

배추의 절임 중 Lipoxygenase의 활성변화

김동경* · 한기영 · 노봉수

서울여자대학교 식품·미생물공학과, *한국식품개발연구원

Change of Lipoxygenase Activity in Chinese Cabbages Submerged in Brines

Dong-Kyoung Kim*, Kee-Young Han and Bong-Soo Noh

Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University

*Korea Food Research Institute

Abstract

Lipoxygenase activity in Chinese cabbage was measured at various concentrations of brines. Lipoxygenase activity on linoleic acid substrate was determined by changing the rate of dissolved oxygen consumption. The inactivation of lipoxygenase by salting was increased when concentration of sodium chloride and soaking time were increased. About 60% of enzyme activity was reduced after submerging in 13% brine solution for 5 hr. The addition of calcium chloride (0.7%) reduced about 10~15% of lipoxygenase activity rather than without. Residual activity of lipoxygenase in Chinese cabbage submerged in 13% brine was 20% and about 60% of lipoxygenase was also inhibited by addition of garlic extract.

Key words: lipoxygenase activity, Chinese cabbage, salting, calcium chloride

서 론

배추를 절여서 김치를 담그는 과정에서 나타나는 풀 냄새가 제조업자뿐만 아니라 소비자들에게도 불쾌감을 주고 있어 이를 개선해야 한다는 필요성이 대두되고 있다. 이러한 풀 냄새의 실체는 아직 밝혀지지 않았지만, 대두의 풀 냄새(*grassy*) 등과 유사한 것으로 추측되는데, 이런 이미취는 휘발성 알코올류, 알데히드류, 케톤류, 에스테르류, 아민류 및 페놀류 등의 화합물이 lipoxygenase의 작용에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있다^(1,2).

Lipoxygenase (EC 1.13.11.12)는 산소 존재시 *cis,cis*-1,4-pentadiene 구조를 가진 불포화지방산의 산화를 촉매하여 과산화물을 형성하는 산화효소로서 여러 종류의 식물 열매 및 채소류에 분포되어 있는데, 특히 대두류, 밀 등의 곡류에 풍부하게 존재하며 생으로 먹는 배추나 상추에는 그 양이 적다고 알려져 있다^(3,8). Lipoxygenase는 monohydroperoxide 형태의 불포화지방산의 산화를 촉진시키고 카로티노이드 색소를 파괴

하며, 이미취와 과산화물을 생성하고 효소적으로 carbonyl 기를 가수분해한다⁽⁹⁾. 이런 반응에서 생성된 hexanal과 (*trans*)-2-hexenal이 향미와 맛의 변화를 주는데 아주 적은 양의 C₆-aldehyde는 맛과 향을 변화시키고 hexanal, (*trans*)-2-hexenal이 생성되면 그 다음 산물인 (*cis*)-3-hexenal도 풀 냄새 같은 냄새를 가지게 된다⁽¹⁰⁾. 콩비린 냄새는 aldehyde, hexanal, hexenal에서 기인하는데, 이것은 13-hydroperoxide linoleic acid와 13-hydroperoxide linolenic acid가 hydroperoxide lyase의 작용으로 이중결합이 형성되면서 생성된다고 하였으며^(10,12), 키위의 경우는 지방을 산화시키는 과정에서 lipoxygenase의 초기 반응으로 생성되는 hexanal, (*trans*)-2-hexenal에 의해 풀 냄새와 같은 냄새와 산패취를 낸다고 하였는데 이들 물질은 클로로필과 카로티노이드의 색소를 산화시키는 데에도 관여하는 것으로 알려져 있으며 이러한 변화는 과육을 저장하는 과정에서나 또는 빛, 열에 의해 더욱 촉진되는 것으로 보고되었다⁽¹³⁾. 이러한 lipoxygenase에 의한 변화를 최소화하기 위하여 열처리하거나 저체제를 첨가하거나 여러 가지 방법들이 모색되었다. 배추의 경우 김치를 제조하는 공정에서 꼭 거쳐야 하는 절임공정 중 이러한 lipoxygenase의 변화에 관하여 이제까지 전혀 보고된 바 없다.

