KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 34, No. 2, pp. 157~163 (2002)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

AOT/isooctane 역미셀계내에서의 lipoxygenase 반응 특성

장판식* · 이광인
서울산업대학교 식품공학과

Characterization of Lipoxygenase in AOT/Isooctane Reversed Micelles

Pahn Shick Chang* and Kwang In Lee
Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

An investigation was carried out to study the characteristics of lipoxygenase in dioctyl sulfosuccinate (aerosol-OT, AOT)/isooctane revered micelles of microaqueous system containing infinitesimal water. α-Linoleic acid as a substrate could be analyzed by the colorimetric methodology using 5%(w/v) cupric acetate-pyridine solution and the activity of lipoxygenase was able to be assayed by the degree of α-linoleic acid consumption per minute. Optimal pH, temperature, and R-value ([water]/[AOT]) were determined as the value of 5.0, 25°C, and 10.0, respectively. Kinetic analysis of the enzyme reaction under the optimal conditions showed that the values of K_m and V_{max} were 0.31 mM of α-linoleic acid and 384.16 μmole of α-linoleic acid decomposed/min, respectively. The results indicate the reaction to be lipoxygenase-catalyzed oxidation of α-linoleic acid in AOT/isooctane reversed micellar system. The inhibitory effect of natural antioxidants on lipoxygenase showed little inhibitory effect of L-ascorbic acid while α-tocopherol showed 72% of inhibitory effect.

Key words: lipoxygenase, reversed micelles, kinetic analysis, inhibition

서 론

Lipoxygenase는 1928년 Bohn과 Heas가 대두에서 carotene을 파괴하는 효소인 carotene oxidase의 존재를 발표하였을 때 처음으로 알려졌으며, 1932년에는 대두에 포함된 불포화 지방질을 산화시키는 효소로 규명되었다. 이후부터 lipoxygenase라고 명명되었으며, 1940년대에는 carotene oxidase와 lipoxygenase는 같은 효소라는 것이 증명되었다[1].

Lipoxygenase(linoleate : oxygen oxidoreductase : EC 1.13.11.12)는 일중항 산소(singlet oxygen) 존재하에서 *cis*, *cis*-1,4 pentadiene(-CH=CH-CH_2-CH=CH-) 구조를 가지고 있는 불포화지방산에만 작용하는 기질 특이성을 갖는 산화효소로서, 다양한 식물체내에 존재하며 특히 콩과 식물 중 대두에 존재하는 lipoxygenase는 가장 활성이 높은 것으로 알려져 있다[2-6].

한편, 식품에서의 lipoxygenase는 필수지방산을 산화시켜 이미, 이취를 발생시키며[7], 이 효소에 의하여 생성된 자유 라디칼은 비타민 및 단백질을 파괴시키는 한편, 특히 두류와 옥수수 등의 비가열 냉동식품에서는 심각한 문제를 야기시키고 있는 바, 이것은 lipoxygenase의 활동이 낮은 온도에서도 지속되는 것으로 볼 수 있다[8]. 이와 같이 식품의 품질저하 요인인 lipoxygenase의 활성을 억제 또는 파괴하기 위한 방법이 연구되고 있으며 이러한 효소의 활성 억제 방법을 확립하기 위해서는 무엇보다 먼저 lipoxygenase 효소의 정확한 활성이 분석되어야만 한다.

그러나, lipoxygenase 효소의 활성을 측정하는데에는 많은 어려움이 따르고 있는 실정이다. 즉, 물과 지방질로만 이루어진 이상계(two phase system) 와 물, 지방질 및 계면활성제로 구성된 에멀젼계(emulsion system)가 이용되어 왔으나[9], 서로 다른 용매사이의 적은 계면적 및 층 분리 문제 등이 지적되어왔다. 따라서, 본 연구에서는 역미셀계를 이용하여 이러한 문제점들을 극복하고자 하였다.

역미셀계(Reversed micellar system)란 비극성 용매내에서 계면활성제의 소수성 부분이 외부로 향하고 친수성 부분이 내부로 향하도록 배열되어 안정화된 수 nm 크기의 수용성 입자가 분포된 계(system)로서 친수성 물질을 함유한 수용액과 역미셀 형성에 적합한 계면활성제를 함유한 비극성 용매를 혼합하면 친수성 물질들은 역미셀의 수용액 내부로 쉽게 침투되어 변성이 일어나지 않는 상태로 존재한다[10,11].

