

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0152590
(43) 공개일자 2023년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 30/72 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 30/7233 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0053928

(22) 출원일자 2023년04월25일

심사청구일자 2023년04월25일

(30) 우선권주장

1020220052368 2022년04월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김경현

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 삼풍아파트 18동 805호

정인호

경기도 수원시 영통구 영통로 498, 134동 804호(영통동, 황골마을1단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 액체크로마토그래피/질량분석법에 의한 효모의 보조인자 정량분석 방법

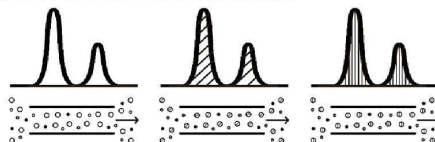
(57) 요약

본 발명은 액체크로마토그래피/질량분석법에 의한 효모의 보조인자 정량분석 방법에 관한 것으로, 효모 세포 내 보조인자를 추출 시 저온 메탄올 켄칭 보다 고속여과법으로 실시하는 것이 추출 효율을 높일 수 있을 뿐만 아니라, pH 7.5-8.0의 용매에서 역상 용리 다공성 흑연성 탄소 소재의 컬럼으로 액체크로마토그래피/질량스펙트럼 분석법으로 보조 인자를 최적화하여 정량 분석할 수 있다.

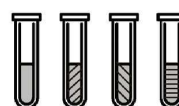
대표도 - 도5

A. Setting for analytical conditions

1) Comparison of columns and elution conditions



2) Comparison of solvents



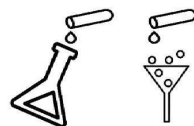
*Optimal analytical conditions

Columns and elution: Hypercarb with reverse phase elution

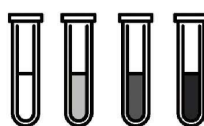
Solvent: Acetonitrile:methanol:water mixture (4:4:2; v/v/v) containing 15 mM ammonium acetate buffer (pH 7.77)

B. Setting for extraction methods from *S. cerevisiae*

1) Comparison of quenching methods



2) Comparison of extraction solvents



*Optimal extraction methods

Quenching method: Fast filtration

Extraction solvent: Acetonitrile:water mixture (1:1; v/v)

(72) 발명자

김정연

서울특별시 동대문구 신이문로8길 44, 2층(이문동)

정유은

경기도 수원시 영통구 에듀타운로 65, 5203동 1802호(이의동, 자연앤자이)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545024879

과제번호 321036052SB010

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치 식품기술개발

연구과제명 마이크로바이옴 타겟 포스트바이오틱스 발굴 및 소재화 기술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교산학협력단

연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

효모 세포 내 보조인자(cofactor)를 액체크로마토그래피/질량분석법(LC/MS)으로 분석하는 방법에 있어서,

상기 효모는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)이며,

상기 분석은 pH 7.5-8.0의 용매에서 역상 용리 다공성 흑연성 탄소 소재의 컬럼으로 실시하는 것을 특징으로 하는

효모 세포 내 보조인자(cofactor)의 분석 방법

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 보조인자는 AMP, ADP, ATP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, CoA, 아세틸-CoA(acetyl-CoA), 부티릴-CoA(butyryl-CoA), DL-β-하이드록시부티릴-CoA(DL-β-hydroxybutyryl-CoA), 크로토닐-CoA(crotonyl-CoA), 헥사노일-CoA(hexanoyl-CoA), 말로닐-CoA(malonyl-CoA) 및 숙시닐-CoA(succinyl-CoA)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 효모는 사카로마이세스 세레비시아 BY4741 (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741)인 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 보조인자는 고속여과법(fast filtration)으로 추출된 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 추출 시 용매는 아세토니트릴과 물을 혼합한 것인 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 용매는 아세트산 암모늄 완충액과 아세토니트릴:메탄올:물의 혼합물과 용해하여 제조된 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 질량 분석기는 음성 모드에서 이온 페어링 시약을 사용하지 않는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 액체크로마토그래피/질량분석법에 의한 효모의 보조인자 정량분석 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아데노신 뉴클레오타이드, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드 그리고 아세틸-코엔자임 A (Co-A) 같은 보조인자들은 살아있는 유기체의 이화작용과 동화작용에서 중추 역할을 하는 분자들이다. 아데노신 뉴클레오타이드들은 인산화를 통해 에너지를 전달하고 니코틴아마이드 아데노신 디뉴클레오타이드들은 산화/환원을 통해서 파워를 운반하며 그리고 아실-CoA(acyl-CoA)는 다양한 유닛들을 운반하고 중합을 촉진한다. 살아있는 유기체들은 세포 내에서 항상성 유지와 재생을 가능하게 하기 위해서 이러한 보조인자들을 적정 수준으로 유지한다. 유기체 내에서 환경적, 유전적 변화에 반응해서 이러한 보조인자 수치의 균형을 유지하는 것은 신진대사 흐름을 다양하게 하고 다양한 화학 물질의 생산과 같은 표현형의 변화 또는 질병의 발달로 이끌 수 있다. 그러므로 살아있는 유기체에서 질병의 병리 생리학을 이해하고 가지있는 화합물질들의 생성하기 위해 보조인자 수치를 분석하는 것은 중요하다.

