

酵素分析法에 의한 微量암모니아의 定量

成河珍 · 梁漢喆*

高麗大學校 農科大學 遺傳工學科

*高麗大學校 農科大學 食品工學科

(1986년 10월 22일 수리)

Determination of Microquantities of Ammonia by Enzymatic Analysis

Ha-Chin Sung and Han Churl Yang*

Department of Genetic Engineering, College of Agriculture, Korea University

*Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University

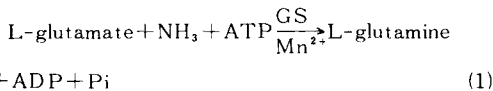
(Received October 22, 1986)

Enzymatic micro-assay methods were studied those were capable of determining ammonia down to 10^{-5} M (0.01 μ mole/ml) in the presence of other nitrogenous compounds such as protein and amino acid. Microquantities of ammonia (0.01-0.1 μ mole) could be determined indirectly by measuring phosphorous, one of the products of the enzymatic reaction catalyzed by glutamine synthetase. In this reaction, L-glutamate, ATP and ammonium chloride were used as substrates, and phosphorous was formed in proportion to the concentration of ammonium chloride in the reaction mixture. Another procedure was examined in which glutamine synthetase reaction coupled with pyruvate kinase and lactate dehydrogenase reactions was used. One milliliter of the assay mixture contained; phosphoenol pyruvate, 3 mM; L-glutamate, 10 mM; ATP, 1 mM; $MgSO_4$, 20 mM; KCl, 75 mM; NADH, 0.2 mM; Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100 mM; pyruvate kinase, 10 U; lactate dehydrogenase, 12 U and glutamine synthetase, 4 U. After preincubation for 20 min at 30°C, NH_4Cl was added and the rates of NADH oxidation were followed at 340 nm. The effective range of this method was proved to be from 0.01 to 0.05 μ mole/ml. Glutamine synthetase reaction coupled with glutamate synthase reaction could also be effectively used for determining microquantities of ammonia. The one milliliter assay mixture contained; ATP, 5 mM; L-glutamate, 5 mM; L-ketoglutarate, 5 mM; $MgCl_2$, 15 mM; NADPH, 0.15 mM; Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100 mM; glutamine synthetase, 1 U and glutamate synthase, 0.5 U. After preincubation for 20 min at 30°C NH_4Cl was added and the rates of NADPH oxidation were followed at 340 nm. The effective range of this procedure was appeared to be from 0.01 to 0.05 μ mole/ml.

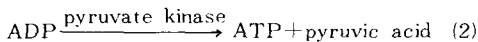
酵素的 分析은 효소가 갖는 基質特異性으로 인해 多成分系의 분석재료로부터 특정된 성분만을 定量가능하므로 生体成分의 분석에 널리 활용되고 있다^{1)~7)}. 효소의 基質特異性이란 효소분자와 기질분자와의 親和性으로서 Michaelis 定數(Km)의 형태로 근사적으로 나타내고 있다. 따라서 효소분석법에서 가장 중요한 制約因子는 그분석대상 성분에 대한

효소의 친화성이며 그 限度이하의 농도로 존재하는 성분은 분석이 불가능하다. 암모니아의 효소분석에 사용되어온 효소는 glutamate dehydrogenase 로서 그 出處에 따라 암모니아에 대한 Km 값이 각각 상이하나 牛肝 glutamate dehydrogenase의 경우 5.7×10^{-2} M 이고^{1) 8)} *Escherichia coli*와 *Salmollela typhimurium* 등 대부분의 새균 glutamate dehydro-

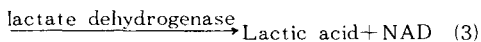
genase의 Km 값은 1mM 이상인 것으로 보고되고 있다⁹. 이와같은 기질에 대한 비교적 낮은 친화성으로 인해 본 효소에 의한 암모니아의 정량 범위는 0.1μmole/ml로 제한되고 있다¹⁰. 따라서 醫藥品의 純度檢定, 血清中の 微量암모니아의 정량을 위하여는 암모니아에 대해 보다 높은 친화성을 갖는 효소를 이용한 정량법이 요구된다. 암모니아를 기질로 하는 또다른 효소반응으로서는 glutamine synthetase(GS, L-glutamate; ammonia ligase, EC 6, 3, 1, 2)에 의한 다음과 같은 반응이 알려져 있다.



