 그리고 20%의 침전물과 80~100%의 침전물에서는 활성이 거의 없었다. 위의 결과는 고등어의 아가미(11)에서 추출한 lipoxygenase의 포화도와 같은 결과였다. Gel filtration chromatography와 ion exchange chromatography에 의해서 얻어진 단백질의 획분에 따른 활성도와 이온 강도에 따른 활성도를 Fig. 1과 2에 나타내었다. Fig. 1에서 나타낸 것처럼 Sephacryl S-200에 의해서 얻어진 3개의 단백질 peak에서 lipoxygenase의 활성은 첫 번째 peak에서 확인할 수 있었다. Ion exchange chromatography에서는 0~0.5M NaCl 농도로 용출시켜 4개의 단백질 peak를 얻었는데 0.1M의 NaCl 농도에서 얻어진 단백질 peak에서만 lipoxygenase의 활성이 확인되었다. 각 단계의 정제도는 Ta-

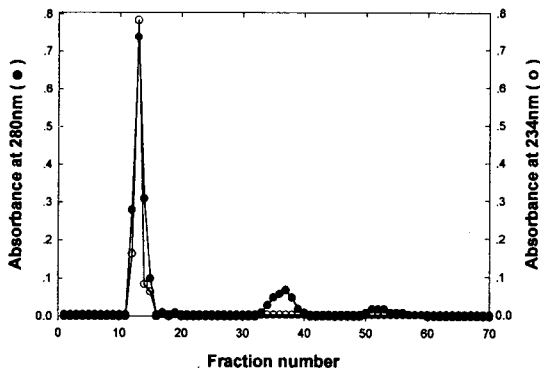


Fig. 1. Gel filtration chromatography of Melania snail lipoxygenase on Sephacryl S-200.

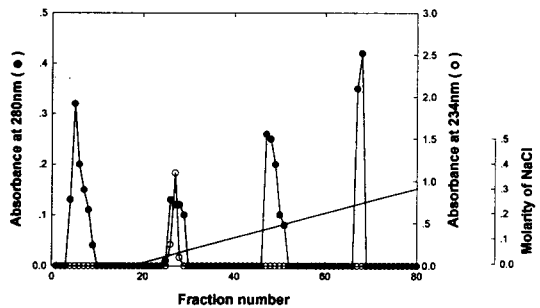


Fig. 2. Ion exchange Chromatography of Melania snail lipoxygenase on DEAE-Sephrose.

Table 1. Purification steps of melania snail

	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude	45,000	2,520	0.06	1	100
Ammonium sulfate(40~60%)	13,810	2,083	0.15	2.5	82.7
Sephacryl S-200	3,168	738	0.23	3.83	29.2
DEAE-Sephrose	24	500	20.83	347.17	19.8

ble 1에서 나타낸 바와 같았으며 염석, Sephacryl S-200 gel chromatography, DEAE-Sephrose ion exchange chromatography 과정을 거치는 동안 specific activity는 20.8U/mg, activity yield는 19.8%를 얻었다.

효소학적 성질과 분자량 결정

pH에 대한 영향

정제 효소의 pH에 따른 활성을 알아보기 위해 pH 4.0~9.0의 범위에서 효소의 활성을 관찰해 본 결과 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. 최대 효소 활성은 pH 6.0~8.0 사이에서 나타났으며 pH 4에서는 최대 활성의 40%를 나타냈다. 이는 완두콩(14)에 존재하는 lipoxygenase의 pH가 6.0~8.0에서의 활성이 가장 강한 것을 나타냈다는 결과와 같음을 보여 주었지만 송어(12)에서의 결과는 pH 7.5에서만 강한 활성을 나타내었고, 광저기(5)에서는 오히려 pH 4.0~9.0 사이에서 최대 활성을 나타낸다고 보고하고 있다.