[0004] 대부분 보조인자들은 주요 대사물질들 보다 무거운 질량을 가지고 있으며 인산염이나 아실기들이 쉽게 분리될 수 있기 때문에 불안정하다. 보조인자 분석을 위해 자외선 탐지를 가진 고성능 액체 크로마토그래피, 모세관 전기이동, 핵자기공명 그리고 효소 처리 방법이 있다. 이것들 중, 액체 크로마토그래피/질량 분광 분석이 높은 민감도와 특수성을 가진 큰 분자들을 분석할 수 있기 때문에 보조인자의 식별과 정량화를 위해 가장 빈번하게 사용되는 방법이다. 지금까지 LC/MS를 이용한 보조인자 분석 방법이 많이 보고되어 왔다. 그러나 아직 해결되지 않은 4가지 주요 문제점이 있다. 일반적으로 LC/MS 분석은 이온 페어링 시약이 포함된 비극성 C-18 컬럼을 사용하는 양성(positive) 모드에서 수행된다. 그러나 이온 페어링 시약은 MS 내에서 이온화되고 이온 역제를 유발해 이온화 효율, 정확성 안정성에 악영향을 끼친다. 게다가 이온 페어링 시약에 의한 양성 모드의 일상적인 작업은 질량 분석기에 있는 이온 페어링 시약 잔류물들을 제거하기 위한 초기 단계에서 유지 보수, 청소 과정을 증가시킨다. 또한, 내부 렌즈들이나 쿼드루폴을 오염시키고 지속적으로 질량분석기에 피해를 입힌다. 두 번째로 보조인자 식별을 위한 다양한 분석 방법들이 보고되었지만 정성, 정량 능력은 동시에 비교되지 않았다. Hypercarb 컬럼, ACQUITY BEH Amide 컬럼 그리고 ZIC-pHILIC 컬럼과 같이 이온 페어링 시약의 사용 없이 보조인자를 식별하는 컬럼들은 극성 컬럼이다. Rost et al.은 ZIC-pHILIC 컬럼과 ACQUITY BEH amide 컬럼 사이에서 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오타이드의 정성 정량 능력을 비교하였다[비특허문헌 1]. 그러나 그들의 보고는 특정 컬럼 그리고 특정 보조인자에 국한되어 있다. 세 번째, 다양한 보조인자들을 동시에 정량화하고 식별하는 연구가 거의 없었다. 오직 Fu et al이 LC/MS로 몇몇 아데노신 뉴클레오타이드, 니코틴 아데닌 디뉴클레오타이드 그리고 아실-CoA를 동시에 분석하였다[비특허문헌 2]. 그러나 이 연구는 이온 페어링 시약을 사용한 양성 모드에서 분석하고 다른 분석 방법들과 그것을 비교하지 않았기 때문에 이 방법을 사용한 일상 작동은 청소 같은 상당한 유지 보수를 수반하고 MS의 수명을 단축시킨다. 또한, 이 연구에서는 탐지의 한계(LoD), 정량의 한계(LoQ)를 보고하지 않았다. 그리고 다른 방법들과 분석 능력을 비교하는데 어려움이 있다. 마지막으로 보조인자의 안정적인 보존을 위한 용매 상태가 오직 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오타이드 또는 아세틸-CoA, 말로닐-CoA와 같은 몇몇 아실-CoA를 위해 조사되었기 때문에 다양한 보조인자들을 보존하기 위한 최적의 용매가 조사되어야 한다. 가능한 많은 아데닌 뉴클레오타이드, 니코틴아마이드 아데노신 디뉴클레오타이드 아실-CoA를 동시에 식별하고 정량화하기 위해서, 컬럼과 용매 같은 LC/MS 방법들을 체계적으로 비교해 최적의 방법을 보고할 필요가 있다.

