

Ascorbate Oxidase를 이용한 Ascorbic Acid의 분광분석법에 의한 정량

박근형 · 김정현 · 현규환 · 김동연

전남대학교 식품공학과

Spectrophotometric Assay of L-Ascorbic Acid with Ascorbate Oxidase

Keun-Hyung Park, Jung-Hyun Kim, Kyu-Hawn Hyun and Dong-Youn Kim

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

Abstract

The difference of absorbance before and after oxidation of L-ascorbic acid(AsA) from cucumber was directly proportional to the concentration of AsA. The effect of pH, enzyme concentration and reaction time on the AsA assay were examined. The values of AsA obtained by the present method and HPLC method agreed well in all cases.

서 론

Ascorbic acid(AsA)의 정량법에 대해서는 많은 방법이 알려져 있는데, 1959년부터 1986년까지 우리나라에서 발행되고 있는 관련 전문학회지에 보고된 논문에서 사용한 AsA 분석법은 Indophenol 법^{1,2)}과 2,4-Dinitrophenylhydrazine법^{3,4)}이 주로 채택 되었으며 그의 최근에 와서 Gas liquid chromatography⁵⁾와 High performance liquid chromatography⁶⁾(HPLC)에 의한 분석이 행해지고 있다.

그런데 최근 AsA에 특이적인 반응성을 갖고 있는 Ascorbate oxidase(AAO)에 의한 AsA의 산화 전후 흡광도 차와 AsA 함량이 비례하는 것이 발견⁷⁾되어 이를 이용한 AsA 정량법이 검토되고 있으나 아직까지 우리나라에서는 이에 관한 연구가 수행된 바 없어 본 연구에서는 우리나라 식물체에서 얻어진 AAO를 이용하여 AsA의 정량가능성과 이에 관련된 제조조건들을 검토하였다.

재료 및 방법

AAO의 조제

AAO(EC 1. 10. 3. 3)는 오이(*Cucumis sativus* L.)에서 다음과 같은 방법으로 얻었다. 겨울에 전라남도 고흥군 동강면에서 신선한 오이(24.2kg)를 구입하여 1cm 정도의 두께로 껍질을 벗겨모아(12.7kg) blender에 의해 마쇄하였다. 마포천으로 여과하여 얻은 여액을 원심분리(1,380×g, 10min)시켜 상등액만 모아 미리 -20°C로 냉각시킨 3배량의 acetone을 넣어 2~3시간 방치시켜 조효소 단백질질을 침전시켰다. 여과지(Toyo No. 2)로 여과하여 얻어진 침전물을 2~4°C의 증류수로 녹여내어 isopropyl alcohol로 -50°C에서 동결시킨 다음 동결건조기(Edwards사제, 영국)로 건조하여 acetone powder를 얻었다.

조효소 용액

효소 용액은 0.2g의 acetone powder를 1,000ml의 McIlvaine buffer(0.1M citric acid+0.2M Na₂HPO₄·12H₂O, pH7.0) 혹은 0.01M phosphate buffer(0.01M sodium phosphate+0.01M potassium

phosphate, pH7.0)로 추출하고 여과지로 여과하여 조효소 용액으로 사용하였다.

흡광도 측정

CECIL CE 594 Double beam spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

시료 검액의 조제

시판되고 있는 주스 5종류를 구입하여 각 시료(5ml)에 2% HPO_3 (5ml)를 가하여 원심분리(2,060 ×g, 15min)하고 그 상등액을 AsA 검액으로 하였다.

AsA의 정량

1) 검액의 조제

control(I) : 0.5ml의 시료검액에 2% HPO_3 , 3.5ml와 1.0ml의 효소용액을 가하여 조제하였는데 이 혼합용액에서 2% HPO_3 은 효소의 활성을 억제시킬 목적으로 사용하였다. 효소 용액은 0.1ml의 crude AAO와 0.9ml의 McIlvaine buffer(pH7.0)를 가하여 조제하였다.

oxidation(II) : 0.5ml의 시료검액에 1.0ml 효소용액을 가하고 30°C에서 30분간 산화시킨 후 2% HPO_3 , 3.5ml를 가하여 산화를 중지시켰다.

2) 흡광도 차의 측정

흡광도의 측정은 243nm에서 측정하고 산화전의 흡광도(I)와 산화후의 흡광도(II)의 차이(ΔE)를 구하였다.

