

한국산 무 (*Raphanus sativus* L.) anionic peroxidase를 이용한 당 정량법 연구

김재홍 · 김성호¹ · 이미영*

순천향대 생명과학부, ¹순천향대 화학과

초 록 : 한국산 무(*Raphanus sativus* L.)로부터 황산암모늄 분별침전과 CM-cellulose ion exchange chromatography를 사용하여 anionic peroxidase(POD)를 분리하였다. 분리된 한국산 무 anionic POD를 비색효소로, *o*-tolidine 혹은 4-aminoantipyrine/diethylaniline(4AA/DEA)을 비색기질로 사용하여 630 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 당 정량반응을 실시하였다. 한국산 무 anionic POD는 비색기질로 4AA/DEA를 사용한 경우 *o*-tolidine을 사용했을 때 보다 더 높은 비색 반응성을 나타내었다. Glucose의 농도증가에 따른 검정곡선을 작성하였을 때 *o*-tolidine과 4AA/DEA를 사용한 경우 상관계수가 각각 $r=0.9983$ 과 $r=0.9963$ 로서 두 가지 방법의 검정곡선이 모두 좋은 직선성을 보여 주었다. 한국산 무 anionic POD와 horseradish POD의 기질산화에 대한 반응성을 비교하기 위하여 *o*-dianisidine과 guaiacol의 Km값을 조사한 결과, 한국산 무 anionic POD가 horseradish POD보다 *o*-dianisidine에 대해 약 40배, guaiacol에 대하여 약 2배의 높은 기질 반응성을 나타내었다. 이러한 결과들은 한국산 무 anionic POD를 비색효소로 사용하여 검출감도가 높은 당 정량용 진단시약을 개발할 수 있음을 보여준다. (1999년 12월 22일 접수, 2000년 2월 2일 수리)

서 론

분석하고자 하는 시료에 시료와 반응하여 색을 나타낼 수 있는 검출시약을 첨가한 후 나타나는 색의 변화를 측정하는 비색 진단법은 육안으로도 판별이 가능하기 때문에 오래전부터 이용되어 왔다. 이중에서도 효소를 이용한 비색반응은 그 검출 감도가 매우 높고, 극히 적은 양의 시료도 분석이 가능할 뿐만 아니라 측정법이 간편하기 때문에 많이 이용되고 있다. 비교적 최근에 개발된 비색진단법으로는 비색 기질인 N-benzoyl-L-Arg-p-nitroanilide의 가수분해 측정을 통한 혈전용해제 개발¹⁾과 p-nitroanilide나 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin의 생성을 비색정량한 apoptosis-mediated drug의 개발²⁾ 등이 있다. 뿐만 아니라 유전자 증폭반응의 부산물로 생기는 인산에 염료나 형광성물질을 반응시켜서 유전자와 DNA분해효소를 고감도로 측정하거나³⁾ squalene epoxidase의 비색반응을 이용한 동맥경화 치료제 개발⁴⁾ 및 XTT를 이용한 가열음식의 Maillard반응 indicator 개발⁵⁾이 가능하게 되었다. 또한 손상된 DNA의 8-oxodeoxyguanosine에 avidin을 붙인 후 POD 비색반응을 통해서 손상된 DNA의 10^{-19} mol의 미량검출이 가능하게 되어 DNA 손상에 의한 돌연변이 과정과 발암화과정, 자유라디칼 독성 등을 이해하는데 큰 도움이 되고 있다.⁶⁾ 효소를 이용한 비색반응에 널리 사용되고 있는 방법중의 하나가 바로 horseradish POD를 이용한 비색진단법이다. 보편적으로 사용되고 있는

horseradish POD의 비색기질로는 guaiacol, diaminobenzidine, phenylenediamine, *o*-dianisidine⁷⁾ 등이 있는데 효소 반응후 반응산물의 형성정도를 측정함으로써 효소활성도를 결정하게 된다.

Horseradish POD의 비색반응은 효소를 항체에 붙여서 기질과 함께 비색정량하는 enzyme linked immunosorbant assay (ELISA)⁸⁾반응 뿐만 아니라, glucose oxidase(GOD)에 coupling시켜 혈중 glucose 농도를 측정⁹⁾하거나 uricase에 coupling시켜 요산¹⁰⁾을 정량할 수 있으므로 당뇨병과 통풍의 진단시약으로 사용되고 있다. 본 연구에서는 기존 진단시약에서 주로 사용되고 있는 수입된 horseradish POD대신 한국산 무에서 분리한 anionic POD를 사용하여 *o*-tolidine과 4AA/DEA를 비색기질로 사용하여 glucose 농도를 측정하고자 한다. 또한 glucose 검출에 사용되는 POD의 기질연구를 통하여 최대 비색감도를 내는 효소와 기질의 최적조건을 구하여 기존 당 정량 진단시약의 검출감도를 향상시킬 수 있는 기초자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

