

## 오이 추출물에 존재하는 Superoxide Dismutase의 열안정성

김은애 · 김기남 · 길지은 · 이민경 · 김석환 · 서정식\* · 박인식<sup>†</sup>

동아대학교 식품영양학과

\*영남이공대학 식품영양과

### Thermostability of Superoxide Dismutase from Cucumber(*Cucumis sativa*)

Eun-Ae Kim, Gi-Nahm Kim, Ji-Eun Kil, Min-Kyung Lee,  
Suk-Hwan Kim, Chung-Sik Suh\* and Inshik Park<sup>†</sup>

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

\*Dept. of Food Science and Nutrition, Yeungnam College of Science and Technology, Taegu 705-037, Korea

#### Abstract

The superoxide dismutase(SOD) in peeled pericarp of cucumber was most stable at pH 8.0 and relatively stable between pH 5.0 and 9.0. The enzyme was stable up to 60°C and retained 12% by heat treatment at 100°C for 5 min. At pH 2.0, the peeled pericarp enzyme activity was decreased to 10% by incubation for 3 hrs. However, the enzyme activity was increased above 25% after incubating the enzyme at pH 7.0 for 6 hrs. Retention of SOD activity in cucumber by various heating methods was also measured. The residual SOD activities of peeled pericarp and whole cucumber was estimated to be 25% and 27% after blanching(2 min), respectively. The skin enzyme retained 53% of its activity after steaming(3 min). When the peeled pericarp enzyme was incubated at 4°C for 20 days, the enzyme activity remained about 81%. However, when the enzyme incubated at 30°C for 20 days, the peeled pericarp enzyme activity decreased to 17% of its original activity. The enzyme activity of peeled pericarp cucumber was not changed after exhaustive dialysis for 3 days, which indicated that the SOD activity in cucumber seems to have molecular weight above 12,000.

**Key words:** superoxide dismutase, cucumber, thermostability

#### 서 론

Superoxide dismutase(SOD: superoxide oxidoreductase: EC 1.15.1.1.)는 superoxide free radical을 분자상의 산소와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로의 dismutation을 촉매한다(1-3). 즉 SOD는 superoxide free radical의 파괴를 촉매하여 이들의 해로운 영향에 대해 oxygen-metabolizing cell을 보호한다. SOD는 그 활성자리에 촉매적 보결 금속(catalytic prosthetic metal)이 다른 3종류의 Cu, Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD의 metalloenzymes이 있고(4), 각각은 cyanide와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 구별된다(3,5,6).

Superoxide radical은 식품의 품질저하와 영양소 파괴를 일으키므로 SOD는 가공전 과정의 식품에 중요하고 식품산화와 지질과산화의 개시단계를 지연시킬 수

있어 식품에 대해 항산화제로 인정받고 있다(7).

건강한 조직에서는 백혈구 등이 반응산소종을 이용하여 외부에서 침입한 각종 비자기물질들을 제거하는 필수적인 물질이기도 하지만 생체막의 불포화 지방산의 지질과산화를 일으켜 막구조를 파괴하므로 세포에 있어 아주 유독하다(8,9). 또 체내의 구성물질인 단백질, 아미노산, 펩타이드 및 효소, DNA, RNA, 당질 등의 주요 거대분자에 비특이적으로 작용하여 세포의 구조적 기능적 손상을 야기하고 그 손상물의 축적이 생체내 이상을 초래하여 노화와 질병을 일으켜 결국은 생명체를 죽음에 이르게 한다(8,10). 생체내에는 다양한 항산화성 방어계가 존재하여 유해산소로부터 생체를 보호하여 생명체가 정상적인 삶을 영위해 갈 수 있도록 해준다(11-13). 그러나 인체 방어 능력이 약화된 경우 활

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

성산소와의 균형이 깨져서 인체가 손상을 입게 된다. 체내에서 생성되는 SOD의 감소된 활성과  $O_2^-$ 의 생성 증가로 인한 인체손상을 막기 위해 식품분야의 앞으로의 과제는 mimic SOD 또는 SOD가 풍부하거나 효소의 활성을 증진시킬 수 있는 낮은 분자량을 가진 물질을 발견하는 것이다(14). 현재 식이성 항산화제에 대한 연구가 진행되고 있고, SOD의 활성과 비슷한 활성을 보이는 저분자복합물에 대해 연구는 seeds, seedings, leaves, fruits 등에서 몇가지 물질을 발견하였으며 식품 구성성분으로써 사용되어지고 있다(15,16).

