

Biotin의 분석을 위한 효소면역측정법(ELISA)의 개발

이경애[†] · 손동화 · 고영태*

한국식품개발연구원

*덕성여자대학교 식품영양학과

Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid and Sensitive Analysis of Biotin

Kyung-Ae Lee[†], Dong-Hwa Shon and Young-Tae Ko*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-420, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract

In order to develop more rapid and reproducible analysis of biotin known as vitamin H, attempts were made to establish the condition for enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) compared with traditional microbiological assay(MBA). Antibiotin and antiserum were obtained from the immunized rabbits injected with emulsion of biotin-KLH conjugate and Freund's adjuvant. The antiserum showed cross-reactivity on biocytin, a derivative of biotin, which is converted to biotin in intestine, at the rate of 177%(median inhibitory concentration(IC_{50})=12.58ppb), but not on other derivatives such as desthiobiotin, diaminobiotin and 2-imino-biotin. Specific antibody for biotin was purified from the antiserum through protein A column and desalting column. The conditions of competitive direct ELISA (cdELISA) were established. Detection range of biotin concentration by cdELISA was 0.01~300ng/ml(ppb). In the spike test with milk, fruit flake and pine-carrot juice, the correlation coefficient between two methods of MBA and ELISA was reliably consistent at the value of $r=0.992$. But detection of biotin by microbiological assay(MBA) was rather restricted in range and nonspecific. Detection range of biotin by MBA was 0.1~0.5ng/ml(ppb). It showed cross-reactivities on biocytin and desthiobiotin at the rate of 80.1% and 66.7%, respectively. In conclusion, ELISA revealed a significant improvement compared with MBA for the biotin detection in terms of sensitivity, detection range and cross-reactivity. In addition, a variety of samples could be analyzed rapidly and conveniently at one time by using ELISA. These results strongly suggest that the ELISA is very promising for the practical application to detect biotin contents in a wide range of food stuffs.

Key words: biotin, competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay, microbiological assay

서 론

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

Biotin은 인체에서 장내세균에 의하여 필요량이 합성되고 대부분의 식품에 미량으로 존재하므로 부족되지 않는 것으로 알려졌으나 설파제 등의 항생제를 복용할 경우에는 장내세균의 생육이 저해되므로 피로감과,

안면창백증, 피부염, 근육마비 등의 결핍증세를 보인다. 또한 여러가지 선천성 질환(inborn error)과 영유아의 돌연사(infant sudden death)도 biotin의 결핍이 원인이 될 수 있는 것으로 보고되고 있다. 그러므로 미국의 경우에는, 성인에 있어서 biotin의 1일 섭취 요구량을 100~200 μ g으로 규정하고 있다(1).

Biotin($C_{10}H_{16}N_2O_3S$, hexa-hydro-2-oxo-1H-thienol [3,4-d]-imidazole-4-pentanoic acid)은 분자량이 224.3인 저분자의 물질로 그 구조는 요소와 비슷한 구조의 imidazol 환과 유황(S)을 가지고 있는 thiophene 유사화합물이 결합한 것이다(2,3).

*To whom all correspondence should be addressed

Biotin은 식품이나 조직 중에서 단백질과 결합되어 있기 때문에 분석하기가 쉽지 않으므로 대부분의 식품에 있어서 biotin의 함량에 대한 정확한 정보가 적고 식품 성분표에도 항목이 표시되어 있지 않다(4,5). 따라서 영양학적인 측면이나 임상적인 연구 등이 미흡한 실정이며, 최근에 영양학적 표식이나 정확한 성분 분석표의 필요성이 증대되면서 신속하고 정확하며 재현성 있는 biotin의 분석방법이 요구되고 있다.