효소원의 분리

본 실험에서 사용한 한국산 무(*Raphanus sativus* L.)는 충남 아산시의 재래시장에서 구입하였고 한국산 무로부터 anionic POD를 분리하여 효소원으로 사용하였다.¹¹⁻¹³⁾ 한국산 무 뿌리를 믹서로 파쇄한 후 거즈를 통과시켜서 효소액을 추출하고 이 효소액을 황산암모늄으로 90% 포화시켜 4°C에서 수 시간 방치시킨 후 10,000×g에서 20분간 원심 분리하였다. 침전물을 모아 최소 부피의 5 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 녹인 후 5 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 대하여 24 시간 투석하였다. 투석된 효소액을 5 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 평형화되어 있는 CM-cellulose column(18.5

찾는말 : 한국산 무, anionic peroxidase, 당 정량
약어 : 4AA/DEA; 4-aminoantipyrine/diethylaniline, CM; Carboxylmethyl, ELISA; Enzyme linked immunosorbant assay, GOD; Glucose oxidase, POD; Peroxidase

*연락처 : Tel : 82-418-530-1355; Fax : 82-418-530-1350
E-mail : miyoung@asan.sch.ac.kr

cm×3 cm)에 주입한 후 동일 원충용액으로 anionic POD분획을 용출시켰다.

비색기질의 선택

본 연구진에서는 1993년도부터 반도체레이저를 광원으로 하는 비색정량분석법을 연구하고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 이를 이용하면 기존의 분광기보다 간편하고, 저렴하게 비색정량용 장치제작이 가능해지기 때문이다. 그러나 지금까지 상용으로 시판되는 저가형 반도체레이저는 발진과장이 붉은 색으로 제한되어 있기 때문에, 본 장치의 응용을 위해서는 푸른색 비색시약을 필요로 하였다. *o*-Tolidine을 기질로 사용하면 최대흡수파장 630 nm의 푸른색 화합물을 형성할 뿐만 아니라 4-aminoantipyrine에 diethylaniline을 첨가하여도 630 nm에서 흡수가 일어나기 때문에 본 연구에서는 *o*-tolidine과 함께 4AA/DEA을 비색기질로 선택하여 당 정량을 실시하였다.

모든 효소반응은 Diode-Array-Detector/UV-VIS Spectrophotometer인 SCINCO UV S-2100을 사용하여 측정하였다.

o-Tolidine 법에 의한 최적조건 결정

한국산 무 anionic POD를 비색 효소로 사용하여 glucose의 농도를 측정하기 위하여 산화기질로 *o*-tolidine을 사용하였다.¹⁷⁾ *o*-Tolidine법에 의한 glucose 농도측정을 위하여 glucose를 GOD와 반응시켜서 생성된 H₂O₂를 POD 존재하에서 비색기질인 *o*-tolidine과 반응시켰고, 최종 발색반응물의 630 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Glucose의 농도를 10 mM로 고정하고 반응시간, pH, 효소농도 및 비색기질의 농도를 변화시켜 가면서 비색반응의 최적조건을 결정하였다.

4-aminoantipyrine과 diethylaniline법에 의한 최적조건 결정

한국산 무 anionic POD를 비색 효소로 사용하여 glucose의 농도를 측정하기 위하여 비색기질로 4AA/DEA을 사용하였다.¹⁸⁾ 비색시약은 0.1 N HCl에 diethylaniline을 1% 용해시킨 용액 15 ml에 4-aminoantipyrine 50 mg을 섞어서 사용하였다. Glucose와 GOD를 반응시켜서 생성된 H₂O₂를 POD 존재하에 4AA/DEA을 산화축합시킨 후 푸른색의 색소화합물을 형성시켰고 630 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 glucose 농도를 측정하였다. 10 mM의 glucose 존재하에 반응시간, pH, 효소농도 및 비색기질의 농도를 변화시켜 가면서 비색반응의 최적조건을 결정하였다.

기질에 대한 반응성 측정

Guaiacol에 대한 POD의 Km값을 결정하기 위하여 50 mM sodium phosphate (pH 6.0) 완충용액에서 H₂O₂의 농도를 5 mM로 고정시키고 guaiacol의 농도를 변화시켜 가면서 470 nm에서 흡광도 증가를 측정하였고, 효소 활성도를 double reciprocal plot하여 Km값을 결정하였다. *o*-Dianisidine에 대한 POD의 Km값을 결정하기 위하여 50 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충용액에서 H₂O₂의 농도를 5 mM로 고정시키고 *o*-dianisidine의 농도를 변화시켜 가면서 400 nm에서 흡광도의 증

가를 측정하였고, 효소 활성도를 double reciprocal plot하여 Km값을 결정하였다.