식품으로 널리 이용되는 오이의 열처리, 조리과정에서의 SOD의 열안정성에 관한 연구는 현재까지 보고되고 있지 않다. 따라서 본 연구는 식품으로 이용되는 상태인 오이의 추출물을 이용하여 다양한 조건에서 안정성을 조사하여 기능성 건강식품으로 이용될 수 있도록 기초자료를 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약

Nitro blue tetrazolium(NBT)은 Sigma Chemical Co.로부터 구입했고, methionine, ethylenediamine tetra-acetic acid(disodium salt, EDTA), riboflavine 등 그 외의 시약들은 모두 특급시약들을 사용하였다.

### 조효소액의 제조

오이의 속을 분리하여 20mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 1:1로 섞어 mixer로 간헐적으로 균질화했다. 균질화된 오이즙을 4°C에서 12,000×g에서 30분간 2회 원심분리하여(14) 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### 효소활성의 측정

동일한 두께의 투명한 시험관에 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.8)에 13mM methionine, 75μM nitro blue tetrazolium, 0.1mM EDTA(Na salt), 2μM riboflavin을 넣은 반응액 2.9ml에 효소액 0.1ml를 넣고 20W의 빛에서 일정한 시간 10분 동안에 일정한 거리 5cm에서 반응시켰다. 이때 반응액은 25°C를 유지하도록 했다. SOD활성은 superoxide에 의해 NBT가 광화학적 환원으로 생성된 불용성의 blue formazan의 형성을 저해하는 정도를 흡광도 560nm에서 측정하였다. 효소활성에 대한 unit는 반응조건에서 NBT의 최대환원의 50%까지 저해하는 SOD활성을 1 unit로 정했다(1,16).

### 효소의 일반적 특징

#### pH 안정성

pH 안정성의 실험은 조효소액을 pH 3.0에서 pH 11.0까지의 각종 완충액(0.1M)을 동량으로 섞어 30°C에서 24시간 동안 둔 후 잔존하는 SOD활성을 측정하였다. 사용된 완충용액은 pH 3.0~4.0은 sodium citrate, pH 5.0은 sodium acetate, pH 6.0은 sodium phosphate, pH 7.0~8.0은 Tris-HCl, pH 9.0~10.0은 sodium borate, pH 11.0은 sodium carbonate를 사용하였다.

#### 최적온도와 열안정성

최적온도는 5°C에서 75°C범위의 반응온도에서 SOD활성을 측정하였고, 열안정성실험은 조효소액을 10°C에서 90°C까지 다양한 온도에서 20분간 둔 후 4°C, 12,000×g에서 15분간 원심분리 후 잔존하는 활성을 측정하였다. 100°C에서 열에 불활성되는 정도를 알아보기 위해 조효소액을 100°C에서 5분 간격으로 30분간 끓인 후 위와 같은 방법으로 잔존하는 SOD활성을 조사하였다.

#### 생체내 잔존량 추정

식품으로 오이를 섭취하였을 때 생체내 잔존하는 SOD활성을 측정하기 위해 36.7°C의 water bath에서 오이의 조효소액을 위속과 동일한 pH 2.0(HCl로 적정)으로 변경시키고 3시간 둔 다음 pH 7.0으로 바꾸어(NaOH로 적정) 장내의 환경으로 만들어 6시간 동안 보관하였다. 그리고 각 과정에서 1시간 간격으로 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다.

#### 보존기간에 따른 효소의 활성

오이속의 조효소액을 4°C와 30°C에서 2일 간격으로 20일 동안 보관후 잔존하는 SOD의 활성을 이틀마다 측정하였다.