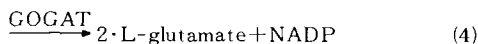
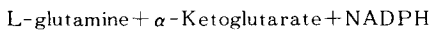
Glutamine synthetase는 微生物 및 動植物細胞에 널리 존재하며 암모니아에 대한 Km 값은 *E. coli* 에서 $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ ¹¹이고 *Lupinus angustifolias*의 경우 $4.0 \times 10^{-4} \text{M}$ ¹²로 glutamate dehydrogenase의 그것에 비해 현저히 낮아 보다 낮은 농도의 암모니아정량에 이용가능할 것으로 예측된다. Glutamine synthetase의 촉매반응(식 1)에서 암모니아량은 반응시 유리되는 무기인을 정량함으로써 측정할 수 있으며, Glutamine synthetase반응(식 1)에 pyruvate kinase(식 2) 및 lactate dehydrogenase(식 3)의 반응을 共役시켜 NADH의 산화에 의한 흡광도의 변 Phosphoenolpyruvate +



Pyruvic acid + NADH



화를 340nm에서 측정 보다 간편하게 정량할 수 있다. 한편 *Klebsiella aerogenes*를 비롯한 많은 세균이 低農度의 암모니아를 glutamine synthetase와 glutamate synthase(GOGAT, NADPH oxidizing, L-glutamine; 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2, 6, 1.53)의 共役系에 의해 동화하는 것으로 알려져 있다¹¹. 이 공역반응에 참여하는 glutamate synthase는 다음과 같은 반응을 촉매한다. 따라서 glu-



tamine synthetase-glutamate synthase 공역반응에 의하면 암모니아의량은 NADPH의 산화에 의한 340nm에서의 흡광도의 차로 정량이 가능하다. Glutamate synthase는 *E. coli*로부터 單離된 이후 각종 세균 및 식물세포에서 발견되어 分離精製되었으며^{11,12} 최근, 아미노산생산균인 *Brevibacterium flavum*(ATCC 14067)로부터 다량의 glutamine synthetase와 glutamate synthase의 분리 정제방법이

보고되었다¹³. *B. flavum*의 glutamine synthetase의 암모니아에 대한 Km 값은 $2.2 \times 10^{-4} \text{M}$ ¹³이며 glutamate synthase의 L-glutamine에 대한 Km 값은 $2.4 \times 10^{-4} \text{M}$ 로 보고되고 있다¹².

本 研究에서는 *B. flavum*의 glutamine synthetase 및 glutamate synthase를 사용 微量암모니아의 酵素의 分析法을 확립하고자 효소반응조건을 검토하였다.

재료 및 방법

효소반응

효소반응은 30℃에서 행하였으며 end-point測定法에 따라 분석하였다.

효소활성 측정

Glutamine synthetase: Wool folk와 Stadtman법의 變法¹³을 사용하였다. 이때의 효소반응계 조성은 50mM L-glutamate, 25mM NH₄Cl, 7.5mM ATP, 30mM MgCl₂, 100M Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 적당량의 酵素蛋白質을 가한다. 효소활성은 1분간에 1μmole의 glutamine을 생성하는 효소량을 1單位로 하였다. 비활성(specific activity)은 효소단백 mg당의 unit로 표시하였다.

Glutamate synthase: 효소반응시 NADPH의 산화속도를 340nm에서 吸光度의 減少로 측정하였다¹⁴ 이때 효소반응계의 조성은 3.5mM L-glutamine, 3.5mM α-ketoglutarate, 0.15mM NADPH, 100mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)과 적당량의 효소단백이며, 효소활성의 1單位는 1분간에 1μmole의 NADPH를 산화하는데 필요한 효소량으로 정하였다.

단백질의 정량

Egg albumin을 標準蛋白質으로 하여 Lowry法¹⁵에 따라 행하였다. 효소정제과정중의 단백질량은 280nm에서의 흡광도로 측정하였으며 정제된 효소의 단백질량은 280nm에서의 흡광도를 측정 후 다음의 계수로부터 환산하였다¹⁶.

$$E_{1\text{cm}, 280\text{nm}}^{1\%} = 8.19 \text{ (Glutamine synthetase)} \\ = 12.88 \text{ (Glutamate synthase)}$$

효소의 정제

本 실험에 사용된 glutamine synthetase와 glutamate synthase는 *Brevibacterium flavum*의 無細胞抽出液을 사용하여 成¹² 등의 방법에 따라 정제하였다.

