

## 오이(*Cucumis sativus* L.)에서 추출한 조효소 용액을 이용한 L-Ascorbic Acid의 정량분석

이숙영<sup>1</sup> · 김홍섭<sup>2</sup> · 고대희

조선대학교 유전공학과<sup>1</sup>, 생물학과<sup>2</sup>, 광주서강전문대학 식품영양과

### An Assay of L-Ascorbic Acid with Crude Enzyme from Cucumber(*Cucumis sativus* L.)

Sook-Young Lee<sup>1</sup>, Hong-Sub Kim<sup>2</sup>, Dae-Hee Koh

Department of Genetic Engineering<sup>1</sup>, Biology<sup>2</sup>, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

Department of Food and Nutrition, Seokang Junior College, Kwangju 500-742, Korea

#### Abstract

The test possibility of L-ascorbic acid(AsA) assay by ascorbate oxidase(A.O) solution obtained from cucumber was estimated. The results obtained were summerized as follow.

The difference of absorbance before and after oxidation of AsA by A.O solution was proportional to the AsA concentration. Iso- AsA compared to same concentration of AsA was 97% response. Therefore, the O specificity on Iso- AsA a was deficient. On the sucrose, glucose, fructose were coexisted from 5 times, 500 times of AsA concentration, none of them were affected by any level of AsA concentration. In the case of EDTA, it was not nearly affected that EDTA was coexisted 50 times of AsA concentration, but EDTA inhibited considerably from 500 times of AsA concentration. The effect of citric acid on the AsA concentration was not in the same level of AsA, however, it was slightly inhibited from 5 times, 50 times of AsA concentration and 500 times of AsA inhibited remarkably.

As known L- AsA was catalyically autooxidated by  $Cu^{2+}$  and  $Fe^{2+}$ . They were not nearly affected in the above 0.01M level on the AsA assay. However,  $Fe^{3+}$  ion was neither nearly affected in the 0.001M level nor in the above 0.01M level on the AsA assay.

Key words : L-ascorbic acid, ascorbate oxidase(A.O), *Cucumis sativus* L.

#### 서 론

Ascorbic acid(AsA)는 1928년 Szent Gyögyyi 가 오렌지, 캐비지 그리고 부신에서 분리한 결정형으로 된 무색무취의 화합물로 녹색 채소와 과일에 많이 함유되어 있는 수용성 비타민으로 쉽게 산화·환원될 수 있는 성질을 가지고 있다. 인체내에는 L-glucono- $\gamma$ -lactone oxidase가 없기 때문에 인체내에서 생합성하거나 저장할 수 없으므로 필요량을 매일 식품으로부터 섭취하여야 한다(Patricia, 1980 ; William, 1981).

그런데 AsA는 식품의 조리, 가공, 저장시 여러 인자들에 의해 쉽게 파괴된다(Pelletier et al., 1976 ; Grundora et al., 1973 ; Lee et al., 1977). 따라서 AsA를 파괴시키는 각종 요인을 찾아 가장 적합한 가공조건 및 방법을 확립하려고 하는 연구가 활발히 행해지고 있다(Mishkin and Karel, 1984 ; Eison-Perchnok and Downes, 1982 ; Mohr, 1980 ; Riemer and Karel, 1978). 또한 AsA는 괴혈병을 치료해 주는 요소이며 최근에는 암과 관련하여 예방(Reddy et al., 1983 ; Jerome et al., 1973) 및 치료(Cameron and Pauling, 1979) 까지 그 가능성이 보고되어 있다.

Corresponding author : Sook-Young Lee

이러한 AsA의 정량법으로는 Indophenol 법(His-ateru, 1971; 유와 정, 1972), 2,4-Dinitrophenylhydrazine 법(김, 1973; 신과 남, 1979), Gas liquid chromatography 법(이, 1975) 그리고 High-performance liquid chromatography에 의한 방법(이와 노, 1982)이 쓰여져 왔으나 최근에 AsA에 특이적인 반응성을 갖고 있는 ascorbate oxidase(A.O)에 의한 AsA의 산화 전 후 흡광도 차와 AsA 함량이 비례하는 것이 발견되어 이를 이용한 AsA의 정량 가능성이 보고되었다(Tetsuzo et al., 1981).

