

## 콩나물 Peroxidase를 이용한 포도당의 효소적 분석

이민경†

동아대학교 식품영양학과

### Enzymatic Determination of Glucose Using Soybean Sprouts Peroxidase.

Min-Kyung Lee

Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

#### Abstract

Soybean sprouts peroxidase can be used for enzymatic determination of glucose. Peroxidase from soybean sprouts was purified by ammonium sulfate precipitation and DEAE Sephacel column chromatography. The glucose could be quantitatively assayed by using glucose oxidase and soybean sprouts peroxidase. The optimum pH and temperature for glucose assay were of pH 5.5 and 40°C, respectively. The relationship between absorbance and glucose concentration was linear. And also the relationship between absorbance and reaction time was linear. The reducing agents such as L-cysteine, dithiothreitol inhibited the glucose assay by glucose oxidase and soybean sprouts peroxidase.

*Key words* : peroxidase, glucose oxidase

#### 서 론

Peroxidase(EC 1.11.1.7)는 많은 식물에 광범위하게 분포되어 있고 동물, 미생물에도 존재하는 효소로서 식물성 식품을 변색시키고 또한 향미손상을 일으킨다고 알려져 있으며<sup>1-3)</sup> 특히 야채의 blanching의 indicator 효소로서 잘 알려져 있다.<sup>4,5)</sup> 또한 산업적으로도 이용가치가 높아서 폐수 처리나 유기합성등에도 응용이 되고 있다.<sup>6,7)</sup> 이러한 peroxidase는 현재 여러 식물이나 미생물로부터 정제되어 그 효소학적 성질이 밝혀져 있으며 lignin생합성이나<sup>8)</sup> indoleacetic acid의 산화, 과일 숙성, 균류나 박테리아의 공격에 대한 방어등에 관한 많은 연구가 있는데<sup>9)</sup> 본 연구에서는 포도당의 효소적 분석에 peroxidase를 이용하여 실험

하였다. 포도당의 정량적 분석은 임상화학, 식품, 음료등의 산업에서 매우 중요하며 분석방법으로 화학적 방법, HPLC 등의 기기를 이용하는 방법등이 있으나 포도당만을 반응하는 효소를 이용하는 효소적방법이 특이성도 있고 비교적 편리하며 정확하다고 할 수 있다.<sup>10)</sup> 이런 효소적 방법에는 두가지의 주요한 방법이 있는데 hexokinase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 이용하는 방법과, 가장 많이 사용되고 있는 glucose oxidase와 peroxidase의 이용방법이 있다.<sup>11)</sup> Park등은<sup>12)</sup> o-dianisidine같은 기질로 glucose oxidase와 Korean-radish peroxidase를 이용하여 포도당을 정량적으로 분석하였다. 이에 저자는 우리가 흔히 먹고 있으며 시중에서 구입이 쉬운 콩나물에 peroxidase의 활성이 높음을 알고 시료로 채택하여 정제하였고 o-dianisidine대

† Corresponding author

신 guaiacol을 기질로 사용하여 pH나 온도의 효과, 그리고 환원제가 포도당의 효소적 분석에 미치는 영향등을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 과산화수소는 Junsei사 제품을, guaiacol, 포도당, L-cysteine, dithiothreitol, glucose oxidase 등은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고 DEAE-Sephacel ion exchange resin은 Pharmacia Fine Chemicals(USA)에서 구입하였으며 콩나물(*Glycine max* L.)은 부산 광역시 사하구 하단동 근처 시장에서 구입하였다.

### 조효소액의 조제

콩나물 (774g)은 줄기부분만을 다듬어 동량의 50mM Tris-HCl(pH 7.0)완충액을 첨가하여 믹서로 3분간 마쇄한 후 cheese-cloth로 여과한 다음 원심분리(10000×g, 20분, 4℃)하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### 효소의 정제

조효소액에 30~70%의 황산 암모늄으로 교반, 포화시킨 후 원심분리(10000×g, 20분, 4℃)하여 침전물을 취하여 소량의 10mM Tris-HCl(pH 7.0)에 녹였다. 이것은 전처리한 투석막에 투석후 10mM Tris-HCl(pH 7.0)완충액으로 평형화된 DEAE-Sephacel ion exchange column에서 0~1.0M의 NaCl을 linear gradient가 되도록 하여 유속 28ml/hr로 용출시켜 2.8ml씩 분획하였다. Peroxidase의 활성이 있는 부분만을 모아서 포도당 정량에 사용하였다.