무기인의 정량

효소반응액 0.5ml에 3N-H₂SO₄ 3ml, 2.5% ammonium molybdate 0.5ml을 가한 후, 10분간 상온에서 정치한 후, ANS 용액 0.2ml을 가하여 15분

간 실온에서 발색시킨 후 610nm에서 흡광도를 측정하고 KH_2PO_4 를 標準物質로 하여 작성한 標準檢線으로부터 산출하였다⁽¹³⁾.

전기영동

Disc gel 전기영동은 David등⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 pH 8.9에서 행하였다.

시약

Pyruvate kinase (토끼근육효소)와 lactate dehydrogenase (牛心臟효소)는 Sigma Chemical Co. 의 제품을 사용하였고, 그밖의 시약은 시판특급품을 사용하였다.

결과 및 고찰

효소표품의 조제

*B. flavum*의 無細胞抽出液을 사용하여 數 단계의 정제과정을 거쳐 암모니아가 混入되지 않은 glutamine synthetase와 glutamate synthase를 각각 單離精製하였다. Glutamine synthetase는 약 10%의 回收率로 490倍 정제되었다 (Table 1). Glutamate

Table 1. Purification of glutamine synthetase of *B. flavum*.

Purification procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg protein)
Cell-free extract	68,600	776,600	8.1
Ammonium phosphate	30,240	616,896	20.4
1st DEAE-cellulose	6,420	526,000	82
2nd DEAE-cellulose	386	349,000	904
(NH_4) ₂ SO ₄ (40-45%)	91	303,000	3,333
Sepharose 6B	29	116,000	3,990
Hydroxylapatite	20	79,600	3,980

Table 2. Purification of glutamate synthase of *B. flavum*.

Purification procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg protein)
Cell-free extract	68,600	28,800	0.42
Ammonium phosphate	30,240	18,144	0.60
DEAE-cellulose	1,780	6,894	4.10
Sepharose 6B	270	6,120	22.70
Hydroxylapatite	12	1,728	135.0
Sephadex G-200	11.5	1,670	145.0

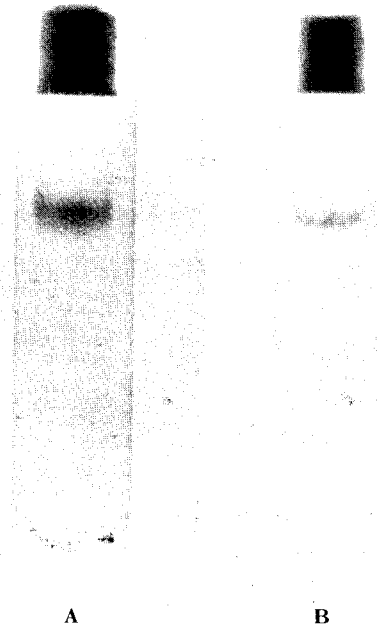


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of glutamine synthetase(A) and glutamate synthase(B).

50μg of protein was subjected respectively, on 7.5% polyacrylamide gel and the current was adjusted to an output of 2mA per gel tube.

synthase는, 약 6%의 回收率로 345倍 정제되었으며 (Table 2) 얻어진 효소표품들은 polyacrylamide gel 전기영동에 의한 순도검정에서 각각 單·蛋白質으로 나타났다 (Fig. 1). 이하의 실험에서 이들을 각각의 효소표품으로 사용하였다.

Glutamine synthetase에 의한 암모니아의 정량

Glutamine synthetase에 의한 암모니아 정량의 반응조건을 검토하기 위하여 일정량의 암모니아 존재 하에서 효소반응이 평형에 달하는데 소요되는 시간을 조사하였다. Glutamine synthetase의 반응계에 염화암모늄 농도가 0.3mM 되도록 첨가한 후 glutamine synthetase를 0.2U/ml 사용하여 반응액중에 생성되는 무기인의 양을 경시적으로 정량한 결과 반응개시후 10~15분에 반응은 평형에 달하였다 (Fig. 2). 한편, 完全反應系에서 염화암모늄을 제외한 반응에서도 小량의 무기인이 검출되었으나 완전반응계에서 glutamine synthetase를 제외한 반응계에서는 검출되지 않았다. 이러한 결과는 반응액중에 암모니아의 混入를 시사하는 것으로서 반응액중의 glutamate에서 유래하는 것으로 예측되므로 염화암모늄을 제외한 glutamine synthetase의 반응계에 glutamate의 농도를 달리하여 효소 반응을 시킨 결과 첨가 glutamate 량에 비례하여 반응액