Biotin의 분석법으로는 HPLC에 의한 기기분석과 *Lactobacillus plantarum*을 이용한 미생물 분석법(microbiological assay; MBA), 방사성 동위원소를 이용한 방사선 면역분석법(radioimmuno assay; RIA) 등이 있으나 검출감도와 분석시간, 안전성 등의 문제가 있어 식품 시료에 적용하는 것은 적절하지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 기존의 미생물 분석법보다 검출감도가 높고 신속, 정확하며 실험방법이 간편하고 경제적인 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

Biotin과 biocytin, desthiobiotin, 2-imminobiotin 등의 biotin 유사 비타민 및 bovine serum albumin(BSA), goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, NHS-LC-biotin과 HABA(4-hydroxybenzene-2-carboxylic acid), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolidine-sulfonic acid) (AB-TS) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였고, keyhole limpet hemocyanin(KLH), Freund's complete adjuvant와 incomplete adjuvant, biotin-HRP, 단백질 정량용 micro BCA kit(#23235), 항체정제용 protein A column(Immuno-pure plus IgG purification kit, #44679)과 5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride(TMB)는 Pierce사로부터 구입하였으며, 기타의 시약은 GR급 이상의 것을 사용하였다. 미생물 분석에 사용한 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014는 한국식품개발연구원으로부터 분양 받았고 *Lactobacilli* broth와 biotin assay media는 Difco사에서 구입하였다. 실험동물로는 New Zealand White 웅성 토끼를 한국실험동물연구소(경기도 수원시)에서 구입하여 사용하였다. Biotin 함량분석을 위한 식품시료는 단백질 식품류(우유)와 탄수화물 식품류(과일 플레이크) 그리고 쿠스류(당근-파인애플 쿠스)로 구분하여 시중의 슈퍼마켓에서 구입하여 사용하였다.

기구 및 기기

Microtiter plate는 Nunc사의 Maxisorp(#446612)를

사용하였으며, microplate reader는 Molecular Devices 사의 Thermo-max™을 이용하였다. 흡광도의 측정은 Jasco V-500 UV-Vis spectrophotometer를 이용하였다.

Biotin-KLH conjugate 제조

ELISA의 면역원과 EPBA의 항원으로 사용한 biotin-KLH conjugate는 biotin과 단백질과의 비특이적인 결합을 최소화하기 위하여 NHS-LC-biotin을 사용하여 Gretch 등의 방법을 참조하여 다음과 같이 제조하였다(6,7). KLH 10mg을 10ml의 중류수에 녹인 후 sodium bicarbonate buffer(50mM, pH 8.5)에 대하여 3회 투석하고, NHS-LC-biotin 4mg을 1ml의 sodium bicarbonate buffer에 녹여 KLH용액과 함께 넣은 후 ice bath(또는 얼음물, 0~4°C)에서 2시간 반응시켰다. 반응하지 않은 biotin의 제거를 위해 0.01M phosphate buffered saline(PBS; 1.9mM NaH₂PO₄, 8.1mM Na₂HPO₄, 154mM NaCl, pH 7.2)으로 3회 투석하였으며 biotin-KLH conjugate의 단백질 농도는 BCA kit를 이용하여 측정하였다. KLH 한 분자당 결합된 biotin 분자의 비율(ratio)은 HABA 방법에 의하여 구하였다(8). 즉, biotinylated protein(biotin-KLH) 100μl를 56°C에서 10분간 반응시킨 후, pronase를 1%가 되도록 가하고 하루밤 반응시켜 biotinylated protein에 대한 HABA 색소의 비특이적 결합(nonspecific binding)을 방지하였다.

특이 항체의 생산과 정제

Biotin에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하기 위하여 면역원으로 준비한 biotin-KLH conjugate와 Freund's complete adjuvant를 동량비로 섞어 유탕액을 만든 후, 체중 3kg 전후의 토끼(New Zealand White종)의 뒷 발바닥에 마리당 500μg씩 피하주사(subcutaneous injection)하였다. 이후 2~3주 간격으로 면역원인 biotin-KLH 500μg을 Freund's incomplete adjuvant와 함께 유탕액을 만들어, 수차례 토끼의 등이나 대퇴에 추가로 면역을 하였다. 매번 면역 1주 후에 토끼의 귀정맥으로부터 채혈하여 3시간 가량 실온에서 방치하여 혈액을 응고시킨 후 약 2시간 냉장보관한 다음, 원심분리(3,000 × g, 10분)하여 항혈청을 분리하고 sodium azide를 0.02%되게 첨가하여 냉동보관하면서 사용하였다.

항체의 정제

생산된 항체는 protein A column과 Sephadex G-25 column을 이용하여 정제하고 Laemmli의 방법(9)에 따라, 12.5%의 gel에서 sodium dodecylsulfate-poly-

acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 확인하였다.

