

고속액체크로마토그래피를 이용한 유당분해효소의 활성도 측정

신명곤[†] · 장판식* · 민봉기 · 김선창**

한국식품개발연구원 쌀이용연구센터

*서울산업대학교 식품공학과

**경남대학교 식품공학과

(1992. 8. 14 접수)

Assay of β -Galactosidase Using High Performance Liquid Chromatography

Myung Gon Shin[†], Pahn Shick Chang*, Bong Kee Min and Sun Chang Kim**

Rice Utilization Research Center, Korea Food Research Institute, San 46-1,

Baekhyun-Dong, Bundang-Ku, Songnam, 463-420, Korea

*Department of Food Science and Technology, Seoul National Polytechnic

University, 172 Kongneung-Dong, Nowon-Ku, Seoul, 139-743, Korea

**Department of Food Science and Technology, Kyungnam University, Masan, 631-701, Korea

(Received Aug. 14, 1992)

요 약. 유당분해효소의 활성도를 정량하기 위하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하는 방법을 확립하였다. Aminex HPX-87C 컬럼 및 RI 검출기를 사용하여 유당, 글루코스 및 갈락토스를 12 분 이내에 정량적으로 분석할 수 있었다. 컬럼 온도는 85°C로 고정하였으며 이동상으로는 탈이온화된 증류수를 사용하였다. ONPG(ortho-nitrophenol- β -D-galactopyranoside)를 이용하는 발색법의 결과와 비교하여, 고속액체크로마토그래피에 의한 유당분해효소 활성도 측정법의 타당성을 고찰하였으며, 그 결과 ONPG 방법과 고속액체크로마토그래피 방법에 의한 효소활성도 측정의 실험결과에는 큰 차이가 없었으며, 고속액체크로마토그래피를 사용하는 경우에는 420 nm에 대한 방해작용이 있는 기질에서도 유당분해효소의 활성도를 측정할 수 있는 장점을 가짐을 확인하였다.

ABSTRACT. An analytical procedure is presented for the quantitative determination of lactose, glucose, and galactose in the hydrolyzate of lactose by β -galactosidase with high-performance liquid chromatography. An Aminex HPX-87C column at 85°C and refractive index detector were used to resolve lactose, glucose, and galactose in only 12 minutes with distilled and deionized water as a mobile phase. The validity of high-performance liquid chromatography as a method for the assay of β -galactosidase was supported by recovery experiments and comparison of results with those by ONPG method, a spectrophotometric assay. The procedure was appropriate for determination of sugars in the enzyme reaction mixture and could be applied to analysis of β -galactosidase activity.

Key Words : β -Galactosidase, HPLC, ONPG, quantitative determination

1. 서 론

고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 당을 분석하는 연구는 수십년 동안 계속되어 왔다. 따라서 이에 관한 논문도 많이 보고되었는바, Macrae 등은 당 분석에 대한 총설을 다수 발표하기도 하였는데^{1,2}, 특히 유당 및 이의 가수분해 산물을 측정하는 방법에 대해서 중점적으로 보고하였다. 물론 유당, 글루코스 및 갈락토스 등의 분석법으로는 분광학적 방법³, 화학적 방법⁴, 시약에 의한 발색법^{5,6}, 효소적 발색법^{7,8} 및 고전적인 크로마토그래피에 의한 방법⁹ 등이 이미 보고되어 있다. 이러한 방법들은 시간이 많이 소요되거나, 예민성이 떨어지며, 혹은 정성적인 분석에 더 가까운 성격을 띠고 있는 실정이었다. 따라서 최근에는 짧은 분석시간, 높은 감도(sensitivity) 및 특이적 반응에 의한 정량성 등의 장점을 지니고 있는 HPLC에 의한 정량분석방법을 사용하여 상기한 당의 성분들을 분석하는 경향이 대부분이다. 예를 들면, 우유¹⁰⁻¹², 버터¹¹, 요구르트^{10,11}, 아이스크림¹² 및 치즈¹¹ 내의 당분석을 수행할 경우, 대부분 HPLC에 의한 분석법을 사용하고 있다.