본 연구에서는 미셀 입자가 매우 작아 투명하면서도 안정된 구조를 가지고 있으며, 입자의 균일한 분배 특성에 의한

*Corresponding author : Pahn Shick Chang, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, 172 Kongneung-dong, Noweon-ku, Seoul 139-743, Korea
Tel: 82-2-970-6437
Fax: 82-2-976-6460
E-mail: pschang@snut.ac.kr

반응의 높은 재현성 및 효소와 기질 사이의 넓은 계면적에 의한 효소반응의 고효율성등의 장점을 지니고 있는 역미셀계 효소 생물 반응계[12]를 선택하여 lipoxygenase의 효소활성도 측정 가능성을 판단하였으며, 보다 안정적이고 예민하게 lipoxygenase의 활성을 측정할 수 있는 방법을 개발하고 최적의 반응 조건을 확립한 다음 저해제가 lipoxygenase활성을 억제하는 양상을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 효소로서는 대두에서 추출 및 정제한 lipoxygenase(5,100 units/mg solid), 기질로서는 α-linoleic acid(*cis*-12-octadecadienoic acid), 계면활성제로서는 dioctyl sulfosuccinate(bis[2-ethylhexyl] sulfosuccinate, aerosol-OT, AOT) 등을 Sigma Chemical Co.(St. Louis, WI, USA)에서 구입하여 사용하였으며, cupric acetate-pyridine 용액은 Lowry와 Tinsley[13] 및 Shipe 등[14]의 방법을 이용하여 조제하였으며, 그 외 시약들은 EP 등급의 시약을 실험에 사용하였다.

효소생물 반응계의 설정

기질인 α-linoleic acid와 계면활성제인 AOT를 각각 1.78 mM 및 25.0 mM의 농도로 isooctane에 용해시킨 후, 이 용액 39.82 mL에 효소용액 180 μL(lipoxygenase 0.45 unit를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 용액)를 넣고 vortex mixer로 50초간 격렬히 교반시켜 직경이 1~2 nm로서 매우 작으면서도 투명한 역미셀계 효소 반응액을 조제하였다.

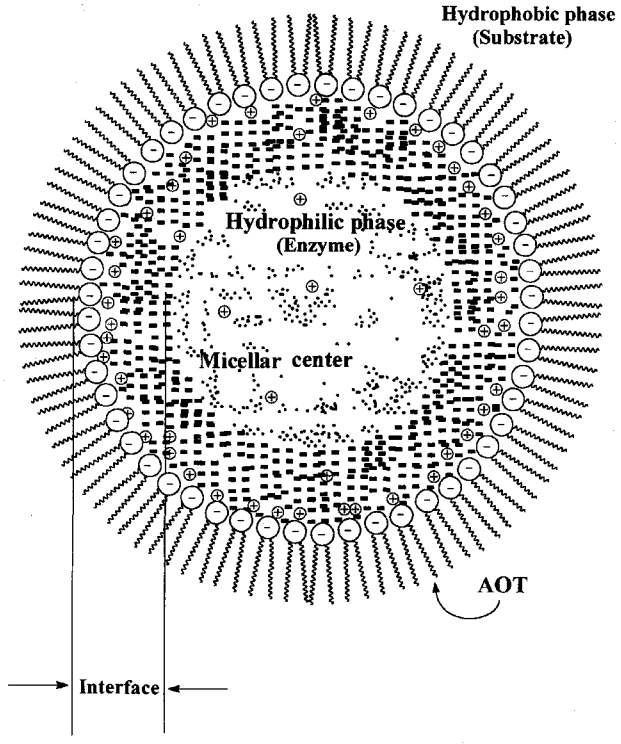

Fig. 1. Schematic representation of the reversed micellar particle in AOT/isooctane reversed micellar system.

상기 방법에 의하여 제조된 AOT/isooctane 역미셀계내에 함유된 미셀입자의 구조는 아래 Fig. 1에 나타내었으며, 이러한 사실은 Seoud[15]가 이미 확증하여 보고한 바 있다.

단순희석법에 의한 lipoxygenase 효소활성 측정

전술한 AOT/isooctane 역미셀계 효소생물반응계내에서 lipoxygenase 효소반응을 수행하면서 일정한 시간 간격으로 시료를 직접 채취하여 234 nm에서의 흡광도 증가 속도(ΔAbsorbance at 234 nm/min)를 측정함으로써 효소활성도를 측정하였다. 이때 234 nm에서의 흡광도 증가는 lipoxygenase 효소 반응 결과 산물로 생성되는 과잉 산화물에 기인하는 것으로 알려져 있다[16].

변형된 cupric acetate-pyridine 발색법에 의한 표준곡선 작성

Lowry와 Tinsley[13] 및 Shipe 등[14]의 방법을 변형하여 Fig. 3의 방법에 따라 cupric acetate-pyridine 용액 및 ethanol 첨가에 의한 α-linoleic acid의 발색반응을 확인하여 효소활성 측정에 이용하고자 하였는 바, 기질인 α-linoleic acid의 농도를 0에서 1.8 mM까지 변화시키면서 비례적인 발색 가능성을 확인하였다. 단, 이때 Lowry와 Tinsley[13] 및 Shipe 등[14]의 경우와는 달리 ethanol을 첨가함으로써 AOT에 의한 흡광도 방해작용을 제거하였다.

변형된 cupric acetate-pyridine 발색법에 의한 lipoxygenase 효소활성 측정

효소반응은 Fig. 2와 같은 실험장치를 이용하여 분석하였는 바, 반응기 내의 온도를 일정하게 유지하여 반응액을 200 rpm의 속도로 서서히 교반시키면서 반응을 실시하였다.