온도에 따른 영향

정제 효소의 반응 온도 조건을 알아보기 위하여 20~60°C의 범위에서 효소 활성을 측정한 결과 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 최적 반응 온도는 30°C에서 나타내었다. 고등어(11)의 경우 8°C에서 30°C 사이에서 강한

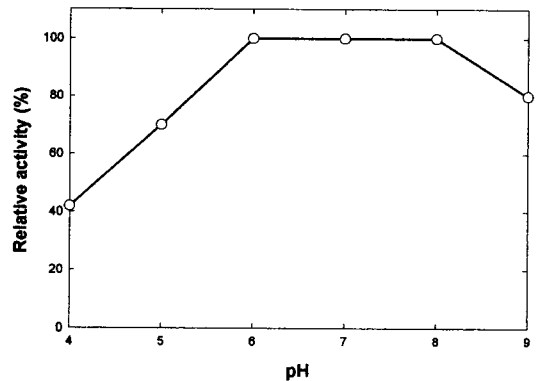


Fig. 3. Effect of pH on the activity of lipoxygenase.

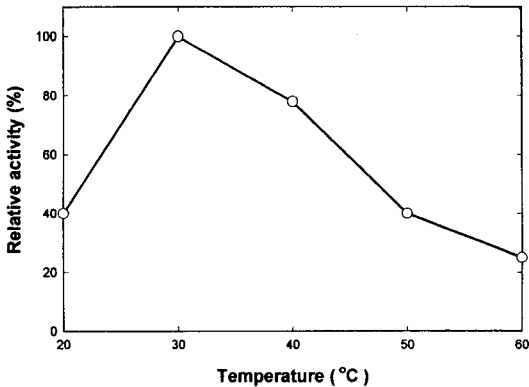


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of lipoxigenase.

요약

양산의 내원사 계곡에 서식하는 다슬기를 채집하여 다슬기 내에 존재하는 lipoxigenase를 정제하고 특성을 관찰하였다. 다슬기에서 추출한 lipoxigenase는 40~60% ammonium sulfate 회분에서 최대의 활성을 보였으며, 20~40%에서도 약간의 활성을 볼 수 있었다. Sephacryl S-200 gel chromatography에서는 3개의 단백질 peak를 얻었고, 그 중 첫번째 peak에서 활성이 나타남을 확인하였다. DEAE-Sephacryl ion exchange chromatography에서는 0M~0.5M범위의 NaCl용액의 농도구배로 용출시킨 결과 0.1M에서 lipoxigenase가 용출되는 것을 알 수 있었다. 각 단계의 정제도는 염석, Sephacryl S-200 gel chromatography, DEAE-Sephacryl ion exchange chromatography 과정을 거치는 동안 specific activity가 20.8U/mg, activity yield는 19.8%였다. 효소의 pH에 대한 영향을 보기 위해 pH 4.0~9.0의 범위에서 효소의 활성을 관찰해 보았다. pH 4.0에서부터 pH가 증가함에 따라 활성도 증가하다가 pH 6.0~8.0 사이에서는 최대의 활성을 나타내었고, pH 8.0 이후에서는 점차 감소하는 추세를 볼 수 있었다. 효소의 온도에 따른 영향을 관찰한 결과 최적 반응 온도는 30°C에서 나타남을 알 수 있었다. 7.5% acrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시한 결과 단일 밴드를 확인할 수 있었는데, 이 단일 밴드를 통해서 완전한 정제가 이루어진 것으로 판명할 수 있었고, 표준 단백질의 밴드와 비교하여 분자량을 검정한 결과 약 35kDa으로 판단되었다.

감사의 글

부경대학교 학술진흥재단 연구비와 해양식량자원의 지방대학 특성화 사업의 지원을 받아 연구한 일부 논문이며 이에 감사드립니다.

문헌

1. 이용호, 김세권, 조규대 : 한국 연안 수산물의 영양 성분과 건강. 유일문화사, (1997)
2. Nagodawithana, T. and Reed, G. : Enzymes in food processing. Academic Press Inc., p.257(1993)
3. Wallace, J. M. and Wheller, E. L. : Lipoxigenase from wheat. An examination of its reaction characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, 23(1975)
4. Chen, A. O. and Whitaker, J. R. : Purification and characterization of a lipoxigenase from immature English peas. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 203(1986)
5. Den, T. D. and Mendoza, E. M. T. : Purification and characterization of a two lipoxigenase isoenzymes

