

## 오이의 Ascorbic Acid Oxidase에 관한 연구

김정원\* · 박은순 · 윤 선

연세대학교 가정대학 식생활학과

\* 연세대학교 교육대학원 가정학전공

### Characteristics of Ascorbic acid Oxidase in Cucumbers

Kim, Jung Won\* · Park Eun Soon · Yoon Sun

*The Graduate School of Education Department of Home Economics,  
Yonsei University*

#### = ABSTRACT =

This study was attempted to investigate the occurrence and the characteristics of ascorbic oxidase in cucumbers.

Ascorbic acid oxidase was isolated from cucumbers and concentrated using ammonium sulfate precipitation.

The results of this study are as follows;

- 1) Ascorbic acid oxidase activity was detected in whole cucumber homogenate.
- 2) Highest amounts of ascorbic acid destroyed after 10 minutes' incubation of ascorbic acid oxidase with its substrate.
- 3) The optimum pH and temperature of this enzyme were found to be pH 6.5 and 40°C, respectively.
- 4) Ascorbic acid content in cucumber juice prepared using the cold water (4°C) was higher than that made with water at 30°C.
- 5) When orange juice (pH 3.4) was added, ascorbic acid destruction was completely ceased. (The ascorbic acid oxidase was inactivated at pH 3.9) Decreasing the temperature and pH are recommended to achieve maximum stability of ascorbic acid in preparing cucumber juice.

## 서 론

Ascorbic acid는 항 괴혈성 인자로 인체내에서는 합성되지 못하므로 반드시 외부로부터 섭취하여야 하고 또한 체내에 많은 양을 저장할 수 없기 때문에 그의 필요량을 매일매일의 음식물으로써 섭취시켜 주어야 한다<sup>1)</sup>. Ascorbic acid의 좋은 급원으로서는 단위함량이 높고 생식할 수 있는 과실류 (감귤 40mg%, Lemon 50mg%, Orange 45mg%, 딸기 52mg%)가 있으나 이는 계절적인 제한과 값이 비싼 관계로 매일 식용할 수 있는 급원이 되지 못하고 있다. 야채류는 채식위주인 한국인의 식생활에서 Ascorbic acid의 공급원으로서는, 1일 섭취량의 79.4%를 차지하고 있다고 보고된 바 있다<sup>2)</sup>.

야채류에 함유되어 있는 Ascorbic acid는 조리, 가공 저장시 여러 인자들에 의해 쉽게 파괴된다<sup>3)4)5)</sup> 따라서 Ascorbic acid 함량변화는 과채류의 가공시 품질 변화와 밀접한 관계를 가지고 있다. 이에 최근에는 Ascorbic acid를 파괴시키는 각종요인 (가공조건) 과 파괴율과의 관계를 도식화하여 가장 적합한 가공조건 및 방법을 찾고자 하는 연구가 활발히 행해지고 있다<sup>6)~9)</sup>. 안<sup>10)</sup>에 의하면 김치에 당근을 많이 섞을 때에는 당근속에 함유된 Ascorbic acid oxidase에 의하여 Ascorbic acid의 손실이 발생된다고 하였다.

Ascorbic acid를 산화시킨다고 알려져 있는 Ascorbic acid oxidase는 구리를 함유하고 있는 효소로서<sup>11)</sup> 식물체에 널리 존재하고 있다<sup>11)</sup>. 이 효소는 식물체내에 soluble한 형태로 있거나 또는 세포벽에 붙어있는 insoluble한 형태로 존재한다. Vines와 Oberbacher<sup>12)</sup>에 의하면 soluble enzyme은 기질로 Ascorbic acid만을 선택하며 phenolic compounds에 대해서는 활성을 갖지 않는다. 이 효소의 최적 pH는 5.6이고 산소를 필요로 한다. 또한 cyanide와 diethyl-dithiocarbamate에 의해 활성이 억제당한다고 보고되었다<sup>12)</sup>. Kanner 등<sup>13)</sup>에 의해 연구된 Ascorbate oxidase는 insoluble한 형태로 orange의 Albedo 부분에 존재하고 있다. 최적 pH는 6.5이고 copper-chelate인 sodiumazide와 sodium dithiocarbamate에 의해 활성이 억제당한다. 이 효소는 또한 열에 불안정하고 pH 3.5이하에서는 失活된다. 따라서 Albedo에 있는 Ascorbic acid의 파괴를 막기 위해서는 Orange 껍질을 blanching하거나 pH를 3.5이하로 처리함이 좋다고 제안되었다<sup>13)</sup>.