#### 다양한 열처리 방법에 따른 효소의 활성변화

조리법에 따라 불활성되는 SOD활성을 조사하기 위해 오이의 속, 껍질 그리고 분리하지 않은 오이로 실험했다. Blanching은 끓는물에 2분 동안 데치고 steaming은 3분 동안 증기에 쪄다. Pan broiling with oil은 2분간 볶고, microwave(650 W, 금성사)는 전자렌지에서 1분간 처리하였다. 각각의 시료를 균질화한 후 20mM의 potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 동량 섞어 12,000×g에서 30분간 2회 원심분리 후 그 상등액으로 실험하였다(17).

#### Dialysis

오이속의 조효소액 4ml씩을 분자량 12,000을 통과하지 못하는 투석막을 이용하여 4°C에서 10mM Tris-HCl pH 8.0의 완충용액으로 3일간 투석하였다. 이때 같

은 완충용액으로 하루에 3회 이상 바꾸어가면서 투석했다.

Activity staining

추출한 오이 조효소액을 12% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 완료 후에 gel을  $2.45 \times 10^{-3} M$  NBT에 20분간 담근 후, 0.028M tetramethylethylenediamine(TEMED),  $2.8 \times 10^{-5} M$  riboflavin과 0.036 M potassium phosphate(pH 7.8)가 함유된 용액에 15분간 20W의 빛을 비추면서 SOD의 activity staining을 수행하였다(18).

결과 및 고찰

효소의 일반적 특성

pH 안정성

오이속의 조효소액을 다양한 pH에서 30°C, 24시간 보관 후 잔존하는 SOD활성을 측정한 결과 pH 8.0에서 가장 안정하였고 pH 5.0~9.0의 범위에서 비교적 안정하였다(Fig. 1). *Aerobacter aerogenes* SOD의 pH 안정성은 pH 7.0이었고(19), *Bacillus circulans*에서의 SOD는 pH 7.0~11.0 사이에서 안정하며(20), *Serratia marcescens*의 SOD는 pH 6.0~11.0 범위에서 pH 안정성을 보였다(21).

최적온도와 열안정성

최적온도는 5°C에서 75°C의 다양한 반응온도에서 조사한 결과 25°C에서 가장 안정하였다(Fig. 2). 조효소

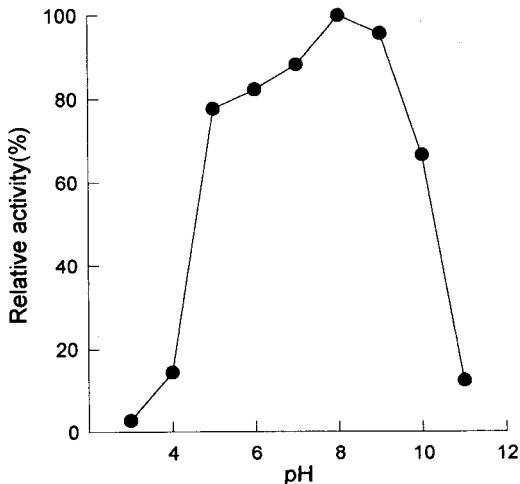


Fig. 1. Effect of pH on stability of SOD from peeled pericarp of cucumber. The enzyme was incubated at 30°C for 24hrs.

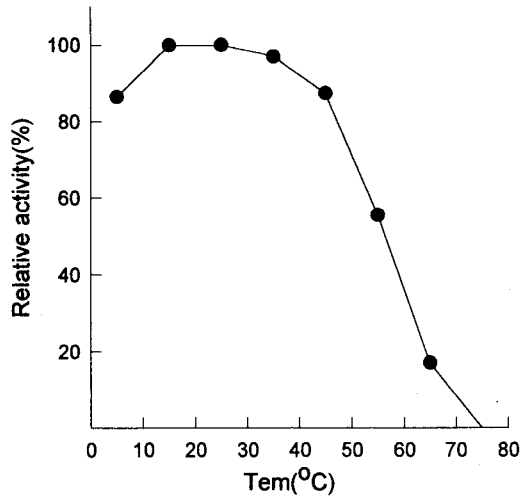


Fig. 2. Effect of temperature on activity of SOD from peeled pericarp of cucumber. The reaction was carried at pH 7.8 for 10 min at various temperatures.

