

젤 여과, 이온 크로마토그래피와 HPLC에 의한 효모 엑기스내의 비타민의 분석 연구

최인호·¹홍억기·²강환구·†김인호
충남대학교 화학공학과, ¹강원대학교 환경·생물공학부, ²한남대학교 화학공학과
(접수 : 2000. 1. 22., 게재승인 : 2000. 2. 19.)

Characterization of Vitamins in Yeast Extract using Gel Filtration, Ion Exchange Chromatography and HPLC

In Ho Choi, Eock kee Hong¹, Whan koo Kang², In Ho Kim†
Department of Chemical Engineering, Chungnam University, Taejon 305-764, Korea
¹Division of Environmental&Biologieal, Kangwon University, Kangwon 210-702, Korea
²Department of Chemical engineering, Hannam University, Taejon 300-791, Korea
(Received : 2000. 1. 22., Accepted : 2000. 2. 19.)

Complex, ill-defined mixtures of natural origin are often used as nutrients in the production of biological products through microbial fermentation. Product yields are affected by variation in these natural products. Yeast extract is a typical example of these natural products. Since it is a mixture of amino acids, peptides and nucleic acids, its composition is not well characterized. In this study, we investigated the properties of thiamine hydrochloride, riboflavin and pyridoxine hydrochloride in yeast extract by using a gel filtration chromatography, ion exchange chromatography and high performance liquid chromatography. Yeast extract solution was fractionated by gel filtration chromatography and ion exchange chromatography, and then, each fraction was analyzed by using a high performance liquid chromatography.

Key Words : vitamins, thiamine, riboflavin, pyridoxine, yeast extract

서 론

술 제조에 사용된 효모는 인체에 무해한 미생물로 알려져 왔고 효모에서의 추출물은 다양한 용도로 사용되었다. 즉 효모는 단백질, 핵산, 효소, 지질, 비타민의 원료로 사용되어왔다. 효모 엑기스는 이러한 효모의 자기소화에 의해 생산되며, 미생물 발효 배지, 조미료, 건강 식품등의 원료로서 전 세계적으로 큰 시장을 형성하고 있다(1).

효모 엑기스(yeast extract)는 다수의 비타민, 아미노산, 핵산 그리고 펩타이드의 복합체이며 미생물의 성장에 있어서 중요한 물질이다. 특히, B계열의 비타민 복합체의 주요 공급원으로서, 비타민 B₁(thiamine hydrochloride), B₂(riboflavin), B₆(pyridoxine hydrochloride)는 영양학적 관점에서 효모 엑기스내의 중

요한 성분들이다(2). 비타민은 생체의 건강과 성장에 관여하는 기본적인 유기 화합물들이기 때문에 이들에 관한 연구의 필요성이 더욱 커지게 되었다. 최근에는, 여러 나라에서 식품의 구성 성분을 표시하게 하는 법안의 도입과 복합 비타민 의약품의 광범위한 사용으로 인해서 신속하고 신뢰할만한 비타민의 분석방법이 필요하게 되었다(3).

예전에 사용되었던, 복합체에서의 비타민의 분석법은 시약을 사용하여 그들의 반응성에 의한 것들이 많았다. 예를 들면, Berger 등(4)은 potassium hexacyanoferrate(III)를 이용한 화학적 산화방법으로서 thiamine을 형광성을 띠게 하여 분석하였으며, Fujiwara와 Matsui(5)는 가성 소다의 존재하에서 cyanogen bromide를 사용하여 thiamine을 분석하였다. 그러나, 이러한 방법들은 인체에 유해한 cyanogen bromide의 상당한 양이 필요할 뿐만 아니라, 자연 환경에도 비친화적이다(6).

이러한 이유로 인해, high performance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 복합체내에 존재하는 수용성 비타민들을 분석하였다. Argoudelis(7)는 pyridoxine과 그 혼합물들에 관해 연구하였고, Yamanaka 등(6)은 CM-gel HPLC 분석법으로 건조 효모에 존재하는 thiamine을 분석하였으며, Cristina 등(8)은 포

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Chungnam National University, 220 Kungdung, Yusunggu, Tae-
jon 305-764, Korea
Tel . 042-821-5685, Fax . 042-822-8995
E-mail . ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

도주와 그 밖에 식품내에 있는 riboflavin을 연구하였다 Esteve 등(9)은 돼지고기와 돼지고기로 만든 식품에 존재하는 pyridoxine을 분석하였다.