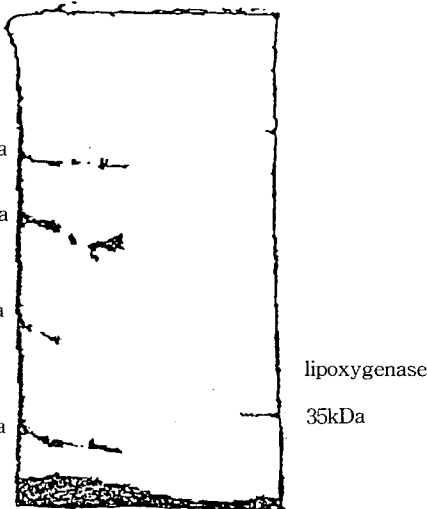


Fig. 5. Measurement of molecular weight by SDS-PAGE.

활성을 보였고, 녹두(6)의 경우는 50°C까지 활성을 유지하다가 60°C에서는 약 50%의 효소 활성을 보여준다고 보고하고 있다. 다슬기에서의 효소의 최적 반응 온도는 다른 시료보다는 조금 불안정함을 볼 수 있었다.

SDS-PAGE에 의한 분자량 결정

7.5% acrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시한 결과 Fig. 5와 같은 단일 밴드를 확인할 수 있었다. 이 단일 밴드를 통해서 완전한 정제가 이루어진 것으로 판명할 수 있었고, 표준 단백질의 밴드와 비교하여 분자량을 검정한 결과 약 35kDa으로 판단되었다. 이는 콩(2)에서 추출한 lipoxigenase의 분자량이 98.5kDa인데 반해 매우 낮은 분자량을 보였고, 어류(2)의 분자량이 70kDa이라는 보고를 보아도 다슬기에서 추출한 lipoxigenase의 분자량은 매우 작음을 알 수 있다

- from cowpea. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 54(1982)
6. 김성렬, 이희수 : 녹두 lipoxygenase의 정제 및 특성. *한국식품과학회지*, 95(1987)
 7. Lumen, B. O., Stone, E. J., Kazeniac, S. J. and Forsythe, R. H. : Formation of volatile flavor compounds in green beans from linoleic and linolenic acids. *J. Food Sci.*, **43**, 698(1978)
 8. Hidaka, T., Katsuki, S., Nagata, Y. and Nakatsu, S. : Lipoxygenase from pumpkins. *J. Food Biochem.*, **10**, 55(1986)
 9. German, J. B. and Kinsella, J. E. : Lipid oxidation in fish tissue enzymatic initiation via lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 680(1985)
 10. 김동경, 한기영, 노봉수 : 배추 lipoxygenase의 특성. *한국식품과학회지*, **29**, 710(1997)
 11. 심선엽 : 고등어 아가미에서 추출한 lipoxygenase의 효소학적 특성. *부경대학교 석사학위논문*(1995)
 12. Hsieh, R. J., German, J. B. and Kinsella, J. E. : Lipoxygenase in fish tissue: Some properties of the 12-lipoxygenase from trout gill. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 680(1988)
 13. 정동효 : 효소학. p.19(1991)
 14. Hayda, M. and Steele, L. : Oxidation of pea lipid by pea lipoxygenase. *J. Food Sci.*, **40**, 808(1975)
 15. Grunand, I. U. and Barbeau, W. E. : Menhaden oil oxidation. *J. Food Biochem.*, **18**, 199(1995)
 16. Harris, E. L. V. and Angal, S. : Protein purification methods. IRL Press(1989)
 17. 김병기 : 효소학. 세문사, p.168(1995)
 18. Kanner, J. and Mendel, H. : Carotene oxidizing factors in red pepper fruits. *J. Food Sci.*, **42**, 1549(1977)
 19. Scopes, R. K. : Protein purification. Springer-Verlag, p.238(1994)
 20. Deutscher, M. P. : Guide to protein purification. Methods in enzymology. Academic Press Inc., p.182(1990)
 21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farrand, A. L. and Randal, R. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
 22. Surrey, K. : Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65(1964)
 23. Bollag, D. M. and Edelstein, S. J. : Protein methods. Wiley-Liss, p.95(1991)

(1998년 6월 30일 접수)