

## Biotin 정량분석을 위한 효소-단백질결합 분석법(EPBA)의 개발

이경애 · 손동화 · 고영태\*

한국식품개발연구원, \*덕성여자대학교 식품영양학과

### Development of Enzyme-Protein Binding Assay for Rapid and Sensitive Analysis of Biotin

Kyung-Ae Lee, Dong-Hwa Shon and Young-Tae Ko\*

Korea Food Research Institute

\*Department of Food and Nutrition, Duksung Women's University

#### Abstract

Conditions for enzyme-protein binding assay (EPBA) were established in order to detect biotin more rapidly and reproducibly than traditional microbiological assay (MBA). EPBA with streptavidin and biotin-KLH conjugate showed cross-reactivities on biocytin, a derivative with biotin activity, at the rate of 109% ( $IC_{50}=0.3$  ppb) and 197% ( $IC_{50}=0.8$  ppb), respectively, but not on other derivatives with no biotin activities, such as desthiobiotin, diaminobiotin and 2-iminobiotin. Detection ranges of biotin by EPBA with streptavidin and biotin-KLH conjugates were 0.01~30 ng/mL and 0.01~1.0 ng/mL(ppb), respectively. In the spike test with milk, fruit flake and pine-carrot juice, the correlation coefficient between MBA and EPBA with biotin-KLH conjugates was  $r=0.994$ . But MBA showed cross-reactivities both on biocytin and desthiobiotin at the rate of 80.1% and 66.7%, respectively. Detection range of biotin by MBA was 0.1~0.5 ng/mL(ppb). These results strongly suggest that EPBA is efficient for biotin detection in sensitivity, detection range, cross-reactivity and time consuming.

Key words: biotin, enzyme protein binding assay, microbiological assay

## 서 론

1926년 Boas에 의하여 처음으로 발견된 biotin (vitamin H)은 여러가지 탄산고정화 반응(carboxylation)에 관여하는 조효소(coenzyme)로서, 생체내의 각종 대사계를 조절하며 성호르몬의 생산, 골(骨)의 성숙, 그리고 항체생산 등에도 관여하고 있다.

Biotin은 인체의 장내세균에 의하여 필요량이 합성되고 대부분의 식품에 미량으로 존재하기 때문에 부족되지는 않는 것으로 알려져 있으나 설파제 등의 항생제를 복용할 경우에는 장내세균의 생육이 저해되므로 여러 가지 결핍증상이 나타난다. 피로감과, 안면창백증, 피부염, 근육마비 등이 주요 결핍증상이며 여러 가지 선천성 질환(inborn error)과 영유아의 돌연사(infant sudden death) 등도 biotin의 결핍이 원인이 될

수 있는 것으로 보고되고 있다. 그러므로 미국의 경우에는, 성인에 있어서 biotin의 1일 섭취 요구량을 100~200  $\mu\text{g}$ 으로 규정하고 있다<sup>(1)</sup>.

Biotin ( $C_{10}H_{16}N_2O_6S$ , hexa-hydro-2-oxo-1H-thienol [3, 4-d]-imidazole-4-pentanoic acid)은 분자량이 224.3인 저분자의 물질로 요소와 비슷한 구조의 imidazol 환과 유황(S)을 가지고 있는 thiophene 유사 화합물이 결합한 것이다. 한편 여러 종류의 biotin 유사 화합물들이 미생물에 의해 생산되거나 화학적으로 합성되는데 그 중 Biocytin은 biotin의 측쇄에 펩타이드(lysine 부)를 갖고 있는 결합형으로서 미생물과 동물체내에서 biotin으로 전환되어 동일한 효과를 나타낸다. Biotin 분자 내의 유황 대신에 산소나 탄소원자가 치환된 desthiobiotin(또는 oxybiotin)은 미생물 특히 유산균에 있어서 biotin과 동일한 효과를 보이는 것으로 알려져 있다<sup>(2,3)</sup>.