Ascorbic acid oxidase의 활성도 측정법으로는

Ascorbic acid에 효소용액을 첨가하여 시간에 따른 Ascorbic acid의 함량변화를 측정하여 이를 효소의 활성으로 간주하는 방법이 쓰여지고 있다<sup>13)</sup>. 또한 oxygen monitor를 사용하여 산소 소비량으로 Ascorbic acid oxidase의 활성을 측정하는 polarographic법이 있으며, 최근에는 산소에 의한 Ascorbic acid의 산화에서 오는 오차를 줄이기 위하여 신속하게 활성을 측정하는 Electrochemical Assay법이 소개되었다<sup>14)</sup>.

채소중 오이는 신선하고 특유한 풍미를 가지고 있으며 Ascorbic acid의 급원체로서 우리 식탁에서 흔히 애용되고 있는 식품이다. 이에 본 연구에서는 오이로부터 Ascorbic acid oxidase를 추출하여 그 특성을 규명하고, Ascorbic acid의 손실을 최소화 할 수 있는 조리, 가공조건을 설정하는데 기여하고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1) 실험재료

오이는 1985년 6월~9월에 서울, 신촌시장에서 구입하였으며 실험당일 구입한 야채만을 사용하였다.

### 2) 실험방법

#### (1) Ascorbic acid의 정량

Ascorbic acid의 측정은 2,4-dinitrophenylhydrazine method<sup>15)</sup>에 의하여 측정하였다. 오이 시료 200g을 동량의 Metaphosphoric-Acetic acid solution과 혼합하여 3분간 Osterizer (Oster coporation, Milwaukee, Wisconsin)로 균일 혼합하였다. 균일 혼합한 slurry 10g을 정확히 평량하여 100ml volumetric flask에 넣고 5% Metaphosphoric-Acetic acid용액을 가하여 잘 혼든뒤 filter paper (Toyo No. 6)를 이용하여 여과한 뒤 처음 몇 ml의 여과액을 버린 후 나머지를 시료로 사용하였다. 시험관에 여과액 2 ml씩을 취하여 oxidation, osazone 형성, osazone용해의 순으로 처리한 후 spectronic 20 (Bausch & Lomb)를 이용하여 520 nm에서 Optical Density를 측정하고 미리 작성한 standard curve에 적용하여 시료 100g당 Ascorbic acid의 양을 계산하였다.

#### (2) 자동산화 (Autoxidation)에 의한 Ascorbic acid 파괴율 측정

2개의 시험관에 각각 Ascorbic acid기질용액만을 5 ml씩 취하여 처음것은 취한 즉시 Ascorbic acid량을 측정하고 다른 하나는 10분동안 30℃에서 방치시킨 다음 Ascorbic acid를 정량하였다. 10분동안 방치시킨 후에

일어나는 Ascorbic acid의 감량은 자동산화에 의한 것으로 간주하였다.

(3) Ascorbic acid oxidase의 분리

Ascorbic acid oxidase분리의 전 과정은 0~4℃에서 이행하였으며 원심분리는 High Speed Refrigerated Centrifuge(Beckman, Model J<sub>2</sub>-21)를 사용하여 20,400 xg에서 행하였다. Ascorbic acid Oxidase 분리 방법은 figure 1에 나타낸 바와 같다.