결과 및 고찰

한국산 무 anionic peroxidase의 분리

비색효소원으로는 현재 진단시약반응에 주로 사용되고 있는 horseradish POD 대신 한국산 무에서 분리한 anionic POD를 사용하였다. 한국산 무에는 pH 7.0에서 전기이동시 anode로 이동하는 anionic POD와 cathode로 이동하는 소량의 cationic POD가 존재하였다. 한국산 무에 존재하는 개별 POD isozyme에 대한 연구로는 효소분리와 특성규명¹¹⁻¹³⁾ 및 유전자수준에서의 연구¹⁸⁻¹⁹⁾가 보고되어 있다. 본 실험에서는 황산암모늄 분별 침전과 CM-cellulose ion exchange chromatography를 통하여 분리한 anionic POD를 효소원으로 사용하였다.

o-Tolidine 법에 의한 당 정량의 최적조건 결정

한국산 무 anionic POD를 비색 효소원으로 사용하여 glucose 농도를 측정하기 위하여 비색기질로 *o*-tolidine을 사용하였다. *o*-Tolidine을 비색기질로 사용한 당정량을 실시하기 위하여 glucose를 GOD와 반응시켜서 생성된 H₂O₂가 POD 존재하에 비색기질인 *o*-tolidine과 반응하도록 한 후 최종적으로 생성된 비색반응물의 630 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 최적 pH는 *o*-tolidine의 농도를 0.43 mM로 고정된 후 100 mM sodium acetate 완충용액(pH 3.0, 4.0, 5.0), 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 5.0, 6.0, 7.0), 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0, 8.0)을 사용하여 반응액의 pH를 3.0에서 8.0으로 변화시켜 가며 결정하였다. 그 결과 *o*-tolidine산화에 대한 최적 pH는 5.0으로 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과를 바탕으로 *o*-tolidine과 POD의 반응은 pH 5.0에서 실시하였다.

최적 POD양을 측정하기 위하여 10 mM의 glucose와 GOD를 0.15 unit/ml로 고정시킨 후 0.43 mM의 *o*-tolidine을 첨가하여 준 후 한국산 무 anionic POD의 양을 변화시키면서 630

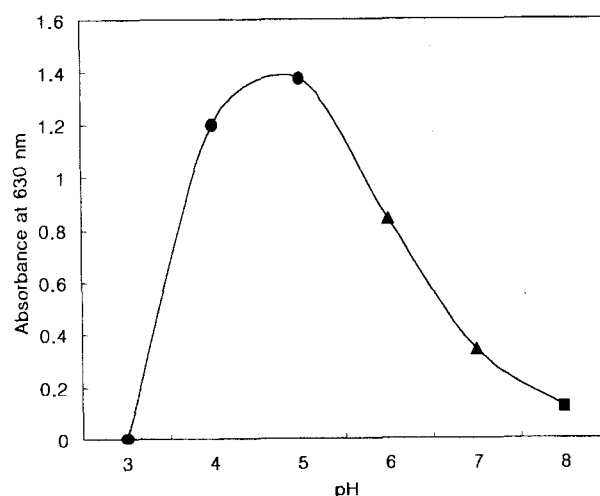


Fig. 1. Effect of pH on *o*-tolidine oxidation by Korean radish POD-GOD assay system. (●) 100 mM sodium acetate buffer, (▲) 100 mM sodium phosphate buffer, (■) 100 mM Tris-HCl buffer.