Biotin은 식품이나 조직 중에서 단백질과 결합되어 있기 때문에 분석하기가 쉽지 않으므로 대부분의 식품에 있어서 biotin의 함량에 대한 정확한 정보가 적고

Corresponding author: Kyung-Ae Lee, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Kyunggi-do 463-420, Korea

식품 성분표에도 항목이 나타나 있지 않다<sup>(46)</sup>. 따라서 영양학적인 측면이나 임상적인 연구 등이 미흡한 실정이며, 최근에 영양학적 표시이나 정확한 성분 분석표의 필요성이 증대되면서 신속하고 정확하며 재현성 있는 biotin의 분석방법이 요구되고 있다.

Biotin의 분석법으로는 HPLC에 의한 기기분석과 방사성 동위원소를 이용한 방사성면역분석법(radioimmunoassay; RIA), *Lactobacillus plantarum*을 이용한 미생물 분석법(microbiological assay; MBA) 등이 있으며 biotin 결합단백질인 avidin을 이용한 EPBA의 개발도 시도되었으나 검출감도와 분석시간, 안전성 등의 문제가 있어 실제로 식품시료에 적용하지는 못하고 있다. 따라서 본 연구에서는 국내에서는 처음으로 biotin 정량분석을 위한 효소-단백질결합 분석법을 개발함으로써, 현재까지 미생물 분석법에 의존하고 있는 식품시료의 biotin 분석이 훨씬 신속하고 정확하며 간편하게 실용화 될 수 있도록 그 기초를 마련하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

Biotin과 biocytin, desthiobiotin, 2-imminobiotin 등의 biotin 유사 비타민 및 bovine serum albumin(BSA), NHS-LC-biotin과 HABA (4-hydroxybenzene-2-carboxylise), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolidine-sulfonicacid) (ABTS) 등은 Sigma 사(미국)의 제품을 사용하였고, key-hole limpet hemocyanin (KLH), biotin-HRP와 streptavidin-HRP, 단백질 정량용 micro BCA kit (#23235), 5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride(TMB)는 Pierce 사(미국)로부터 구입하였으며 기타의 시약은 GR 급 이상의 것을 사용하였다. 미생물 분석에 사용한 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014는 한국식품개발연구원으로부터 분양 받았고 *Lactobacilli* broth와 biotin assay media는 Difco 사(미국)에서 구입하였다.

### 기구 및 기기

Microtiter plate는 Nunc 사(미국)의 Maxisorp (#446612)을 사용하였으며, microplate reader는 Molecular Devices 사(미국)의 THERMO-max™을 이용하였다. 흡광도의 측정에는 Jasco V-500 UV-Vis spectrophotometer를 이용하였다.

### Biotin-KLH conjugate 제조

EPBA의 항원으로 사용한 Biotin과 KLH conjugate는 biotin과 단백질과의 비특이적인 결합을 최소화하기 위

하여 NHS-LC-biotin을 사용하여 Bayer와 Wilcheck<sup>(7)</sup> 및 Gretch 등의<sup>(8)</sup> 방법을 참조로 하여 다음과 같이 제조하였다. KLH 10 mg을 10 mL의 증류수에 녹인 후 sodium bicarbonate buffer (50 mM, pH 8.5)에 대하여 3회 투석하고, NHS-LC-biotin 4 mg을 1 mL의 동일한 buffer에 녹여 KLH 용액과 함께 넣은 후 ice bath (또는 얼음물, 0~4°C)에서 2시간 반응시켰다. 반응하지 않은 biotin을 제거하기 위해 0.01 M phosphate buffered saline (PBS; 1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl, pH 7.2)으로 3회 투석하였으며 biotin-KLH conjugate의 단백질 농도는 BCA kit를 이용하여 측정하였다. KLH 1 분자당 결합된 biotin 분자의 비율(ratio)은 HABA 방법에 의하여 구하였다<sup>(9)</sup>. 즉, biotinylated protein (biotin-KLH) 100 µL를 56°C에서 10분간 반응시킨 후, pronase를 1%가 되도록 가하고 하루밤 반응시켜 biotinylated protein에 대한 HABA 색소의 비특이적 결합을 방지하였다.