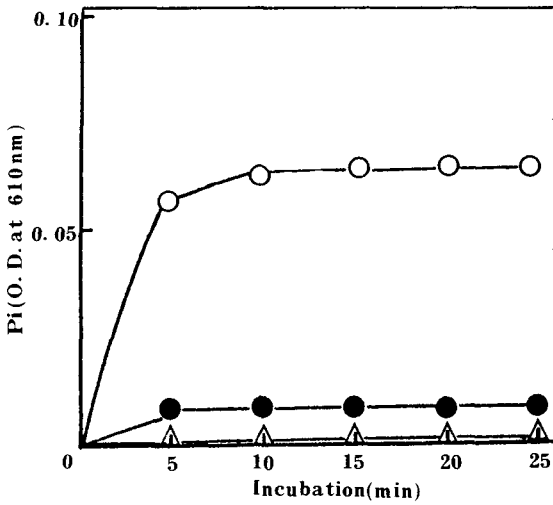


Fig. 2. Formation of phosphorous during the glutamine synthetase reaction.

The reaction mixture contained: mono sodium glutamate 10mM; ATP, 7.5mM; MgCl₂, 30mM; Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100mM; NH₄Cl, 0.3mM and glutamine synthetase, 0.2 unit/ml.
 Symbols; —○—, complete mixture
 —●—, complete-NH₄Cl
 —△—, complete-Glutamine synthetase

중의 무기인량이 검출되었다 (data 생략). 염화암모니움의 농도를 각기 달리하는 glutamine synthetase의 반응계에서 30분간 효소반응을 시킨 후 이때 반응액중의 생성된 무기인량을 측정하였다. 반응액중의 무기인산은 표준물질로 첨가한 염화암모니움 량이 증가함에 따라 비례하여 증가함으로써 암모니아 농도 0.01~0.10mM의 범위에서 직선의 표준곡선을 얻을 수 있었다 (Fig. 3).

Glutamine synthetase와 pyruvate kinase 및 lactate dehydrogenase 共役系에 의한 암모니아 정량

Glutamine synthetase에 의한 암모니아정량의 또 다른 방법으로 glutamine synthetase반응에 pyruvate kinase와 lactate dehydrogenase의 반응을 組合하여 NADH 산화에 따른 흡광도 감소를 340nm에서 측정하는 방법을 들 수 있다. Glutamine synthetase-pyruvate kinase-lactate dehydrogenase 共役系에 의한 암모니아정량을 검토하기 위하여 먼저 각 효소의 副反應에 의한 NADH 酸化能을 조사하였다. 이들 효소중 glutamine synthetase가 NADH 산화반응을 나타냈으나 100mM imidazole buffer (pH 8.0) 중 에서 50℃, 10분간 열처리함으로써 제거되었다 (data 생략). 이 共役系에 의하면 시약중에 混入된 암모니아를 예비반응시키므로써 제거할 수 있다. 이 共

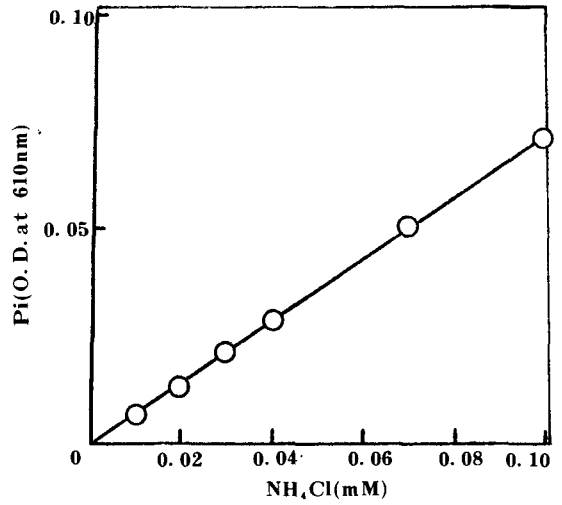


Fig. 3. Determination of ammonia by glutamine synthetase.

The complete reaction mixture contained: mono-sodium glutamate, 10mM; ATP, 7.5mM; MgCl₂, 30 mM; Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100mM; glutamine synthetase 0.2 unit/ml; and NH₄Cl as indicated. The enzyme reaction was carried out at 30℃ for 30 min.