Corresponding author: Bong-Soo Noh, Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University, 126 Kongnung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-774, Korea

한편, 생마늘의 수용액, 에탄올, 클로로포름 추출액 60 mg/mL를 대두 lipoxygenase에 첨가하였을 때 수용액 추출물의 경우에는 약 40%, 에탄올 추출액은 약 50%, 클로로포름 추출액은 약 20%의 저해를 보여주었는데⁽¹⁴⁾ 김치제조 중 부원료로 사용되는 마늘 또는 마늘 추출물도 배추 lipoxygenase의 활성을 저해할 것으로 예상이 된다.

대두에 함유된 lipoxygenase 효소가 수용액 중에서 아스코르브산 등 각종 저해제의 영향으로 효소작용이 저해를 받아서 이미취를 감소시킬 수 있다고 하였는데 이때 사용될 수 있는 저해제로는 아스코르브산 외에 calcium chloride dihydrate, calcium phosphate monobasic, L-cysteine, DL-dithiothreitol 및 EDTA-disodium-calcium salt 등이 있다.⁽¹⁵⁾ 염화칼슘은 배추조직의 연화를 억제시킬 목적으로 이용되는데 백 등⁽¹⁶⁾은 김치의 연화현상을 방지하기 위하여 배추에 존재하는 pectin esterase (PE)와 polygalacturonase (PG)의 특성을 이용하여 경도를 살펴 본 결과 PE의 최적 염화칼슘의 농도가 0.02 M이었고 줄기의 경우 염화칼슘의 농도가 증가할수록 경도가 높아지는 경향이었으며 잎사귀의 경우에는 0.03~0.05 M 범위에서 경도가 가장 높았다고 한다. 이런 결과를 보면 배추절임시 염화칼슘에 의해 조직이 변화하여 lipoxygenase의 활성 변화가 예상되나 이에 관하여 보고된 논문은 없는 실정이다.

본 실험에서는 절임 과정에서 풀 냄새의 변화에 영향을 미칠 것으로 예상되는 lipoxygenase 활성의 변화와 소금절임시 염화칼슘을 첨가하는 경우 lipoxygenase 활성 변화에 미치는 영향을 살펴보고자 한다. 아울러 절임의 방법과 김치 제조시 부재료로 이용되는 마늘의 추출물을 첨가하여 lipoxygenase의 효소 활성 정도를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 배추는 농수산물직판장(노원구 중계동)에서 구입한 후 4°C로 저장하면서 실험에 사용하였으며 배추는 통째로 Food mixer (한일전기, FM-707T)에서 균질화시켜 여과지(Whatman, No. 2)로 여과하고 40~50% (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 원심분리한 후 침전액을 투석하여 조효소액으로 사용하였다.

효소활성의 측정

Lipoxygenase의 활성도는 Pinsky 등⁽⁹⁾의 방법과 같이 30°C로 유지된 수용조에서 cell 내의 용존산소의 변화량을 용존산소측정기(YSI 59, Yellow Springs In-

strument, USA)를 이용하여 측정하였다. 즉, 0.2 mL linoleic acid (99% Sigma Chem. Co.)를 기질로 사용하여 4 mL의 H₂O, 1 mL의 0.1 N NaOH와 5 µL의 Tween 20 (Sigma Chem. Co.)을 넣고 vortex로 잘 혼합한 후 시간당 용존산소 소비량(ΔO₂/Δt: ppm/min)을 효소활성으로 나타내었다.

절임의 영향

절임시간에 따른 영향은 배추를 13%의 소금(주식회사 한주, 99%)물에서 1~20시간 절인 후 조효소액을 제조하여 효소활성을 측정하였다. 절임 후 세척 정도의 영향을 보기 위하여 배추를 13%의 소금물에서 5, 10, 15, 20시간 절인 후 4회 세척하여 효소활성을 측정하였다. 소금농도에 따른 영향은 배추를 0, 3, 6, 9, 12, 15%의 소금 농도에서 5시간 절인 후의 lipoxygenase 활성을 측정하였다.

Calcium chloride의 영향

Calcium chloride의 영향을 살펴보기 위하여 소금물에 0.7% calcium chloride를 첨가한 후 배추를 1~5시간 동안 각각 절인 후 효소활성을 측정하였으며, 배추를 3, 13%의 소금물에서 각각 5시간 절이면서 calcium chloride의 첨가량(0, 0.5, 0.7, 1.0, 1.4, 2%)에 따른 변화도 관찰하였다.