비경합적 효소면역측정법(noncompetitive ELISA)

항체역가는 biotin-KLH를 사용한 비경합적 ELISA로 측정하였다. Coating buffer(0.02M Tris, 0.15M NaCl, pH 9.0)에 용해시킨 biotin-KLH(2 μ g/ml) 100 μ l를 well에 채우고 4°C에서 하루밤 또는 37°C에서 3시간 방치하여 coating한 후, washing buffer(0.02M Tris, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 150 μ l로 3회 세척하였다. 여기에 washing buffer를 사용하여 1/2,000로 희석한 항 biotin 항체 100 μ l를 넣고 상온에서 한시간 동안 항원-항체 반응을 시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 세척한 well에 washing buffer를 사용하여 1/2,000로 희석한 2차 항체(goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate)를 100 μ l 넣고 상온에서 한시간 방치하였다. 반응이 끝난 후 washing buffer로 다시 3회 세척하고 기질용액(0.1% ABTS, 0.1M citric acid phosphate buffer, pH 4.0, 0.1% hydrogen peroxide: 사용 직전에 첨가) 100 μ l를 넣어 상온에서 30분간 방치하여 발색시켰다. 반응 정지액(0.1% sodium azide) 100 μ l를 첨가하여 발색 반응을 정지시킨 후, microplate reader를 이용하여 파장 405nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 각 시료당 3개씩의 well을 사용하여 얻은 흡광도의 평균값으로 항체역가를 구하였다.

경합적 직접 효소면역측정법(cdELISA)

시료중의 biotin 농도를 측정하기 위한 cdELISA는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 하였고, 각 시료의 biotin 함량은 biotin 표준곡선으로부터 구하여 산출하였다. Biotin 표준곡선은 시료를 분석할 때마다 동시에 작성하였으며, biotin 표준용액의 농도를 0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 10, 30, 100, 300, 1000ppb가 되게 washing buffer로 각각 희석하여 biotin-HRP와 함께 동량비로 섞은 후 cdELISA로 분석하여 작성하였다.

항 biotin 항체의 교차반응(Cross reactivity)

항체의 특이성을 조사하기 위하여 유사 biotin에 대한 항 biotin 항체의 교차반응을 cdELISA에 의해 분석하였다. Washing buffer에 농도별로 희석한 biotin 유도체들(biocytin, desthiobiotin, 2-iminobiotin, diaminobiotin)을 각각 biotin 대신 첨가하여 cdELISA로 분석하였다. 교차반응의 정도는 항 biotin 항체에 대한 biotin-HRP의 결합을 50% 저해하는 biotin의 농도를,

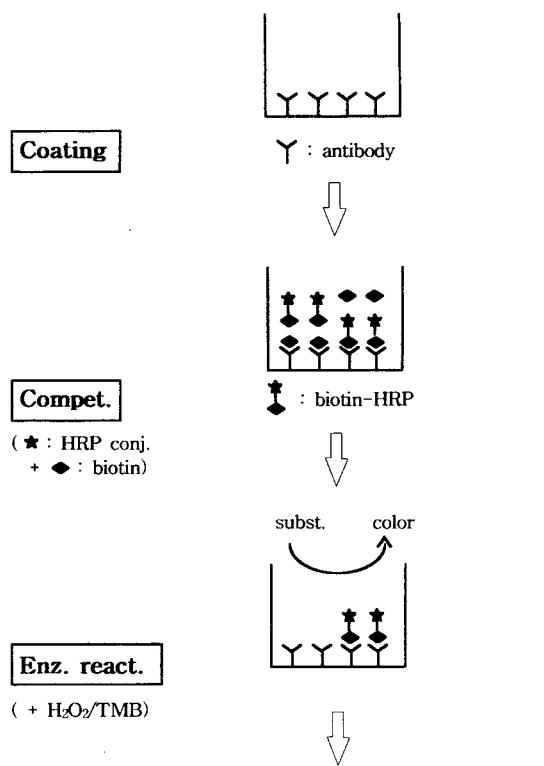


Fig. 1. Schematic procedure of cdELISA.

biotin-HRP의 결합을 50% 저해하는 유사 biotin의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

미생물 분석법(MBA)

Lactobacillus plantarum ATCC 8014를 이용한 AO-AC법에 의하였다(10).