### 포도당 정량

콩나물 peroxidase에 의한 효소적 분석에 있어서 반응물의 최종농도는 glucose 9mM, guaiacol 15mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM이며 완충액은 0.1M Na-acetate(pH 5.5)이었다. 분석은 0.1ml의 peroxidase와 10배 희석한 glucose oxidase를 0.1ml 첨가하였을 때 시작되었고 전체부피는 3ml이며 40℃에서 20분간 반응하여 460nm에서 흡광도를 이용하여 효소활성을 측정하였다.

### 단백질농도의 측정

DEAE-Sephacel ion exchange column 통과후 얻은 각 분획의 단백질농도는 280nm에서 흡광도로 측정하였으며 효소의 정제단계별 단백질농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry등의<sup>13)</sup> 방법으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Peroxidase의 정제

콩나물 peroxidase의 정제는 Table 1에서와 같이 DEAE-Sephacel column chromatography에서 얻은 분획이 조효소액에 비해 specific activity가 10.8배 증가되었으며 수율은 11.3%였다. Fig. 1은 정제결과 peroxidase가 fraction number 48~54번 사이에서 단일 peak의 효소활성을 보여주었다.

### 포도당 농도의 효과

Fig. 2는 glucose oxidase와 콩나물 peroxidase에 의해 산화된 guaiacol과 포도당의 양과의 관계를 나타낸 것이다. 포도당 농도의 90μmol까지 glucose oxidase와 peroxidase의 흡광도가 직선적으로 증가됨을 알수있었다.

Table 1. Summary of purification procedure of peroxidase from soybean sprouts.

Purification step	Volume (ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude	200	219.8	492.8	0.4	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30~70%	19	80.9	79.6	1.0	36.8	2.3
Dialysis	18.5	68.5	53.0	1.3	31.2	2.9
DEAE Sephacel	14	24.9	5.2	4.7	11.3	10.8

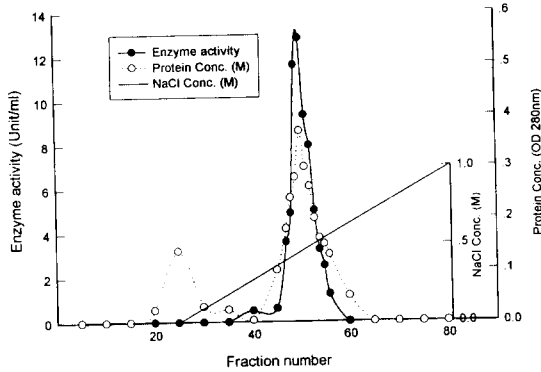


Fig. 1. Elution profile of peroxidase on DEAE-Sephacel column chromatography.

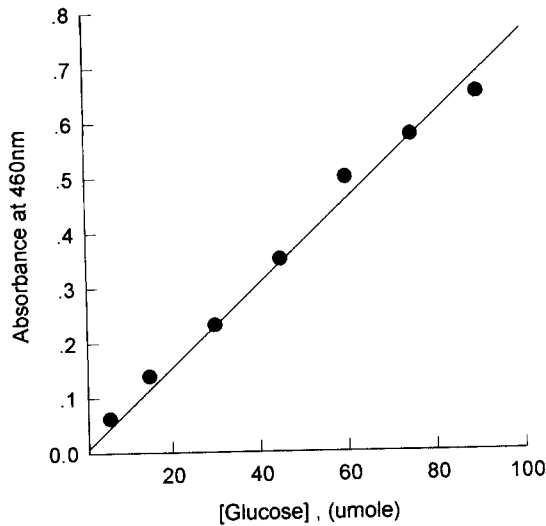


Fig. 2. Effect of amount of glucose on glucose oxidase-soybean sprouts peroxidase assay system.

pH에 대한 효과

Fig. 3은 포도당 분석에 있어서 산화된 guaiacol에 대한 pH의 효과를 나타낸 것이다. 반응의 최적 pH는 5.5로 나타났다 이는 *Aspergillus niger*로부터 추출한 glucose oxidase와 Korean-radish peroxidase가 o-dianisidine을 기질로 반응시켰을때 pH 5.5에서 가장 활성이 높았음을 보여주는 Park등의<sup>12)</sup> 연구와 같았다. 반응에 쓰인 완충액(0.1M)은 pH 3은 Na-glycine, pH 4~5는 Na-acetate, pH 6은