AsA 산화 효소로 알려진 A.O는 분자량이 13萬으로 8~12개의 Cu를 포함하며 AsA의 호기적 산화를 촉매하여 dehydroascorbate로 만드는데 vicinal enediol구조를 갖는 lactone ring에 특이성을 갖는 것으로 알려져 있다(Nakamura et al., 1968; Dodds, 1948). 그러나 Dayan등(1976)의 보고에 의하면 A.O는 전에 알려진 것보다는 특이성이 적다고 보고한 바가 있으며, AsA에 대한 A.O의 특이성은 효소의 근원에 따라 달라질 수 있다고 보고하였다(Matsumoto et al., 1981). 한편, 박 등(1988)은 오이에서 얻어진 A.O를 이용하여 AsA 정량 가능성을 검토하여 보고한 바 있으나 Dayan등의 보고를 감안할 때 시료중에 존재하는 불순물에 의해 영향을 받을 수 있으리라 생각된다.

따라서 본 연구는 A.O를 이용한 AsA의 분석이 보다 더 정확하고 신뢰성 있는 분석이 되기 위하여 오이에서 얻어진 조효소 용액을 이용하여 AsA 분석 가능성과 검액중에 공존하는 물질이 A.O의 특이성 및 AsA 분석에 미치는 영향을 검토하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. Crude ascorbate oxidase(A.O)의 조제 및 Ascorbic acid(AsA)의 정량

#### 1) Crude ascorbate oxidase의 추출

A.O는 오이(*Cucumis sativus* L.)에서 박 등(1988)의 방법에 따라 추출하였다. 즉 신선한 오이를 양동시장에서 구입하여 1cm 정도의 두께로 껍질을 벗겨 모아 3.8kg의 오이를 믹서로 마쇄하고 가제로 여과하여

얻은 여액을 원심분리(1,400×g, 10min)시켜 상등액만 모아 미리 -20℃로 냉각시킨 3배량의 acetone을 넣어 2~3시간 방치시켜 조효소 단백질을 침전시킨 후, 여과지(Toyo No.2)로 여과하여 얻어진 침전물을 2~4℃의 증류수로 녹여내어 isopropyl alcohol로 -50℃에서 동결시킨 다음 동결 건조기(Freeze Dryer, Edwards 社製, 영국)로 건조하여 acetone powder를 얻었다.

#### 2) 조효소 용액의 조제

조효소 용액의 제조는 acetone powder를 1,000ml의 Mcilvaine buffer(0.1M citric acid, 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0)로 추출하고 여과하여 조효소 용액으로 사용하였다.

#### 3) Ascorbic acid의 정량분석

시료 검액을 조효소 용액에 의해 산화시켜 박 등(1988)의 방법에 따라 243nm에서 흡광도를 측정하고 산화전의 상태에서 측정된 흡광도의 차를 이용하여 검량선을 작성한 후 이 검량선에 의해 AsA를 정량하였다.

산화는 0.5ml의 시료 검액에 1.0ml의 조효소 용액(0.2mg/ml)을 가하고 30℃에서 30분간 산화시킨 후 3.5ml의 2%  $\text{HPO}_3$  용액을 가하여 산화를 중지시켰으며 이 용액을 산화 후의 검액으로 하였다.

산화전의 검액(control)은 0.5ml의 시료 검액에 2%  $\text{HPO}_3$  용액을 3.5ml와 1.0ml의 조효소 용액을 가하여 사용하였다.

검량선을 작성하기 위하여 10~2,000 $\mu\text{g}$ 에 상당한 AsA(sigma 社製)를 100ml의 증류수에 녹인 AsA 표준 용액을 각 농도에서 산화 전후의 흡광도의 차와 농도와의 관계를 조사하여 검량선으로 이용하였고, 흡광도는 double beam spectrophotometer(Cecil CE-594)를 사용하여 측정하였으며 효소 활성은 최대의 효소 활성을 나타내는 값을 100으로 한 %값으로 나타내었다.

#### 4) Ascorbic acid 분석 조건의 검토

조효소 용액을 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}$ /ml의 농도로 조제하여 경시적으로 조사하여 산화반응의 종류에 필요

한 농도와 반응 시간을 검토하였다.