(4) 단백질 농도 측정

분리한 효소용액(Ascorbic acid oxidase)의 단백질 농도는 Bovine Serum Albumin을 standard protein으로 사용하여 Lowry법에 의하여 측정하였다.

(5) 효소의 활성도 측정

Ascorbic acid oxidase의 활성은 Kanner<sup>13)</sup>의 방법을 수정하여 측정하였다. 효소활성에 필요한 기질용액은 Ascorbic acid(Shinyo pure chemical co.)에 0.1M Phosphate Buffer (pH 5.6)용액을 가하여 Ascorbic acid의 최종 농도가  $2 \times 10^{-4}$  M이 되도록 하여 사용하였다.

시험관에 기질용액과 동량의 효소용액을 가한후 격렬

히 흔들어 혼합시킨후 30℃의 water bath에서 incubate 시키면서 0분에서 30분까지 매 10분 간격으로 5 ml 씩을 취한다음 6% HPO<sub>3</sub> 5 ml 을 가하여 효소를 불활성화시켰다. 각 시험관마다 처음 0분 및 각각의 최종 incubate 시간에서의 Ascorbic acid 량을 측정하여 그 변화를 효소의 활성으로 간주하였다. Ascorbic acid oxidase의 활성은 효소단백질 1 mg 을 기준으로 하여 표현하였다.

(6) pH변화에 따른 Ascorbic acid oxidase의 활성 측정

0.1 M Phosphate Buffer를 사용하여 pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0에서 10분동안의 Ascorbic acid 함량변화를 측정하여 그 측정치의 차이를 효소의 활성으로 간주하였다.

(7) 온도변화에 따른 Ascorbic acid oxidase의 활성 측정

기질용액 5 ml 씩을 취하여, 각각 5℃, 30℃, 40℃, 50℃ 및 60℃로 온도를 맞춘 후 동량의 효소용액을 가하여 각 온도에서 10분간 incubate시켰다. 10분간 일어나는 Ascorbic acid의 변화량을 측정하여 온도에 따

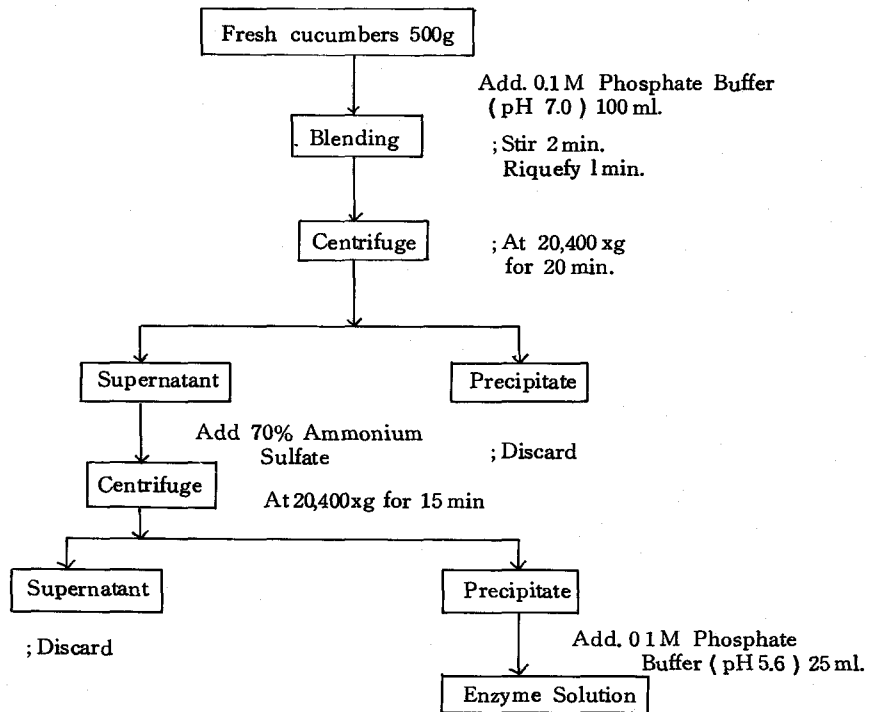


Fig. 1. Separation and concentration of ascorbic acid oxidase from cucumbers.