[0005] 다음으로, 살아있는 유기체로부터 보조인자를 추출하는 방법의 최적화하는 분석만큼이나 중요하다. 살아있는 유기체로부터 대사산물을 추출하는 것은 다음 단계를 포함한다. 1) 대사활동을 중지하고 대사산물의 변형을 보호하는 쿨링 단계 그리고 2) 세포막 투과성을 증가시키고 세포로부터 대사산물을 빼내는 추출 단계. 각 단계는 대사산물을 추출하는 수율과 관련 있다. 세포 내 보조인자의 농도를 정확하게 반영하기 위해서 추출 효율을 높이는 것은 필수적이다. *Saccharomyces cerevisiae*는 "일반적으로 안전한 것으로 인식(GRAS)"되어 있다. 그리고 가지있는 화합물질을 합성하거나 생물학 치료에서 가장 널리 사용되는 효모이다. 현재 대부분의 연구에서 *S. cerevisiae*에서 보조인자들을 추출하기 위해, 대사 활동은 저온 메탄올 쿨링을 통해 정지되고 대사체들은 메탄

을 그리고 끓는 에탄올과 같이 세포 투과성을 증가시키는 다양한 용매를 사용해서 추출된다. 그러나 저온 메탄올 켄칭은 *S. cerevisiae* 세포막 손상으로 인한 유출을 야기한다. 이 과정은 추출 단계 이전에 대사산물을 세포 밖으로 방출시켜 대사체 추출 수율은 상당히 낮추는 것으로 알려져 있다. 그러므로 보조인자 수율을 매우 낮출 것이다. 또한, 비특허문헌 3은 *S. cerevisiae*에서 누수 없이 극성 대사산물 추출을 할 때 저온 메탄올 켄칭 대신 고속 여과 방식으로 대체하는 것을 제안하였다. 추출 단계 효율은 유기체, 용매 그리고 대사산물의 종류에 달려있고 이 중에서 가장 중요한 요소는 용매 속에서 대사체의 용해성과 안정성이다. 보조인자는 매우 극성이고 용매의 온도와 pH에 극도로 민감하므로 적절한 온도와 pH에서 용매의 극성 추출은 아마 보조인자 추출에 안정적이다. 그러나 *S. cerevisiae*의 보조인자를 위한 추출 용매의 효율성은 체계적으로 아직 비교가 되지 않았고 편리한 추출 용매인 순수한 메탄올 그리고 끓는 에탄올을 포함해서 다양한 종류의 추출 용매가 여전히 사용되고 있다. 최소 손실로 *S. cerevisiae*의 보조인자를 추출하기 위해 켄칭과 추출 방법의 최적화가 필수적이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006]

(비특허문헌 0001) L.M. Rost, A. Shafaei, K. Fuchino, P. Bruheim, Zwitterionic HILIC tandem mass spectrometry with isotope dilution for rapid, sensitive and robust quantification of pyridine nucleotides in biological extracts, J. Chromatogr. B 1144 (2020) 122078.

(비특허문헌 0002) X. Fu, S. Deja, B. Kucejova, J.A.G. Duarte, J.G. McDonald, S.C. Burgess, Targeted determination of tissue energy status by LC-MS/MS, Anal. Chem. 91 (2019) 5881-5887.

(비특허문헌 0003) S. Kim, D.Y. Lee, G. Wohlgemuth, H.S. Park, O. Fiehn, K.H. Kim, Evaluation and optimization of metabolome sample preparation methods for *Saccharomyces cerevisiae*, Anal. Chem. 85 (2013) 2169-2176.

(비특허문헌 0004) W. Lu, L. Wang, L. Chen, S. Hui, J.D. Rabinowitz, Extraction and quantitation of nicotinamide adenine dinucleotide redox cofactors, Antioxid. Redox Signal. 28 (2018) 167-179.

(비특허문헌 0005) J.M. Buescher, S. Moco, U. Sauer, N. Zamboni, Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites, Anal. Chem. 82 (2010) 4403-4412.

(비특허문헌 0006) R.R. Gilibili, M. Kandaswamy, K. Sharma, S. Giri, S. Rajagopal, R. Mullangi, Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantitation of acetyl-CoA and malonyl-CoA in animal tissues, Biomed. Chromatogr. 25 (2011) 1352-1359.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명자들은 높은 정확성으로 가능한 많은 보조인자를 동시에 인식하고 정량화하기 위해서 다양한 이온 페어링 시약 없이 음성(negative) 모드에서 LC/MS를 사용하는 분석 방법을 평가하고 최적의 조건을 연구하였다. 게다가, *S. cerevisiae* 유래 대부분의 보조인자들을 추출할 수 있는 최적의 방법을 결정하기 위해 체계적으로 켄칭과 추출 용매 방법들을 평가하였다. 이를 달성하기 위해 아데노신 뉴클레오티드, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드 그리고 다양한 아실-CoA를 포함하는 15개 보조인자를 선택하고, 보조인자를 정확하게 식별하고 정량화 하기 위해서 Orbitrap LC/MS를 사용하였다. 최근에 합성 생물학에서 가장 널리 사용되는 효모인 야생형 *S. cerevisiae* 을 사용하였다.