흡광도에 영향을 미치는 인자

1) pH와 흡광도

control: AsA(Sigma사제, 특급)의 농도 2mg%인 시료검액 0.5ml에 pH 1.5, 2.0, 3.0으로 조절한 1M acetate-HCl buffer 용액 4.4ml 혹은 pH 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 조절한 McIlvaine buffer 용액 4.4ml를 가하고, 거기에 0.1ml crude AAO(0.01M phosphate buffer, pH 7.0)를 가하여 조제하였다.

oxidation: 0.5ml의 AsA(2mg%)에 0.1ml crude AAO(0.01M phosphate buffer, pH7.0)를 가하여 30분간 산화시킨 후, pH1.5, 2.0, 3.0으로 조절한 1M acetate-HCl buffer 용액 4.4ml, 혹은 pH 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0으로 조절한 McIlvaine buffer 용액 4.4ml를 가하여 각

pH의 용액이 되도록 하였다.

흡광도 차의 측정 : ΔE 는 UV영역인 220~300nm에서 산화전의 흡광도(control)에서 산화후의 흡광도(oxidation)를 뺀 값으로 구하였다.

2) 효소의 활성과 pH와의 관계

0.5ml의 AsA(2mg%)를 0.1ml의 crude AAO에 pH1.5~3.0으로 조절한 1M acetate-HCl buffer 용액 0.9ml, 혹은 pH 3.0~8.0으로 조절한 McIlvaine buffer용액 0.9ml를 첨가하여 각 pH로 조절된 효소용액으로 산화시켜 각 pH 조건에서 효소 활성을 조사 하였다.

3) Crude AAO의 pH 안정성

0.5ml의 AsA(2mg%)에 crude AAO 0.2ml를 pH 1.5부터 3.0까지는 1M acetate-HCl buffer 용액 0.8ml로 그리고 pH 3.0부터 8.0까지는 McIlvaine buffer 용액 0.8ml를 첨가하여 각 pH가 되도록 조제하였고, 이 검액을 30°C에서 산화시킨 후 ΔE 값을 측정하였다.

회수율 실험

시판주스 2종류를 25ml씩 2% HPO_3 , 25ml를 가하고, AsA를 0, 5, 10, 20, 50mg%가 되게 첨가한 다음에 0.5ml씩 취하여 30분간 산화시킨 후 ΔE 를 측정하여 주스의 AsA 함량을 측정하고 AsA 첨가전 주스의 AsA 함량을 뺀 값으로 회수율을 계산하였다.

HPLC의 분석 조건

μ Bondapak NH_2 column(0.8×10cm, Waters 사제)을 사용하여 MeOH-0.25% KH_2PO_4 (50 : 50, V/V)의 solvent system, flow rate 1.6ml/min의 조건으로 UV(254nm)로 검출하였다.

결과 및 고찰

AAO를 이용한 AsA의 분석

1) Crude AAO의 수율

신선한 오이의 껍질 12.7kg에서 acetone powder 51.56g을 얻을 수 있어 crude AAO의 수율은 0.4% 정도 였다.

2) AsA 산화 전후의 흡광도 차와 AsA함량과의 관계

본 실험에서 얻어진 AAO의 조효소 용액에 의

한 AsA의 산화전후 흡광도 차와 AsA 함량과의 관계를 조사하기 위하여 AsA 함량을 0.1 μ g/ml부터 20 μ g/ml의 범위로 검액을 조제하여 Tono등²⁾에 의해서 보고된 243nm에서 ΔE 를 측정 한 결과, 본 실험에서 얻어진 AAO에 의한 ΔE 값은 AsA의 함량과 정비례 관계(Fig. 5 참조)를 나타내, 본 실험에서 얻어진 AAO에 의한 AsA의 정량분석의 가능성을 나타냈다.

3) 흡광도에 미치는 영향

가. pH와 흡광도

반응용액의 각 pH조건이 ΔE 값에 미치는 영향을 조사하기 위하여, pH 1.5부터 pH 8.0의 범위에서 220~300nm의 UV영역에서 측정된 최대의 ΔE 값을 나타내는 파장과 pH와의 관계를 Fig. 1에 나타냈다.