### 효소-단백질결합 분석법 (EPBA)

Coating buffer (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 농도별로 용해시킨 biotin-KLH와 streptavidin 100 µL를 각각 microplate well에 채우고 4°C에서 하루밤 또는 37°C에서 3시간 방치하여 coating 한 후, washing buffer (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 150 µL로 3회 세척하였다. 여기에 농도별로 희석한 biotin-효소 접합체 (biotin-HRP, streptavidin-HRP)와 희석한 시료(유리 biotin)를 각각 50 µL 씩 1:1로 혼합한 액을 만들어 100 µL 씩 well에 넣고 상온에서 한시간 동안 결합반응을 시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 기질용액 (0.01% TMB, 0.05 M phosphate citrate buffer, pH 5.0, 0.1% hydrogen peroxide : 사용직전에 첨가) 100 µL를 넣어 상온에서 30분간 방치하여 발색시킨 후 반응 정지액 (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 100 µL를 첨가하고 microplate reader를 이용하여 파장 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 각 시료당 3개씩의 well을 사용하여 얻은 흡광도의 평균값을 구하였으며, 각 시료의 biotin 함량은 시료분석 때마다 동시에 작성하는 biotin 표준곡선으로부터 구하여 산출하였다. Biotin 표준곡선은 biotin의 농도를 0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 10, 30, 100, 300, 1000 ppb가 되게 washing buffer로 희석하여 Fig. 1과 같이 EPBA를 실시하여 작성하였다.

### 미생물 분석법 (MBA)

*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014를 이용한 AOAC 법에 의하여 biotin을 분석하였다<sup>(10)</sup>. Biotin 표준곡선의

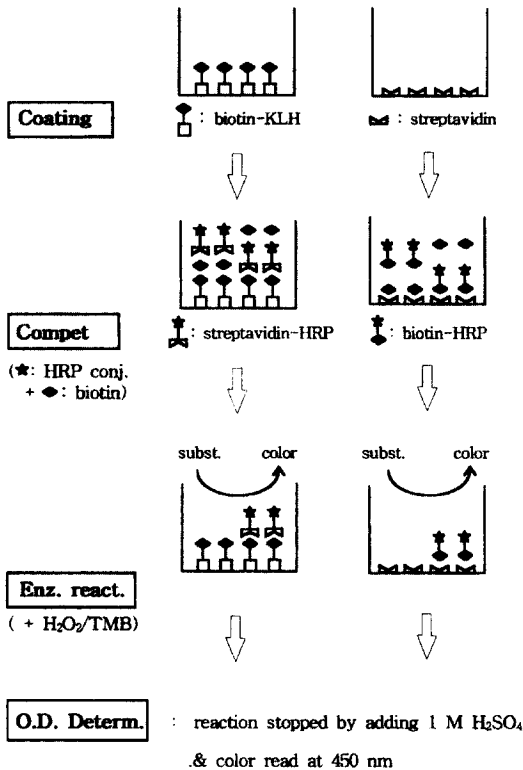


Fig. 1. Schematic procedure of EPBA for biotin assay.

로부터 시료중의 biotin 농도를 신출하였으며. Biotin 표준곡선의 작성을 위해서는 biotin의 농도를 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ng/mL로 washing buffer에 조제하여 사용하였다.

**교차반응(cross-reactivity)**

biotin-결합 단백질의 특이성을 조사하기 위하여 유사 biotin에 대한 교차반응을 분석하였다. Washing buffer에 농도별로 희석한 biotin 유도체들 (biocytin, desthio-biotin, 2-iminobiotin, diaminobiotin)을 각각 biotin 대신 첨가하여 EPBA로 분석하였다. 교차반응의 정도는 항 biotin 항체에 대한 biotin-HRP의 결합을 50% 저해하는 biotin의 농도를, biotin-HRP의 결합을 50% 저해하는 유사 biotin의 농도로 나눈 % 값으로 나타내었다.