액을 10~90°C의 온도에서 20분간 방치한 후 측정된 SOD의 열 안정성은 Fig. 3과 같이 오이속의 조효소액은 60°C까지는 안정하였다. *Bacillus circulans*의 SOD는 45°C까지 열에 안정하였고(20), *Serratia marcescens*의 SOD는 50°C에서 60분간 둔 후에도 60%의 활성이 유지되었다(21). 100°C에서 5분 간격으로 30분간 SOD활성이 열에 불활성되는 정도를 측정된 실험에서는 오이속의 조효소액은 5분 후에 12%의 활성이 남아 있었다. 우유의

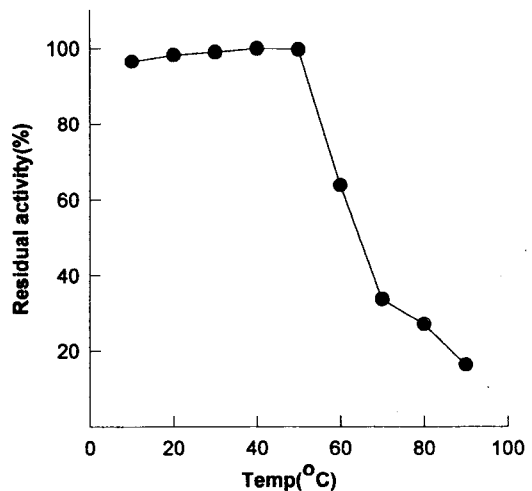


Fig. 3. Effect of temperature on stability of SOD from peeled pericarp of cucumber. The enzyme was incubated at various temperature for 20 min and residual activity was measured.

Cu,Zn-SOD의 활성은 저온살균 처리 후에도 그 활성이 유지되나 70°C 이상에서는 불활성되었고(22) corn과 oats의 crude extracts의 SOD는 peroxidase보다 열안정성이 높았다(1). Cabbage extracts의 SOD는 45°C에서 안정하고 그 이상의 온도에서는 열에 의하여 불활성되었다(23). 오이의 SOD는 비교적 열에 안정하고 만약 오이를 이용한 식품음료나 가공과정 중에 저온살균(pasteurization) 처리하였을때 산화도 막을 수 있고 SOD의 보유률도 높일 수 있을 것으로 생각된다.

생체내 잔존량 추정

오이속의 조효소액을 36.7°C에서 pH 2.0으로 3시간, pH 7.0으로 6시간을 둔 후 잔존하는 SOD 활성을 측정한 결과, pH 2.0에서 3시간이 지났을때 오이속의 조효소액은 10% 활성만이 남아 있었으나, pH를 7.0으로 변경했을 경우에는 6시간 후에 25%로 증가하였다(Fig. 4).

보관기간에 따른 효소활성의 변화

오이속의 조효소액을 4°C와 30°C에서 20일간 보관하면서 SOD활성을 측정하였다. 4°C에서 오이 속의 조효소액은 20일 후에 81%의 활성이 잔존하는 것으로 측정되었고(Fig. 5), 30°C에서는 1일만 지나도 그 활성이 20% 이하로 떨어졌고, 20일 후에도 17%의 활성만이 남아 있었다.