마늘 추출액의 영향

마늘 추출액에 따른 lipoxygenase의 저해를 알아보기 위하여 생마늘의 수용액, 에탄올, 클로로포름 추출액을 첨가하여 효소활성의 알아보았다. 생마늘과 에탄올의 추출액은 마늘즙액(10 g)에 증류수와 에탄올 각각 15 mL로 5분간 추출시킨 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 그 상등액을 사용하였고, 클로로포름 추출액은 마늘즙액(10 g)에 클로로포름 15 mL로 추출시켜 여과한 후 anhydrous sodium sulfate로 수분을 제거한 후에 사용하였다. 이러한 추출물을 생배추와 13%의 소금물에서 5시간 절인 것으로 조효소액을 조제하여 조효소액 50 mL에 마늘 추출액 10 mL를 첨가한 후 완충용액으로 100 mL을 채운 후 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

배추의 뿌리부분, 잎부분, 줄기부분으로 나누어 lipoxygenase의 활성을 측정한 결과는 Table 1에서 보여주듯이 뿌리와 잎부분의 효소활성이 줄기부분보다

높게 나타났는데, 이것은 배추의 위치에 따라 효소의 활성이 다름을 보여 주는 것으로 본 실험의 모든 경우 상대적인 실험오차를 줄이기 위하여 배추를 세로로 1/2 등분된 것을 통째로 갈아서 조효소액을 제조하여 효소활성을 측정하는데 사용하였다.

절임의 영향

Fig. 1은 배추를 13%의 소금물에서 절이는 과정에서 침지시간에 따른 효소의 활성을 측정한 결과이다. 절임시간이 증가함에 따라 효소의 실효정도가 크게 나타나 5시간 절임시 약 60%의 효소활성이 감소한 것을 볼 수 있었다. 오이의 경우 10% 소금물에 72시간 침지할 경우 효소활성이 거의 실효된다고 보고한 것⁽¹⁷⁾과 유사한 결과를 보여 주었다.

Fig. 2는 5시간 절임시 소금의 농도를 달리하였을 때 lipoxygenase의 활성변화를 측정한 것으로 소금의 농도가 증가하면 증가할수록 실효의 정도가 큰 것으로 나타났다. 이는 절이는 과정에서 세포벽 등이 삼투압에 의해 파괴되고 이로 인하여 효소가 직접 소금물

에 노출되기 때문에 효소의 활성이 감소되는 것으로 보여진다.

절임 후 세척정도에 따라 효소의 활성을 측정한 결과는 Table 2에서 보는 것과 같이 세척하지 않은 경우 침지시간에 따라 실효정도가 크게 변화하였는데 비하여 4회 세척한 것은 침지시간에 크게 영향을 받지 않았으며 5시간 침지한 후 4회 세척한 경우 잔존효소활성이 57.45%로 세척에 의해 효소가 부분적으로 씻겨져 버리는 것으로 여겨진다.

Calcium chloride의 영향

배추를 절임시 소금물에 0.7% calcium chloride를 첨가하여 영향을 살펴 본 결과는 Fig. 1에서 보여 주듯이 calcium chloride를 첨가하지 않은 것이 0.7% calcium chloride 첨가에 의해 그 실효정도가 약 10~15% 낮게 나타났으며 이는 calcium chloride 첨가가 펙틴의 구조를 단단하게 cross-link시켜 배추조직의 변화를 가

Table 1. Distribution of lipoxygenase activity at various parts of Chinese cabbage

Part	Lipoxygenase activity (O ₂ ppm/min)
Root	1.56±0.004 ¹⁾
Leaf	1.61±0.017
Stem	1.13±0.003

¹⁾standard deviation.