[0008]

이로서, 본 발명자들은 효모 세포 내 보조인자(cofactor)를 추출하고 액체크로마토그래피/질량분석법(LC/MS)으로 분석하는 최적의 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009]

따라서, 본 발명은 효모 세포 내 보조인자(cofactor)를 액체크로마토그래피/질량분석법(LC/MS)으로 분석하는 방법에 있어서,

[0010]

상기 효모는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)이며,

[0011] 상기 분석은 pH 7.5-8.0의 용매에서 역상 용리 다공성 흑연성 탄소 소재의 컬럼으로 실시하는, 효모 세포 내 보조인자(cofactor)의 분석 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 효모 세포 내 보조인자(cofactor)를 액체크로마토그래피/질량분석법(LC/MS)으로 분석하는 방법에 관한 것이다.

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명에서 용어 보조인자(cofactor)는 체내에서 효소에 첨가되어 효소의 작용을 돕는 화학적인 물질로, 단백질이 아닌 유기물이나 금속 이온으로 되어 있으며, 단백질 효소에 붙어 효소가 활성을 나타내도록 돕는 역할을 한다. 보조 인자는 조효소와 보결족 두 가지로 나누어지게 되는데, 효소 작용 후 떨어져 나가는 물질로, 대부분 유기물로 구성되어 있는 것을 조효소라고 하고, 효소와 강하게 결합되어 있어 효소와 잘 떨어지지 않는 금속 이온을 보결족이라고 한다.

[0016] 본 발명에서 보조인자는 구체적으로 AMP, ADP, ATP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, CoA, 아세틸-CoA(acetyl-CoA), 부티릴-CoA(butyryl-CoA), DL-β-하이드록시부티릴-CoA(DL-β-hydroxybutyryl-CoA), 크로토닐-CoA(crotonyl-CoA), 헥사노일-CoA(hexanoyl-CoA), 말로닐-CoA(malonyl-CoA) 및 숙시닐-CoA(succinyl-CoA)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0017] 본원에서 '효모' 라 함은 사카로마이세스 세레비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*)을 의미하며, 보다 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시애 BY4741 (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741)이다.

[0018] "사카로마이세스 세레비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*)" 는 "일반적으로 안전한 것으로 인식(GRAS)"되어 있으며, 가치있는 화합물질을 합성하거나 생물학 치료에서 가장 널리 사용되는 효모이다.

[0019] 본원에서 사용된 효모 내 보조인자를 분석하는 방법으로 액체크로마토그래피/질량분석법(LC/MS)을 이용하였으며, 이러한 분석은 역상 용리 다공성 흑연성 탄소 소재의 컬럼으로 실시함으로써 최적화하였다.

[0020] 본원에서 역상 용리 다공성 흑연성 탄소 소재의 컬럼은 역상 용리 하이퍼카브(Hypercarb RP)를 의미한다. 본원에 사용된 하이퍼카브 컬럼(Hypercarb column)은 다공성 흑연성 탄소(100% porous graphitic carbon(PGC)) 소재를 충전한 컬럼이며 충전물질 입자의 규격(직경)은 3μm 또는 5μm이다[(Hypercarb Porous Graphitic Carbon LC Column 3μm, 2.1 × 100 mm; Thermo Fisher Scientific) fitted with a Hypercarb Drop-In Guard Cartridge (Thermo Fisher Scientific)].

[0021] 본원에 사용된 ZIC-pHILIC 컬럼은 다공성 폴리머 비드에 양쪽성 고정상이 공유결합된 컬럼"이며, 충전물질 입자의 직경은 5μm이다[(SeQuant ZIC-pHILIC, 5 μm, polymeric, PEEK 4.6 × 150 mm; SupelcoInc, Bellefonte, PA, USA)].

[0022] 본원에 사용된 ACQUITY BEH 아미드 컬럼은 실리카 하이브리드 입자의 다공성 컬럼이며, 입자의 극성 그룹에 NO₂가 리간드로 결합된 컬럼"으로, 충전물질 입자의 직경은 1.7μm이다[(ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm, 2.1 × 150 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA)].