**시료의 전처리 및 회수율 분석**

Biotin의 함량 분석을 위하여 시유 (단백질 식품)와 과일 플레이크 (탄수화물 식품) 그리고 당근-파인애플 주스 등을 시중에서 구입하여 사용하였으며 Bitsch 등<sup>(11)</sup> 및 Hoppner와 Lampi<sup>(12)</sup>의 방법을 참고로 하여 전처리 하였다. 회수율의 분석을 위하여 시료에 g (mL)

당 20 ng, 200 ng, 2000 ng의 biotin을 각각 첨가한 후, 각 시료의 전처리 방법에 따라 각각 biotin을 추출하였다. 인위적으로 첨가한 biotin의 함량과 추출 후에 측정된 biotin의 함량을 MBA와 EPBA로 분석하여 그 회수율을 계산하고, 각각에 의한 분석치를 비교하여 방법간의 상관성을 검토하였다. 분석에 사용된 시료의 전처리는 다음과 같다

**우유제품 시료:** 1 mL의 milk에 동량의 citrate buffer와 1% EDTA를 1 mL, 1% glutathione 0.1 mL 그리고 2% papain을 0.4 mL 넣어 57°C water bath에서 90분간 반응 시켰다. 여기에 2.4 mL의 citrate buffer를 첨가하고 121°C에서 10분간 고온 가압처리(autoclave) 한 후 washing buffer로 희석하여 사용하였다.

**곡류제품 시료:** 과일 후레이크 5 g을 블렌더(blender)에 갈아서 균질화 시킨 후 50 mL의 증류수로 희석하고 5분간 초음파 처리하였다. 처리액은 상온에서 20분간 진탕하여 원심분리 (6,000×g, 10 min.)하고 상등액에 carrez I (0.36 M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3H<sub>2</sub>O) 0.5 mL과 carrez II (1.04 M ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) 0.5 mL을 넣어 반응을 시킨 후 원심분리하였다. 상등액에 전량이 25 mL이 되도록 증류수를 가한 다음 washing buffer로 희석하였다.

**주스제품 시료:** 주스를 원심분리 (6,000×g, 10 min.)하여 고형분을 제거한 후, 그 중에서 10 mL을 취하여 20 mL의 증류수를 첨가하여 희석하고 1 N NaOH로 pH를 4-6으로 조정하였다. 증류수를 첨가하여 전량을 50 mL로 조정한 뒤 washing buffer로 희석하였다.

**결과 및 고찰**

**Biotin-KLH conjugate의 제조**

Biotin-KLH conjugate에서 단백질 1 분자에 결합된 biotin의 양을 BSA와 HABA 검정곡선으로부터 각각 산출한 결과, KLH 1 mole 당 결합한 biotin은 약 1.8 mole 인 것으로 비교적 결합률이 낮은 것으로 확인되었다. 이는 10 mg의 KLH가 10 mL의 증류수에서 완전히 용해되지 않은 결과에 의한 것으로 생각된다. 즉 실제로 biotin과 반응을 할 수 있는 KLH의 농도는 계산상의 단백질 양보다 적었기 때문에, biotin의 결합비율이 상대적으로 낮게 나타난 것으로 판단된다.

**효소-단백질결합 분석법 (EPBA)**

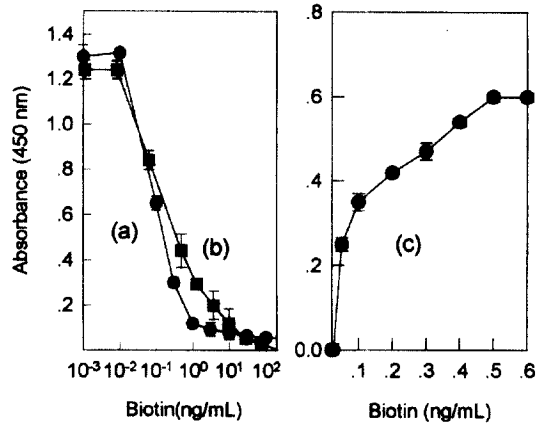
EPBA의 분석조건을 검토하였다. Coating을 위한 biotin 결합 단백질 (biotin-KLH와 Streptavidin)의 희석 농도, blocking 유무, biotin-효소 접합체인 biotin-HRP의 희석 농도, 기질의 종류 등을 검토하였다. Coating