일정시간 간격으로 효소반응액 5 mL를 취한 후, 여기에 5%(w/v) cupric acetate-pyridine 용액(pH 6.1) 및 ethanol을 각각 1 mL를 넣고 vortex mixer로 50초간 격렬히 교반시킨 후, 1,000×g에서 2분간 원심 분리한 상등액을 취하여 UV/visible spectrophotometer(UV-2101PC, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 715 nm에서 흡광도를 측정함으로써 효소활성을 산출하였다(Fig. 3).

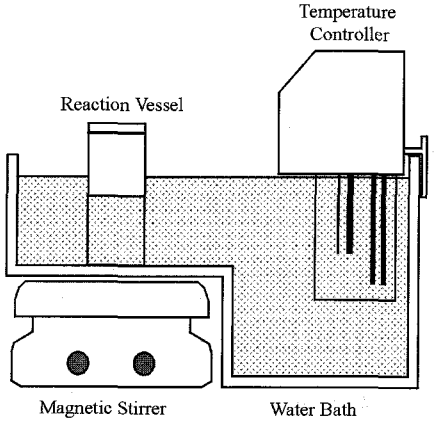

Fig. 2. Schematic representation of the enzyme bioreactor for the lipoxygenase reaction.

Preparation of 39.82 mL of isooctane containing
0.05%(w/v) α-linoleic acid and 25 mM of AOT
⇩
Addition of 180 μL enzyme solution
(0.1 M phosphate buffer(pH 7.0))
⇩
Formation of a stable reversed micellar system
after vigorous mixing for 50 sec
⇩
Reaction at 25℃
⇩
Sampling the reactant of 5 mL
⇩
Colorization by vigorous mixing for 50 sec after additon of
1 mL 5%(w/v) cupric acetate-pyridine solution and 1 mL ethanol
⇩
Centrifugation at 1,000×g for 2 min
⇩
Taking the supernatant and measuring the absorbance at 715 nm

Fig. 3. Schematic procedure for the assay of lipoxygenase.

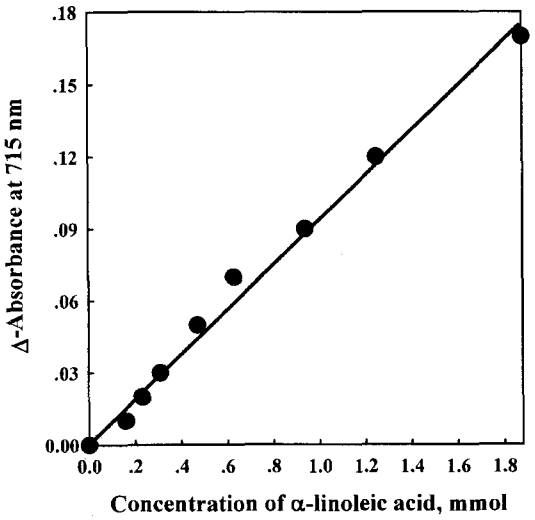

Fig. 4. Standard curve for the assay of lipoxygenase in 50 mM-AOT/ isooctane reversed micelles.

Lipoxygenase 효소활성도 정의

Lipoxygenase 효소 1 unit는 효소반응을 위한 최적 조건 하에서 단위 시간(min)당 1 μmole의 α-linoleic acid를 산화하여 분해시키는 능력으로 정의하여 본 연구에서의 효소활성도로 계산하였다.

Lipoxygenase 효소반응의 최적화 및 효소동력학 조사

AOT/isooctane 역미셀계내에서 lipoxygenase 효소의 기질을 산화·분해하기 위한 제반조건들 즉, 역미셀계 입자내의 pH, 전체 반응액의 온도 및 반응액내의 전체 수분함량 등의 실험변수들을 최적화하였다.

먼저, 효소반응의 최적 pH를 결정하기 위하여 citrate-phosphate buffer는 pH 3.0~5.5, phosphate buffer는 pH 6.0~8.0 구간에서 이용하였으며, 최적 온도는 반응액의 온도를 10~45℃까지 변화시키면서 실험을 수행하였다. 한편, 역미셀 입자 내의 수분함량인 R값([water]/[AOT])은 1~17까지 변화시키면서 효소반응 효율을 극대화시키는 최적의 조건을 구하였다.

또한, 동력학적 반응 특성을 살펴보기 위하여 K_m 및 V_{max} 등을 Michaelis-Menten 방법 및 Lineweaver-Burk 방법을 이용하여 결정하였다.

천연 항산화제가 lipoxygenase 효소활성에 미치는 영향

수용성 및 지용성 천연 항산화제의 대표적 종류인 L-ascorbic acid와 α-tocopherol이 lipoxygenase의 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 L-ascorbic acid 및 α-tocopherol을 각각 2~10 mM 농도로 첨가하여 최적 조건의 lipoxygenase 활성과 비교함으로써 효소활성의 저해 정도를 측정하였다.