시료의 전처리 및 회수율 분석

Biotin의 함량 분석을 위하여 시유(단백질 식품), 과일 플레이크(탄수화물 식품) 그리고 당근-파인애플 주스 등을 시중에서 구입하여 사용하였으며 Bitsch 및 Hoppner 등의 방법을 참고로 하여 전처리하였다(11, 12). 회수율의 분석을 위하여 시료에 g(ml) 당 20ng, 200ng, 2000ng의 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 세가지 방법간의 상관성을 검토하였다. 분석에 사용된 시료의 전처리는 다음과 같다.

우유제품 시료

1ml의 milk에 동량의 citrate buffer와 1% EDTA를 1ml, 1% glutathione 0.1ml 그리고 2% papain을 0.4ml 넣어 57°C water bath에서 90분간 반응시켰다. 여기에 2.4ml의 citrate buffer를 첨가하고 121°C에서 10분간 고온 가압처리(autoclave)한 후 washing buffer로 희석하여 사용하였다.

곡류제품 시료

과일 후레이크 5g을 블렌더(blender)에 갈아서 균질화시킨 후 50ml의 중류수로 희석하고 5분간 초음파 처리하였다. 처리액은 상온에서 20분간 진탕하여 원심분리($6,000 \times g$, 10min.)하고 상동액에 carrez I(0.36 M $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) 0.5ml과 carrez II(1.04 M $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5ml를 넣어 반응을 시킨 후 원심분리하였다. 상동액에 전량이 25ml가 되도록 중류수를 가한 다음 washing buffer로 희석하였다.

쥬스제품 시료

쥬스를 원심분리($6,000 \times g$, 10min.)하여 고형분을 제거한 후, 그 중에서 10ml를 취하여 20ml의 중류수를 첨가하여 희석하고 1N NaOH로 pH를 4~6으로 조정하였다. 중류수를 첨가하여 전량을 50ml로 조정한 뒤 washing buffer로 희석하여 사용하였다.

결과 및 고찰

특이항체의 생산

Biotin-KLH conjugate에서 단백질 한 분자에 결합된 biotin의 양을 BSA와 HABA 검정곡선으로 부터 각각 산출한 결과, KLH 1mole 당 결합한 biotin은 약 1.8 mole인 것으로 확인되었다. KLH가 불균일상의 큰 단백질 분자이고 면역원성도 크며 hapten과의 공유결합에 관여하는 lysine 잔기가 많이 노출되어 있다는 점에서 볼 때, 이는 매우 낮은 결합률이라 할 수 있다. 그러나 이것을 면역원으로 하여 항체의 생산을 유도하였을 때 생산된 항체의 항체가가 높게 나타난 것은 항원용액을 면역 증강제인 Freund's adjuvant와 함께 유탕액을 만들어서 면역하고, Shon 등의 방법(13)과 같이 면역부위를 등 및 발바닥으로 바꾸어 여러 차례 추가면역(boost)하였기 때문인 것으로 생각된다. Biotin-KLH

conjugate로 면역한 토끼에서 5차례의 채혈로 얻은 항biotin 항혈청의 항체 역가는 비경합적 ELISA에 의해 측정하였으며 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 이때 실험에 사용된 세마리의 모든 토끼에서 biotin에 대해 특이적으로 결합하는 항 biotin 항혈청(antibiotin antibody)이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 대체로 첫 면역 후 일주일 만에 biotin에 대한 특이항체를 생성했으며 4차 면역 후에는 매우 높은 항체 역가의 항체를 생산하기 시작했다. 항체가가 높았던 3번 토끼의 4차 항체가 cdELISA에서도 가장 경합이 잘 일어났으며 발색치도 가장 높게 나타났다. 따라서 이후의 실험에서는 3번 토끼의 4차 항혈청을 사용하였다. 분석시에 항혈청을 그대로 사용하면, 항체 이외에 혼입되어 있는 혈청 성분이 분석시 장해 요인이 될 수도 있으므로 시료 분석시에는 항체를 정제하여 사용하였다.