한편, 이렇게 많은 연구들이 수행되었지만, 이때의 HPLC에 의한 당분석 결과를 이용하여 유당분해효소의 초기반응속도를 측정함으로써, 유당분해효소의 효소활성도 정의와 정량적인 관계를 지어 수행한 연구는 전무한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 이러한 HPLC 기술을 이용하여 유당분해효소의 활성도를 정의하고, 기존의 유당분해효소 활성도 측정법으로서 널리 사용되고 있는 ONPG (ortho-nitrophenol- β -D-galactopyranoside)방법과 비교하여 ONPG 방법의 결점을 보완할 수 있는 유당분해효소 활성도 측정 방법의 확립을 위한 전단계로 보문을 작성하였다.

2. 실험

2.1. 재 료

유당분해효소는 상업적으로 유용한 효소인 Maxilact LX 5000을 GIST-BROCADES사 (Wateringseweg 1, the Netherlands)로부터 구입하여 사용하였으며, 이 효소의 활성도는 350 units/mL of solution (효소 활성도의 정의는 “2.3 유당분해효소의 활성도 측정”에 명시

하였음) 이었다.

효소반응에 사용한 기질은 0.1%(w/v) 유당 용액 및 5 mM ortho-nitrophenol- β -D-galactopyranoside(ONPG)였으며, 이때의 유당 및 ONPG는 SIGMA사(St. Louis, MO 63178, U. S. A.)로부터 구입하여 사용하였다.

효소반응에 적절한 pH를 유지하기 위하여 100mM-potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 완충용액으로 사용하였으며, 효소반응을 중지시키기 위하여는 50 mM-Na₂CO₃ 용액을 조제하여 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

Ortho-nitrophenol (ONP), 글루코스 및 갈락토스는 SIGMA사의 표준품을 사용하였으며, 당의 정량분석을 위한 분리용 HPLC column인 Aminex HPX-87C는 BIO-RAD사 (Richmond, CA 94804, U. S. A.) 제품이였다.

HPLC는 U6K Injector, Differential Refractometer Index Detector 및 Waters 501 Solvent Delivery System이 부착된 WATERS사 (Milford, MA 01757, U. S. A.) 제품을, UV spectrophotometer는 JASCO사(Tokyo, Japan) 제품인 UVIDEC-610을 각각 사용하였다.

2.3. 유당분해효소의 활성도 측정

2.3.1. ONP 발색에 의한 효소활성도 측정

Lederberg¹³의 방법에 따라 ONPG를 기질로 사용하여 측정하였다. 100 mM-potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 5 mM이 되도록 용해한 기질 용액 2 mL를 37°C에서 이온화 및 15분간 예열시킨 후, 10 배 희석한 효소액 0.5 mL를 가하여 37°C에서 효소반응을 시작하였다. 일정 시간 효소반응을 일으킨 후 냉각된 50 mM-Na₂CO₃ 용액 2.5 mL를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 발색된 황색의 흡광도를 420 nm에서 측정하였으며, 효소의 활성도는 ONP 표준곡선으로부터 정량적으로 환산하였다. 이때 대조구는 100°C에서 5분간 가열한 효소용액을 사용하여 효소반응을 일으킨 다음 발색시켜 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

효소활성의 단위인 유당분해효소 1unit는 상기한 반응 조건하에서 1분 동안에 1 μ moie의 ONPG를 분해하여 1 μ mole의 ONP를 유리시키는 능력을 갖는 효소량으로 정의하였다.

2.3.2. HPLC에 의한 효소활성도 측정

100 mM-potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 유

당을 0.1%(w/v) 되도록 용해한 기질 용액 2 mL를 37°C에서 이온화 및 15 분간 예열시킨 후, 100 배 희석한 효소액 0.5 mL를 가하여 37°C에서 효소반응을 시작하였다. 일정 시간 효소반응을 일으킨 후 냉각된 50 mM-Na₂CO₃ 용액 2.5 mL를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 효소반응액 10 μL를 직접 취하여 Table 1에 나타난 HPLC 운전조건하에서 반응산물로 얻어지는 글루코스, 갈락토스 및 분해되지 않은 유당을 정량적으로 분석하여 유당분해효소의 활성도를 환산하였으며, 효소활성도 1 unit는 온도 37°C와 pH 7.0의 실험 조건하에서 1 분 동안에 1 μmole의 유당을 분해하여 1 μmole의 글루코스와 1 μmole의 갈락토스를 생산하는 효소량으로 정의하였다.

