

## 아스파라지나아제

### Asparaginase

**정 의** 이 품목은 *Aspergillus oryzae* 및 *Aspergillus niger*의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

이 품목은 L-아스파라진을 가수분해하여 L-아스파르트산과 암모니아를 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 살모넬라균시험법에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목 25g을 취하여 「식품의 기준 및 규격」 일반시험

법의 미생물시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

## 활성시험법(역가)

*Aspergillus oryzae*의 배양물에서 얻어진 효소제는 제 1 법, *Aspergillus niger*의 배양물에서 얻어진 효소제는 제 2 법을 각각 적용한다.

### 제 1 법

분석원리 : 본 역가시험은 pH 7.0, 온도 37°C에서 L-아스파라진(L-asparagine)의 가수분해로 생성된 암모니아를 측정하는 방법으로 이 때 생성된 암모니아는  $\alpha$ -ketoglutarate와 결합하여 L-글루탐산을 생성하며, 이 과정에서 소비되는 NADH(Nicotineamide adenine dinucleotide, reduced)의 소비량을 측정하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체 일정량을 취하여 최종 희석액 1mL가 0.4~1.0 ASNU를 함유하도록 MOPS완충액으로 희석한 액을 시험용액으로 한다 (흡광도가 약 0.10~0.25의 범위가 되도록 조정한다).

시험조작 : 기질용액 2.4mL를 시험관에 넣고 37±0.1°C의 수욕조에서 미리 10분간 방치한 후 시험용액 0.1mL를 가해주고 즉시 흔들어서 섞은 다음 1mL를 정확히 취하여 액층 1cm 셀에 넣고, 미리 항온시켜 둔 Triton X-100을 함유한 0.1M MOPS완충액(pH 7.0)을 공시험용으로 하여 파장 340nm에서 흡광도를 신속하게 측정한다. 반응시작 시점으로 부터 3분에서 5분까지 2분간 10초 간격으로 흡광도를 측정한다(반응시작 시점의 흡광도는 2.3~2.8 범위가 되어야 하며, 2.3 이하인 경

우는 기질용액을 새로 조제한다). 시험조작을 상기와 동일하게 2회 이상 반복하여 분당 흡광도 곡선의 기울기( $\Delta A/\text{min}$ )를 구한다. 이 때 기울기는 15% 이내에서 일치하여야 한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(ASNU/g)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times 2.5 \times D}{0.1 \times 6.3 \times 1 \times W}$$

- $\Delta A/\text{min}$  : 시험용액의 분당 흡광도 감소값
- 2.5 : 최종반응액의 양(mL)
- D : 검체의 희석배수
- 0.1 : 사용된 시험용액의 양(mL)
- 6.3 : NADH의 흡광계수( $\text{mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
- 1.0 : 흡광셀의 길이(cm)
- W : 검체의 채취량(g)

역가의 정의 : 1 Asparaginase unit(ASNU)는 상기시험조건 하에서 1 분당  $1\mu\text{mol}$ 의 암모니아를 생성하는 효소의 양이다.

#### 시 액

4M 수산화나트륨용액 : 수산화나트륨 16g에 물을 가하여 100mL로 하고 완전히 녹을 때까지 흔들어 준다.

0.1M MOPS완충액(pH 7.0) : MOPS(Sigma M1254 또는 이와 동등한 것) 20.9g을 물 약 950mL에 녹이고 4M 수산화나트륨용액으로 pH를 7.0으로 맞춘 후 Triton X-100 (Sigma T9284 또는 이와 동등한 것) 1mL를 가한 다음 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이 액은 사용 시 조제한다.

기질용액 : L-아스파라진(Sigma A7094 또는 이와 동등한 것) 0.25g을

달아 25mL 플라스크에 넣고, 이에 MOPS완충액(pH 7.0) 20mL를 가하여 완전히 용해시킨 후 NADH(Roche 107735 또는 이와 동등한 것) 0.011g을 가한다. 다시 이에  $\alpha$ -ketoglutarate(Sigma K3752 또는 이와 동등한 것) 0.063g과 Glutamate dehydrogenase(Fluka 49392 또는 이와 동등한 것) 2,000단위 이상을 가해 주고 MOPS완충액(pH 7.0)을 가하여 25mL로 한다. 이 액 1mL에는 L-asparagine 10mg,  $\alpha$ -ketoglutarate 2.5mg, NADH 0.44mg, Glutamate dehydrogenase 80 Unit 이상이 함유되어 있다. 이 용액은 상온에서 2시간 동안 안정하다.

## 제 2 법

분석원리 : 본 역가시험은 L-asparagine 가수분해로 생성된 암모니아를 측정하는 방법으로, 이 때 생성된 암모니아를 페놀-니트로프루시드(phenol nitroprusside)용액과 알카리성차아염소산염(alkaline hypochlorite)과 반응시켜 나타나는 청색의 흡광도를 파장 600nm에서 측정하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 검체 일정량을 취하여 0.1M 구연산완충액(pH 5.0)을 사용하여 최종 희석액 1mL가 6 ASNU를 함유하도록 시험용액을 조제한다.