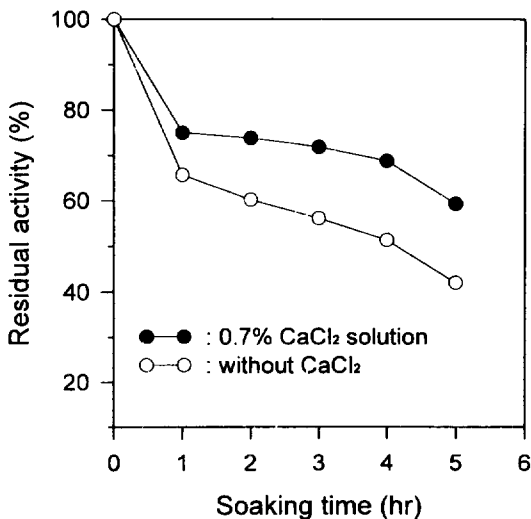


Fig. 1. Effect of soaking time on lipoxygenase activity in Chinese cabbage submerged in brines (13%) with and without calcium chloride.

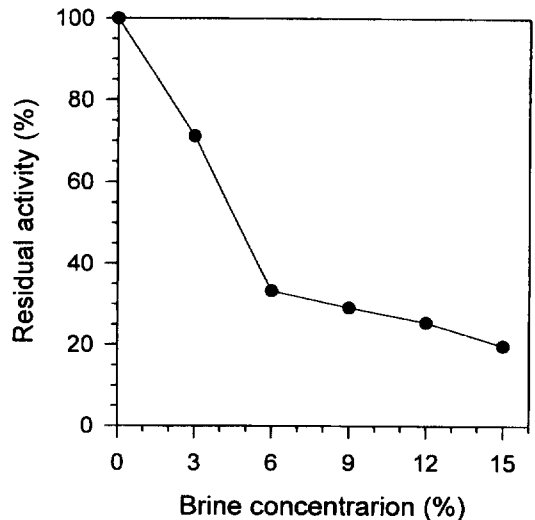


Fig. 2. Effect of brine concentration on lipoxygenase activity in Chinese cabbage submerged for 5 hours at room temperature.

Table 2. Effect of washing and soaking time in 13% brine on lipoxygenase activity in Chinese cabbage

Soaking time (hr)	Residual lipoxygenase activity (O ₂ ppm/min)	
	not washed	washed 4 times
0	1.530 (100) ¹⁾	-
5	1.525 (99.67)	0.879 (57.45)
10	1.519 (99.28)	0.799 (52.22)
15	0.892 (58.3)	0.740 (48.37)
20	0.759 (49.6)	0.679 (44.38)

¹⁾percentage based on the value without washing at zero time.

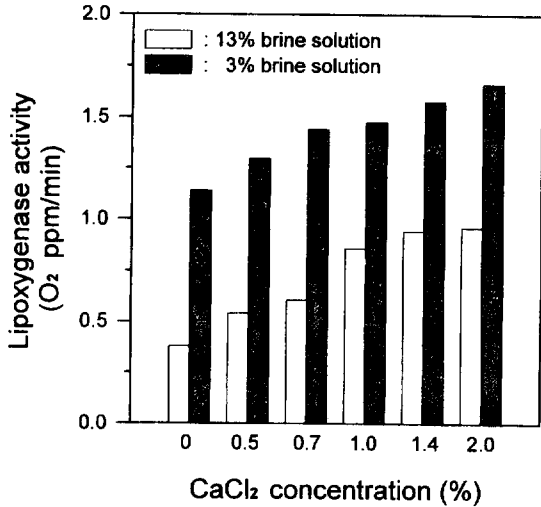


Fig. 3. Effect of calcium chloride concentration on crude lipoxygenase in Chinese cabbage submerged in 13% brine after 5 hours at room temperature.

저와 효소의 불활성을 방해하는 것으로 여겨진다. Buescher 등⁽¹⁷⁾은 오이를 소금물에 침지할때 calcium chloride를 첨가하면 lipoxygenase 활성의 손실이 일어나지 않는다고 보고하였는데 본 실험의 결과는 이와 유사한 경향을 나타냈다. Restrepo 등⁽¹⁸⁾은 대두 lipoxygenase에 calcium ion을 첨가하여 효소를 활성화시켜 calcium ion이 효소의 activator로 작용하였음을 보여 주기도 하였다.