Table 1. HPLC conditions for the analysis of glucose, galactose, and lactose

Materials	Conditions
Column	Aminex HPX-87C
Detector	RI, X16
Eluent	Distilled and deionized water
Flow rate	0.6 mL/min
Sample solvent	Distilled and deionized water
Temperature	85°C

3. 결과 및 고찰

3.1. ONP 발색에 의한 효소활성도 측정

곽¹⁴, 강¹⁵ 등이 사용한, 최근까지 널리 사용되고 있는 Lederberg의 방법에 의하여 유당분해효소의 활성도를 측정하기 위하여 먼저 효소반응의 산물로 형성되는 ONP의 표준곡선을 완성한 바 Figure 1의 결과를 얻었으며, 이때의 표준곡선은 Δ Absorbance at 420 nm = $0.0470 + 0.028 \times [ONP]$ 로 산출되었다. 이러한 표준곡선식을 이용하여 효소반응을 정량적으로 분석할 수 있었으며 이 결과를 근거로 하여 유당분해효소반응의 정량적인 분석이 가능하였다. 또한, 유당분해효소의 농도변화에 따른 효소반응의 경시적인 변화를 나타낸 Figure 2의 결과를 토대로 하여서는 효소활성도 측정의 적정조건을 확립할 수 있었는 바, 반응온도 37°C, pH 7.0 및 효소반응의 기질로 사용된 ONPG의 농도가 5

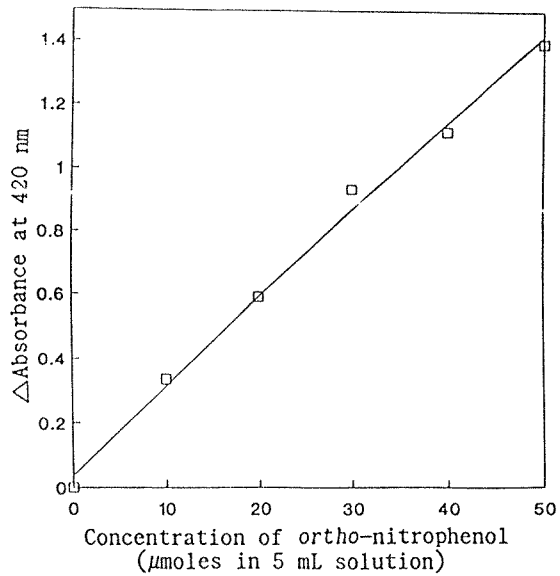


Figure 1. Standard curve of ortho-nitrophenol.

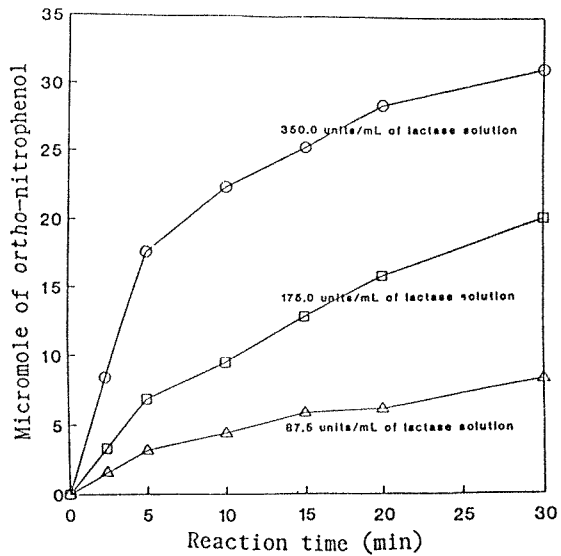


Figure 2. Ortho-nitrophenol increase as a function of reaction time at different β -galactosidase concentration.

nM인 경우, 효소반응의 초기시간을 5 분으로 결정할 수 있는 최대의 효소 농도는 350 units/mL of solution 이었다.

이러한 결과, 본 연구에서 사용한 유당분해효소는 350 units/mL of solution의 활성도를 가지는 것으로 판명되었으며 후술할 HPLC 방법에 의한 효소활성도 측정 방법의 합리성 판단의 자료로 사용하였다.