한편, 이때 효소활성 저해의 정도를 보다 예민하게 측정하기 위하여 다른 실험조건은 동일하게 하되 기질의 농도 및 효소의 농도는 각각 2 배로 높여서 효소의 저해 실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

Cupric acetate-pyridine 변법에 의한 lipoxygenase 효소활성 측정

먼저, 역미셀계내에서 lipoxygenase 효소반응을 일으킨 후 반응액을 isooctane으로 직접 희석시켜 234 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다.

반응초기 및 후반기에서의 흡광도 차이가 0.1 이내로 작았으며, 특히 효소반응 후반기에서의 흡광도 값의 변동이 심하였다.

따라서, 본 실험에서는 단순 희석법으로 lipoxygenase 효소반응을 추적하는 것은 측정 작업의 효율성이 매우 낮은 것으로 판단되어 새로운 측정법을 개발할 필요가 있는 것으로 생각되었다.

이후의 단계에서는 lipoxygenase 효소반응의 기질인 α-linoleic acid를 cupric acetate-pyridine 용액에 의하여 발색 가능성을 타진하였으며, 효소반응이 진행되면서 분해되는 기질함량을 측정함으로써 lipoxygenase 효소의 활성을 예민하게 정량·분석하였다. 즉, Lowry와 Tinsley[13] 및 Shipe 등[14]의 방법을 변형하여 5%(w/v) cupric acetate-pyridine 용액에 의한 α-linoleic acid의 발색 정도를 확인함으로써 Fig. 4의 결과를 얻었는 데, α-linoleic acid가 1.8 mM까지 비례적으로 발색됨을 확인하였다. 이때, α-linoleic acid가 5%(w/v) cupric acetate-pyridine 용액에 의하여 발색되는 이유는 α-linoleic acid중에 함유되어 있는 carboxyl기가 cupric acetate-pyridine 용액내의 Cu^{2+} 이온과 결합하여 발색반응을 일으키기 때문인 것으로 Lowry와 Tinsley[13]가 이미 보고한 바 있다.

한편, 본 효소반응계내에는 계면활성제의 일종인 AOT가 존재하다가 cupric acetate-pyridine 용액과 시료용액과의 발색반응시 혼탁함을 유발시켜 정량분석을 방해하였으며, 이러한 혼탁현상은 ethanol 첨가에 의하여 제거되는 것으로 나타났

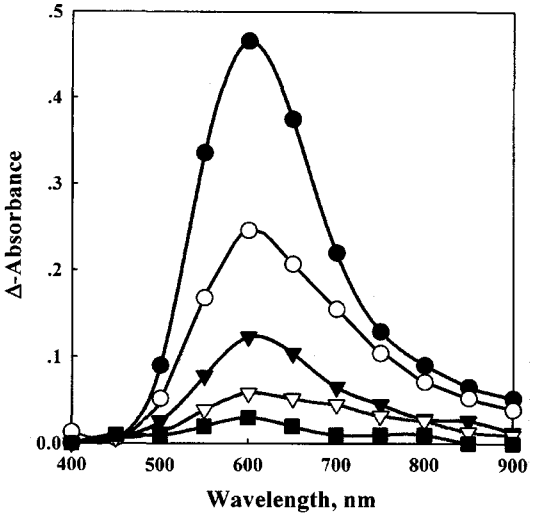

Fig. 5. Spectrophotometric scanning pattern for the analysis of turbidity in 5%(w/v) cupric acetate-pyridine-AOT solution.
- ● - : 200 mM AOT, - ○ - : 100 mM AOT, -▼ - : 50 mM AOT, - ▽ - : 25 mM AOT, -■ - : 100 mM AOT+1 mL ethanol.

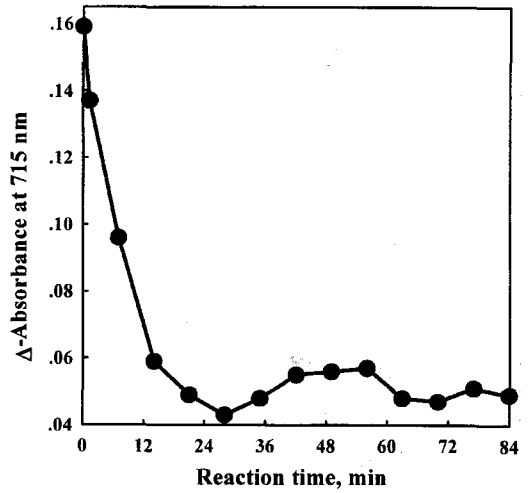

Fig. 6. Time course of the lipoxygenase reaction in 50 mM-AOT/ isooctane reversed micelles.
α-Linoleic acid of 0.05% (w/v) was used as a substrate at R-value of 10.0.