본 연구에서는 HPLC를 이용하여 효모 엑기스내에 존재하는 thiamine hydrochloride, riboflavin, 그리고 pyridoxine hydrochloride의 특성을 조사하였다 Gel filtration chromatography (GFC)와 HPLC에 의한 분석으로서 효모 엑기스내 성분의 분자량 분포를 연구하였으며, ion exchange chromatography(IEC)와 HPLC에 의해서 효모 엑기스 성분의 이온 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

효모 엑기스는 미국의 DIFCO사에서 구입한 제품을 사용하였으며, 비타민 시료 물질인 thiamine hydrochloride, riboflavin 그리고 pyridoxine hydrochloride는 모두 미국의 Sigma사에서 구입한 제품이었으며, 이동상으로는 J T. Baker사의 methanol과 2차 증류한 증류수를 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(FH-0.5 μ m, Division of Millipore, Waters)를 이용하여 여과한 후에 사용하였다.

실험기기

각 비타민과 GFC, IEC를 통해 얻은 효모 엑기스 분획들의 체류 시간은 HPLC를 사용하여 측정하였으며, 실험에서 사용한 HPLC의 기기 구성은 자기 다음과 같다. 펌프는 영인과학 M930이고, detector는 영인과학 M720를 사용하였으며, 사용 파장은 254nm이었다 주입 밸브는 M7725i(with 20 μ l loop, Rheodyne, USA)이었고, 칼럼으로 di-ol Kromasil(4.6 \times 250mm, Eka chemicals, Sweden)을 사용하였다 크로마토그램은 Autochrom data module(영인과학)을 통해서 신호 변환을 거친뒤, Autochrom software를 사용하여 수집 및 분석하였다.

효모 엑기스내에 존재하는 비타민등 구성 성분의 분자량 분포를 측정하기 위한 GFC실험에서 사용한 충전물은 Sephadex G-10 젤이었으며, 유리 칼럼(11.2 \times 500mm)에 충전하여 사용하였다 Spectra/Chrom UV detector를 사용하여 254nm에서 흡광도를 측정하였으며, 크로마토그래피 자료는 Protek 506 module(홍창)과 Protek software를 사용하여 분석하였다.

효모 엑기스내에 존재하는 성분의 이온 특성을 연구하기 위한 IEC실험에서는 CM-cellulose 양이온 교환 젤을 1M NaCl 용액으로 불려서 유리 칸럼(25.2 \times 40mm)에 충전하여 사용하였다. 평형 완충 용액으로 pH=6인 0.02M 인산 완충용액을 사용하였다. IEC실험에서 사용한 기타 장비는 GFC실험에서 사용한 것과 동일한 것이었다.

실험방법

효모 엑기스내에 존재하는 thiamine hydrochloride, riboflavin, pyridoxine hydrochloride의 특성을 조사하기 위해서, 각각의 순수 비타민들을 HPLC를 사용하여 체류 시간을 측정하였다. 이동상의 조성은 water/methanol, 90/10%(v/v)이었으며, 유량은 1.0ml/min으로 고정하였다. 샘플 주입시 각 비타민은 이동상과 동일한 조성의 용액에 용해시켰으며, thiamine hydrochloride는

0.1g/l, riboflavin과 pyridoxine hydrochloride는 10g/l의 농도로 주입하였다

GFC실험에서는 효모 엑기스를 이동상과 동일한 10mM NaCl 용액에 10g/l의 농도로 용해시켜 시료를 만들었다. 시료의 주입 부피는 2.5ml이었으며, 이동상의 유량은 0.2ml/min으로 조절하였다. 분획들의 채취는 5분마다 이뤄졌으며, 얻어진 각 분획들은 HPLC를 사용하여 분석하였다.

효모 엑기스내의 비타민들의 이온 특성을 알아보기 위한 IEC실험에서 주입 농도는 10g/l이었고, 주입 부피는 10ml로 하였다. 각 분획들은 1분마다 얻어졌으며, 얻어진 분획들은 GFC실험에서의 동일하게 HPLC를 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Figure 1은 표준 물질인 thiamine hydrochloride, riboflavin, pyridoxine hydrochloride를 각각 di-ol 칼럼을 사용하여 HPLC로 최적 이동상에서 분석한 결과이다. Thiamine hydrochloride는 약 3분, riboflavin은 약 2.5분 그리고 pyridoxine hydrochloride는 4분의 체류시간을 갖는 것으로 각각 나타났다.