다양한 열처리 방법에 따른 효소의 활성변화

데치기, 찌기, microwave이용, 볶음의 조리방법을 이용하여 열처리한 실험결과를 Table 1에 나타내었다. 비교적 많은 효소의 잔존활성을 보이는 열처리방법은 오이속은 데치는 동안 25%, 껍질은 찌는 동안 53%, 속과 껍질로 분리하지 않은 오이는 데치기에서 27%의 활성이 남아 있었다. 오이 껍질이 열처리 실험에서 잔존하는 SOD활성이 오이속이나 분리하지 않은 오이보

Table 1. Effect of various heating method on residual SOD activity in cucumber

	Relative activity(%)		
	Peeled pericarp	Skin	Whole
Fresh <sup>1)</sup>	100.00	100.00	100.00
Boiling in water <sup>2)</sup>	25.94	44.55	27.18
Microwave <sup>3)</sup>	12.68	51.02	19.14
Steaming <sup>4)</sup>	10.23	53.40	24.57
Pan broiling with oil <sup>5)</sup>	24.28	34.23	27.21

<sup>1)</sup>Fresh: Not cooked

<sup>2)</sup>Boiling: Cooked in boiling water for 2 min

<sup>3)</sup>Microwave: Cooked by microwave oven<650 W> for 1 min

<sup>4)</sup>Steaming: Cooked by steaming for 3 min

<sup>5)</sup>Pan broiling with oil: Cooked with corn oil in pan for 2 min

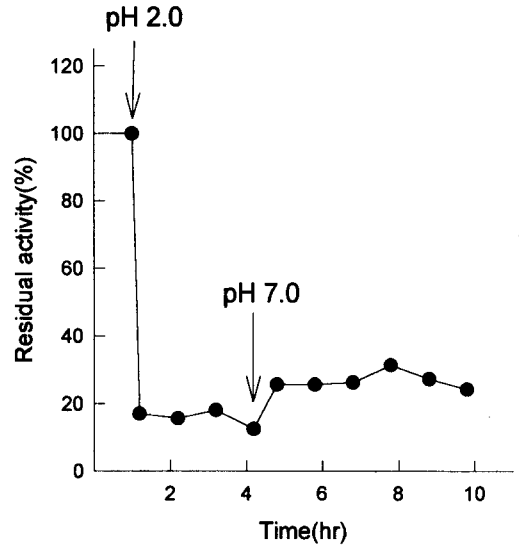


Fig. 4. Effect of pH change on residual activity of SOD from peeled pericarp of cucumber. The enzyme was incubated at pH 2.0 for 3hrs and then it as adjusted to pH 7.0.

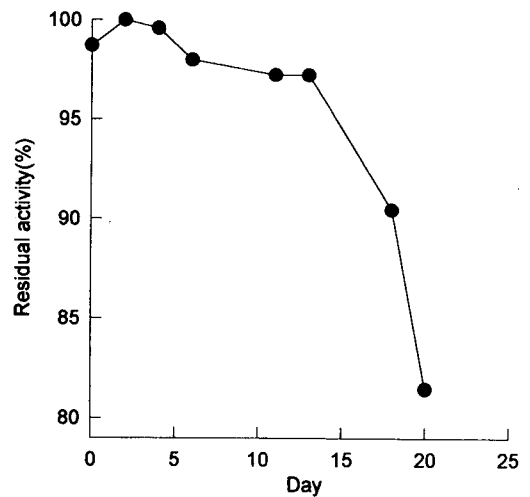


Fig. 5. Effect of incubated time on residual activity of SOD from peeled pericarp of cucumber. The enzyme was incubated at 4°C for 20days.

다 높았다.

Dialysis

분자량 12,000 이상의 물질은 보유되는 투석막에서 3일간의 투석후 SOD활성을 측정한 결과 활성이 변하지 않는 것으로 보아 오이속의 SOD는 적어도 분자량 12,000 이상의 물질인 것으로 생각된다.

## Activity staining

12% nondenaturing PAGE 후 activity staining한 결과  $R_f$ 가 0.23, 0.56 그리고 0.60에서 3종류의 band가 확인되었다. 따라서 오이속에는 SOD의 활성을 나타내는 3종류의 isozymes이 존재함이 확인되었다.