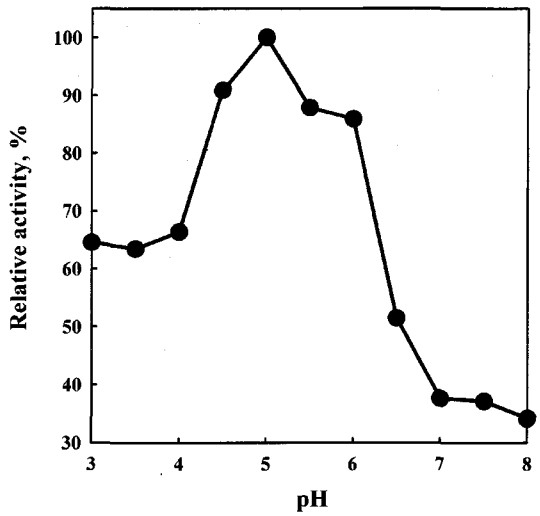

Fig. 7. Effect of pH on the lipoxygenase activity in 50 mM AOT/ isooctane reversed micelles.
α-Linoleic acid of 0.05%(w/v) was used as a substrate at R-value of 10.0.

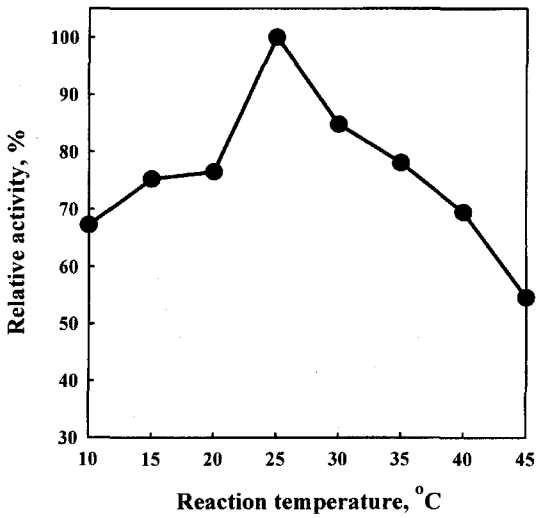

Fig. 8. Effect of temperature on the lipoxygenase activity in 50 mM AOT/isooctane reversed micelles.
α-Linoleic acid of 0.05%(w/v) was used as a substrate at R-value of 10.0.

다(Fig. 5 참고). 따라서, α-linoleic acid를 발색시키되 반응초기의 α-linoleic acid 함량과 lipoxygenase 효소반응 후에 잔존하는 α-linoleic acid의 함량을 비교하여 그 차이를 효소활성도로 간주할 수 있었다. 그러므로, 이러한 변형된 발색법을 개발함으로써 AOT의 방해(혼탁) 작용을 제거할 수 있었으며 간편하면서도 예민하게 lipoxygenase의 효소활성 측정이 가능한 것으로 판단하였다.

Lipoxygenase 효소활성 측정

Fig. 2와 같은 공정에 의하여 역미셀을 형성한 후, 5%(w/v) cupric acetate-pyridine 용액을 이용하여 lipoxygenase의 효소활성을 측정함으로써 Fig. 6의 결과를 얻었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 반응시간 30분 내외에서 효소반응 속도가 극도에 도달함을 확인할 수 있었으며, 효소-기질 반응시간 15분까지는 효소반응속도가 반응시간 경과에 따라 비례적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 따라서, 이후 모든 실험에서의 효소활성은 15분 이내에서의 초기 반응속도값으로 표현하였으며, 효소반응 최적화 작업에서의 판단 기준으로 사용하였다.

역미셀 입자내 pH 및 반응온도의 최적화

역미셀계 내에서 lipoxygenase의 효소반응 특성을 규명하고자 최적 pH 및 반응온도를 분석한 결과, Fig. 7 및 Fig. 8의 관계곡선을 얻을 수 있었다.

Fig. 7 및 Fig. 8에서 보는 바와 같이 pH 5.0 및 반응온도 25℃에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편, Nakayama 등[17]은 가지나무(egg plant) 열매에서 추출한 lipoxygenase의 최적 pH 및 최적 온도가 각각 7.0 및 25℃라고 보고하였고, 김

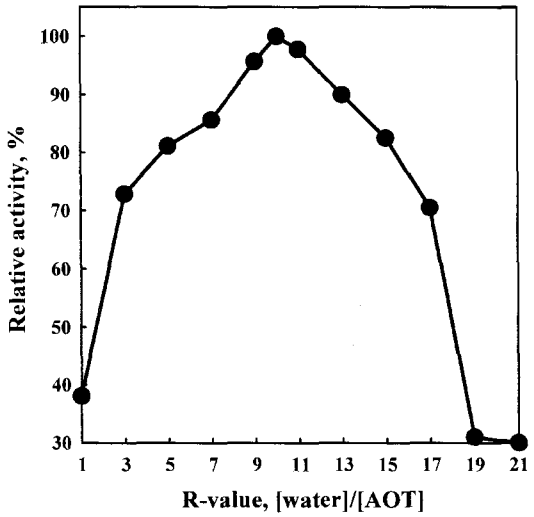

Fig. 9. Effect of R-value on the lipoxygenase activity in 50 mM AOT/isooctane reversed micelles.
R-value is described as the value of [water]/[AOT].

