

## α-아세토락테이트디카복실라아제

### α-Acetolactate decarboxylase

**정 의** 이 품목은 *Bacillus brevis*의 α-아세토락테이트디카복실라아제 유전자가 삽입된 *Bacillus subtilis*의 배양물에서 얻어진 효소이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다. 이 품목은 α-아세토락테이트의 카복실기를 디카복실화하여 아세트인과 이산화탄소를 생성한다.

**성 상** 이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.

**확인시험** 이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

**순도시험** (1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 4.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(3) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 살모넬라에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물

시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

### 활성시험법(역가)

분석원리 : 본 역가시험은 아래의 시험조작 조건하에서  $\alpha$ -아세토락테이트디카복실라아제를  $\alpha$ -아세토젯산에 작용시켜 생성된 아세트인을 1-나프톨 및 크레아틴의 혼합물과 정색반응을 시켜 반응물의 흡광도를 측정하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체를 MES · Brij35 · 염화나트륨의 혼합액에 녹여 최종 희석액 1mL가 0.025~0.075 ADU를 함유하도록 시험용액을 조제한다.

시험조작 : 시험용액, MES완충액 및 기질용액을 30℃수욕조에서 미리 10분간 항온시킨다. 효소공시험용(B<sub>1</sub>)은 시험용액 0.2mL 및 MES완충액 0.2mL를 각각 정확히 취하여 시험관에 넣고 흔들어 섞어 준 다음 즉시 30℃에서 정확히 20분간 방치한다. 효소시험용(H<sub>1</sub>)은 시험용액 0.2mL 및 기질용액 0.2mL를 각각 정확히 취하여 시험관에 넣고 흔들어 섞어 준 다음 즉시 30℃에서 정확히 20분간 방치한다. 완충액공시험용(B<sub>2</sub>)는 MES · Brij35 · 염화나트륨의 혼합액 0.2mL 및 MES완충액 0.2mL를 각각 정확히 취하여 시험관에 넣고 흔들어 섞어 준 다음 즉시 30℃에서 정확히 20분간 방치한다. 완충액시험용(H<sub>2</sub>)는 MES · Brij35 · 염화나트륨의 혼합액 0.2mL 및 기질용액 0.2mL를 각각 정확히 취하여 시험관에 넣고 흔들어 섞어 준 다음 즉시 30℃에서 정확히 20분간 방치한다. 정확히 20분 후에 각각의 시험관에 발색액 4.6mL씩을 가

해주고 흔들어 혼합한 다음 실온에서 정확히 40분간 방치한 후 파장 522nm에서 흡광도를 측정하여 효소공시험액(B<sub>1</sub>), 효소시험액(H<sub>1</sub>), 완충액공시험액(B<sub>2</sub>) 및 완충액시험액(H<sub>2</sub>)의 흡광도를 각각 측정한다.

검량선의 작성 : 미리 아세트인 0.1g을 정밀히 달아 물을 가하여 100mL로 하고, 이 액 1, 2, 4, 6 및 8mL를 각각 정확히 취하여 각각에 물을 가하여 100mL씩으로 한다. 이 액 0.4mL씩을 정확히 취하여 각 시험관에 넣고 발색액 4.6mL 씩을 가해주고 흔들어 혼합한 다음 실온에서 정확히 40분간 방치한 후 파장 522nm에서 각각의 흡광도를 측정하고 아세트인의 농도(μg/mL)에 대한 검량선을 작성한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(ADU/g)} = \frac{\Delta A \times F}{88.1} \times 5.0 \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{1}{W}$$

ΔA : (H<sub>1</sub>-B<sub>1</sub>) - (H<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>)

F : 검량선으로부터 구한 흡광도 1 당 아세트인의 농도(μg/mL)

88.1 : 아세트인의 분자량

5.0 : 최종 반응액의 양(mL)

20 : 반응시간(분)

0.2 : 시험용액의 채취량(mL)

W : 시험용액 1mL에 함유된 검체의 양(g)

역가의 정의 : 1 α-Acetolactate decarboxylase unit(ADU)는 상기 시험조건 하에서 1분간에 1μmol의 아세트인을 유리시키는 효소의 양이다.

## 시 액

MES완충액(0.05M, pH 6.0) : MES[2-(*N*-Morpholino)ethanesulfonic acid] 9.76g을 900mL의 물에 녹인 다음 1N 수산화나트륨용액으로 pH를 6.0으로 조절하고 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이 액은 상온에서 2주간 안정하다.

15% Brij35용액 : Brij35(Polyoxyethylene lauryl ether) 15.0g에 물 70mL를 가해주고 60°C로 가온하면서 녹여 주고 식히 다음 물을 가하여 100mL로 한다. 이 액은 냉장 보존시에 2개월간 안정하다.

MES · Brij35 · 염화나트륨의 혼합액 : MES 48.8g 및 염화나트륨 175.32g을 약 4,500mL의 물에 녹이고 이에 15% Brij35용액 17mL를 가해 주고 1N 수산화나트륨용액으로 pH를 6.0으로 조절한 후 물을 가하여 5,000mL로 한다. 이 액은 상온에서 2주간 안정하다.

기질용액 : 50mL플라스크에 Ethyl-2-acetoxy-2-methylacetolactate (Aldrich No. 220396 또는 이와 동등한 것) 100 $\mu$ L를 취하여 넣고 0.5N 수산화나트륨용액 6mL를 가한 다음 20분간 저어주면서 용해한다. 이에 MES완충액 40mL를 가해 주고 0.5N 염산으로 pH를 6.0으로 조절한 다음 MES완충액을 가하여 50mL로 한다. 이 액은 사용 시 조제한다.

발색액 : 1-나프톨(1-Naphthol) 5.0g 및 크레아틴(Creatine) 0.5g을 1N 수산화나트륨용액에 녹여 500mL로 한다. 이 액은 사용 시 조제한다.

## 보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.