경합적 ELISA의 분석조건 검토

직접법에 의한 경합 ELISA(cdELISA)의 경우에 coating 항체의 희석 농도, blocking 유무, biotin-효소 접합체인 biotin-HRP의 희석 농도, 기질의 종류 등을 검토하였다. 단백질 농도가 2 μ g/ml이 되도록 coating buffer에 희석한 항체를 100 μ l씩 well에 채우고 4°C에서 하루밤 방치시킨 후 cdELISA를 한 결과, Biotin-HRP의 농도는 40ng/ml(ppb)를 최적 농도로 나타났다. 또한 발색을 위해 첨가하는 기질로서는 ABTS/ H_2O_2 보다는

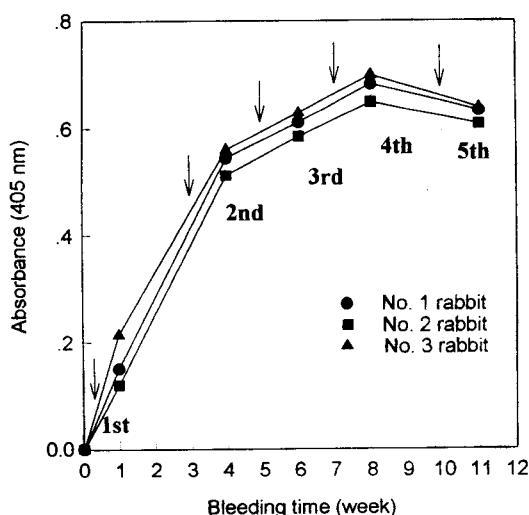


Fig. 2. Production of antibiotin antibodies after immunized with biotin-KLH in three rabbits. Arrows indicate each injection point. Antibody production was determined by indirect noncompetitive ELISA.

TMB/H₂O₂가 HRP에 대하여 더욱 민감하였으므로 0.01 %의 TMB(0.01% TMB, 0.05M phosphate citrate buffer, pH 5.0, 0.1% hydrogen peroxide)를 발색기질로 사용하였다.

항 biotin 항체의 교차반응

항 biotin 항체는 biotin과 구조가 비슷한 유사 비타민과도 결합이 가능하므로, cdELISA에 의하여 biotin의 유도체들에 대한 교차반응(cross reactivity)을 검토하였다. Fig. 3에서와 같이 biotin보다는 biocytin이 특이항체에 더 잘 결합하는 것으로 나타났으며, 각 유도체들의 교차반응의 정도는 biotin에 대한 결합정도를 100%로 하였을 때, biocytin이 177%였다. 이들의 결합율은 50% 저해하는 농도인 IC₅₀은 Table 1에서와 같이 biotin이 22.38ppb, biocytin은 12.58ppb로 확인되었다. Biocytin을 제외한 desthiobiocytin, diaminobiocytin, 2-iminobiocytin 등의 유도체들에서는 전혀 교차반응을 나타내지 않았으므로, 이 항체는 biotin의 총량을 정량할 수 있는 매우 특이적인 항체임을 알 수 있었다.

미생물 분석법(MBA)

현재까지 biotin 분석에 공인된 방법으로 사용되어 왔던 MBA의 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 biotin과 biocytin, desthiobiocytin에 대하여 모두 교차반응이

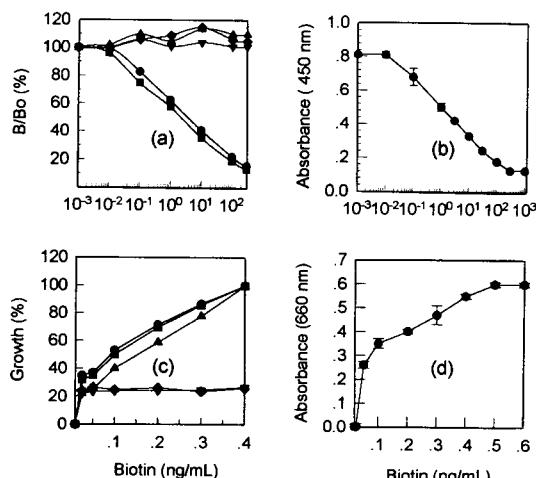


Fig. 3. Cross reactivities and standard curve of biotin and its various derivatives with the antibiotin-antibodies by ELISA.