3.2. HPLC에 의한 효소활성도 측정

Table 1에 나타난 조건하에서 HPLC를 수행하여 Figure 3의 결과를 얻었는 바, 유당, 갈락토스 및 글루코스 등의 peak를 분리 및 정량분석을 행할 수 있었으며, 이러한 결과를 이용하여 각각의 성분에 대한 표준곡선을 얻을 수 있었다.

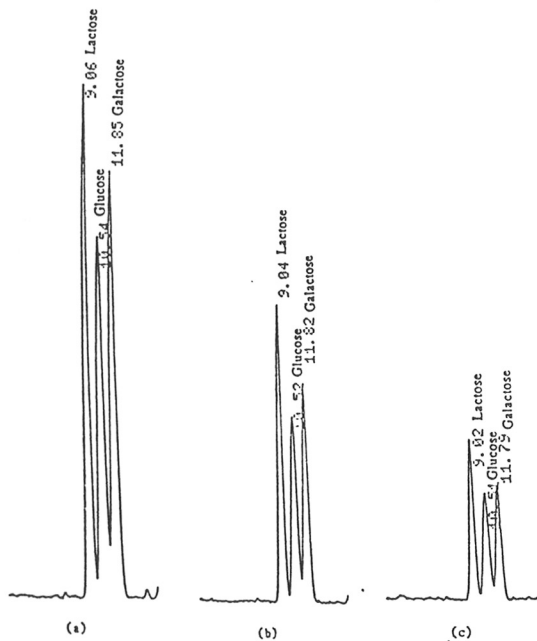


Figure 3. HPLC chromatogram of glucose, galactose, and lactose. (a) 0.1% (w/v) in 10 μ L of distilled and deionized water, (b) 0.05% (w/v) in 10 μ L of distilled and deionized water, (c) 0.025% (w/v) in 10 μ L of distilled and deionized water.

각 성분들에 대한 표준곡선을 산출한 결과,

$$(i) (\text{peak area of lactose}) = 11089 + 6994857 \times ([\text{lactose}], \mu\text{moles} / 10 \mu\text{L of DDW})$$

$$(ii) (\text{peak area of glucose}) = 5114 + 7358581 \times ([\text{glucose}], \mu\text{moles} / 10 \mu\text{L of DDW})$$

$$(iii) (\text{peak area of galactose}) = 22633 + 7211968 \times ([\text{galactose}], \mu\text{moles} / 10 \mu\text{L of DDW})$$

의 관계식을 각각 얻을 수 있었으며, 이러한 표준곡선식을 이용하여 유당분해효소의 효소반응에 대한 경시적인 변칙을 정량적으로 분석할 수 있었는 바, “2.3.2. HPLC에 의한 효소활성도의 측정”에 의거한 실험조건하에서 효소반응을 수행하여 Figure 4의 결과를 얻을 수 있었다.

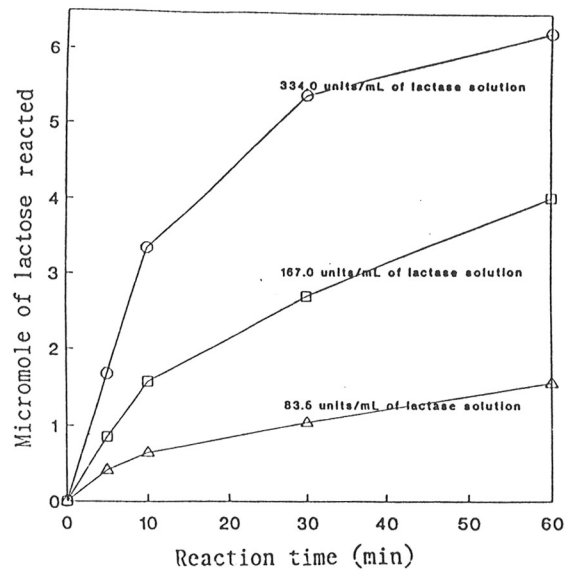


Figure 4. Lactose decrease as a function of reaction time at different β -galactosidase concentration.