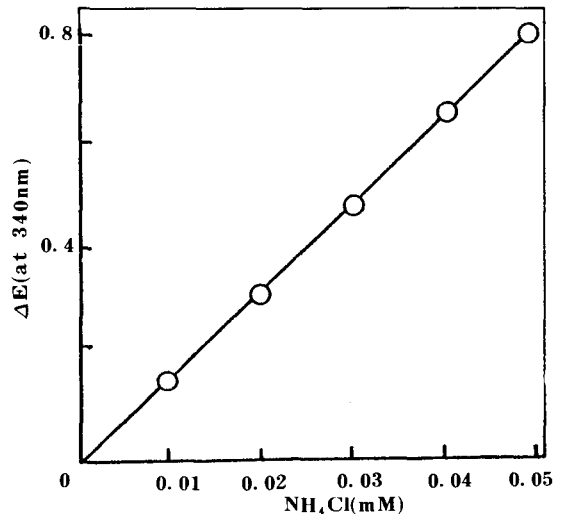


Fig. 4. Determination of ammonia by the glutamine synthetase-pyruvate kinase-lactate dehydrogenase system.

The reaction mixture contained: phosphoenolpyruvate, 3mM; mono sodium glutamate, 10mM; ATP, 1 mM; MgSO₄, 20mM; KCl, 75mM; NADH, 0.2 mM; Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100mM; pyruvate kinase, 10unit/ml; lactate dehydrogenase, 12unit/ml and glutamine synthetase, 4unit/ml. After the preincubation at 30℃ for 20min, ammonium chloride was added. The enzyme reaction was carried out at 30℃ for 30min.

역反系 (Fig. 4) 에서 염화암모늄을 제외한 후 glutamate 의 첨가농도를 달리하여 30℃에서 NADH 의 산화반응을 검토한 결과 10mM 의 농도의 경우 20분 이내에 반응이 정지하였다. 이 반응액에 염화암모늄농도를 0.1mM 되도록 첨가한 후 30℃에서 효소반응이 평형에 달하는 시간을 조사한 결과 15분내에 평형에 달하였다. 이상의 반응조건 검토결과에 의해 설정한 반응계를 사용 암모니아 농도에 따른 340nm에서의 흡광도차를 측정하여 암모니아 농도 0.01~0.05mM의 범위에서 직선관계를 얻었다.

Glutamine synthetase와 glutamate synthase 共役系에 의한 암모니아정량

본 효소반응계에 사용된 glutamine synthetase 와 glutamate synthase의 NADPH에 대한 酸化能을 검토하였다. 이들중 glutamate synthase가 NADPH酸化能을 나타냈다. 효소의 첨가량을 달리하여 340nm에서의 NADPH의 酸化速度를 검토한 결과 0.5 U/ml 첨가시 30℃, 20분간의 반응에서 평형에 달하였다. 이어서 glutamine synthetase 1.0U/ml 와 0.5U/ml의 glutamate synthase를 포함하는 반응계에 0.1mM의 염화암모늄을 첨가시 반응 종료에 소요되는 시간을 조사한 결과 30분내에 평형에 달하였다. 이상의 반응조건검토에서 선정된 glutamine

synthetase-glutamate synthase 共役系에서 염화암모늄을 제외한 반응액을 30℃에서 20분간 예비 반응시킨후 각 암모니아 농도에 대해 30℃에서 30분간 반응시켜 340nm에서의 흡광도차를 측정한 결과 0.01~0.05mM의 범위에서 직선관계를 얻었다 (Fig. 5).

요 약

단백질, 아미노산등 각종 질소화합물의 共存下에서 10⁻⁵M (0.01μmole/ml)의 微量암모니아 정량이 가능한 酵素의 分析法에 관하여 검토하였다. Glutamine synthetase의 L-glutamine 합성 반응에서 생성되는 無機磷정량법에 의하면 암모니아정량 범위는 0.01~0.10mM이었다. Glutamine synthetase 와 pyruvate kinase 및 lactate dehydrogenase 의 共役系를 이용하여 340nm에서의 NADH산화에 의한 흡광도감소에 의하여 암모니아를 정량하였다. 이 방법의 정량범위는 0.01~0.05mM이었으며 반응계의 조성은 phosphoenol pyruvate, 3mM; L-glutamate, 10mM; ATP, 1mM; MgSO₄, 20mM; KCl, 75mM; NADH, 0.2mM; Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100mM; pyruvate kinase, 10U/ml; lactate dehydrogenase, 12U/ml과 glutamine synthetase, 4U/ml이었다. 효소반응은 30℃에서 20분간 예비반응후 각 농도의 염화암모늄을 가한후 30℃에서 30분간 반응시켰다.