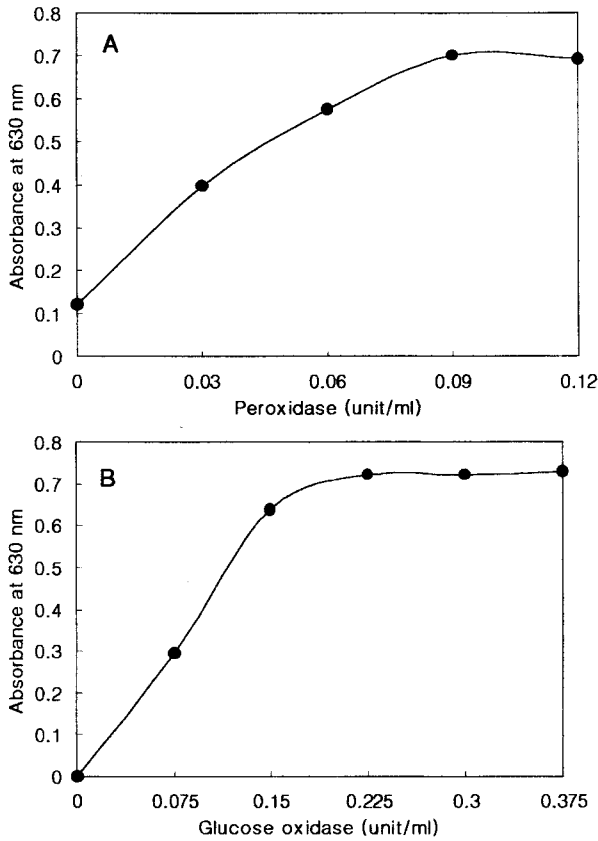


Fig. 2. (A) Determination of the amount of Korean radish POD for the measurement of glucose concentration by using *o*-tolidine as the chromogen. (B) Determination of the amount of GOD for the measurement of glucose concentration by using *o*-tolidine as the chromogen.

nm에서의 흡광도를 측정하였다. 그 결과 한국산 무 anionic POD의 양이 0에서 0.09 unit/ml인 구간에서 흡광도가 균일하게 증가하였으나 농도가 이보다 높아지면 흡광도가 일정하게 유지되었다(Fig. 2A). 최적 GOD 양을 측정하기 위하여 10 mM glucose와 함께 POD를 0.09 unit/ml로 고정시킨 후 GOD양을 변화시켜 가면서 pH 5.0에서 반응시켰다. 그 결과 GOD의 양이 0에서 0.15 unit/ml인 구간에서 흡광도가 균일하게 증가하였으며 그 이후로는 흡광도가 일정하게 유지되었다(Fig. 2B). 이상의 결과를 통하여 당 정량반응에 필요한 한국산 무 anionic POD와 GOD의 최적양이 각각 0.09 unit/ml 및 0.15 unit/ml임을 알 수 있었다.

기질인 *o*-tolidine의 적정조건을 결정하기 위하여 10 mM의 glucose와 0.15 unit/ml GOD 및 0.09 unit/ml POD에 *o*-tolidine의 양을 변화시키면서 630 nm에서의 흡광도를 측정하고 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 *o*-tolidine의 양이 증가함에 따라 흡광도가 정량적으로 증가하였으므로 이 구간내에서 당의 정량이 가능함을 알 수 있었다.

4-aminoantipyrine/diethylaniline 법에 의한 당 정량의 최적 조건 결정

Glucose와 GOD를 반응시킨 후 생성되는 H₂O₂는 한국산 무 anionic POD에 의해서 4AA/DEA과 산화축합하여 푸른색의 색

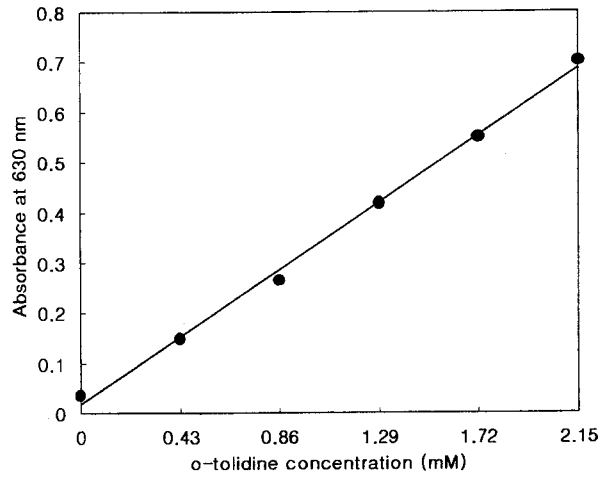


Fig. 3. Determination of the optimum *o*-tolidine concentration by using Korean radish POD-GOD assay system.

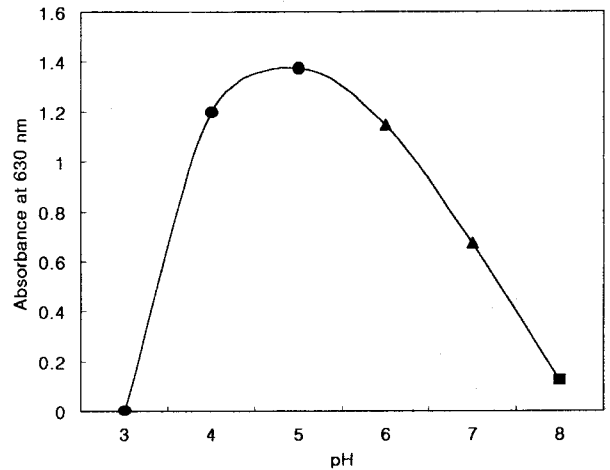


Fig. 4. Effect of pH on 4AA/DEA oxidation by Korean radish POD-GOD assay system. (●) 100 mM sodium acetate buffer, (▲) 100 mM sodium phosphate buffer, (■) 100 mM Tris-HCl buffer.