- (a) Cross reactivity of ELISA
 - (b) Standard curve of ELISA
 - (c) Cross reactivity of MBA
 - (d) Standard curve of MBA
- Biotin, —■— Biocytin, —▲— Desthiobiocytin,
—◆— Diaminobiocytin, —▼— 2-Iminobiocytin

Table 1. Comparisons of MBA and ELISA for biotin determination in foods

Methods	MBA	ELISA
Reagents	<i>Lactobacillus plantarum</i> , media	antibody, microplates
Detection limit(ppb)	0.1	0.01
Time(hr.)	48	1.5
Cross reactivity (%)	100(0.08) ¹⁾ Biocytin Desthiobiocytin Diaminobiocytin 2-Iminobiocytin	100(22.38) ²⁾ 80.1(0.10) 66.7(0.12) 0(N.D.) 0(N.D.) 0(N.D.)
Detection range(ppb)	0.1~0.5	0.01~300

¹⁾ Conc. of biotin inhibiting 50% of *L. plantarum* growth
²⁾ $IC_{50} = \frac{\text{Conc. of derivatives inhibiting 50\% of streptavidin(or biotin-KLH) binding}}{\text{Conc. of derivatives inhibiting 50\% of streptavidin(or biotin-KLH) binding}} \times 100(\text{ng/ml})$

³⁾ N.D. means not detected.

일어났으며 각각의 교차반응률은 Table 1과 같았다. Biotin 100%에 대하여 biocytin이 81%의 교차반응율을 보였으며, desthiobiocytin에 대하여서도 67%의 교차반응이 일어났다. 즉, 미생물 분석법에 의한 biotin의 측정시, 동물체 내에서는 biotin의 효율을 갖지 않는 desthiobiocytin과도 교차반응이 일어났으며, 또한 검출한 계가 ELISA나 EPBA에 의한 경우보다 10배 낮은 0.1 ppb로 나타났다.

Biotin의 분석에 사용되는 각 방법들에 대하여 분석에 소요되는 시간, 검출 한계, 교차반응률 등의 여러 가지 면에서 비교하여 볼 때, Table 1에서와 같이 특이항체를 이용한 cdELISA로 biotin을 분석하는 것이 MBA에 비하여 특이성이 높고 재현성이 있으며 간편한 분석방법인 것으로 나타났다. 특히 한꺼번에 다양한 항체를 생산할 수 있고 분석에 소요되는 시간도 적어서 경제적인 것으로 나타났다. 또한 검출 농도의 범위가 0.01~300ppb로 비교적 넓기 때문에 biotin의 함량이 다양하게 분포되어 있는 식품시료의 경우에는 ELISA에 의한 분석법이 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

시료의 분석

각 식품마다 biotin 함량에 대한 정확한 식품성분표가 없고 가공식품에도 영양표지(nutrition fact)가 되어있지 않았으므로 MBA를 기준으로 하여 분석하였다. 회수율과 수분 함량을 고려하지 않은 시료의 중량(g) 또

는 ml)에 대한 biotin의 평균 함량(ng)과 분석치의 범위는 Table 2에 나타난 바와 같다.

우유의 경우에 MBA에 의한 biotin 함량은 평균 32.20 (28.5~35.0)ng/ml이었고 ELISA에서는 35.90(34.2~37.6)ng/ml의 분석치를 나타냈으며 ELISA에 의한 분석치와 MBA에 의한 분석치 간의 상관관계가 매우 큰 것으로 나타났다. 그러나 MBA에서는 분석치의 범위가 28.5~35.0ng/ml로서 분석치간의 오차가 비교적 크게 나타났다. 탄수화물 식품에 파일 플레이크에서는 각각 9.35(7.0~11.0), 16.5(14.5~18.0)ng/g으로 분석되었으며, 당근-파인애플 쥬스의 경우는 8.6(6.2~11.2), 15.2(9.5~14.5)ng/ml로 나타나 시료간의 분석치가 부분적으로 심하게 차이가 있었다. 이는 시료마다 추출방법을 각각 다르게 사용하였기 때문에 전처리방법에 따른 여러가지 요인에 의한 결과로 판단되었다. 그러므로 각 시료마다 다르게 설정된 추출 조건의 효율성을 검토하기 위하여 biotin의 회수율을 측정하였다.