[0023] 본 발명의 일 구현예로서, 효모 세포 내 보조인자는 고속여과법(fast filtration)으로 추출하는 것이 바람직하다. 또한, 추출 시 용매는 아세토니트릴과 물을 혼합한 것을 사용하는 것이 보다 바람직하다. 특히, 아세토니트릴과 물을 1:1 부피비로 혼합한 것이 더욱 바람직하다.

[0024] 본 발명의 일 구현예로서, 효모 세포 내 보조인자를 LC/MS로 정량 분석 시 pH 7.5-8.0의 용매에서 수행하는 것이 바람직하다.

[0025] 상기 용매는 아세트산 암모늄 완충액과 아세토니트릴, 메탄올 및 물의 혼합물과 용해하여 제조된 것이 보다 바람직하다.

[0026] 더욱 바람직하게는 상기 아세토니트릴, 메탄올 및 물의 혼합물은 아세토니트릴:메탄올:물이 4:4:2의 부피 비로 혼합된 것이다.

발명의 효과

- [0028] 보조인자는 모든 살아있는 유기체에서 이화작용과 동화작용에 중추적인 역할을 한다. 많은 연구에서 살아있는 유기체의 대사 상태를 이해하기 위해 보조인자의 농도를 조사했으며, 이는 가치 있는 화학 물질을 생산하거나 질병의 병리생리학을 이해하는 데 사용될 수 있다. 다양한 분석 플랫폼 중에서 액체 크로마토그래피/질량 분석법(LC/MS)은 보조인자의 정량화에 가장 자주 사용되는 방법이다. 여러 연구에서 LC/MS를 사용하여 보조인자에 대한 다양한 분석 방법을 보고하였다. 그러나 최적의 LC/MS 방법이 없기 때문에 다양한 보조인자를 동시에 분석하기가 어렵다. 또한, 기존의 프로토콜은 추출 효율이 낮아 세포 내 보조인자의 실제 농도를 반영하기 어려울 수 있기 때문에 세포에서 보조인자를 추출하는 방법을 최적화해야 한다.
- [0029] 본 발명에서는 LC/MS를 이용한 보조인자 분석을 위해 다양한 분석 방법을 체계적으로 비교하고 최적의 방법을 개발하였다. 또한 *Saccharomyces cerevisiae*에서 보조인자를 추출하기 위한 켄칭 방법과 추출 용매를 체계적으로 비교하고 최적의 방법을 확립하였다. 이러한 최적화된 방법은 LC/MS 분석 및 *S. cerevisiae*에서 보조 인자 추출을 위한 표준 프로토콜로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 LC/MS로 분석한 다양한 분석 조건에 대한 총 이온 크로마토그램을 나타낸 것이다 [Hypercarb NP: 순상 용출이 있는 Hypercarb 컬럼; Hypercarb RP: 역상 용리가 있는 Hypercarb 컬럼; ACQUITY BEH NP: 순상 용리가 있는 ACQUITY BEH 아미드 컬럼; ACQUITY BEH RP: 역상 용리가 있는 ACQUITY BEH 아미드 컬럼; ZIC-pHILIC NP: 순상 용리가 있는 ZIC-pHILIC 컬럼; ZIC-pHILIC RP: 역상 용리가 있는 ZIC-pHILIC 컬럼].
- 도 2는 보조 인자에 대한 안정성 테스트 결과이다[(A), 에너지 및 (B) CoA 관련 보조 인자. DW(중류수, pH 7.00); 용매 1(아세트니트릴:메탄올:15mM 아세트산 암모늄을 함유한 물 혼합물, pH 7.77); 용매 2(아세트니트릴:메탄올:15mM 아세트산 암모늄을 함유한 물 혼합물, pH 8.95) 및 용매 3(아세트니트릴:메탄올:15mM 아세트산 암모늄을 함유한 물 혼합물, pH 10.00). 용매 2 및 용매 3의 pH는 에탄올아민을 첨가하여 조정하였다. 3개의 독립적인 복제물이 사용되었다].
- 도 3은 저온 메탄올 켄칭 또는 고속 여과 방법을 사용하여 효모에서 추출한 보조 인자의 농도를 비교하기 위한 박스 및 위스커 플롯을 나타낸 것이다[p 값은 t-테스트에 이어 FDR을 사용하여 계산되었다. *는 FDR 조정 p 값 < 0.05를 나타낸다. ***는 FDR 조정 p 값 < 0.01을 나타낸다. 9개의 복제(독립 복제 3개 × 기술 복제 3개)를 사용하였다].
- 도 4는 효모에서 다양한 추출 용매로 추출한 보조 인자의 농도를 비교하기 위한 박스 및 위스커 플롯을 나타낸 것이다[*는 ANOVA에 이어 Fisher의 LSD(FDR 조정 p 값 < 0.001)에 기반한 그룹 간의 유의미한 차이를 나타낸다. 9개의 복제(독립 복제 3개 × 기술 복제 3개)를 사용하였다. AMW: 아세트니트릴:메탄올:물(4:4:2, v/v/v)의 혼합물; WiPM: 물:이소프로판올:메탄올(2:2:5, v/v/v)의 혼합물; 50ACN 아세트니트릴:물(50ACN; 1:1, v/v)의 혼합물; PM: 순수 메탄올].
- 도 5는 분석 조건과 추출 방법의 계통적 비교 모식도이다[(A) 분석 조건의 비교 (B) 추출 방법의 비교].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0034] [실시예]
- [0035] 1. 재료 및 방법
- [0037] 1.1 화학물질과 시약
- [0038] AMP, ADP, ATP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, CoA, acetyl-CoA, butyryl-CoA, DL-β-hydroxybutyryl-CoA,