ΔE 값의 최대치는 pH 4.5부터 pH 8.0의 범위에서는 265nm에서 최대를 보여주었고, pH 1.5부터 pH 3.0범위에서는 243nm에서 최대를 나타냈다. 본 실험의 결과는 Hewitt와 Dickes등³⁾이 보고한 각 pH에서의 흡광도 값이 최대를 보인 UV 파장과 비슷한 양상을 보여주며, Tono등²⁾의 결과와도 일치된 결과를 나타냈다. 그런데 pH 4.5~8.0범위에서는 ΔE 가 265nm에서 최대를 보였으나

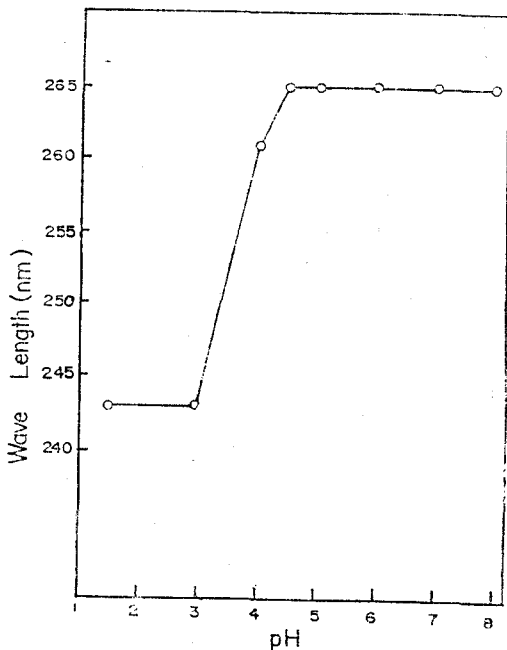


Fig. 1. Relationship between pH and wave length for the difference spectral peak in an AsA-AAO system

방치하면 잔존하는 효소에 의해 ΔE 값이 불안정하므로, 2% HPO₃ 3.5ml를 첨가하면 효소 활성을 중지시켜서 ΔE 값을 안정화 할 수 있었다. 따라서 본 실험은 검액 조제시 2% HPO₃ 3.5ml를 첨가하면 효소의 활성이 억제되고, pH 3.0 이하가 되므로 ΔE 값이 최대치를 나타내는 243nm에서 측정하였다.

나. 효소의 활성과 pH와의 관계

AAO 활성에 미치는 pH영향을 조사하기 위하여 pH 1.5~7.5의 조건에서 5분, 10분, 30분, 60분 동안 산화시킨 다음 2% HPO₃를 첨가하여 활성을 정지시킨 후 측정된 상대적인 ΔE 값을 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다.

pH 6.0~7.5에서는 ΔE 값이 최대값을 나타냈고, pH 5.0에서는 최대값의 약 60%, pH 4.5에서는 약 40%에 이르는 활성을 나타냈으나 pH 3.0 이하에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 또 활성이 최대값을 나타낸 pH조건(pH 6.0~7.5)에서는 반응시간 5분에 최대치에 달했으나, pH 5 이하에서는 pH가 낮아짐에 따라 그 pH조건에서 최대에

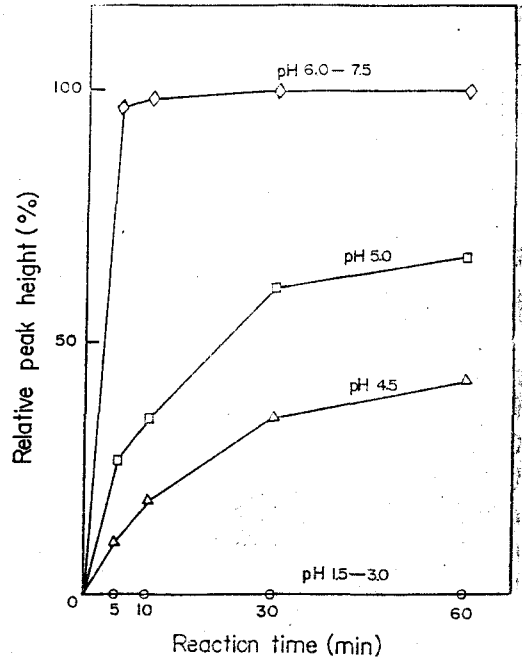


Fig. 2. Effect of pH on the peak height of difference spectra in an AsA-AAO system(AsA 2mg%)

McIlvaine buffer(pH3.0~8.0) acetate-HCl buffer(pH1.5~3.0) Relative peak height(%) indicates the percentage relative to maximum value.

이르는 시간이 60분 이상이 걸렸다.