른 활성도를 조사하였다.

(8) 오이 juice의 제조조건에 따른 Ascorbic acid 변화량 비교

오이 100g씩에 각각 100 ml의 얼음물, 100 ml의 30℃ 물 및 100 ml의 orange juice (PH 3.4, 30℃)를 가하고 3분동안 Osterizer로 균일혼합 (blending) 하였다. 면가제를 사용하여 가볍게 한번 비틀어 잔 후 여과액 10g에 함유된 Ascorbic acid의 량을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1) Ascorbic acid의 자동산화

Ascorbic acid의 자동산화에 관하여 Johnson and Telendo<sup>17)</sup>는 orange juice에서 head space부분의 산소 농도가 증가될수록 자동산화율이 증가한다고 밝히고 있다. 또한 Eison - Perchonck와 Downes<sup>7)</sup>은 pH 6.1에서 buffered model system을 사용하여 Ascorbic acid의 자동산화를 연구했는데, Ascorbic acid 용액에 oxygen-nitrogen gas를 혼합하여 거품을 일으켰을 때 20분에서 176분 사이의 범위에서 18.3Kcal/M의 Energy를 낼 수 있는 자동산화가 일어난다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 10분간의 Autoxidation에 의한 Ascorbic acid 파괴량을 측정하였는데 실험결과 10분간의 Autoxidation에 의한 Ascorbic acid 감량은 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구의 실험에서 측정된 Ascorbic acid 파괴량은 Ascorbic acid oxidase에 의한 것으로 간주하였다.

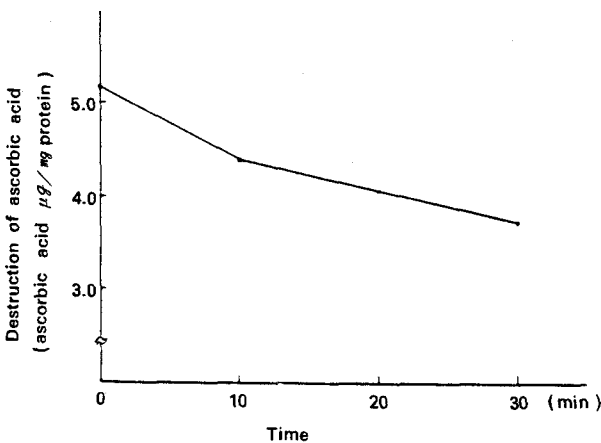


Fig. 2. Time Dependency of ascorbic acid destruction by cucumber ascorbic acid oxidase at pH 6.5, 30°C.

#### 2) Ascorbic acid oxidase의 활성

(1) 시간의 변화에 따른 Ascorbic acid oxidase의 활성

Fig. 2.에서 보는 바와 같이 기질용액에 Ascorbic acid oxidase를 가하여 반응시켰을 때 처음 10분까지의 Ascorbic acid 감소량이 20.87%로 가장 현저했고 20분, 30분에서는 처음 10분동안보다 적은 감소율을 나타냈다.

Kanner<sup>8)</sup>는 Orange 껍질에 있는 Ascorbic acid oxidase를 기질과 incubate시킨 후 5분간격으로 50분동안 Ascorbic acid의 잔존율을 측정하여 보고하였는데 이에 따르면 처음 10분동안은 반응시간에 따라 Ascorbic acid 함량이 비례적으로 감소하다가 그 이후에는 점차 원만하게 감소함을 보였다. 이는 본 연구의 결과와 유사한 것으로 사려된다. 따라서 본 연구에서는 Ascorbic acid oxidase의 활성도를 측정하기 위해 처음 10분동안의 Ascorbic acid 함량변화를 정량하였다.