소화합물을 형성하였다. 따라서 비색효소로 한국산 무 anionic POD를 사용하고 4AA/DEA를 비색기질로 사용하여 630 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 당 정량이 가능하였다. 최적 pH를 구하기 위하여 비색시약(4AA/DEA)의 양을 20 μl로 고정된 후 완충용액의 pH를 pH 3.0에서 8.0으로 변화시켰다. 그 결과 한국산 무 anionic POD반응의 최적 pH는 5.0으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과를 바탕으로 4AA/DEA계에 대한 한국산 무 anionic POD의 반응은 pH 5.0의 100 mM sodium acetate 완충용액을 사용하여 실시하였다.

최적 효소량을 결정하기 위하여 10 mM의 glucose와 GOD 0.15 unit/ml를 반응시킨 후 비색시약과 함께 한국산 무 anionic POD의 양을 변화시켜 가면서 pH 5.0에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 Fig. 5A에 나타내었다. 또한 같은 조건에서 GOD를 변화시켜 가면서 흡광도를 측정하고 그 결과를 Fig. 5B에 나타내었다. Fig. 5A와 Fig. 5B에서 알 수 있듯이 한국산 무 anionic POD 0.2 unit/ml와 GOD 0.15 unit/ml에 의해 최적 효소반응이 일어났다

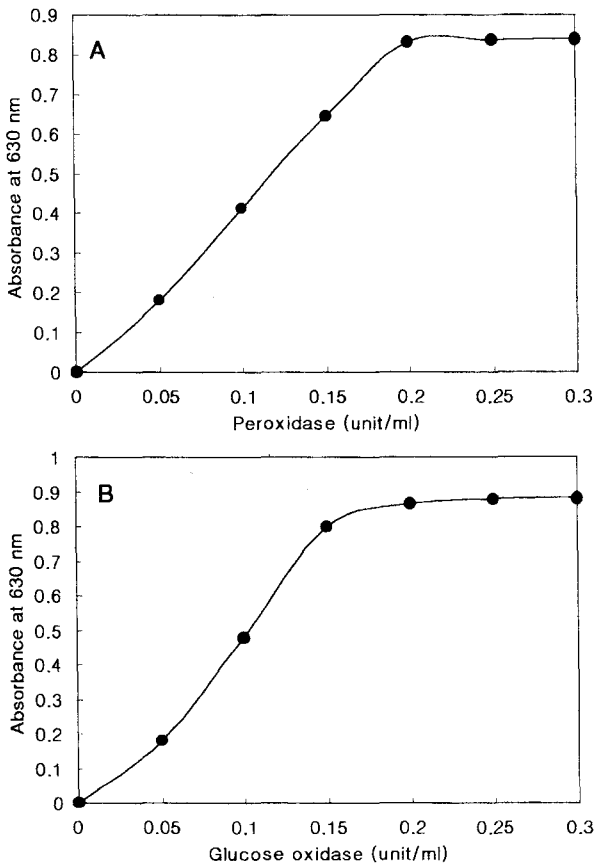


Fig. 5. (A) Determination of the amount of Korean radish POD for the measurement of glucose concentration by using 4AA/DEA as the chromogen. (B) Determination of the amount of GOD for the measurement of glucose concentration by using 4AA/DEA as the chromogen.