buffer에 농도별로 희석한 biotin 결합 단백질을 100 µL 씩 well에 채우고 4°C에서 하루밤 방치시킨 후 EPBA 를 한 결과, 단백질의 농도를 1 µg/mL로 coating 하였을 때, 흡광도의 변화율이 가장 높게 나타난 40 ng/mL (ppb)가 biotin-HRP와 streptavidin-HRP의 최적 농도로 나타났다. 또한 발색을 위해 첨가하는 기질로서는 ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 보다는 TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HRP에 대하여 더욱 민감하게 발색되었으므로 0.01%의 TMB (0.01% TMB, 0.05 M phosphate citrate buffer, pH 5.0, 0.1% hydrogen peroxide)를 발색기질로 사용하였다. Biotin 결합 단백질을 coating 한 후에 blocking은 하지 않았는데 이는 washing buffer 중에 들어 있는 0.05% Tween 20이 well 표면 등에서 비특이적인 결합을 저해시켜 분석에 영향을 주지 않는 것으로 생각되며, 실제로 0.5%의 gelatin으로 blocking을 했을 때 분석치간의 차이는 없는 것으로 나타났다.

**교차반응**

Biotin 결합단백질은 biotin과 구조가 비슷한 유사 비타민과도 결합이 가능하므로, EPBA에 의하여 biotin의 유도체들에 대한 교차반응(cross reactivity)을 검토하였다.

Avidin 유도체인 streptavidin과 biotin-KLH conjugate를 coating하여 EPBA로 분석한 결과, Biotin-KLH conjugate와 streptavidin-HRP conjugate를 이용한 EPBA에서는 biotin 보다 biocytin에 결합하는 비율이 높았으며 다른 유도체에 대해서는 교차반응이 일어나지 않았다. 각 교차반응율은 Table 1에 나타난 바와 같이 biotin 100% (IC<sub>50</sub>=1.58 ppb)에 대하여 biocytin이 197% (IC<sub>50</sub>=0.80 ppb) 였으며 나머지 유도체들은 교차반응을 보이



**Fig. 2. Standard curve for biotin determination by EPBA and MBA. (a) EPBA with biotin-KLH (b) EPBA with streptavidin (c) MBA**

지 않았다. 또한 Fig. 2의 biotin 표준곡선에 의한 검출 한계는 0.01 ppb로, biotin-BSA를 coating 단백질로 하고 avidin-HRP를 효소기질로 사용했던 Finglas 등<sup>(13)</sup>의 보고보다 훨씬 좋은 검출감도를 보였다. 검출범위는 0.01~1.0 ng/mL로서 비교적 넓지 않았으나 정확한 양을 측정하기에 충분한 방법인 것으로 보이며, 이는 biotin과 결 KLH의 결합 방법에서의 차이와 avidin 보다 반응성이 좋은 streptavidin-HRP conjugate를 효소 기질로 사용하였기 때문인 것으로 생각된다.

Streptavidin에 유리 biotin과 biotin-HRP conjugate를 결합시킨 EPBA에서는 streptavidin에 대하여 biotin 보다 biocytin이 더 잘 결합하였다. 교차 반응의 정도는 Table 1에서와 같이 biotin 100% (결합을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub>=0.33 ppb)에 대하여 biocytin이 109%

**Table 1. Comparisons of MBA and EPBA for biotin quantification in foods**

Methods	MBA	EPBA	
		Streptavidin	Biotin-KLH
Detection limit (ppb)	0.1	0.01	0.01
Biotin	100 (0.08) <sup>1)</sup>	100 (0.33) <sup>2)</sup>	100 (1.58)
Biocytin	80.1 (0.10)	109 (0.30)	197 (0.80)
Cross reactivity (%)			
Desthiobiotin	66.7 (0.12)	0 (N.D)	0 (N.D)
Diaminobiotin	0 (N.D) <sup>3)</sup>	0 (N.D)	0 (N.D)
2-imminobiotin	0 (N.D)	0 (N.D)	0 (N.D)
Detection range (ppb)	0.1~0.5	0.01~30	0.01~1.0