Figure 2는 효모 엑기스를 Sephadex G-10 젤을 충전한 칼럼

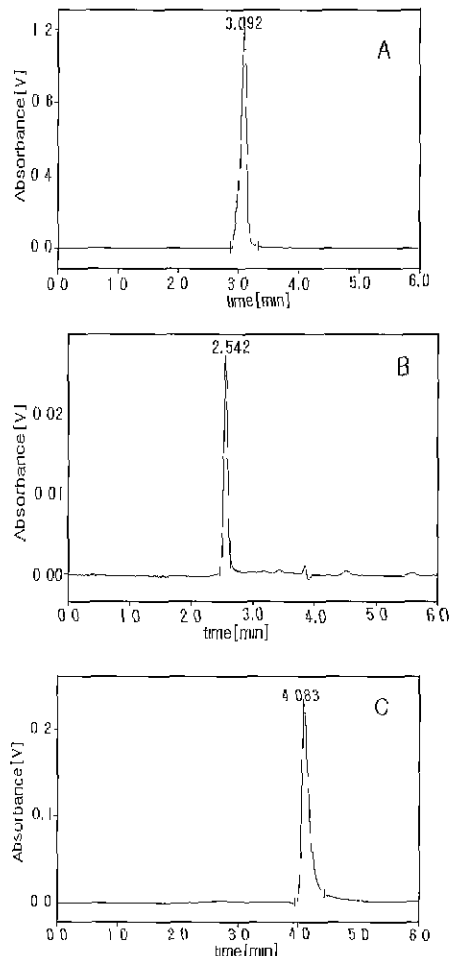


Figure 1. HPLC chromatograms of vitamin. A: thiamin hydrochloride, B: riboflavin, C: pyridoxine hydrochloride (Di-ol column, water/methanol= 90/10 vol.%, inj. vol =20 μ l)

을 사용하여 GFC실험을 한 결과이다. 효모 엑기스는 분자량 분포에 따라 크게 3부분으로 나눌 수 있다. 각 부분에서 얻어진 분획들을 각각 HPLC로 분석하였고, 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. Figure 4는 Figure 2의 각 부분의 성분들이 갖는 분자량 크기를 알아보기 위해 그린 선택도 곡선이다. K_{av} 는 다음과 같이 정의된다.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (1)$$

여기서 V_e 는 각 피크의 용출 부피, V_0 는 틈새 부피, 그리고 V_t 는 칼럼 전체 부피를 나타낸다. Figure 2의 각 피크의 K_{av} 값에 대해 Figure 4와 비교해 보면, part 1의 K_{av} 는 0이어서, 분자량이 700에 가까운 성분들임을 알 수 있다. 또한 part 2의 K_{av} 는 약 0.4로서, 분자량이 350가량인 성분들을 포함하고 있으며, part 3의 K_{av} 는 약 0.8이며, 분자량이 200정도인 성분들을 포함하고 있음을 알 수 있다. 즉, Figure 3A는 분자량이 약 700정도인 성분들을 나타내는 part 1에서 얻어진 분획을 di-ol 칼럼을 사용한 HPLC실험을 한 결과이며, 그들은 약 2.5분과 3.8분의 체류 시간을 갖는 것으로 나타났다. Figure 3B는 약

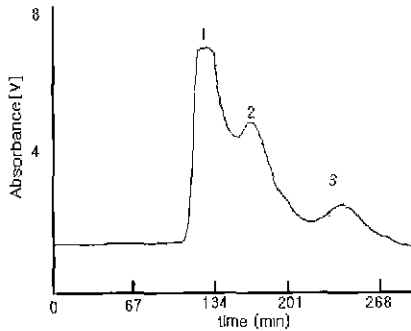


Figure 2. GFC chromatogram of yeast extract (conc of sample=10g/l, loading volume=2.5ml, column volume=50ml, Sephadex G-10 gel)