검량선의 작성 : 황산암모늄 3.0g을 정밀히 달아 0.1M 구연산완충액(pH 5.0) 40mL에 교반하여 녹인 다음 50mL로 하고, 이 액 1mL, 2mL, 5mL, 10mL 및 15mL를 정확히 취하여 0.1M 구연산완충액(pH

5.0)을 가하여 각각 50mL로 한 액을 각 표준용액으로 한다. 각 액 1mL는 1.2, 2.4, 6, 12 및 18mg/mL의 황산암모늄을 함유한다. 5개의 시험관에 기질용액 2mL를 넣고  $37\pm 0.1^{\circ}\text{C}$  수욕조에서 미리 10분간 항온시킨 다음, 각각의 표준용액 0.1mL를 정확히 취하여 넣고 즉시 흔들어 섞어 주고  $37\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 에서 정확히 30분간 방치한다. 삼염화초산용액 0.4mL를 가하고 흔들어 섞은 다음 물 2.5mL를 가하여 반응액으로 한다. 별도의 시험관에 물 0.8mL를 넣고 반응액 20 $\mu\text{L}$ 를 가하여 섞어주고 페놀-니트로프루시드용액 170 $\mu\text{L}$ 를 넣고 섞어준 후 0.2% 알칼리성차아염소산용액 170 $\mu\text{L}$ 를 가하여 섞어준다. 각 액을  $37\pm 0.1^{\circ}\text{C}$  수욕조에서 10분간 방치한 다음 파장 600nm에서 흡광도를 측정하고 표준용액의 농도 (mg/mL)에 대한 검량선을 작성한다.

시험조작 : 기질용액 2mL를 정확히 취하여 시험관에 넣고  $37\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 의 수욕조에서 미리 10분간 항온시킨 다음, 시험용액 0.1mL를 가해주고 즉시 흔들어 섞어 준 후  $37\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 에서 정확히 30분간 방치한다. 삼염화초산용액 0.4mL를 가하고 흔들어 섞은 다음, 물 2.5mL를 가하여 반응액으로 한다. 별도의 시험관에 물 0.8mL를 넣고 반응액 20 $\mu\text{L}$ 를 가하여 섞어주고 페놀-니트로프루시드용액 170 $\mu\text{L}$ 를 넣고 섞어준 후 0.2% 알칼리성차아염소산용액 170 $\mu\text{L}$ 를 가하여 섞어준다. 이 액을  $37\pm 0.1^{\circ}\text{C}$  수욕조에서 10분간 방치한 다음 파장 600nm에서 효소반응액의 흡광도( $A_T$ )를 측정한다. 따로, 시험관에 기질용액 2mL와 삼염화초산용액 0.4mL를 가하고 흔들어 섞은 다음 시험용액 0.1mL를 가하여

37±0.1℃에서 정확히 30분간 방치한 후, 물 2.5mL를 가하고 별도의 시험관에 물 0.8mL를 넣고 반응액 20μL를 가하여 섞어주고 페놀-니트로프루시드용액 170μL를 넣고 섞어준 후 알칼리성차아염소산용액 170μL를 가하여 섞어준다. 이 액을 37±0.1℃수욕조에서 10분간 방치한 다음 파장 600nm에서 효소공시험용액 흡광도(A<sub>B</sub>)를 측정한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가(ASNU/g)를 구한다.

$$\text{역가(ASNU/g)} = \frac{(A_T - A_B) \times V \times D \times 2 \times 10^6}{a \times 132.14 \times W \times 30 \times 10^3}$$

A<sub>T</sub> : 효소반응액의 흡광도

A<sub>B</sub> : 효소공시험용액의 흡광도

V : 시험용액의 초기 부피(mL)

D : 검체의 희석배수

a : 검량선의 기울기(mL/mg)

W : 검체의 채취량(g)

30 : 반응시간 (분)

역가의 정의 : 1 Asparaginase unit(ASNU)는 상기시험조건 하에서 1분당 1μmol의 암모니아를 생성하는 효소의 양이다.

시 액

기질용액 : L-아스파라진(1수염) 1.5g을 0.1M 구연산완충액(pH 5.0) 80mL에 완전히 녹인 후 100mL로 한다. 이 액은 사용 시 조제한다.

4M 수산화나트륨용액 : 수산화나트륨 160g을 물 800mL에 녹인 후 물을 가하여 1,000mL로 한다.

0.1M 구연산완충액(pH 5.0) : 구연산(1수염) 21.01g을 물 900mL에 녹인 후 4M 수산화나트륨용액으로 pH를 5.0로 조정한 후 물을 가하여 1,000mL로 한다.

삼염화초산용액 : 삼염화초산 25g을 물을 가하여 100mL로 한다.

### **보존기준**

냉암소에서 밀봉 보관하여야 한다.