## 요 약

오이속의 조효소액에 존재하는 Superoxide dismutase (SOD)활성의 pH 안정성은 pH 8.0에서 가장 안정하였고 pH 5.0~9.0 사이의 범위에서는 비교적 안정하였다. 최적 온도는 25°C였고 열 안정성은 60°C까지는 안정하였다. 100°C에서 5분간 보관하였을 경우에는 12%만이 남아있었다. 오이에 존재하는 SOD활성이 섭취 후에도 안정한가를 확인하기 위한 실험에서는 위속의 pH와 동일하도록 오이속의 조효소액의 pH를 2.0으로 변형시킨 후 36.7°C에서 3시간 동안 보관 후에 잔존 활성이 10%였고, 장내의 환경인 pH 7.0으로 바꾸어 6시간 동안 둔 후 잔존하는 SOD의 활성은 25%로 활성이 증가되었다. 다양한 열처리 후에 잔존하는 오이의 SOD활성은 오이속은 데치기에서(끓는물에서 2분) 25%, 껍질은 찌는 동안에(3분) 53%, 그리고 속과 껍질로 분리하지 않은 오이는 데치기에서 27%의 활성잔존물을 보였다. 4°C에서는 20일간 보관한 후에 오이속의 조효소액은 81% 활성이 있었고, 30°C에서는 17%의 활성이 남아 있었다. 투석한 결과 SOD의 활성은 변화가 없었으므로 오이속에 존재하는 SOD는 적어도 분자량이 12,000 이상의 물질로 추정된다.

## 문 헌

- Giannopolitis, C. and Ries, S. : Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, **59**, 309 (1977)
- McCord, J. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049(1969)
- Robinson, D. and Eskin, N. : *Oxidative enzyme in foods*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, p.49 (1991)
- Fridovich, I. : Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.*, **58**, 61(1986)
- Droillard, M. and Paulin, A. : Isoenzymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation(*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol.*, **94**, 1187(1990)
- Asada, K., Takahashi, M. and Nagate, M. : Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 471(1974)
- Feys, M. : *Ripening and Senescence of Fruits* : The accumulation of fermentation products and the oxidation of membrane lipids in relation to storage and physiological deterioration of apples. Katholieke Universiteit de Leuven, p.142(1985)
- 홍정일, 권미향, 나경수, 성하진, 양한철 : 냉이(*Capsella bursa-pastoris*)에 탄올 추출물의 유리라디칼소거 및 xanthine oxidase 저해활성. *한국농화학회지*, **38**, 590(1995)
- Lynch, R. and Fridovich, I. : Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, **253**, 1838 (1978)
- 한태석, 광재현, 김상희, 김석중 : Superoxide dismutase 유사활성을 지닌 식물체가 oxidative stress를 받고 있는 초파리의 수명에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **28**, 865(1996)
- Stryer, L. : *Biochemistry*. 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York, p.553(1995)
- Pryor, W. A. : Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Physiol.*, **48**, 657(1986)
- 박진우 : DNA 산화손상과 노화. *한국노화학회지*, **1**, 179 (1991)
- Kim, S., Han, D., Park, M. and Rhee, J. : Screening for superoxide dismutase-like compounds and its activators in extracts of fruits and vegetables. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2263(1994)
- Kim, S., Han, D., Moon, K. and Rhee, J. : Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural anti-oxidants. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 822(1995)
- Rabinowitch, H. and Sklan, D. : Superoxide dismutase activity in ripening cucumber and pepper fruit. *Physiol. Plant.*, **52**, 380(1981)
- 임숙자 : 여러가지 가열방법에 따른 채소의 ascorbic acid 잔존량. *한국조리과학회지*, **8**, 61(1992)
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**, 2767(1971)
- Kim, S., Lee, S. and Lee, T. : Purification and characterization of superoxide dismutase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 101(1991)
- Lee, T. and Lee, S. : Purification and properties of superoxide dismutase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1361(1988)
- Maejima, K., Miyata, K. and Tomoda, K. : A manganese superoxide dismutase from *Serratia marcescens*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1537(1983)
- Korycka-Dahl, M., Richardson, T. and Hicks, C. : Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. *J. Food Protection*, **42**, 867(1979)
- Walker, J., McLellan, K. and Robinson, D. : Heat stability of superoxide dismutase in cabbage. *Food Chem.*, **23**, 245(1987)