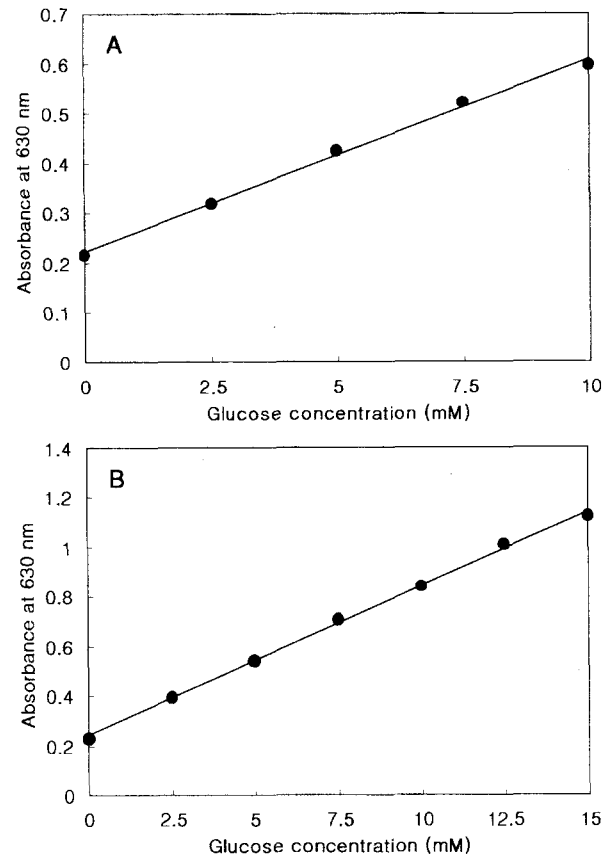


Fig. 7. (A) Calibration curve of glucose determination by using Korean radish POD with *o*-tolidine as the chromogen. (B) Calibration curve of glucose determination by using Korean radish POD with 4AA/DEA as the chromogen.

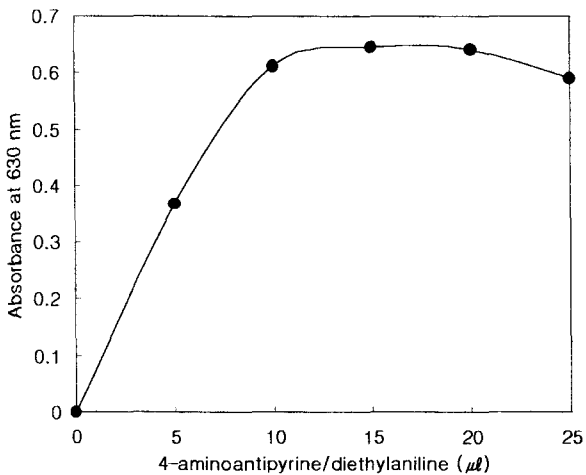


Fig. 6. Determination of the optimum 4AA/DEA concentration by using Korean radish POD-GOD assay system.

4AA/DEA의 최적 농도 결정을 위하여 10 mM glucose와 GOD 0.15 unit/m^l을 반응시킨 후 한국산 무 anionic POD 0.2 unit/m^l와 함께 비색시약의 양을 변화시켜가면서 pH 5.0에서 30 분동안 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 그 결과 비색액의 양이 10에서 20 μ l일 때 최적효소반응이 일어났다(Fig. 6).

당 정량의 검정그래프 작성

정상인의 공복시 혈중 당 농도는 평균 100 mg/dl(약 5.6 mM)이고 당뇨병자의 경우 약 200 mg/dl로 알려져 있다. *o*-tolidine 법에 따라 glucose의 농도를 혈중 평균 당 농도이내인 0, 2.5, 5, 7.5, 10 mM로 변화시켜 가며 0.15 unit/ml의 GOD와 반응시킨 후 0.43 mM *o*-tolidine과 함께 한국산 무 anionic POD 0.2 unit/m^l를 5분동안 반응시켰다. Glucose의 농도증가에 따라 흡광도를 측정하여 검정그래프를 작성한 결과 상관계수 $r=0.9983$ 의 높은 직선성을 보여 주었다(Fig. 7A). 4AA/DEA법을 사용한 경우에도 당 분석구간인 0-15 mM 사이에서 상관계수 $r=0.9963$ 의 좋은 직선성을 보여 주었다(Fig. 7B). 이러한 결과는 한국산 무 anionic POD를 사용한 이 두가지 방법이 당 분석을 위한 진단시약으로 사용될 수 있음을 보여준다. 이상의 결과를 종합하여 *o*-tolidine법과 4AA/DEA법의 당 검출감도를 비교해 보면 기질로 4AA/DEA를 사용한 경우 *o*-tolidine을 사용했을 때보다 모든 glucose농도구간에서 흡광도가 높게 나타났을 뿐만 아니라 육안으로도 더 높은 비색성을 보여주었다.