(2) pH 변화에 따른 Ascorbic acid oxidase의 활성

Fig. 3에서 보는 바와 같이 Ascorbic acid oxidase 활성은 최적 pH 6.5를 기점으로 그 이상 또는 그 이하의 pH에서는 감소되는 경향을 나타내었다. 이 결과는 orange 껍질에서 분리한 Ascorbic acid oxidase<sup>13)</sup>의 최적 pH 6.5와 일치하였다.

(3) 온도변화에 따른 Ascorbic acid oxidase의 활성

Fig. 4에서 보는 바와 같이 Ascorbic acid oxidase에 의한 Ascorbic acid 파괴량이 40℃까지는 계속 증

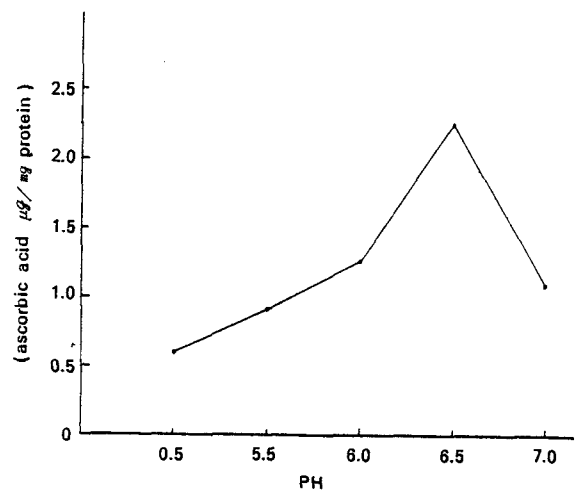


Fig. 3. Activity of Ascorbic acid oxidase as a function of pH.

가하다가 그 이후에서는 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 오이의 Ascorbic acid oxidase 의 최적온도는 40 ℃ 였다. 이는 온도가 상승함에 따라 Ascorbic acid oxidase 로 인한 산화반응이 증가하다가 그 이상의 온도에서는 효소단백질의 변성으로 인하여 활성도가 낮아지기 때문이라고 사려된다.

Kanner<sup>13)</sup>에 의하면 orange 껍질에서 추출한 ascorbic acid oxidase 의 최적온도는 pH 5.6 일 때에 40 ℃ 라고 보고한 바 있다.

3) 오이 juice 제조시 온도 및 pH 변화에 따른 Ascorbic acid 함량의 변화

Kanner<sup>13)</sup>는 Ascorbic acid oxidase 의 활성을 저지시키기 위한 방법으로 pH를 3.5 이하로 낮추거나 온도를 고온으로 높일 것, 또한 sodiumazide와 sodium dithiocarbamate 같은 동 킬레이트 화합물(copper-chelate)에 의한 저지방법을 보고하였다. Farhangi<sup>18)</sup> 등은 blanching 으로 인해 Ascorbic acid oxidase 는 완전히 불활성화 되었으나 Ascorbic acid 의 손실이 50 % 나 되므로 고온에 의한 효소 저지방법은 효과가 없다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 온도를 낮추는 방법과 pH를 저하시키는 방법을 사용한 조리·가공조건을 연구하였다. 우선, 온도를 낮추는 방법으로 오이에 4 ℃ 의 물을 가하여 blending하고(S<sub>1</sub>) 또 오이에 30 ℃ 의 물을 가하여 blending 하여(S<sub>2</sub>) 각각 2개의 sample 에서 10분동안의 Ascorbic acid 보유율을 측정하였다. 연구결과 Table 1 에서 보는 바와같이 S<sub>2</sub>는 S<sub>1</sub>에 비하여 8.9%나 더 감소되었다. 따라서 효소의 작용이 저온에서 다소 둔화된다는 것을 알 수 있다. 다음으로 pH를 낮추는 방법으로는, 30 ℃에서 오이를 blending할 때, 물