인위적으로 첨가시킨 biotin의 회수율 분석

각 시료마다 g(또는 ml)당 20ng, 200ng, 2000ng의 biotin을 첨가하였으며, 0ng/g의 첨가치는 그 식품에 존재하는 고유 biotin 함량으로하여 계산하였다. 추출조건이 다른 각 시료에 대하여 MBA와 병행하여 분석하였으며 biotin 회수율의 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 단백질 식품류인 우유시료인 경우에 각각 109.3%와 107.6%의 높은 회수율을 보였으나, 탄수화물 식품류인 파일 후레이크의 경우에는 70.8%와 76.7%, 그리고 당근-파인애플 쥬스는 65.1%, 71.1%의 낮은 회수율

을 각각 나타냈다. 쥬스에서의 biotin 회수율이 낮은 것은 아마도 쥬스중에 존재하는 색소나 비타민 C가 biotin의 분석을 방해하기 때문인 것으로 판단된다. 그러므로 쥬스 시료를 추출하는 과정 중에 ascorbate oxidase를 처리하는 단계를 첨가하는 등, 분석시 장애요인을 제거하는 과정이 필요한 것으로 나타났다(14).

또한 우유시료의 biotin 회수율이 다른 시료들의 회수율에 비하여 현저하게 높은 것은, biotin이 식품중에서 단백질과 결합된 상태로 존재하기 때문에 이를 분리시키기 위하여 행했던 여러 가지 방법들이 유리biotin의 양을 증가시켰기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 biotin의 분석에 있어서, 단백질 분해효소인 papain 첨가와 산 또는 알칼리 가수분해 등에 의한 추출방법이 가장 적절한 방법인 것으로 나타났으며 이는 Hood의 결과 및 Hoppner 등의 결과와 일치하였다(12,14,15). 그러므로 biotin의 분석에 있어서 ELISA를 활용하여 분석을 신속하고 간편하게 하기 위해서는 시료의 전처리 과정을 간단하게 할 수 있는 추출 조건을 각 식품의 특성에 맞게 설정하여 최적화하는 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

검출법의 신뢰성 검정

시료의 분석과 회수율 분석에서의 분석치(Table 2)를 이용하여 cdELISA와 기존의 분석법인 MBA 간의 상관관계를 구하였다. MBA와 ELISA의 분석치는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 $r=0.992$ 의 매우 높은 상관계수(correlation coefficient)를 나타내었다.

그러므로 본 실험에서 개발한 ELISA 의한 면역 기

Table 2. Recoveries of biotin from foods

Foods	Biotin added ¹⁾ (ng/g, ml)	Biotin detected(ng/g, ml) ²⁾		Recovery rates of biotin(%)	
		MBA	ELISA	MBA	ELISA
Milk	0	32.2	35.9	100.0	100.0
	20	48.3	57.3	92.6	102.5
	200	226.7	219.5	97.3	93.0
	2,000	2,806.1	2,612.3	138.1	128.3
				Ave.=109.3	Ave.=107.6
Flake	0	9.4	16.5	100.0	100.0
	20	18.6	28.5	63.2	78.0
	200	164.3	163.7	78.5	75.4
					Ave.=70.8
				Ave.=76.7	
Juice	0	8.6	15.2	100.0	100.0
	20	19.7	25.3	68.9	71.8
	200	128.0	151.4	61.4	70.3
					Ave.=65.1
				Ave.=71.1	

¹⁾Biotin added to sample prior to extraction, ²⁾Mean of biotin detected

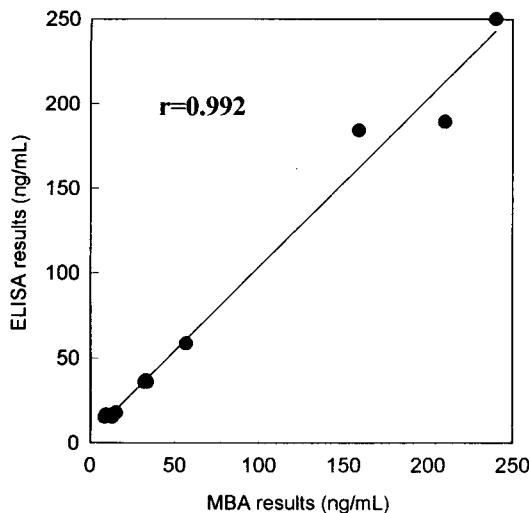


Fig. 4. Correlation plot of biotin determination by MBA versus ELISA.