Glutamine synthetase와 glutamate synthase의 共役系를 사용한 암모니아정량법의 암모니아정량 범위는 0.01~0.05mM이었으며 반응계의 조성은 ATP, 5mM; L-glutamate, 5mM; α-ketoglutarate, 5mM; MgCl₂, 1.5mM; NADPH, 0.15mM; Tris-HCl buffer (pH 7.0) 100mM; glutamine synthetase, 1U/ml과 glutamate synthase, 0.5U/ml이었다. 효소반응은 30℃에서 20분간 예비반응시킨 후 각 농도의 염화암모늄을 가하여 30℃에서 30분간 반응시켰다.

참고문헌

1. Hoffmann, E. and Schmidt, W.: *Biochem. Z.* **324**, 125 (1953).
2. Hoffmann, E.: *Methods of Enzymatic Analysis*, p. 93. Academic Press, New York, (1955).
3. Meister, A.: *Methods in Enzymology* (S.P. Colowick and N.O. Kaplan. ed.), Vol. II, p. 380. Academic Press, New York, (1955).
4. Tower, D.B.: *Methods in Enzymology* (C.H.W. Hirs, ed.) Vol. XI, p. 88. Academic Press, New York, (1967).

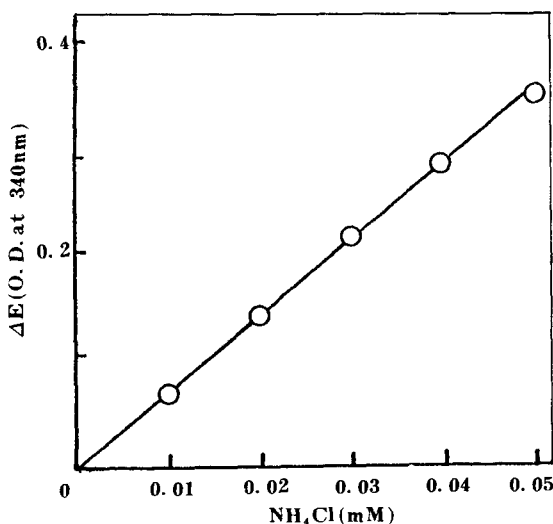


Fig. 5. Determination of ammonia by the glutamine synthetase-glutamate synthase system.

The reaction mixture contained: ATP, 5mM; mono sodium glutamate, 5mM; α-ketoglutarate, 5mM; MgCl₂, 15mM; NADPH, 0.15mM; Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100mM; glutamine synthetase, 1.0unit/ml and glutamate synthase, 0.5unit/ml. After the preincubation at 30℃ for 20min, ammonium chloride was added. The enzyme reaction was carried out at 30℃ for 30min.

5. Russel, J.A.: *J. Biol. Chem.*, **156**, 457 (1944).
6. Hoffmann, E.: *Methods of Enzymatic Analysis* (H.U. Bergmeyer, ed.), p. 915, Academic Press, New York, (1963).
7. Summer, J.B.: *Methods in Enzymology* (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, ed.), Vol. II, p. 378. Academic Press, New York, (1955).
8. Strecher, H.J.: *Methods in Enzymology* (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, ed.), Vol. II, p. 220. Academic Press, New York, (1955).
9. Tyler, B.: *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 1127 (1978).
10. Mondzac, A.: *J. Lab. Clin. Med.*, **66**, 526 (1965).
11. B.J. Mifflin, P.J. Lea and P.M. Wallsgrove: *Glutamine Metabolism, Enzymology, and Regulation*, (J. Mora and R. Palacios ed.) p. 213, Academic Press, New York, (1980).
12. H.C. Sung, T. Tachiki, H. Kumagai and T. Tochikura: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 4 (1984).
13. T. Tachiki, S. Wakisaka, H. Kumagai and T. Tochikura: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1487 (1982).
14. H.C. Sung, T. Tachiki, H. Kumagai and T. Tochikura: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 371 (1984).
15. O.H. Lowry, N.T. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193** 265 (1951).
16. H.C Sung, T. Tachiki, H. Kumagai and T. Tochikura: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 6 (1984).
17. B.J. Davis: *Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.*, **121**, 404 (1964).