한편 Matsumoto¹⁰⁾은 AsA에 대한 AAO의 활성에 영향을 미치는 pH를 검토하기 위하여 McIlvaine buffer와 phosphate buffer로 pH 4.0~8.0의 범위에서 조사한 결과, Phosphate buffer에서는 pH 5.0~7.5의 범위에서 McIlvaine buffer에서는 pH 6.0~7.5의 범위에서 AAO 활성이 거의 100%에 도달하였다고 보고하였으며 그리고 Tono⁹⁾은 McIlvaine buffer를 사용한 경우 pH 5.5~7.5의 범위에서 효소의 활성이 최대를 나타낸다고 하였는데 본 실험에서 얻어진 AAO도 McIlvaine buffer의 경우 pH 6.0~7.5의 범위에서 최대의 AAO 활성을 보여 Matsumoto¹⁰⁾, Tono⁹⁾의 결과와 일치하였다. 그래서 본 실험에서는 McIlvaine buffer를 사용하여 효소 활성이 최대를 나타내는 pH 7.0의 조건을 선택 하였다.

다. crude AAO의 pH안정성

앞 실험의 결과 pH에 따라 효소의 활성이 현저한 차이를 나타냈으므로 crude AAO의 pH에 대한 안정성을 조사하였다. Fig. 3은 효소가 pH 6.0~7.5의 범위에서 안정하고 활성은 pH 6.0 이하에서는 현저히 감소한다는 것을 보여주고 있다.

본 실험의 결과는 Gerwin¹¹⁾의 결과와 일치하고 있는데, 그들은 pH 6.0 이하에서의 효소활성의

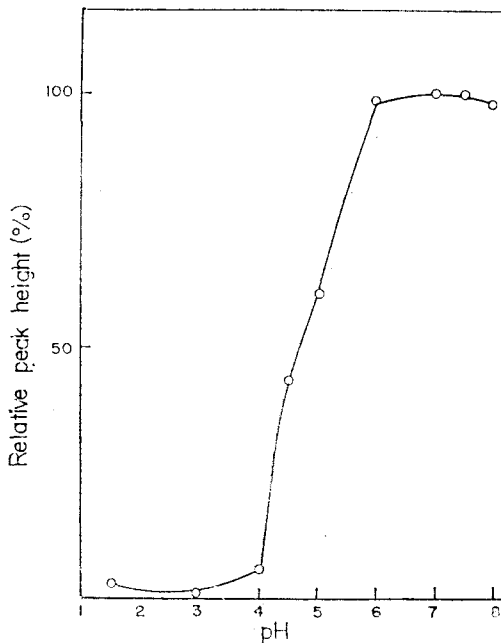


Fig. 3. Effect of pH on the stability of the enzyme(at 30°C)

현저한 저하는 존재하는 buffer의 음이온이 경쟁적으로 AAO를 저해하기 때문이라고 설명하였으며, 또 이러한 결과는 Tono⁹⁾의 결과와도 일치하여 AAO의 특징을 나타내고 있다.

pH 3.0 이하에서는 acetate-HCl buffer나 McIlvaine buffer의 경우에서도 활성을 나타내지 않았는데, 이 조건에서 효소는 거의 활성을 나타내지 않는 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 사용한 AAO 추출에는 McIlvaine buffer(pH 7.0) 또는 0.01M phosphate buffer(pH7.0)를 택하였다.

라. 효소의 농도와 반응시간과의 관계

crude AAO액을 2, 4, 8배로 McIlvaine buffer로 희석하여 효소활성을 경시적으로 조사하여 얻어진 산화적정시간에 대한 관계는 Fig. 4에서 보여준다.

Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 효소의 농도가 감소할수록 AAO의 활성이 감소되었는데, 본 실험에서 채택한 효소농도(0.2mg/ml)의 2배 희석액의 경우에서도 30분이내에 100% 활성에 도달하였다. 그래서 본 실험에서는 조효소 농도 0.2mg/ml로