이상의 결과에 근거하여 유당분해효소의 효소활성도 측정을 위한 적정조건을 확립하여 본 연구에 사용된 유당분해효소의 활성도를 측정된 결과, 반응온도 37°C, pH 7.0 및 효소반응의 기질로 사용된 유당의 농도가 0.1% (w/v) 인 경우, 유당분해효소는 334 units/mL of solution의 활성도를 가지는 것으로 판명되었으며, 이러한 결과는 전술한 바 있는 ONP 발색법에 의하여 결정된 효소활성도와 유사함을 알 수 있다. 따라서 HPLC 기술에 의하여 유당분해효소의 활성도를 정량적으로 분석할 수 있음을 확인하였다.

한편, ONP 발색에 의한 효소활성도 측정시의 효소 농도는 원액을 10배 희석시킨 용액을 사용한 반면,

HPLC 기술에 의하여 효소활성도를 정할 경우에는 효소농도를 원액의 100 배로 희석하여 사용하였다. 즉, 효소활성도 분석의 예민성(sensitivity) 측면에서 고려해 볼 때, HPLC 기술에 의한 정량분석법이 ONP 발색에 의한 경우보다 매우 우수함을 알 수 있다.

또한, ONP 발색법에 의하여 유당분해효소의 활성을 측정할 경우, 효소반응액의 색깔에 의하여 420 nm에서 방해작용이 있는 경우에는 효소활성도 분석시 오차를 발생시킬 수 있는 단점이 있다. 그러나 HPLC에 의한 방법을 사용할 경우에는, 효소반응액의 색깔에는 관계없이 반응액내에 존재하는 유당, 글루코스 및 갈락토스를 직접 정량, 분석하기 때문에 색깔 방해작용에 의한 오차를 발생시키지 않는 장점도 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 HPLC를 이용하여 유당분해효소의 활성도를 정량적으로 분석할 수 있는 방법을 개발하였다.

HPLC 기술을 사용하여 유당분해효소의 활성도를 측정할 수 있었으며 이러한 결과를 기초로 하여 유당분해효소에 대한 효소반응의 정량적인 분석이 가능하였다.

유당분해효소의 활성화 측정을 위하여 가장 널리 사용되고 있는 기존의 ONP 발색법과 비교한 결과, 약 10 배 가량의 예민성(sensitivity)을 가지면서, 효소반응액의 색깔에는 관계없이 반응액내에 존재하는 유당, 글루코스 및 갈락토스를 직접 정량, 분석하기 때문에 색깔 방해작용에 의한 오차를 발생시키지 않는 장점도 있어 유당분해효소의 활성화 측정에 매우 유용할 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. R. Macrae, *J. Food Technol.*, **15**, 93(1980).
2. T. N. Tweeten and C. B. Euston, *Food Technol.*, **34**, 29(1980).
3. H. H. Nijpels, P. H. Evens, g. Novak, and J. P. Ramet, *J. Food Sci.*, **45**, 1684(1980).
4. Association of Official Analytical Chemists, "Official Methods of Analysis" 12th Ed., AOAC, Washington, U. S. A. (1975).
5. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350(1956).
6. I. J. Jeon and R. Bassette, *J. Food Prot.*, **45**, 14(1982).
7. F. S. Cheng and G. D. Christian, *Analyst*, **102**, 124(1977).
8. J. Huntington, *Food Prod. Dev.*, **12**, 78(1978).
9. G. R. Noggle, W. Pigman, "The Carbohydrates: Chemistry, Biochemistry, and Physiology" 1st Ed., p. 602, Academic Press Inc., New York, U. S. A. (1957).
10. J. R. Euber and J. R. Brunner, *J. Dairy Sci.*, **62**, 685(1979).
11. M. L. Richmond, D. L. Barfuss, B. R. Harte, J. I. Gray, and C. M. Stine, *J. Dairy Sci.*, **65**, 1394(1982).
12. J. J. Warthesen and P. L. Kramer, *J. Food Sci.*, **44**, 626(1979).
13. T. Lederberg, *J. Bacteriol.*, **60**, 318(1950).
14. H. S. Kwak, *Kor. Dairy Technol.*, **7**, 69(1990).
15. K. H. Kang, H. K. Min, H. K. Yi, and Y. H. Jang, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 456(1991).