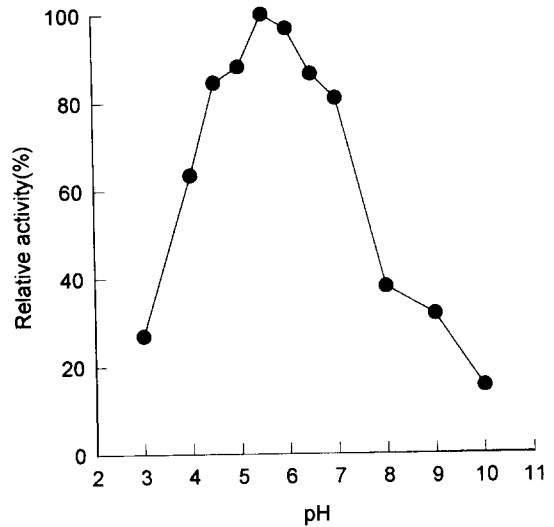


Fig. 3. Effect of pH on glucose oxidase-soybean sprouts peroxidase assay system.

Na-phosphate, pH 7~8은 Tris-HCl, 그리고 pH 9~10은 Na-borate를 사용하였다.

온도에 대한 효과

20°C에서 80°C까지의 다양한 온도에서 반응을 시켜본 결과 Fig. 4와 같이 40°C에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 이는 Park등의<sup>12)</sup> 포도당 분석방법에서의 최적온도가 40°C로 나타난것과 동일하였다.

반응시간에 대한 효과

Fig. 5는 glucose oxidase와 콩나물 peroxidase를 이용한 포도당 분석에서 반응시간에 따른 효소의 활성도를 나타낸 것이다. 반응시간이 경과됨에 따라 활성도가 증가됨을 알 수 있었다.

환원제의 효과

Table 2는 L-cysteine과 dithiothreitol과 같은 환원제가 glucose oxidase와 콩나물 peroxidase에 의한 포도당 분석에 있어서의 저해효과를 나타낸 것이다. Dithiothreitol은 L-cysteine에 비해 더 강력한 저해제로 나타났으며 농도가 높을수록 더 강한 저해효과가 있음을 알 수 있었다. Park등의<sup>14)</sup> 연구에서도 glucose oxidase와 Korean-radish peroxi-

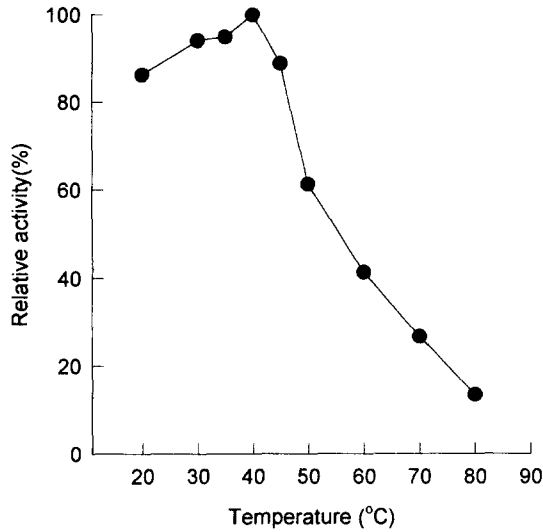


Fig. 4. Effect of reaction temperature on glucose oxidase-soybean sprouts peroxidase assay system.

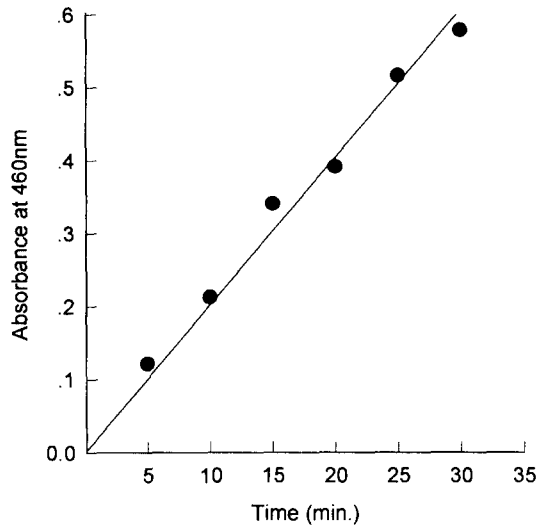


Fig. 5. Effect of incubation time on glucose oxidase-soybean sprouts peroxidase assay system.

dase에 의한 포도당 분석에 있어서 glutathione, cysteine, dithiothreitol과 같은 환원제가 저해효과를 나타낸다고 보고한바가 있다.