crotonyl-CoA, hexanoyl-CoA, 및malonyl-CoA, succinylCoA (순도 >85%)와 같은 보조인자에 대한 표준 분석물은 Sigma-Aldrich(Saint Louis, MO, USA)에서 구입했다. 표준 혼합물은 증류수 또는 아세트니트릴:메탄올:물 (4:4:2; v/v/v)에 15mM 아세트산 암모늄 완충액을 이용하여 다양한 pH값의 용매에 각 표준물을 1000mg/mL의 농도로 용해하여 준비하였다. pH 값(용매 1: pH 7.77; 용매 2: pH 8.95; 용매 3: pH 10.00). 용매 2 및 3의 pH는 에탄올아민을 첨가하여 조정하였다. 아세트산 암모늄과 에탄올아민은 Sigma-Aldrich에서 구입한 반면 HPLC 등급 아세트니트릴, 메탄올 및 이소프로판올은 J.T. 베이커(미국 뉴저지주 필립스버그)에서 구입하였다.

1.2 *S. cerevisiae*에서 보조인자 추출

효모에서 보조인자를 추출하기 위한 켄칭 및 추출 방법을 최적화하기 위해 야생형 *S. cerevisiae* BY4741을 효모 추출물 peptone dextrose broth(YPD; 10g/L 효모 추출물, 20g/L 펩톤, 20g/L 포도당)과 함께 250mL 플라스크에 100mL 만큼 30℃에서 200rpm으로 배양하였다. 보조 인자는 아래에 설명된 켄칭 방법 및 추출 용매를 사용하여 효모에서 추출되었다.

1.2.1 저온 메탄올 켄칭 그리고 보조인자 추출

손실 없는 저온 메탄올 켄칭으로 대사 활동을 중단시키기 위해 *S. cerevisiae* 배양액 1mL를 -40℃에서 순수 메탄올 5mL에 빠르게 첨가하였다. 효모 세포와 메탄올의 혼합물을 4℃에서 5분 동안 16,100×g에서 원심분리하고 세포 알갱이를 얻었다. 세포 알갱이를 초음파 처리기(Sonics & Materials, Newtown, CT, USA)를 사용해서 10mL의 아세트니트릴:메탄올:물(4:4:2, v/v/v)과 15mM 아세트산 암모늄 완충액에 -20℃에서 5분동안 현탁하고 3분 동안 볼텍스로 균질화하였다. 4℃에서 5분간 16, 100×g로 원심분리한 후 추출된 대사체를 포함하는 상등액을 모아 LC/MS 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다.

1.2 고속 여과와 보조인자 추출

고속 여과로 대사 활동을 정지하기 위해, 1mL의 *S. cerevisiae* 배지를 나일론 멤브레인 필터(0.45 μm 구멍 크기, 30mm 지름; Whatman, Piscataway, NJ, USA) 빠르게 진공 여과하고 20℃ 5mL의 증류수로 행겼다. 멤브레인 필터와 세포 혼합물을 즉시 아세트니트릴:메탄올:물(AMW; 4:4:2, v/v/v), 아세트니트릴:물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:이소프로판올:메탄올 (2:2:5, v/v/v), 순수 메탄올 같은 추출 용매 10mL와 50mL 코니컬 튜브에 섞었다. 혼합물이 담긴 코니컬 튜브를 액체 질소에 담가 세포 대사와 대사체의 변화를 정지했다. 모든 절차는 30초 이내에 완료되었다. 코니컬 튜브를 얼음 위에서 해동하고 5분 동안 초음파 처리하고 3분 동안 볼텍스로 섞은 다음 4℃에서 10분 동안 16,100×g에서 원심 분리했다. 대사체를 포함하는 상등액을 수집하여 LC/MS 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다.