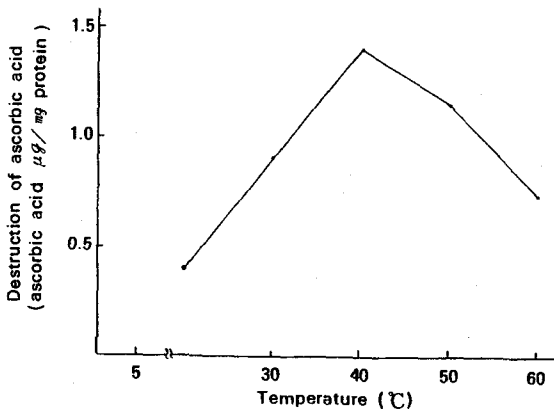


Fig. 4. Activity of cucumber ascorbic acid oxidase as a function of temperature.

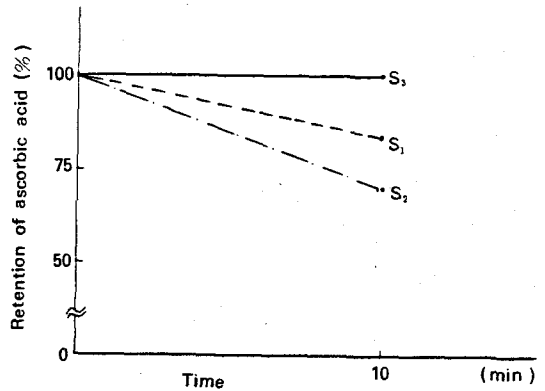


Fig. 5. Ascorbic acid contents in cucumber juice prepared at different temperatures & pHs.

Table 1. Ascorbic acid contents on the different conditions of cucumber juices

Sample	Ascorbic acid contents (mg)		Destruction of ascorbic acid (%)
	0min	10 min	
S <sub>1</sub>	0.24	0.20	16.7
S <sub>2</sub>	0.215	0.16	25.6
S <sub>3</sub>	0.37	0.37	0.0

\* S<sub>1</sub>: cucumber + cold water (4 ℃, pH 5.7)  
 S<sub>2</sub>: cucumber + water (30 ℃, pH 5.7)  
 S<sub>3</sub>: cucumber + orange juice (30 ℃, pH 3.9)

을 가하여 blending한 것(S<sub>2</sub>)과 orange juice (pH 3.4)를 가하여 blending한 것(S<sub>3</sub>)으로 각각 sample을 달리 하여 Ascorbic acid의 함량을 측정한 결과 Table 1 및 Fig. 5에서 보는 바와같이 S<sub>2</sub>(pH 5.7)는 Ascorbic acid의 파괴가 있었으나 S<sub>3</sub>(pH 3.9)는 Ascorbic acid의 손실이 전혀 없었다. 따라서 효소의 작용을 저지시키기 위하여 orange juice를 첨가하여 pH를 낮춘 것은 매우 효과적인 방법으로 나타났다.

요 약

본 연구는 오이의 추출물에서 Ascorbic acid oxidase 활성의 존재유무를 검토하고 이 효소의 특성을 규명하여 Ascorbic acid의 손실을 최소화하는 과제류의 조리, 가공조건을 설정하는데 도움이 되고자 시도

되었다. 오이에서 Ascorbic acid oxidase 를 분리해 내어 그 특성을 연구한 결과 시간의 변화에 따른 Ascorbic acid oxidase 의 활성은 처음 10 분 동안 Ascorbic acid 감소량이 가장 현저하였으며 Ascorbic acid oxidase 의 최저 pH는 6.5 로 나타났다. 또한 온도의 변화에 따른 Ascorbic acid oxidase 의 활성은 40℃까지는 계속 증가하다가 최적온도 40℃를 기점으로 그 이상의 온도에서는 감소하였다. 본 연구에서 고찰한 결과를 실제로 적용시켜 오이 juice 를 제조하여 온도 및 pH 변화에 따른 Ascorbic acid 함량을 비교한 결과 냉장온도에서 4℃의 물로 blending 한 것이 실온의 물로 blending 한 것보다 Ascorbic acid 함량이 높았으며 orange juice (pH 3.4) 를 첨가하여 blending 한 것은 Ascorbic acid 함량이 감소되지 않은 것으로 나타났다. 따라서 야채 juice 조제시 저온에서 처리하고 pH 를 3.9 이하로 낮추며 juice 조제 후 바로 섭취하는 것이 Ascorbic acid 의 파괴를 최소화할 수 있는 바람직한 방법이라고 사려된다.