1)  $\frac{\text{Conc. of biotin inhibiting 50\% of } L. \text{ plantarum growth}}{\text{Conc. of derivatives inhibiting 50\% } L. \text{ plantarum growth}} \times 100 \text{ (ng/mL)}$

2)  $IC_{50} = \frac{\text{Conc. of biotin inhibiting 50\% of streptavidin(or biotin-KLH) binding}}{\text{Conc. of derivatives inhibiting 50\% of streptavidin(or biotin-KLH) binding}} \times 100 \text{ (ng/mL)}$

3) N.D means not detected

( $IC_{50}=0.30$  ppb)로 biotin-KLH에 비해 비교적 교차 반응율이 낮아 특이성은 약간 높았으며 다른 유도체들은 모두 교차반응을 보이지 않았다. 이 결과는 Bitsch 등<sup>(11)</sup>이 방사성동위원소를 이용하여 시도했던 EPBA의 결과와는 달리 desthiobiotin에 대한 교차반응은 일어나지 않았다. 검출감도도 0.01 ng/mL로서 Finglas 등<sup>(12)</sup>의 연구 결과에서보다 약 5배 정도 높게 나타났다. 따라서 avidin 보다는 avidin 유도체인 streptavidin을 이용한 EPBA에서 비특이적인 결합이 제거되므로써 biotin 분석이 훨씬 효과적임이 확인되었다<sup>(7)</sup>. 검출 가능한 biotin의 농도는 Fig. 2의 표준곡선에서와 같이 0.01~30 ng/mL로서 biotin 함량이 다양하게 분포되어 있는 여러 가지 식품시료 분석에 유용할 것으로 생각된다.

미생물 분석법 (MBA)

현재까지 biotin 분석에 공인된 방법으로 사용되어 왔던 MBA에서는 biotin과 biocytin, desthiobiotin에 대하여 모두 교차반응이 일어났으며 각각의 교차반응율은 Table 1과 같았다. Biotin 100%에 대하여 biocytin이 81%의 교차반응율을 보였으며, desthiobiotin에 대하여서도 67%의 교차반응이 일어났다. 즉, 미생물 분석법에 의한 biotin의 측정시, 동물체 내에서는 biotin의 효율을 갖지 않으며 분자 내의 유황 대신에 산소나 탄소원자가 치환된 desthiobiotin(oxybiotin)과도 교차반응이 일어났으며, 또한 검출한계가 EPBA에 의한 경우보다 10배 낮은 0.1 ppb로 나타났다. 분석에 소요되는 시간은 48시간으로서 1.5시간이 소요되는 EPBA에 비하여 훨씬 많은 시간이 소요되었다.

Biotin의 분석에 사용되는 각 방법들에 대하여 분석에 소요되는 시간, 검출 한계, 교차반응률 등의 여러 가지 면에서 비교하여 볼 때, biotin-결합단백질을 이용한 EPBA로 biotin을 분석하는 것이 MBA에 비하여 특이성이 높고 재현성이 있으며 간편한 분석방법인 것으로 나타났다. 특히 streptavidin을 이용한 EPBA 분석은 biotin 결합단백질을 제조할 필요가 없어 매우 간편하며 재현성이 있고 검출농도의 범위가 0.01~30 ppb로서 비교적 넓으므로 biotin의 함량이 다양한 식품시료들의 screening에 유용하고, biotin-KLH conjugate를 이용한 EPBA 분석은 검출범위는 넓지 않았으나 Fig. 3에서와 같이 MBA와의 상관관계가 0.994로서 정확하게 biotin 정량분석을 할 수 있으므로 식품시료나 혈액 등의 분석에도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