Calcium chloride의 농도가 미치는 영향을 보기 위하여 3, 13%의 소금물에서 5시간 절이면서 calcium chloride를 0~2%의 농도별로 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 3%와 13%의 소금물 절임시 모두 calcium chloride의 농도가 높아짐에 따라 효소활성이 점차로 증가함을 보여 주어 Fig. 1의 결과와 같은 경향을 나타냈다. Truong 등⁽¹⁹⁾은 cowpea lipoxygenase-1과 lipoxygenase-2가 칼슘이온에 영향을 받는데 lipoxygenase-2는 칼슘이온의 증가에 따라 점차적으로 저해되나 lipoxygenase-1은 0.6 mM이하에서는 활성화되며 1 mM보다 크면 농도 증가에 따라 점차 감소한다고 하였다. 본 실험에서 calcium chloride 농도 2% (1.8 mM)까지는 lipoxygenase 활성이 계속 증가하는 것으로 나타났다.

마늘 추출액에 따른 저해 효과

마늘(추출액)은 김치제조시 사용되는 부원료로서 절임과정을 거쳐 숙성기간에 소금농도와 함께 어떤 영향을 미치는지를 살펴보고자 이의 첨가에 따른 효소활성의 변화를 관찰하였다. 마늘 추출액에 따른 저

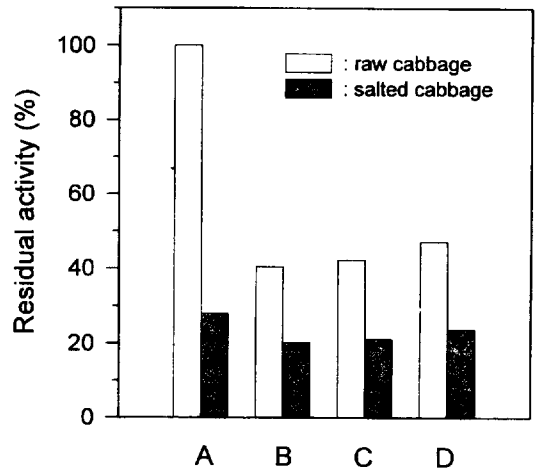


Fig. 4. Inhibition of lipoxygenase by water, ethanol and chloroform extract of garlic. Chinese cabbage was submerged in 13% brine after 5 hours at room temperature. A: raw cabbage, B: water extract, C: ethanol extract, D: chloroform extract.

해정도를 알아보기 위하여 생마늘을 수용액, 에탄올, 클로로포름으로 추출하여 lipoxygenase 활성을 알아보았다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 절이지 않은 생배추의 경우 수용액 추출물을 첨가한 것은 40%, 에탄올 추출물은 42%, 클로로포름 추출물의 경우는 약 50%의 잔존활성을 보여주었지만 추출 방법간에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 13%의 소금물에서 5시간 절인 배추로 조효소액을 조제하여 잔존활성을 측정된 결과에서도 수용액 추출물을 첨가한 것이 20%, 에탄올 추출물 21%, 클로로포름 추출물은 24%로 추출방법간에는 차이가 없는 것으로 나타났지만 절인 배추의 lipoxygenase는 마늘 추출액에 대하여 어느 정도 저해되는 것으로 나타났다. 김 등⁽¹⁴⁾의 마늘 추출에 의한 대두 lipoxygenase의 활성 저해에 관한 연구에서 보면 마늘 추출액 10~180 mg/mL를 대두 lipoxygenase에 첨가하여 활성 저해를 살펴 본 결과 마늘 추출액 60 mg/mL 첨가시 물 추출물의 경우에는 약 40%, 에탄올 추출액은 약 50%, 클로로포름 추출액은 약 20%의 저해를 보여주었다. 본 실험의 경우 마늘 추출액에 의한 효소 저해효과 보다는 절임에 의한 저해효과가 보다 큼을 알 수 있었으며 절인 배추에 마늘 추출액을 사용하면 보다 더 효소 저해가 증가됨을 확인할 수 있었다.