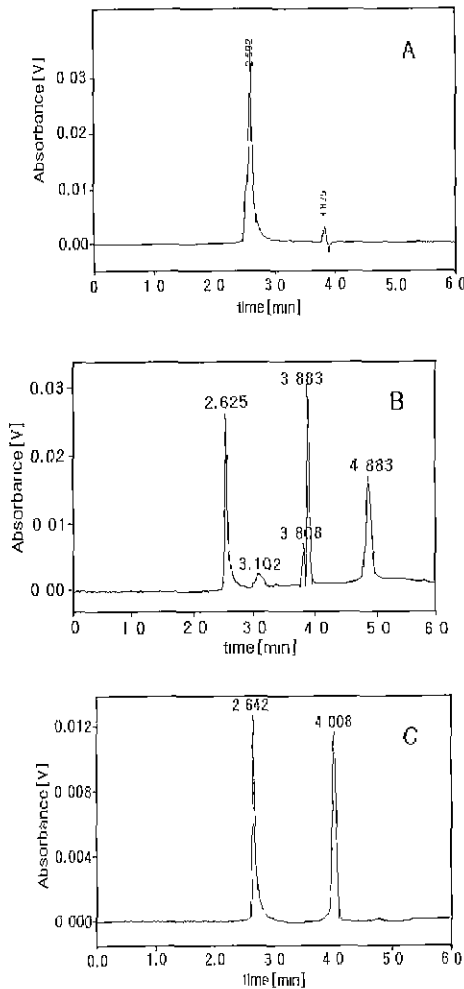


Figure 3. HPLC chromatogram of fractions obtained in Figure 2. A: fraction in part 1, B: fraction in part 2, C: fraction in part 3 (Di-ol column, water/methanol=90/10 vol.%, inj. vol.=20μl)

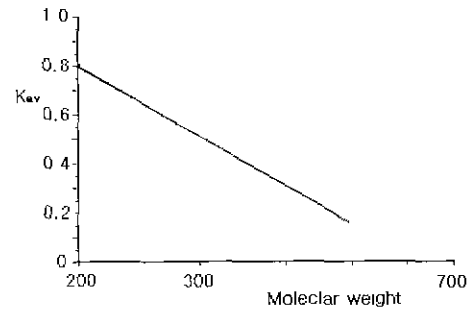


Figure 4. Selectivity curve of Sephadex G-10

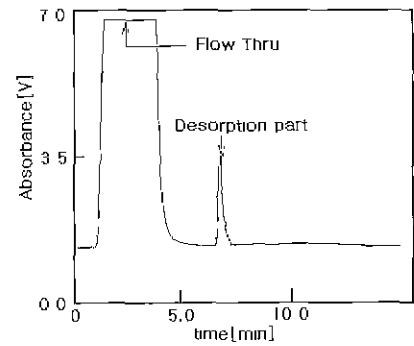


Figure 5. IEC chromatogram of yeast extract. (conc of sample=10g/l, loading volume=10ml)

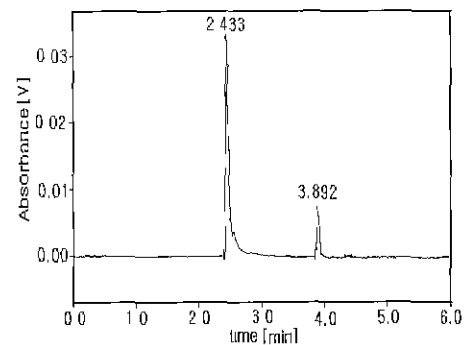


Figure 6. RP-HPLC chromatogram of fraction from desorption part in Figure 5 (Di-ol column, water/methanol=90/10 vol.%, inj. vol.=20μl)

350정도의 분자량을 갖는 성분들을 나타내는 part 2로부터 얻어진 분획을 di-o 칼럼을 사용한 HPLC실험을 한 결과를 나타낸 것이며, 그들은 각각 2.6분, 3.1분, 3.8분, 3.9분 그리고 4.9분의 체류 시간을 갖는 것으로 나타났다. 또한 분자량이 약 200정도로 나타나는 part 3에서 얻어진 분획을 앞에서와 동일하게 HPLC실험을 행한 결과를 Figure 3C에 나타냈으며, 그들은 각각 약 2.6분과 4분의 체류 시간을 갖는 것으로 나타났다.

Figure 3의 결과를 thiamine hydrochloride, riboflavin 그리고 pyridoxine hydrochloride의 앞에서의 HPLC실험 결과(Figure 1)과 비교하면, 분자량이 각각 337, 376인 riboflavin과 thiamine hydrochloride는 Figure 2의 part 2에 속하는 성분이며, 또한 205의 분자량을 갖는 pyridoxine hydrochloride는 part 3에 존재함을 알 수 있다. 또한 Figure 3에서도 나타나듯이, 약 2.6분 부근의 체류 시간을 갖는 성분들은 상당히 넓은 분자량 분포를 갖고 있음을 알 수 있다.