1.3 LC/MS로 보조인자 분석 그리고 통계분석

UltiMate 3000 BioRS 시스템(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)은 Thermo Q-Exactive Orbitrap 고해상도 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific)와 결합하여 보조인자의 식별 및 정량화에 사용되었다. 보조 인자 분리를 위해 Hypercarb Drop-In Guard Cartridge (Thermo Fisher Scientific)가 장착된 Hypercarb 컬럼 (Hypercarb Porous Graphitic Carbon LC 컬럼, 3μm, 2.1 × 100mm; Thermo Fisher Scientific), ZIC-pHILIC 컬럼 (SeQuant ZIC) -pHILIC, 5μm, 폴리머, PEEK 4.6 × 150mm, Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA) 및 ACQUITY BEH Amide 컬럼(ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7μm, 2.1 × 150mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA)가 사용되었다. 이동상 A는 20mM 아세트산 암모늄과 0.1% 에탄올아민을 함유한 증류수를 사용하였다. 20mM 아세트산 암모늄 그리고 0.1% 에탄올아민 포함한 아세톤니트릴, 물(8:2, v/v) 혼합물이 이동상 B로 사용되었다. 역상 용리(용출) 구배는 다음과 같다: 0에서 1.5분까지, 이동상은 10% B였으며, 이후 9.5분에 걸쳐 100%로 증가하고 3.5분 동안 100%에서 유지되었다. 순상 용출 구배는 다음과 같다: 0에서 1.5분까지 이동상은 100% B였으며 6분에 걸쳐 10%로 감소한 다음 7분에 걸쳐 10%로 유지되었다. 유속은 0.300 mL/min이었고 주입량은 3 μL였다. 컬럼과 샘플러의 온도는 각각 25℃와 6℃였다

고해상도 질량 스펙트럼은 Q Exactive Hybrid Q-Orbitrap 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여

negative mode에서 가열된 전기분무 이온화(HESI) 이온 소스를 사용하여 기록하였다. HESI 이온 소스 매개변수는 다음과 같이 설정되었다. 시스 가스 유속, 46 임의 단위; 보조 가스 유량, 11 임의 단위; 분무 전압: 2.5kV, 모세관 온도, 300℃S-렌즈 RF 레벨, 50 임의 단위; 및 보조 가스 히터 온도, 325 ℃. 전체 스캔 MS 데이터의 매개변수는 다음과 같다: 스캔 범위, 300~1100 질량 대 전하 비율(m/z); 해상도, 70,000; 극성, 음수; 자동 이득 제어(AGC) 대상, 1e6; 및 최대 주입 시간(IT), 200ms. 질량 스펙트럼의 검출 및 디콘볼루션을 위해 Xcalibur 시스템 소프트웨어(버전 4.2, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 질량 스펙트럼 데이터를 전처리 했다. TraceFinder(버전 4.1; Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 보조 인자를 식별하고 정량화 했다. 데이터의 통계적 분석을 위해 MetaboAnalyst를 사용하여 Student's t-test와 ANOVA(Analysis of variance)와 Fisher의 최소유의차를 수행하였다. 서로 다른 용매 사이의 보조 인자의 안정성을 비교하기 위해 3개의 독립적인 복제가 사용되었다. 켄칭 방법과 추출 용매를 비교하기 위해 9개의 복제(독립적인 복제 3개 × 기술 복제 3개)를 사용했다.

[0053] 1.4 탐지와 정량의 한계 계산

[0054] LoD 및 LoQ 는 이전에 설명한 방법을 기반으로 계산되었다. 간단히 말해서, LoD 를 계산하기 위해 표준 용액의 허용 농도가 가장 낮은 10개의 샘플을 분석하고 $x_{LoD} = 3s_x$ 를 계산하였다(s_x : 측정된 면적의 표준 편차).

x_{LoD} (예상 검출 한계) 근처의 여러 저농도 표준 용액을 선택하고 분석하여 검량선(신호 $x = A \times \text{농도} + B$)을 생성하였다. $LoD = x_{LoD}/A$ 방정식을 사용하여 LoD 를 계산했다. 방정식 $x_{LoQ} = 10s_x$ 를 사용하여 x_{LoQ} 를 계산하였다. 그런 다음 방정식 $LoQ = x_{LoQ}/A$ 를 사용하여 LoQ 를 계산하였다.