#### REFERENCES

- 1) William, S.R.: *Nutrition and diet therapy*. C.V. Mosby Co., fourth edition, pp. 124~125, 1981.
- 2) 허 금 · 유정열 · 이기열 · 성낙응 · 채범석 · 차철환 : 국민영양조사보고 (1969). 한국영양학회지 3 (1) : 2~41, 1970.
- 3) Pelletier, O., Nantel, C., Tremblay, L. Leduc R. and Brassard, R.: *Vitamin C in potatoes prepared in various ways. Presented at the CIFST 19 Ann. Conf. May 31, 1976 Ottawa*.
- 4) Grundora, J., Davideck, J., Velisek, J. and Jamicek G.: *Determination of L-ascorbic and acid L-dehydro ascorbic acid in plant materials and preserved foods, Lebensm-Wiss. U Technol* 6 : 11~15 1973.
- 5) Lee, Y.C., Kirk, J.R., Bedford C.L. and Heldman, D.R.: *Kinetics and computer simulation of ascorbic acid stability of tomato juice as function of temperature, pH and metal catalyst* J. Food Sci 42 (3) : 640-678, 1977.
- 6) Mishkin, M., Saguy, I. and Karel, M.: *A dynamic test for kinetic models of chemical changes*

during processing (Ascorbic acid Degradation in dehydration of potatoes). J. of Food Sci 49 : 1267-1270, 1984.

- 7) Eison-Perchonok, M.H. and Downes, T.W. : *Kinetics of ascorbic acid autoxidation as a function of dissolved oxygen concentration and temperature* J. of Food Sci 47 : 765-769, 1982.
- 8) Mohr Jr., D.H.: *Oxygen mass transfer effects on the degradation of vitamin C in foods* J. of Food Sci 45 : 1432-1437, 1980.
- 9) Riemer, J. and Karel, M.: *On the anaerobic degradation of ascorbic acid in dehydrated Tomato juice* J. Agric. Food Chem 26 (2) : 350-353, 1978.
- 10) 안숙자 : 김치에 당근을 섞을때의 Vitamin C 의 변화, 석사논문, 중앙대학교 대학원.
- 11) Dawson, C.R.: *In "The Biochemistry of copper" Ed. Peisach, Aisen, and Blumberg, p.305 Academic Press, New York, NY., 1966.*
- 12) Vines, H.M. and Oberbacher, M.F.: *Citrus fruit enzymes : I. Ascorbic acid oxidase in orange peel* Physiol 38 : 333-335, 1963.
- 13) Stelaharel, J.K. and Ben-Shalom, N.: *Ascorbate oxidase in Mature orange peel*, J. of Food Sci 46 : 1407-1409, 1981.
- 14) Jchenk, J.O., Miller, E. and Adams, R.N.: *Electrochemical assay for brain ascorbate with ascorbate oxidase*, Anal. Chem. 54 : 1452-1457, 1982.
- 15) 일본약학회, 1957. 위생시험법 주해. pp 157-158, 금원출판사.
- 16) 照丙淳○ : セタミン定量法, 凡木國夫篇 (醫齒藥出版) p. 124, 1964.
- 17) Johnson, R.L., and Teledo, R.T.: *Storage stability of 55 Brix orange juice concentrate aseptically packaged in plastic and glass containers* J. Food Sci 40 : 443-447, 1975.
- 18) Farhangi, M and Guy Valadon, L.R.: *Effect of acidified processing and storage on carotenoids (pro Vitamin A) and Vitamin C in Mung Bean Sporuts*. J. of Food Sci 46 : 1464-1466, 1981.