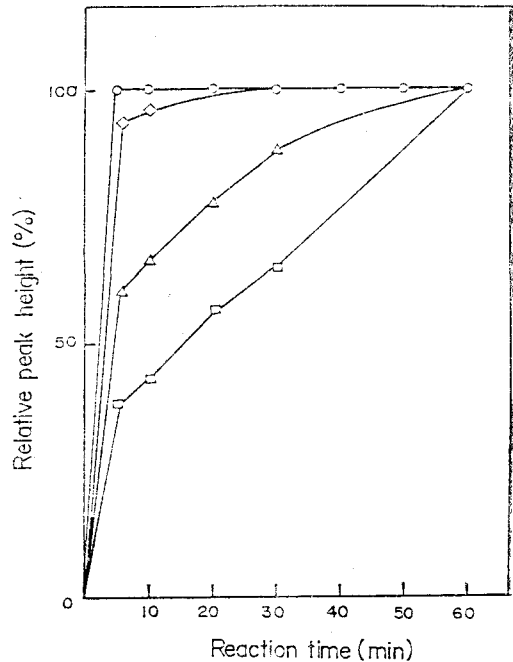


Fig. 4. Time course of enzymic oxidation of AsA in different enzyme concentrations(AsA 2mg%)

- : 0.2mg/ml(crude AAO),
- ◇—◇ : (1 : 2 dilution),
- △—△ : (1 : 4 dilution),
- : (1 : 8 dilution)

30분간 반응시켜 ΔE 값을 구하였다.

시판 주스의 AsA 정량

1) 회수율 실험

시판 주스중 오렌지주스 2종류를 택하여 AsA 함량을 5~50mg% 수준으로 첨가하여 회수율을 측정 한 결과를 Table 1에 나타냈다.

본 방법에 의해 얻어진 회수율은 98.3~99.8%로 AsA의 분석에 높은 검출성을 나타내어 본 방법이 높은 정량성을 갖고 있음을 보여주었다.

2) AsA-AAO system을 이용한 시판 주스의 AsA 함량

10~2,000 μ g에 상당한 AsA를 100ml의 증류수에 녹인 AsA 표준용액과 ΔE 값의 관계를 나타낸 검량선을 Fig. 5에 나타내었다.

ΔE 값은 AsA 함량과 직선관계를 나타내므로 이 검량선에 의해 AsA 함량을 측정 하였으며, 측정된 시판 주스의 AsA 함량을 Table 2에 나타내었다.

3) HPLC방법에 의한 분석

AsA 표준용액을 HPLC로 분석하여 얻어진 검량선을 Fig. 6에 나타냈으며, 이 검량선에 의해 시판 주스의 AsA 함량을 측정 한 결과는 Table 2에 나타내었다.

4) 본 실험방법과 타 분석방법과의 비교

Table 1. Recovery of AsA added to the test solution

Sample	AsA added (mg%)	AsA found ^c (mg% \pm S.D.)	Recovery (%)
Juice ^a	0	50.45 \pm 0.18	—
	5.00	55.25 \pm 0.22	99.6
	10.00	60.08 \pm 0.14	99.4
	20.00	70.35 \pm 0.22	99.8
	50.00	99.28 \pm 0.10	98.8
Juice ^b	0	41.92 \pm 0.14	—
	5.00	46.27 \pm 0.25	98.6
	10.00	52.25 \pm 0.25	98.7
	20.00	61.17 \pm 0.14	98.8
	50.00	90.37 \pm 0.24	98.3

a, b ; (sample 25ml+2% HPO₃ 25ml)+AsA.

c ; The values found are an average of 3 determined.

S.D.=Standard deviation.

시판 주스의 AsA 함량을 본실험방법과 HPLC 방법으로 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 이들 2가지 방법에서 얻어진 AsA 함량은 거의 유사