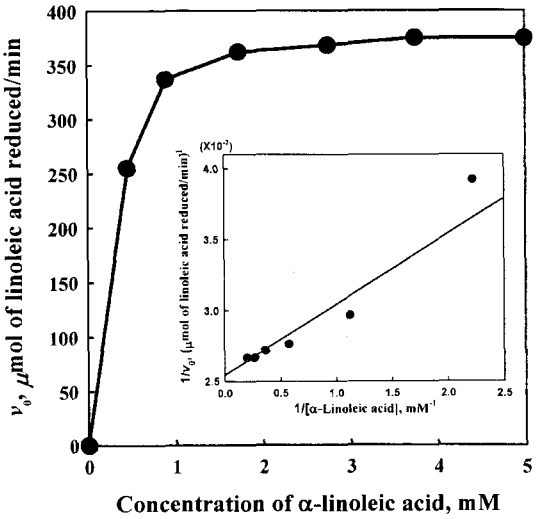

Fig. 10. Michaelis-Menten plot and Lineweaver-Burk plot for the lipoxygenase-catalyzed oxidation reaction in 50 mM AOT/isooctane reversed micelles.
α-Linoleic acid of 0.05%(w/v) was used as a substrate at R-value of 10.0., pH of 5.0, and temperature of 25°C.

등[18]은 배추 lipoxygenase의 최적 pH가 7.0이라고 보고하였으며, Boyes 등[19]은 키위 lipoxygenase의 최적 pH가 6.2라고 하였으며, 장 등[20]은 오이 lipoxygenase의 최적 pH가 5.5라고 보고하였다. 이상의 연구들은 모두 lipoxygenase의 추출원과 실험 조건 등이 본 연구의 실험 조건과는 상이한 점이 있으나, 일반적으로 lipoxygenase의 반응조건이 pH 7.0 이하의 약 산성 하에서와 반응 온도 25°C 부근에서 최적의 활성을 나타냄을 알 수 있다.

따라서, 본 연구에서 확인된 대두 lipoxygenase의 최적 활성 조건인 pH 5.0 및 반응온도 25°C가 이상의 연구결과와 유사한 경향을 보임을 알 수 있었다.

Lipoxygenase 효소반응을 위한 역미셀 입자내 수분함량의 최적화

역미셀계 효소 생물 반응계내에서 효소 반응의 기질인 α-linoleic acid와 lipoxygenase의 활성 부위가 결합하여 효소-기질반응이 일어나야만 최종 생성물이 형성된다. 이때, 물에 대한 용해도가 높은 효소액과 물에 불용성 기질인 α-linoleic acid는 수용액상과 비극성 유기용매상의 경계면(interface)에서 산화반응이 유발되는데 이러한 계면 형성작용을 촉진하기 위하여 계면활성제를 이용하게 되며, 역미셀계 효소 생물 반응계에서는 계면 형성 능력이 효소 반응 속도를 결정하는 중요한 요인이 된다고 보고되어 왔다[21,22]. 따라서, 본 연구에서는 지용성 기질, 수용성 효소용액 및 계면활성제로 구성된 역미셀계 효소반응계들[23-27] 중 가장 효과적인 효소반응율을 갖는 계면활성제인 AOT와 최적의 비극성 유기용매인 것으로 알려져 있는 isooctane을 선택하여 실험을 수행하였다.

상기한 결과들을 바탕으로 하여 실험을 수행하였는 바, isooctane 유기용매내에 50 mM의 농도로 AOT를 용해시킨 후 수분함량(R = [water]/[AOT])을 변화시키면서 α-linoleic acid가 산화되는 정도를 비교하여 Fig. 9의 결과를 얻을 수 있었으며, R값이 10.0일 때 가장 높은 효소 활성도를 나타내었다. 이는 Han 등의 보고[28]와도 일치하는 결과로서, R 값이 10.0 이하인 경우는 수분의 부족에 의하여 효소의 활동도가 낮아지며 이에따라 산화 반응이 비효율적으로 야기되며, 반면에 R값이 10.0 이상인 경우에는 역미셀의 불안정성 및 효소의 변성속도가 증가하는 등의 이유로 인하여 효소 반응 속도가 저하되는 것으로 추측되었다.

효소동력학 상수의 결정

역미셀계내에서의 lipoxygenase 효소 반응을 위한 최적조건인 pH 5.0, 반응온도 25°C, R = 10.0 하에서 lipoxygenase 효소가 α-linoleic acid를 산화 및 분해하는 동력학적 연구를 수행하였는 바, lipoxygenase의 K_m값과 V_{max}값을 계산할 수 있었으며, K_m은 0.31 mM(기질농도에 대응함, mM of α-linoleic acid), V_{max}는 384.16 μmol/min(단위시간(min)당 기질 1 μmol을 산화·분해하는 속도, μmol of α-linoleic acid decomposed/min)로 각각 산출되었다. 이는 AOT/isooctane 역미셀계내에서 lipoxygenase에 의한 α-linoleic acid의 산화·분해 반응이 Michaelis-Menten 모델을 완전히 따르는 것을 나타내며, 따라서 AOT/isooctane 역미셀계 내에서의 lipoxygenase 효소반응은 주변환경에 의한 큰 제한없이 수용액계 내에서와 유사한 거동(behavior)을 보임을 의미한다(Fig. 10).