시료의 분석

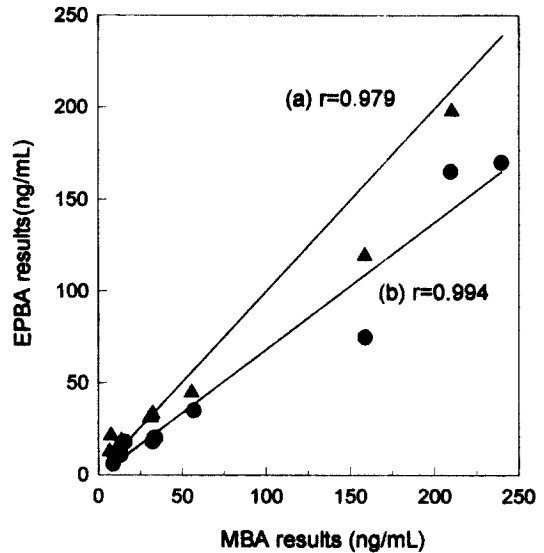


Fig. 3. Correlation plot of biotin determination by MBA versus EPBA with biotin-binding protein. (a) streptavidin coated (b) biotin-KLH coated

우유의 경우에 MBA에 의한 biotin 함량은 평균 32.20 (28.5-35.0) ng/mL 이었고, biotin-KLH와 streptavidin에 대한 EPBA에서는 각각 35.90(34.2-37.6) ng/mL, 32.10 (30.5-34.5) ng/mL의 분석치를 나타냈다. 설정된 추출 조건의 효율성을 검토하기 위하여 biotin의 회수율을 측정한 결과, 우유시료인 경우에 MBA에서는 109.3%, EPBA에서는 96.6%로 나타나, 과일 플레이크나 주스

Table 2. Recoveries of biotin from foods by MBA and EPBA

Foods	Biotin added <sup>1)</sup> (ng/g, ml)	Biotin detected (ng/g, ml) <sup>2)</sup>		Recovery rates of biotin(%)	
		MBA	EPBA (streptavidin)	MBA	EPBA (streptavidin)
Milk	0	32.2	32.1	100.0	100.0
	20	48.3	47.5	92.6	91.2
	200	226.7	213.5	97.3	91.8
	2,000	2,806.1	2,171.0	138.1	106.8
				Ave.=109.3	Ave.=96.6
Flake	0	9.4	11.0	100.0	100.0
	20	18.6	23.2	63.2	74.8
	200	164.3	152.6	78.5	72.0
			Ave.=70.8	Ave.=73.4	
Juice	0	8.6	12.2	100.0	100.0
	20	19.7	19.8	68.9	61.5
	200	128.0	63.2	61.4	76.8
			Ave.=65.1	Ave.=69.2	

<sup>1)</sup> Biotin added to sample prior to extraction

<sup>2)</sup> Mean of biotin detected

시료에 비하여 비교적 회수율이 좋은 것으로 나타났다(Table 2). 이는 우유 등의 단백질 식품에 있어서 단백질 분해 효소인 papain 첨가나 산 또는 알칼리 가수 분해 등에 의한 추출방법이 유리 biotin의 양을 증가시켰기 때문인 것으로 생각된다. 주스시료에서의 biotin 회수율이 낮은 것은 주스중에 존재하는 색소나 Vit C가 biotin의 분석을 방해하기 때문인 것으로 판단되므로 분석시 장애요인을 제거하는 과정(ascorbate oxidase 등의 처리)이 필요한 것으로 나타났다. 또한 시료 분석치에 의하여 MBA와 EPBA간의 상관관계(correlation coefficient)를 구하여 본 결과, Fig. 3에서와 같이 biotin-KLH와 Streptavidin에서 각각  $r=0.994$ ,  $r=0.979$ 로서 비교적 높은 것으로 확인되었다. 그러므로 본 실험에서 개발한 효소-단백질결합 분석법(EPBA)을 이용하여 biotin을 분석하는 경우 미생물 분석법보다 신속하고 정확하며 간편하게 다량의 시료에 적용할 수 있어, 식품이나 사료 등의 분석에 실제로 적용할 수 있으며 분석의 한계성을 극복할 수 없었던 생화학 및 임상 연구분야 등에도 많은 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