Figure 5는 효모 엑기스를 CM-cellulose 양이온 교환 젤을 충전한 칼럼을 사용한 IEC실험 결과를 나타낸 것이다. 효모 엑기스내에서 양이온으로서 존재하는 성분들을 나타내는 desorption part에서 얻어진 분획을 di-o 칼럼을 사용한 HPLC의 실험 결과를 Figure 6에 나타내었다. Figure 6의 결과를 표준물질인 thiamine hydrochloride, riboflavin 그리고 pyridoxine hydrochloride의 앞에서의 HPLC실험 결과(Figure 1)과 비교하면, 효모 엑기스내에서 riboflavin은 양이온으로서 존재함을 알 수 있다. 특히, Yamanaka 등의 건조 효모내의 thiamine hydrochloride의 특성 연구에 의하면(6), thiamine hydrochloride는 pH가 3이하 그리고 6이상일 경우에는 양이온 교환 젤에 흡착되지 않으며 pH가 4.5일 경우에 완전히 흡착되는 것으로 나타났다. 본 연구에서 행한 IEC실험에서의 pH는 6이었는데, 이러한 pH의 영향으로 인하여 thiamine hydrochloride는 CM-cellulose 양이온 교환 젤에 흡착되지 않은 것임을 알 수 있었다.

요 약

효모 엑기스내에 존재하는 thiamine hydrochloride, riboflavin 그리고 pyridoxine hydrochloride의 분자량 분포 특성과 이온 특성을 GFC, IEC 그리고 HPLC를 이용하여 알아보았다. Sephadex G-10 젤을 충전한 칼럼을 사용한 GFC실험과 di-o 칼럼을 사용한 HPLC실험을 통하여 효모 엑기스내의 thia-

mine hydrochloride, riboflavin 그리고 pyridoxine hydrochloride의 분자량 분포 특성을 연구하였고, CM-cellulose gel을 사용한 IEC실험과 HPLC실험을 통하여 각 비타민들의 효모 엑기스내에서의 이온 특성을 연구하였다. 본 연구의 결과로서는 효모 엑기스내에 존재하는 thiamine hydrochloride와 riboflavin은 그 분자량이 각각 337, 376으로서, 중간 정도의 분자량 분포를 갖는 성분임을 알 수 있었고 205의 분자량을 갖는 pyridoxine hydrochloride는 작은 분자량 분포대에 나타났다. 또한 riboflavin은 pH가 6일 때에, 효모 엑기스내에서 양이온의 형태로 존재하고 thiamine hydrochloride는 CM-cellulose 양이온 교환 젤에 흡착되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Choi, S. J., B. H. Jung (1998), Simultaneous Production Process of Invertase and Yeast Extract from Baker's Yeast, *Korean J. of Biotechnology and Bioengineering*, **13**, 308.
2. Anna, K. K. (1990), *Yeasts and Yeast-like Organisms*, 1st ed., pp131-205, VCH Press, New York.
3. Wills, R. B. H., C. G. Show and W. R. Day(1977), Analysis of Water Soluble Vitamins by High Pressure Liquid Chromatography, *J. of Chrom. Sci.* **15**, 262-266
4. Berger, G., F. Bergel and A. R. Todd(1935), Conversion of Thiamine into Thiochrom by Using Potassium Hexacyanoferrate(III), *Nature*, p136.
5. Fujiwara, M. and K. Matsui(1953), Conversion of Thiamine into Thiochrom by Using Cyanogen Bromide in the Presence of Sodium Hydroxide *Anal. Chem.*, **25** 810.
6. Yamanaka Kenta, Masayuki Matsuoka and Kiyoshi Banno (1996), Determination of Thiamine in Dried Yeast by High-Performance Liquid Chromatography Using a Clean-up Column of CM-cellulose, *J. of Chrom. A* **726**, 237-240.
7. Argoudelis, C. J. (1997), Simple High-Chromatographic Method for the Determination of All Seven Vitamin B₆-related Compounds, *J. of Chrom. A* **790**, 83-91.
8. Cristina A., F. Mattivi and D. Tonin(1998), Determination of Riboflavin, Flavin Mononucleotide and Flavin-Adenine Dinucleotide in Wine and Other Beverage by High performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *J. of Chrom. A* **823**, 355-363.
9. Esteve, M. J., A. Frigola and J. M. Garcia-Cantabella(1998), Determination of Vitamin B₆(pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) in Pork Meat and Pork Meat Products by Liquid Chromatography, *J. of Chrom. A* **795**, 383-387.
10. Elizabeth Hill(1978), *Gel Filtration Theory and Practice*, p32, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.