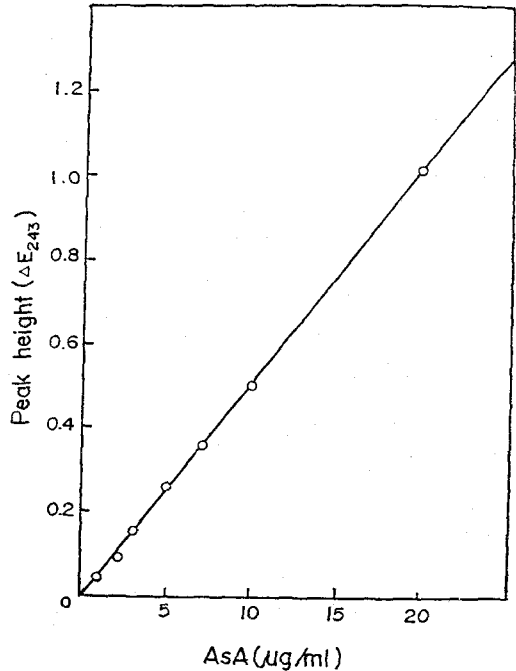


Fig. 5. Standard curve for AsA estimation

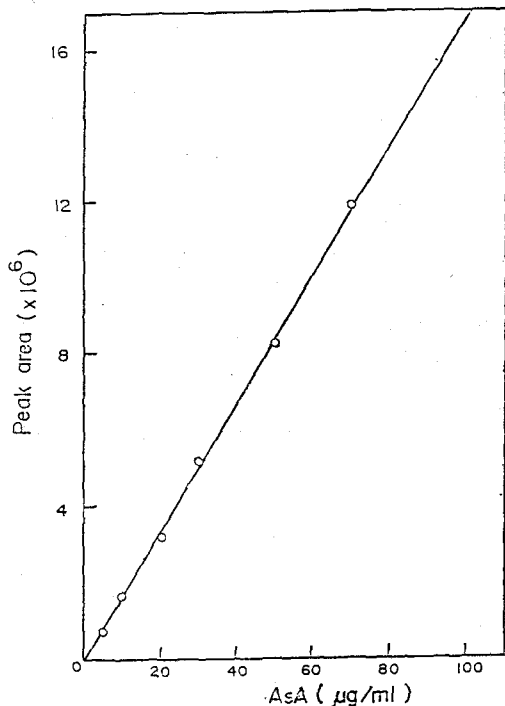


Fig. 6. Standard curve for AsA estimation

Table 2. Comparison of AsA contents commercial orange juice according to analytical methods

Sample	The present method (mg%)	HPLC method (mg%)
Juice	12.25	11.25
Juice	1.88	2.00
Juice	29.75	28.00
Juice	26.25	25.50
Juice	0.20	0

한 경향을 보였다. 따라서 본 연구에서 검토된 AAO를 이용한 AsA 정량법이 AsA의 분석에 바로 응용할 수 있다고 생각하며, 본 방법은 조효소만 준비되어 있다면 AsA의 정량을 간단하고 빠른 시간에 행할 수 있을뿐 아니라 정도 높은 분석 방법이 될 수 있다고 생각 된다.

초 록

오이에서 얻어진 AAO조효소를 이용하여 AsA 정량 가능성을 검토한 결과, AAO에 의한 산화 전후의 흡광도 차는 AsA 함량과 정비례한 관계를 나타냈다. AAO를 이용한 AsA분석에 영향을 미치는 pH와 흡광도, 효소의 활성과 pH와의 관계, crude AAO의 pH 안정성, 효소의 농도와 반응시간과의 관계를 검토한 결과, 흡광도 차가 최대를 나타낸 파장은 243nm였고, 효소의 활성이 최대를 보인 pH는 pH 6.0~7.5범위였고, 본 실험에서 이용한 효소 농도로는 5분 이내에 산화반응이 종결

되었다. 시판 오렌지주스의 AsA 함량을 AAO를 이용한 방법과 HPLC 방법에 의해서 분석하여 비교한 결과, 본 방법으로 분석된 AsA함량과 HPLC 방법에 의해서 얻어진 수치는 거의 비슷한 값을 나타냈으며, 본 방법에 의한 AsA회수율은 98.3~99.8%로 높은 검출효과를 보였다.

참 고 문 헌

1. 유춘희, 정재기 : 한국영양학회지, 5 : 109(1972)
2. Hisateru Mitsuda: 한국식품과학회지, 3 : 193 (1971)
3. 김양희 : 대한가정학회지, 11 : 14(1973)
4. 신미경, 남창우 : 한국식품과학회지, 11 : 77 (1979)
5. 이중희 : 한국농화학회지, 18 : 52(1975)
6. 이영춘, 노봉수 : 한국식품과학회지, 14 : 330 (1982)
7. Tono, T. and Fujita, S.: Agric. Biol. Chem., 45 : 2947(1981)
8. Hewitt, E.J. and Dickes, G.J.: Biochem. J., 78 : 384(1961)
9. Tono, T. and Fujita, S.: Agric. Biol. Chem., 46 : 2953(1982)
10. Matsumoto, K., Yamada, K. and Osajima Y.: Anal. Chem., 53 : 1974(1981)
11. Gerwin, B., Stephen, R.B. and John W.: J. Biol. Chem., 249 : 2005(1974)