

Biospecific method에 의한 Biotin의 고감도 분석법 개발

이경애, 손동화¹, 고영태덕성여자대학교 식품영양학과, ¹한국식품개발연구원

Biotin (Vitamin H)은 항난백장해인자로서 중요한 영양성분 및 식품첨가물의 하나이다. 이는 동물의 체내대사에서 포도당 및 지방산의 생합성, 아미노산의 대사에 필요한 보조소 (cofactor)로서 중요한 역할을 한다. Biotin의 결핍은 식욕부진, 성장장애, 영양이용율의 감소를 나타내며, 심한 경우에는 탈모, 피부염, 근마비를 초래한다. 성인의 1일 섭취요구량은 100 - 200ug이다. 식품이나 조직중에서 biotin은 단백질과 결합되어 있어 분석이 용이하지 않고, 그 이용성도 불분명한 점이 있으며, biotin 함량에 대한 정보도 적은 편이다. 그러나 근년 영양학적 표시(nutritional labelling)이나 정확한 성분 분석표(compositional data)의 필요성이 증대되고, 특히 신속하고 정확하며 재현성있는 분석방법이 요구되고 있다.

기존의 biotin분석은 대체로 *Lactobacillus plantarum*을 이용한 미생물법 (microbiological assay; MBA)이나 방사성동위원소를 활용한 방법에 주로 의존하고 있으나, 이들은 분석시간이 길고, 불포화지방산이나 biotin analog들에 대하여도 반응을 보여 정확성이 떨어지는 단점이 있다. 또한, HPLC에 의한 방법은 검출감도가 매우 낮고 복잡한 전처리를 요하는 등 신속한 분석에는 부적합하다. 그러므로 본 연구에서는 신속정밀한 biotin의 분석방법으로서, biotin에 생물특이적으로 반응하는 항체 및 비타민결합단백질 (avidin류)을 이용한 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 및 EPBA (enzyme protein binding assay)를 개발하고자 하였다.

먼저, ELISA를 개발하기 위하여, biotin을 KLH (keyhole limpet hemocyanin)에 공유결합시켜 얻은 biotin-KLH conjugate를 Freund's adjuvant와 함께 수 차례 토끼에 피하주사하므로써 항혈청을 생산하였다. 그 중 우수한 항혈청을 선별하고, 이 항혈청과 biotin-HRP (horse raddish peroxidase) conjugate를 이용하여 competitive direct ELISA (cdELISA)의 최적조건을 확립하였다. 이 때 ELISA의 표준곡선으로 부터 biotin의 검출한계는 0.01 ng/ml (ppb)임을 알 수 있었다. 이는 Lee 등 (1990)이 보고한 것보다 400 배 이상 높은, 매우 양호한 검출감도를 나타냈다. 또한 biotin의 analog들에 대한 특이항체의 교차반응 (cross-reactivity)을 검토하였을때, biotin에 대한 결합정도를 100 %로 하면, biocytin은 178 %였으며 desthiobiotin, diaminiobiotin, 2-iminobiotin 등은 모두 0 %로 나타났다. 한편 biotin-KLH와 streptavidin-HRP conjugate를 이용한 EPBA의 경우에도 검출한계가 0.01 ppb로서 ELISA와 비슷한 검출감도를 보였으며 이는 Finglas 등 (1986)의 보고보다 5 배 가량 높은 검출감도를 나타냈다. 또한, 이들 결과는 모두 MBA에 의한 분석시의 검출감도인 0.1 ppb보다 훨씬 높은 검출감도를 보였다.

그러므로, 식품이나 사료 중에 존재하는 미량비타민인 biotin의 분석에는 생물특이적 반응을 이용한 이들 ELISA나 EPBA가 효과적으로 활용가능한 것으로 생각된다. 현재, 시료 중의 biotin 분석에 이들 방법을 적용하기 위하여 가장 효율적인 biotin의 추출조건 및 분석조건을 계속하여 검토중이다.