한국산 무 peroxidase와 horseradish peroxidase의 반응성 비교

진단시약이나 면역반응에서 비색반응의 표지효소로 주로 사용되는 horseradish POD와 본 연구에서 개발한 한국산 무

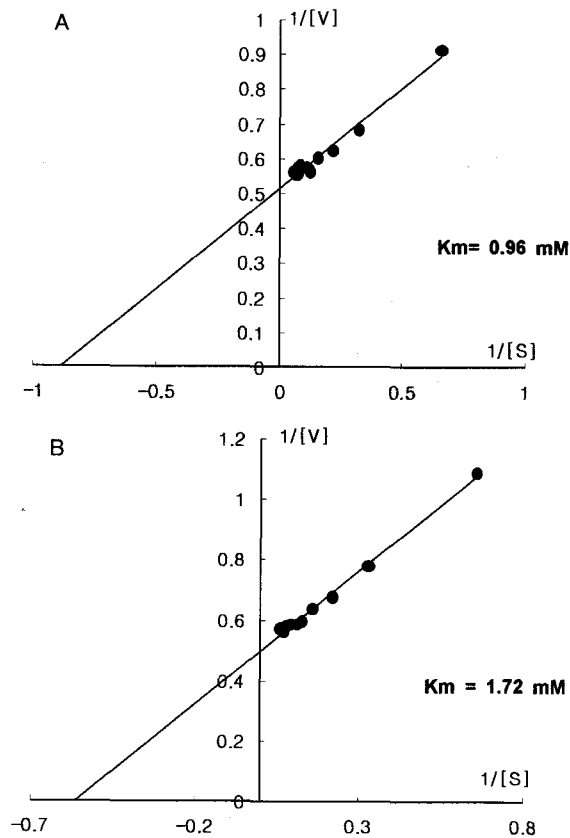


Fig. 8. Double reciprocal plot of activity vs guaiacol concentration for Korean radish POD (A) and horseradish POD (B).

POD의 비색반응성을 비교분석 하기 위하여 합성기질로 주로 사용되는 *o*-dianisidine과 guaiacol에 대한 K_m 값을 결정하였다. K_m 값은 효소의 기질의 친화도 및 반응성을 나타내는 기준으로서 K_m 값이 적을수록 높은 기질친화도를 나타낸다. Fig. 8에서 보여주듯이 한국산 무 POD와 horseradish POD의 guaiacol에 대한 K_m 값은 각각 0.96, 1.72 mM로 나타났고, *o*-dianisidine에 대한 K_m 값은 각각 0.03, 1.28 mM로 나타났다 (Fig. 9). K_m 값을 기준으로 비교하였을 때 *o*-dianisidine산화의 경우 한국산 무 POD가 horseradish POD보다 약 40여 배의 높은 기질 친화도를 나타냈을 뿐만 아니라 guaiacol산화에 있어서도 한국산 무 POD가 약 2배의 높은 반응성을 나타냈다. 따라서 한국산 무 anionic POD를 비색효소로 사용할 경우 기존진단시약보다 검출감도가 높은 당 정량반응이 가능할 것으로 예측된다. 또한 비색반응의 기질로 주로 사용되는 *o*-dianisidine에 대하여 한국산 무 anionic POD의 반응성이 약 40여 배 높다는 사실은 horseradish POD대신 한국산 무 POD를 사용할 경우 수입 대체효과와 함께 막대한 외화절감효과도 가능함을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 과학재단의 '98 국산연구기기 활용 연구비(KOSEF 98-0304-004-1)로 수행되었다.

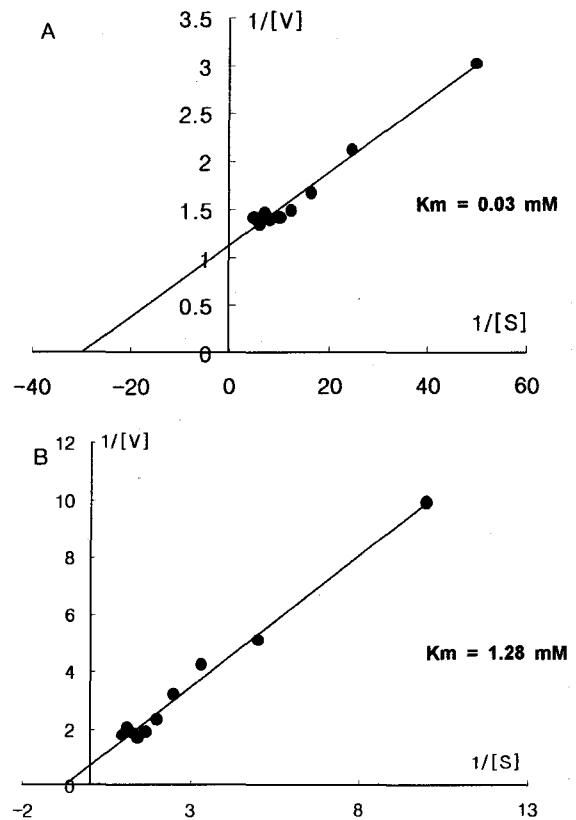


Fig. 9. Double reciprocal plot of activity vs *o*-dianisidine concentration for Korean radish POD (A) and horseradish POD (B).