Table 2. Effect of L-cysteine and dithiothreitol concentration on glucose oxidase-soybean sprouts peroxidase assay system.

Addition	Concentration(mM)	Relative activity(%)
Control	0.0	100.0
L-Cysteine	0.1	88.4
	1.0	60.8
	10.0	22.8
Dithiothreitol	0.1	43.8
	0.5	20.9
	1.0	14.8

### 요 약

콩나물의 줄기로부터 추출, 정제한 peroxidase는 glucose oxidase와 함께 guaiacol을 기질로 사용하여 포도당의 분석에 사용되었다. Peroxidase는 DEAE-Sephacel ion exchange column chromatography를 통해 얻은 분획이 조효소액에 비해 specific activity가 10.8배 증가되었고 수율은 11.3%였다. 정제된 peroxidase와 glucose oxidase를 이용한 포도당 분석의 최적 pH는 5.5였고 최적온도는 40°C로 나타났다. 포도당 양의 증가에 따라 효소활성은 증가되었으며 반응시간과의 관계에서도 직선을 보여 주었다. 그리고 L-cysteine과 dithiothreitol과 같은 환원제는 포도당 분석에 이용되는 glucose oxidase와 콩나물 peroxidase의 활성을 저해하는 것으로 나타났다.

### 참 고 문 헌

1. Burnett, F. S. : Peroxidase and its relationship to food flavour and quality. A review. *J. Food Sci.*, **42**, 1(1977)
2. Vamos-Vigyazo, L., Gajzago, I., Nadudvari-Markus, V. & Kerek M. M. : Changes in some enzyme activities and browning rate of apricots during storage. *Quai. Plant Plant Foods Hum. Nutr.*, **35**, 139(1985)
3. Sessa, D. J. & Anderson, R. L. : Soybean peroxidases : Purification and some properties. *J. Agric. Food chem.*, **29**, 960(1981)
4. Aylward, F. and Haisman, D. R. : Oxidation systems in fruits and vegetables their relation to the quality of preserved products. *Adv. Food Res.* **17**, 1(1969)

5. Winter, E. : Behavior of peroxidase during blanching of vegetables. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **141**, 201 (1969)
6. Michael L. McCormick, Garry R. Buettner, and Bradley E. Britigan : The spin trap  $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-*N-tert*-butylnitron stimulates peroxidase-mediated oxidation deferroxamine. *The journal of Biological Chemistry*, **270**, 29265(1995)
7. Egley, G. H., Paul, R. N. Tr, Vaughn, K. C. & Duke, S. O. : Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sidas spinosa* L. *Planta*, **157**, 224(1983)
8. Bonnarne, P. & Jeffries, T. W. : Mn<sup>II</sup> regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Envir. Microbiol.*, **56**, 210(1990)
9. D. S. Robinson and N. A. M. Eskin : Peroxidases and catalases in foods, pp.3, *Oxidative enzymes in foods*. Elsevier applied science London and New York. (1991)
10. Naveh, D., Mizrahi, S. & Kopelman, I. J. : Quantitative determination of peroxidase in sweet corn by chemiluminescence. *J. Agric. Food chem*, **29**, 36(1981)
11. Suk-Hee Lee, Sang Yool Lee, Tai Boong Uhm, Woo-Jung Kim and Si Myung Byun : A study on coimmobilized glucose oxidase-catalase system. *Korean J. Food sci. Technol.* **17**, 37(1985)
12. Inshik Park, Sunok Kho and In Nam : Korean-radish peroxidase for enzymatic determination of glucose. *Korean Biochem. J.* **22**, 411 (1989)
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. chem.*, **193**, 265(1951)
14. Inshik Park, In Nam and Sunok Kho : Interference of reducing agents in the assay of glucose by glucose oxidase-Korean radish peroxidase method. *Korean Biochem. J.* **23**, 1(1990)