결론적으로 볼 때, 미셀 입자의 직경이 수 nm로서 극히 작으며 미셀 입자 외부의 소수층(hydrophobic phase)에는 기질분자(α-linoleic acid)가 용해되어 있고, 내부의 친수층(hydrophilic phase)에는 lipoxygenase 효소가 각각 존재하면서 미셀 입자표면 및 외부와의 계면에서 산화반응이 야기되는 역미셀계 효소반응계는 수용액상에서의 다른 효소 반응계와 마찬가지로 Michaelis-Menten 방정식을 적용할 수 있음을 알 수 있었다.

Lipoxygenase 효소에 대한 천연 항산화제의 저해 효과

천연 항산화제의 대표적 종류인 L-ascorbic acid와 α-toco-

Table 1. Effect of L-ascorbic acid on the lipoxygenase activity in 50 mM AOT/isooctane reversed micelles

Concentration of L-ascorbic acid (mM)	Δ-Absorbance (at 715 nm) at different reaction time* (min)					
	0*	5*	10*	15*	20*	25*
0.0	0.488	0.320	0.321	0.317	0.321	0.320
2.0	0.488	0.320	0.320	0.321	0.320	0.320
2.5	0.488	0.321	0.321	0.318	0.321	0.320
3.3	0.488	0.320	0.321	0.320	0.319	0.321
5.0	0.488	0.323	0.320	0.320	0.321	0.322
10.0	0.488	0.322	0.321	0.322	0.320	0.321

Table 2. Effect of α-tocopherol on the lipoxygenase activity in 50 mM AOT/isooctane reversed micelles

Concentration of α-tocopherol (mM)	Δ-Absorbance (at 715 nm) at different reaction time* (min)					
	0*	5*	10*	15*	20*	25*
0.0	0.488	0.320	0.321	0.317	0.321	0.320
2.0	0.488	0.340	0.348	0.342	0.340	0.337
2.5	0.488	0.341	0.340	0.344	0.344	0.343
3.3	0.488	0.361	0.340	0.341	0.346	0.341
5.0	0.488	0.364	0.356	0.352	0.354	0.353
10.0	0.488	0.370	0.367	0.365	0.364	0.371

pherol이 lipoxygenase 효소활성에 미치는 영향을 살펴 본 결과, 먼저 L-ascorbic acid의 경우 AOT/isooctane 역미셀계내에서는 lipoxygenase 활성을 전혀 저해하지 않는 것으로 나타났다(Table 1 참고). 이러한 결과는 임 등[29]이 보고한 내용(19.8% 저해효과 있음)과는 차이를 보였는 데, 이는 임등의 경우는 수분이 많은 이상계(two phase system)에서의 실험 결과로서 수분이 극미량 함유된 역미셀계내에서의 수용성 항산화제는 절대적인 함량이 매우 낮음에 의하여 효소활성 저해효과가 거의 없는 것으로 판단되었다.

반면, 지용성 항산화제의 대표적 종류인 α-tocopherol을 첨가하여 lipoxygenase 효소 활성에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 2를 완성하였는 바, 최대 72%까지 효소 활성도를 저해하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터, lipoxygenase에 의한 산패를 억제하기 위하여는 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid보다 지용성 항산화제인 α-tocopherol을 사용하는 것이 더 유리한 것으로 판단되었다.

요 약

본 연구에서는 음이온 계면활성제인 dioctyl sulfosuccinate (aerosol-OT, AOT)와 비극성 유기용매인 isooctane으로 구성된 역미셀계를 이용하여 lipoxygenase의 반응특성을 살펴보았다. 기질로 사용되는 α-linoleic acid가 5%(w/v) cupric acetate-pyridine 용액에 의하여 정량적으로 발색됨을 확인하였는 바, 기질이 단위시간당 소모되는 정도로서 lipoxygenase 효소의 활성을 측정하였다.

Lipoxygenase 효소반응을 위한 최적 pH, 온도 및 R값 ([water]/[AOT]) 등을 측정한 결과 각각 5.0, 25°C, 10.0 등이었으며 K_m 및 V_{max}값은 각각 0.31 mM of α-linoleic acid 및 384.16 μmol of α-linoleic acid decomposed/min임을 확인함으로써, 역미셀계내에서 lipoxygenase 효소활성을 예민하고 안정되게 측정할 수 있었다.

한편, 지용성 항산화제의 일종인 α-tocopherol을 역미셀계에 적용시킨 결과 최대 72%까지 lipoxygenase 효소의 활성도를 저해하는 것으로 판명되었으며, 이는 대두 가공품 및 곡류 가공품에 α-tocopherol을 첨가함으로써 가공품의 품질을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 서울산업대학교 학술연구비 지원에 의하여 작성되었으므로 이에 감사 드립니다.