참고문헌

1. Maria, J. M., Castro, I., Barry, K. and Stephen, A. (1996) A spectrophotometric assay for the determination of the catalytic efficiency of plasminogen activators using a slowly hydrolyzed plasmin substrate. *Anal. Biochem.* **226**, 225-231.
2. Vanessa, G., Steven, R. K. and Guohong, Z. (1997) Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal. Biochem.* **251**, 98-102.
3. Toshihiro, Y., Haruo, T., Emiko, N., Tamiko, N., Osamu, H., Yoshimitsu, N. and Koichiro, K. (1997) Activity measurement for deoxyribonucleases I and II with picogram sensitivity based on DNA/SYBR green I fluorescence. *Anal. Biochem.* **255**, 274-276.
4. Neil, J. G., Clive, R. N. and Stephen, L. (1997) A colorimetric assay for phosphate to measure amplicon accumulation in polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **254**, 18-22.
5. Hiroyuki, U., Susumu, M., Toshinao, I. and Masayoshi, S. (1997) Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **251**, 206-209.
6. Louiso, S., Rakhee, P., Jennie, C. and Sian, T. (1997) Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues. *Anal. Biochem.* **255**, 20-31.
7. Johannes, E., Kathleen, E. and Matthew, B. G. (1991) In

- 'Peroxidases in Chemistry and Biology,' Vol. 2, CRC Press Inc., USA.
8. Hood, L. E., Weissman, I. L. and Wood, W. B. (1984) In 'Immunology,' 2nd Ed., Chap. 3, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., USA.
 9. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1997) In 'Principles of Biochemistry,' 2nd Ed., Chap. 18, Worth Publishers, Inc., USA.
 10. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1997) In 'Principles of Biochemistry,' 2nd Ed., Chap. 17, Worth Publishers, Inc., USA.
 11. Lee, M. Y. and Kim, S. S. (1994) Characteristics of six isoperoxidases from Korean radish root. *Phytochemistry* **35**, 287-290.
 12. Lee, M. Y. and Kim, S. S. (1994) Purification and immunological relationships of six radish isoperoxidases. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 259-265.
 13. Lee, M. Y. and Kim, S. S. (1998) Characteristics of a low molecular weight minor anionic isoperoxidase A_{3n} from radish. *J. Biochem. Mol. Biol.* **31**, 548-553.
 14. Kim, S. H., Shin, C. M. and Yoo, J. S. (1996) Design of simple and compact thermal lensing spectroscopy system with visible diode laser. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **17**, 536-538.
 15. Kim, S. H. (1997) Diode-laser-based portable thermal lensing spectroscopy system with optical fiber. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **18**, 108-109.
 16. Kim, S. H. and Yoo, J. S. (1997) The application of diode laser colorimetry coupled with a fiber optic dipping probe for quantitative detection of a protein. *J. of Kor. Phys. Soc.* **30**, 431-433.
 17. Kim, J. K. (1994) In 'Clinical chemistry,' Chap. 2, Chung Gu Press Inc., Korea.
 18. Park, J. H. and Kim, S. S. (1996) Isolation, restriction mapping, and promoter sequence analysis of an isoperoxidase gene from Korean radish, *Raphanus sativus* L. *J. Biochem. Mol. Biol.* **29**(1), 52-57.
 19. Lee, D. J. and Kim, S. S. (1998) The regulation of 5' upstream region of a Korean radish cationic peroxidase gene by gibberellic acid and abscisic acid. *Plant Science* **139**, 105-115.

Glucose Determination by Using Korean Radish Anionic Peroxidase

Jae-Hong Kim¹, Sung-Ho Kim² and Mi-Young Lee^{1*}(*Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam 336-745, Korea; ²Department of Chemistry, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam 336-745, Korea)

Abstract : Anionic peroxidases (POD) were isolated from Korean radish (*Raphanus sativus* L.) root by using fractionation with (NH₄)₂SO₄ and CM-cellulose ion exchange chromatography and used as the colorimetric enzyme for glucose determination. The chromogen used in this work was *o*-tolidine or 4-aminoantipyrine/diethylaniline (4AA/DEA) and the colored products were measured at 630 nm. Korean radish anionic POD showed much better colorimetric reaction of glucose determination with 4AA/DEA than with *o*-tolidine. The r values of calibration curve for glucose determination by *o*-tolidine and 4AA/DEA were 0.9983 and 0.9963, respectively. In order to compare the reactivity for substrate oxidation by Korean radish POD and horseradish POD, the Km values against *o*-dianisidine and guaiacol were measured. Korean radish POD had about 40 fold higher affinity for *o*-dianisidine and 2 fold higher affinity for guaiacol as revealed by Km values. These results showed that Korean radish POD could be developed as the colorimetric diagnosis reagent for glucose determination with high sensitivity.

Key words : Korean radish, anionic peroxidase, glucose determination

*Corresponding author