요 약

배추를 절이는 과정에서 배추 lipoxygenase의 활성 변화는 linoleic acid를 기질로 하여 용존산소 소비량의

변화로 효소활성을 측정하였다. 소금물에 배추를 침지한 경우 소금의 농도가 증가할수록, 절임시간이 길어질수록 효소의 실패 정도가 큰 것으로 나타났다. 13%의 소금물에서 5시간 절인 후 약 60%의 효소활성이 감소하였다. 한편 calcium chloride의 영향을 살펴보기 위하여 절임시 0.7% calcium chloride를 첨가한 결과 calcium chloride를 첨가한 것이 calcium chloride를 첨가하지 않은 것 보다 효소의 실패정도가 10~15% 적은 것으로 나타났다. 효소 저해제로 마늘 추출물을 사용한 결과 생배추에 첨가한 경우는 약 40%, 13%의 소금물에 절인 후의 배추의 경우는 약 20%의 잔존활성을 보여 주었다.

감사의 글

본 연구의 일부는 과학기술처 G7 선도과제(전통발효식품의 과학화)의 지원을 받아 수행되었음을 감사드립니다.

문헌

1. Wolf, W.J.: Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 136 (1975)
2. Grosch, W. and Laskawy, G.: Differences in the amount and range of volatile carbonyl compound formed by lipoxygenase isozymes from soybean. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 791 (1975)
3. Pinsky, A., Grossman, S. and Trop, M.: Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruit and vegetable. *J. Food Sci.*, **36**, 571 (1971)
4. Galliard, T. and Chan, H.W.-S.: A Comprehensive Treatise. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 4. Stumpf, P.K. (Ed.), Academic Press, New York, p.131 (1980)
5. Sekiya, J., Kajiwara, T., Munehika, K. and Hatanaka, A.: Distribution of lipoxygenase and hydroperoxidelyase in the leaves of various plant species. *Phytochem.*, **22**, 1867 (1983)
6. Tappel, A.L.: Enzyme of lipid metabolism (lipoxidase). *Method in Enzymol.*, **5**, 539 (1961)
7. Axelrod, B., Cheesbrough, T.M. and Laakso, S.: Lipoxygenase from soybeans. *Method in Enzymol.*, **71**, 441 (1981)
8. Hildebrand, D.F. and Kito, M.: Role of lipoxygenases in soybean seed protein quality. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 815 (1984)
9. Rhee, C.O., Toshio, D. and Yukio, K.: Distribution of lipoxygenase activity among flavors from different milling of wheat. *Foods and Biotech.*, **2**, 44 (1993)
10. Garder, H.W.: Lipoxygenase pathway in cereals. *Adv. Cereal Sci. Technol.*, **9**, 161 (1988)
11. Gardner, H.W.: in *Flavor Chemistry of Fats and Oils*. Min, D.B. and Smouse, T.H. (ed.), American Oil Chemists' Society, Champaign, IL., p.189 (1985)
12. Whitehead, I.M., Muller, B.L. and Dean, C.: Industrial use of soybean lipoxygenase for the production of natural green note flavor compounds. *Cereal Foods World*, **40**(4), 193 (1995)
13. Boyes, S., Perera, C. and Young, H.: Kiwifruit lipoxygenase: Preparation and characteristics. *J. Food Sci.*, **57**, 1390 (1992)
14. Kim, M.R., Mo, E.K., Kim, S.H. and Sok, D.E.: Inhibition of lipoxygenase activity by the extract of various processed garlic (Inhibitory effect of garlic extracts on soybean lipoxygenase activity). *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **22**, 280 (1993)
15. 임효식, 조영훈, 이종욱 : 대두 현탁액의 lipoxygenase의 활성저해 인자들의 영향. *한국식품과학회지*, **27**, 19 (1995)
16. 백형희, 이창희, 우덕현, 박관화, 백운화, 이규순, 남상봉 : 펙틴 분해효소를 이용한 김치 조직의 연화 방지. *한국식품과학회지*, **21**, 149 (1989)
17. Buescher, R.W., McGuire, C. and Skulman, B.: Catalase, lipoxygenase, and peroxidase activity in cucumber pickles as affected by fermentation, processing, and calcium chloride. *J. Food Sci.*, **52**, 228 (1987)
18. Restrepo, F., Snyder, H.E. and Zimmerman, G.L.: Calcium activation of soybean lipoxygenase. *J. Food Sci.*, **38**, 779 (1973)
19. Truong, V.D., Evelyn, M. and Mendoza, T.: Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from cowpea. [Vignaungiculata(L.) Walp.] *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 54 (1982)

(1997년 3월 4일 접수)