5) 검액 중에 공존하는 물질이 Ascorbic acid 분석에 미치는 영향

AsA의 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 iso-AsA, sucrose, glucose, fructose, EDTA, citric acid 및 Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 등의 금속 이온을 여러 농도로 공존시켜 AsA의 분석에 미치는 영향을 조사하여 AsA 10 $\mu$ g/ml의 경우를 100으로 한 %값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. Ascorbate oxidase의 수율

신선한 오이 껍질(1cm 정도의 두께) 7.5kg에서 acetone powder 31.27g을 획득하여 crude ascorbate oxidase의 수율은 0.42% 정도였다. 이러한 결과는 박 등(1988)이 오이에서 얻은 수율과 유사한 값을 나타냈는데 이러한 사실로 보아 우리나라에서 생산된 오이에서 얻을 수 있는 crude A.O의 수율은 약 0.4%임

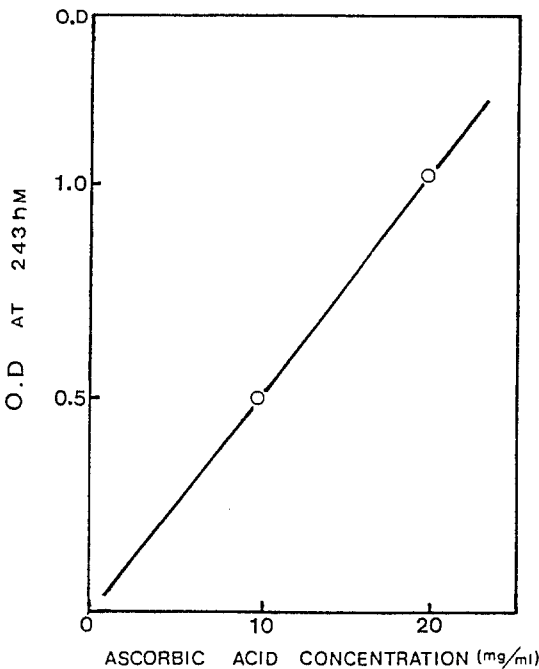


Fig. 1. Ascorbic acid concentration VS absorbance

을 알 수 있었다.

2. Ascorbic acid의 정량 분석

10 $\mu$ g/ml와 20 $\mu$ g/ml 농도의 AsA를 조효소 용액 (0.2mg/ml)으로 산화시킨 후 측정된 흡광도와 산화 전 상태에서 측정된 흡광도의 차를 측정하여 본 결과 Fig. 1과 같이 AsA의 함량과 비례관계를 나타내었다. 이러한 결과는 Tono(1981), 박 등(1988)의 결과와 일치하여 본 실험에서 얻어진 조효소 용액을 이용하여 AsA 정량 분석의 가능성을 확인할 수 있었다.

3. Ascorbic acid 분석에 필요한 효소의 농도와 반응 시간

AsA 10mg/ml 용액을 조효소 용액 25 $\mu$ g/ml에서 200 $\mu$ g/ml 농도 범위로 각각 반응시간을 달리하여 산화를 시켜 본 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 효소의 활성은 효소의 농도가 높을수록 증가되었는데 효소 활성

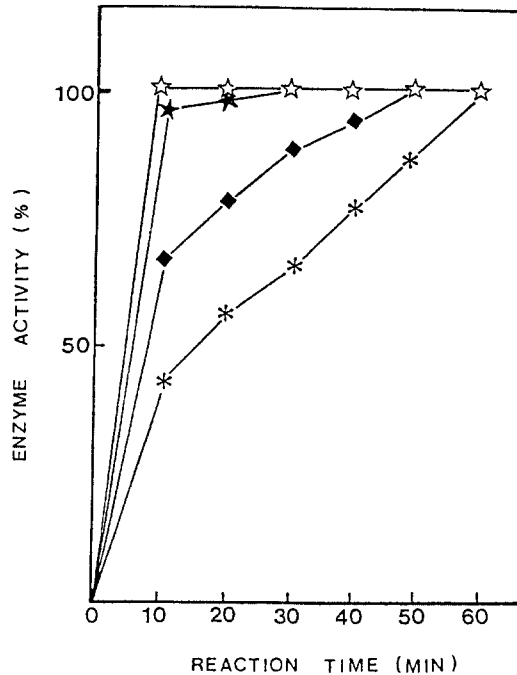


Fig. 2. Time course of enzyme oxidation by ascorbate oxidase, ☆-☆ : 200 $\mu$ g crude A.O/ml, ★-★ : 100 $\mu$ g crude A.O/ml, ◆-◆ : 50 $\mu$ g crude A.O/ml, \*-\* : 25 $\mu$ g crude A.O/ml