법(ELISA)을 이용하여 biotin을 분석하는 경우 신속하고 정확하며 간편하게 다양한 시료를 분석할 수 있어 식품이나 사료 등의 biotin을 측정하는 방법으로 활용할 수 있을 것으로 생각되며, 나아가 분석의 한계성을 극복할 수 없었던 생화학 및 임상 연구분야 등에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

Biotin 즉 비타민 H를 신속하고 간편하게 분석하기 위하여 효소 면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)에 의한 분석방법을 확립하고자 하였다. Keyhole limpet hemocyanin(KLH)을 carrier protein으로 한 biotin-KLH conjugate를 제조하여 Freund's adjuvant와 유탕액을 만든 후 토끼에 면역하여 항biotin 항혈청을 얻었다. 이 항혈청은 인체내에서 유일하게 biotin의 활성을 갖는 biocytin에 대하여 177%의 교차반응율(50% 결합저해농도: $IC_{50}=12.58\text{ppb}$)을 보였으며 desthiobiotin 및 diamminobiotin, 2-iminobiotin 등의 다른 유도체에서는 교차반응이 일어나지 않아 특이성이 높은 것으로 나타났다. 이 항혈청을 protein A column과 Sephadex G-25 column으로 정제하여 항체가 높은 항biotin 항체를 얻었다. 이 항체를 이용하여 직접법에 의한 경합적 ELISA(competitive direct ELISA; cdELISA)로 biotin을 분석하기 위한 조건을 확립하였다. Biotin의 검출범위는 0.01~300ng/ml(ppb)로 비교적 넓은 범위의 농도를 측정할 수 있었으며 검출감도는 0.01ng/ml로 매우 높게 나타났다. ELISA의 분석결과

를 미생물 분석법(microbiological assay; MBA)과 비교하기 위하여 시유와 과일 플레이크 그리고 당근-파인애플 주스에 대하여 spike test를 한 결과, 두 방법간의 상관관계가 $r=0.992$ 로 매우 높게 나타났다. 그러나 기존의 분석방법인 미생물 분석법에서의 검출범위는 0.1~0.5ng/ml(ppb)로 분석범위가 매우 제한되어 있었고 검출감도도 0.1ng/ml로 비교적 낮았다. 또한 biocytin 외에 desthiobiotin과 같이 biotin 활성이 없는 유도체에 대해서도 66.7%의 교차반응을 나타냈다. 그러므로 ELISA에 의하여 biotin을 분석하는 것이 기존의 미생물 분석법에 비하여 검출 감도나 검출 범위, 교차반응 등의 여러 가지면에서 우수할 뿐만 아니라 분석방법이 간편하고 신속하며 다양한 시료를 동시에 분석할 수 있기 때문에 식품시료의 분석에는 특히 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 농림수산 기술개발 사업지원과제의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

문 협

- The National Research Council : *Recommended Dietary Allowances*. 10th ed., National Academy of Science, Washington, D.C.(1989)
- Machlin, L. J. : *Handbook of vitamins*. 2nd ed., Marcel Dekker, New York and Basel(1991)
- Friedrich, W. : *Vitamins*. 2nd ed., Berlin, New York, p.755(1988)
- Korea Institute for Population & Health : *Recommended Dietary Allowances for Koreans*(1995)
- Rural Nutrition Institute : *Food Composition Table*. 4th ed., Nutrition Institute, R. D. A.(1991)
- Bayer, E. A. and Wilchek, M. : Avidin-biotin technology, In "Methods in molecular biology" Humana Press Inc., Totowa, NJ, Vol. 10, p.137(1992)
- 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(1987)
- 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(1990)
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680(1970)
- AOAC : *Official methods of analysis*. 15th ed., Association of official analytical chemists, Arlington, Virginia(1990)
- Bitsch, R., Salz, I. and Hötzl, D. : Biotin assessment

- in foods and body fluids by a protein-binding assay (PBA). *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **59**, 59(1989)
12. Hoppner, K. and Lampi, B. : Total folate, pantothenic acid and biotin content of yoghurt products. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **23**, 223(1990)
13. Shon, D. H., Han, S. M., Lee, Y. W., Cho, S. H., Kang, S. Y. and Lee, K. A. : Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of fu-
- monisin. *Kor. J. Appl. Microbiol.*, **24**, 119(1996)
14. Hood, R. L. : The use of linear regression analysis in the isotope dilution assay of biotin. *Anal. Biochem.*, **79**, 635(1977)
15. Lee, H. A., Mills, E. N. C., Finglas, P. M. and Morgan, M. R. A. : Rapid biospecific methods of vitamin analysis. *J. Micronutr. Anal.*, **7**, 261(1990)

(1998년 8월 28일 접수)