Biotin의 분석에 사용되는 기존의 미생물 분석법보다 신속하고 간편한 효소-단백질결합 분석법(enzyme protein binding assay; EPBA)을 개발하였다. Biotin-KLH conjugate와 streptavidin을 이용한 EPBA에서, biotin의 활성을 갖는 biocytin에 대하여 각각 109% ( $IC_{50}=0.3$  ppb)와 197% ( $IC_{50}=0.8$  ppb)의 교차반응을 보였으나 desthiobiotin과 diaminobiotin 그리고 2-iminobiotin에서는 교차반응을 보이지 않았다. Streptavidin과 biotin-KLH conjugate를 이용한 EPBA에서 검출범위는 각각 0.01~30 ng/mL과 0.01~1.0 ng/mL (ppb)로 나타났다. 우유시료와 과일 플레이크 그리고 당근-파인애플 주스에 대한 spike test에서 EPBA(biotin-KLH conjugate)와 미생물 분석법(microbiological assay; MBA)간의 상관관계는  $r=0.994$ 로 매우 높은 것으로 나타났다. 그러나 MBA는 biocytin과 desthiobiotin에 대하여 각각 80.1%, 66.7%의 교차반응을 나타냈다. 검출범위도 0.1~0.5 ng/mL (ppb)로 분석범위가 매우 제한되어 있었다. 그러므로 EPBA에 의하여 biotin을 분석하는 것이 기존의 미생물 분석

법에 비하여 검출 감도나 검출 범위, 교차반응 그리고 분석시간 등의 여러 가지 면에서 우수한 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 1995년도 농림수산 기술개발 사업 지원 과제의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. The National Research Council: *Recommended Dietary Allowances*. 10th ed., National Academy of Science, Washington, D. C. (1989)
2. Machlin, L. J.: *Handbook of Vitamins*. 2nd ed., Marcel Dekker, New York and Basel (1991)
3. Friedrich, W.: Biotin. p.755-805 in *Vitamins*. ed., Walter de Gruyter, Berlin · New York (1988)
4. Korea Institute for Population & Health: *Recommended Dietary Allowances for Koreans* (1995)
5. Rural Nutrition Institute: *Food Composition Table*, 4th ed., Nutrition Institute, R. D. A. (1991)
6. Lee, H. A., Mills, E. N. C., Finglas, P. M. and Morgan, M. R. A. M.: Rapid biospecific methods of vitamin analysis. *J. Micronutr. Anal.*, **7**, 261-270 (1990)
7. Bayer, E. A. and Wilchek, M.: Avidin-biotin technology. pp 137-162 in Mansom, M., *Methods in Molecular Biology*. vol. 10: Immunochemical protocols. ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ USA (1992)
8. Gretch, D. R., Suter, M. and Stinski, M. F.: The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin affinity chromatography to isolate herpesvirus hydrophobic proteins or glycoproteins. *Anal. Biochem.*, **163**, 270-277 (1987)
9. Cox, J. C. and Longoria, C. C.: Some observation on a new filter pad technique for the estimation of avidin and biotin. *Microchem. J.*, **41**, 41-47 (1990)
10. A. O. A. C.: *Official Methods of Analysis*. 15th ed., Arlington, Virginia (1990)
11. Bitsch, R., Salz, I. and Hötzel, D.: Biotin assessment in foods and body fluids by a protein-binding assay(PBA). *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **59**, 59-64 (1989)
12. Hoppner, K. and Lampi, B.: Total folate, pantothenic acid and biotin content of yoghurt products. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **23**(4/5), 223-225 (1990)
13. Finglas, P. M., Faulks, R. M. and Morgan, M. R. A.: The analysis of biotin in liver using a protein-binding assay. *J. Micronutr. Anal.*, **2**, 247-257 (1986)

(1998년 9월 1일 접수)