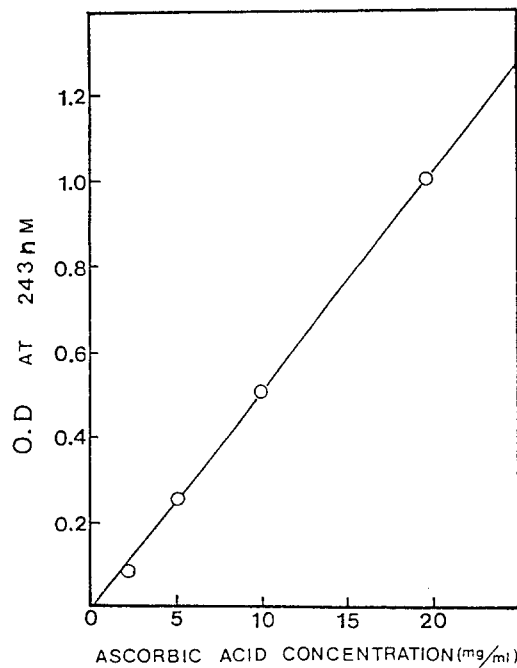
이 최대치에 이르는 시간은 조효소 용액의 농도가 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우 10분, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 30분, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 50분, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 60분을 나타내어 어느 농도에서도 60분에는 최대값에 도달함을 알 수 있었다. 이러한 결과로 본 실험에서는 확실히 반응을 종결시키고 분석 시간을 단축하기 위하여 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 조효소 용액을 분석 조건으로 하였으며 반응시간은 충분히 여유를 두어 30분으로 하였다.

**4. Crude ascorbate oxidase에 의한 ascorbic acid 분석을 위한 검량선 작성**

각 농도의 AsA를 전 항의 실험에서 채택된 조효소 용액의 농도로 30분간 반응시켜 흡광도를 측정하고 얻어진 AsA 값을 이용하여 검량선을 작성하여 Fig. 3에 나타내었는데 검량선은 직선의 비례관계에 있어서 AsA 함량을 측정할 수 있었다.

**5. 시료 검액 중에 공존하는 물질이 ascorbic acid의 분석에 미치는 영향**

AsA 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 시료 검액중에 각종 공존 물



**Fig. 3. Calibration curve for AsA estimation**

질의 존재에 따른 AsA의 분석에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

Iso-AsA의 경우 동량의 AsA에 비해 97%의 response를 나타내 효소의 특이성이 결여된 결과를 나타내었는데, 이러한 결과는 A.O가 vicinal enediol 구조

**Table 1. Effects of other compounds on determination of L-ascorbic acid**

Compounds	Amount added ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Percentage of relative responses
AsA <sup>a</sup>	10	100.0
AsA + Iso AsA <sup>b</sup>	0 + 10	97.0
	10 + 2	111.4
	10 + 10	185.0
AsA + Sucrose	10 + 50	99.1
	10 + 500	102.2
	10 + 5000	98.9
AsA + Glucose	10 + 50	100.3
	10 + 500	97.7
	10 + 5000	96.8
AsA + Fructose	10 + 50	101.3
	10 + 500	104.0
	10 + 5000	96.4
AsA + EDTA <sup>c</sup>	10 + 50	109.7
	10 + 500	98.9
	10 + 5000	16.2
AsA + Citric acid	10 + 10	99.1
	10 + 50	92.0
	10 + 500	88.5
AsA + Cu <sup>2+</sup> <sup>d</sup>	10 + 5000	6.4
	10 + 0.001	99.8
	10 + 0.01	83.4
AsA + Fe <sup>2+</sup> <sup>d</sup>	10 + 0.1	50.6
	10 + 0.001	95.3
	10 + 0.01	97.6
AsA + Fe <sup>2+</sup> <sup>d</sup>	10 + 0.1	12.3
	10 + 0.001	96.8
	10 + 0.01	95.5
	10 + 0.1	94.8

a. AsA, L-ascorbic acid  
 b. Iso AsA, D-iso ascorbic acid  
 c. EDTA, disodium ethylene diamine tetraacetate  
 d. Concentration Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> mM

를 갖는 lactone ring에 특이성을 갖고 있다고 한 Dodds의 보고와 일치되었다.

Sucrose, glucose와 fructose의 경우에 있어서는 AsA 농도의 5배, 500배가 공존할 때 어느 수준에서도 AsA 분석에 영향을 거의 미치지 않았다. 이러한 결과로 보아 상당한 수준의 당류가 AsA와 공존하더라도 AsA 분석에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 일반적으로 AsA 분석 시료에는 당이 포함되어 있는 경우가 많음을 고려할 때 이러한 사실은 상당히 바람직하다고 생각된다.