문 헌

1. Kruger, J.E., Lineback, D. and Stauffen, C.E. Enzymes and Their Role in Cereal Technology. American Association of Cereal Chemists, Inc., p. 241 (1987)
2. Eskin, N.A. Grossman, S. and Pinsky, A. Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 9: 1-40 (1977)
3. Galliard, T. and Chan, H.W. A comprehensive treatise, In: The Biochemistry of Plants, Vol. 4, p. 131. Stumpf, P.K. (ed.), Academic Press, New York, USA (1980)
4. Zakut, R. Grossman, S. Pinsky, A. and Wilchek, M. Evidence for an essential methionine residue in lipoxygenase. FEBS Lett. 72: 107-110 (1976)
5. Choi, S.W. and Osawa, T. Isolation and idendification of lipoxygenase inhibitor from nutmeg spice. Food Sci. Biotechnol. 5: 156-160 (1996)
6. Choi, S.W., Kang, W.W., Chung, S.K. and Cheon, S.H. Antioxidative activity of flavonoids in persimmon leaves. Food Sci. Biotechnol. 5: 119-123 (1996)
7. Grosch, W. and Laskawy, G. Differences in the amount and range of volatile carbonyl compounds formed by lipoxygenase isoenzymes from soybeans. J. Agric. Food Chem. 23: 791-794 (1975)

8. Lee, Y.C. Lipoxygenase and off-flavor development in some frozen foods. Korean J. Food Sci. Technol. 17: 53-58 (1981)
9. Grossman, S., Trop, M., Avtalion, R. and Pinsky, A. Properties of agarose-bound soya-bean lipoxygenase. Biochem. J. 127: 909-910 (1972)
10. Rho, Y.T., Kim, Y.S., Cho, H.Y. and Pyun, Y.R. A study on protein separation with AOT-isooctane reverse micellar system. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 542-547 (1989)
11. Chang, P.S., Kang, S.T. and Rhee, J.S. A general kinetic model for lipase-catalyzed glycerolysis of triolein. Food Sci. Biotechnol. 1: 46-49 (1992)
12. Chang, P.S. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aerosol-OT/isooctane reversed micelles by phospholipase A_2. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 26-31 (1997)
13. Lowry, R.R. and Tinsley, I.J. Colorimetric analysis of free fatty acids by cupric sulfate, J. Am. Oil Chem. Soc. 53: 470-472 (1976)
14. Shipe, W.F., Senyk, G.F. and Fountain, K.B. Modification of cupric sulfate method for the analysis of free fatty acids, J. Dairy Sci. 63: 193-198 (1980)
15. Seoud, A.A.E. Acidities and basicities in reversed micellar systems. In: Reverse Micelles, p. 81. Luisi, P.L. and Straub, B.E. (eds.), Plenum Press, New York, USA (1984)
16. Shin, H.S. The Newest Food Chemistry, p. 445. Kwangmungak, Seoul (1995)
17. Nakayama, T., Takeura, Y. and Ueda, U. Visible spectrophotometric assay, purification and molecular properties of a lipoxygenase from egg plant (*Solanum melongena Linne*) fruits. Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 1067-1072 (1995)
18. Kim, D.K., Han, K.Y. and Noh, B.S. Characteristics of crude lipoxygenase in Chinese cabbages. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 710-715 (1997)
19. Boyes, S., Perera, C. and Young, H. Kiwifruit lipoxygenase: Preparation and characteristcs. J. Food Sci. 57: 1390-1395 (1992)
20. Chang, M.J., Cho, I.Y. and Lee, S.K. Characteristics of hydroperoxide lyase and lipoxygenase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 314-319 (1997)
21. Chang, P.S., Rhee, J.S. and Kim, J.J. Continuous glycerolysis of olive oil by immobilization on liposome in reversed micelles. Biotechnol. Bioeng. 38: 1159-1165 (1991)
22. Zaks, A. and Klibanov, A.M. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. Science 224: 1249-1251 (1984)
23. Barbaric, S. and Luisi, P.L. Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents. 5. Activity and conformation of α-chymotrypsin in isooctane-AOT reversed micelles. J. Am. Chem. Soc. 103: 4239-4244 (1981)
24. Eicke, H. F. On the stabilization of micelles in apolar solvents by solubilized ions and polar liquids. J. Coll. Interface Sci. 52: 65-76 (1975)
25. Eicke, H.F. and Shepherd, J.C.W. Dielectric properties of apolar micelle solutions containing solubilized water. Helv. Chim. Acta 57: 1951-1963 (1974)
26. Fletcher, P.D.I., Freedman, R.B., Robinson, B.H., Rees, G.D., and Schmacker, R. Lipase-catalyzed ester synthesis in oil-continuous microemulsions. Biochim. Biophys. Acta 912: 278-282 (1987)
27. Grandi, C., Smith, R.E., and Luisi, P.L. Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents: Activity and conformation of lysozyme in isooctane reverse micelles. J. Biol. Chem. 256: 837-843 (1981)
28. Han, D. and Rhee, J.S. Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. Biotechnol. Bioeng. 28: 1250-1255 (1986)
29. Im, H.S., Cho, Y.H. and Rhee, C.O. Effect of inhibitor on lipoxygenase inactivation in soybean homogenates. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 19-24 (1995)

(2002년 1월 14일 접수)