또한 EDTA 경우는 AsA의 50배가 공존할 때는 AsA 분석에 거의 영향을 미치지 않았으나, 500배로 공존할 때는 현저한 저해 효과를 나타내었으며, citric acid는 AsA와 동량에서 거의 영향이 없었으나 5배, 50배에서는 약간 저해적인 영향을 나타내다가 500배에서는 현저한 저해효과를 나타냈다.

한편, 금속이온의 경우에 있어서  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  이온은 L-AsA를 촉매적으로 자동 산화시키는 것으로 알려져 있는데, 0.001M 농도에서는 거의 영향을 미치지 않았으나, 0.01M 농도에서는 AsA 분석에 상당한 저해효과를 나타냈다. 그러나  $Fe^{3+}$  이온의 경우는 0.1M 용액에서도 거의 영향을 나타내지 않았다.

## 요 약

신선한 오이에서 얻어진 crude ascorbate oxidase를 이용하여 ascorbic acid 분석 가능성과 검액 중에 공존하는 물질이 ascorbic acid 분석에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 오이에서 얻어진 A.O를 이용한 산화 전후의 흡광도 차이는 AsA의 함량과 비례관계를 나타내고 있어 A.O를 이용하여 AsA 정량분석이 가능함을 알 수 있었다.
2. Iso-AsA는 동량의 AsA에 비해 97% response를 나타내어 A.O의 특이성이 결여된 결과를 나타냈다.
3. Sucrose, glucose와 fructose는 AsA와 공존할 때는 거의 영향을 미치지 않아 AsA 분석 시료에 일반적으로 당이 많이 포함되어 있음을 생각할 때 상당한 수준의 당류가 공존하더라도 AsA 분

석에는 별로 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

4. EDTA 그리고 citric acid는 AsA와 공존할 때 5배, 50배에서는 약간 저해적으로 영향을 나타냈으나 500배에서는 현저한 저해효과를 나타내었다.
5.  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  이온은 AsA와 공존할 때 0.01M 농도에서는 AsA 분석에 상당한 저해효과를 나타냈으며,  $Fe^{3+}$  이온의 경우는 0.1M 농도에서도 거의 영향을 미치지 않았다.

## 참고문헌

1. Cameron, E. and Pauling, L. : *Cancer Res.*, **39**, 663(1979)
2. Dodds, M. L. : *Arch. Biochem.*, **18**, 51(1948)
3. Eison-Perchonok, M. H. and Downes, T. W. : *J. Food Sci.* **47**, 765(1982)
4. Grundora J., Davideck, J., Velisek J. and Jamicek G. : *Lebensm-Wiss U Technol* **6**, 11(1973)
5. Hisateru, M. ,: 한국식품과학회지, **3**, 193(1971)
6. Jerome, J. K., Theodore, D., Conney, A. H. and Burns, J. J. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 747(1973)
7. Lee, Y. C., Kirk, J. R., Bedford C. L. and Heldman, D. R. : *J. Food Sci.* **42**, 640(1977)
8. Matsumo, J., Yamada, K. and Osajima, Y. : *Anal. Chem.*, **53**, 1974(1981)
9. Mishkin, M. Saguy, I. and Karel, M. : *J. Food Sci.*, **49**, 1267(1984)
10. Mohr, Jr. D. H. : *J. Food Sci.*, **45**, 1432(1980)
11. Nakamura, T., Makino, N. and Ogura, Y. : *J. Biochem.*, **64**, 189(1968)
12. Patricia, A. K. : *Nutrition*, Prentice, 294(1980)
13. Pelletier, O., Nantel, C., Tremblay, L., Leduc, R. and Brassard, R. : Presented at the CIFST 19 Ann Comf. May **31**, Ottawa(1976)
14. Reddy, B. S., Hanson, K. , Mathew, L. and

- Sharma, C. : *Fd, Chem. Toxic.* 21, 129(1983)
15. Riemer, J. and Karel, M. : *J. Agric Food Chem.* 26, 350(1978)
16. Tetsuzo, T. and Shui, F. : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2947(1981)
17. 김양희 : *대한가정학회지*, 11, 14(1973)
18. 박근형, 김정현, 현규환, 김동연 : *한국농화학회지*, 31, 52(1988)
19. 유춘희, 정재기 : *한국영양학회지*, 11, 14(1972)
20. 이영춘, 노봉수 : *한국식품과학회지*, 14, 330 (1982)
21. 이중희 : *한국농화학회지*, 18, 52(1975)
- 
- (1995년 7월 21일 수리)