[0056] 2 .결과 및 토의

[0058] 2.1 보조 인자 분석을 위한 크로마토그래피 조건의 비교 및 최적화

[0059] 이온 페어링 시약을 사용하지 않고 음성 모드에서 보조 인자를 식별하고 정량화하기 위해 특정 보조인자의 식별에 적합한 것으로 보고되어있는 Hypercarb, ACQUITY BEH Amide 및 ZIC-pHILIC 컬럼과 같은 세 가지 극성 컬럼을 비교하였다. 이 연구에서 우리는 AMP, ADP 및 ATP을 포함하는 아데노신 뉴클레오타이드; NAD⁺, NADH, NADP⁺ 및 NADPH를 포함하는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드; CoA, acetyl-CoA, butyryl-CoA, DL-β-hydroxybutyryl-CoA, crotonyl-CoA, hexanoyl-CoA, malonyl-CoA 및 succinyl-CoA와 같은 다양한 CoA 같이 대부분의 대사에 관여하는 보조 인자를 사용하였다. (표 1). LC/MS를 이용한 보조인자에 대한 고정밀 고감도 분석을 위해서는 각각의 보조인자가 좁은 피크를 형성해야 하고, 보조인자 피크가 서로 떨어져 있어야 한다. 부적합한 분석 조건에서 보조인자는 컬럼에서 적절하게 용출되지 않고 테일링을 통해 둥근 피크를 형성한다. 보조인자 피크가 겹치면 신호가 서로 교란되고 매트릭스 효과와 노이즈가 증가하여 잘못된 양성 신호가 발생한다. 분석 조건 간 보조인자의 정량화 능력을 비교하기 위해 피크 수, 피크 간 거리, 테일링 인자(TF; 정량화에 적합 ≤ 2.00), 용량 계수(k'; 정량화에 적합 >2.00), 이론 단수(N; 정량화에 적합 >2000)(표 2). 정량화 기준에 따르면 각 피크의 너비가 머무름 시간 1분 이내에 크로마토그램을 형성하지 않거나 TF 값이 2.0 보다 큰 경우 적절한 피크로 간주하지 않았다(N. A., 해당 없음). 그 결과 모든 컬럼에서 역상 용리로 분석한 대사체는 기준을 통과하였으나, 순상 용리에서는 대부분의 대사체가 머무름 시간이 1분 이상인 둥근 피크 크로마토그램을 형성하였으며, 이들의 TF, k', N 값은 기준 미만이었다(표 2).

[0060] 서로 다른 분석 조건 간의 비교에서 역상 용리가 있는 모든 컬럼은 서로 다른 머무름 시간, TF, k' 및 N 값을 가진 모든 보조 인자를 검출했다(표 2). 역상 용리 Hypercarb 컬럼에서 모든 피크는 서로 다른 머무름 시간으로 검출되었으며 TF, k' 및 N의 바람직한 값을 나타냈으며(표 2), 총 이온 크로마토그램(TIC)의 전체 높이가 가장 높았다 (도 1). 역상 용리 ACQUITY BEH Amide 컬럼에서 모든 피크는 바람직한 TF 값을 나타내었지만 바람직하지 않은 k' 및 N 값을 나타냈다(표 2). 머무름 시간이 1.65분에서 1.93분 사이에 모든 피크가 중첩되었으며(표 2),

TIC의 전체 높이는 두 번째로 높았다(도 1). 역상 용리 ZIC-pHILIC 컬럼에서 모든 피크는 바람직한 TF 값과 바람직하지 않은 k' 값(표 2) 및 AMP, NADH, NADPH, 아세틸 CoA, DL β -hydroxybutyryl-CoA, 그리고 말로닐-CoA 같은 보조 인자를 나타냈으며 바람직한 N 값을 나타내었지만 다른 것들은 그렇지 않았다(표 2). 역상 용리 ZIC-pHILIC 컬럼에서 모든 피크는 3.60분에서 3.95분 사이에 중첩되었으며(표 2), TIC의 전체 높이는 세 번째로 높았다(도 1).

[0061] 순상 용리를 갖는 3개 컬럼의 분석 조건에서 대부분의 피크가 기준을 통과하지 못하거나 적합하지 않은 TF, k' 및 N 값을 나타냈으며(표 2), TIC의 전체 높이가 역상 용리 보다 훨씬 낮았다(도 1). Hypercarb 컬럼의 순상 용리에서는 기준을 통과한 피크가 없었고(표 2), TIC의 전체 높이가 가장 낮았다(도 1). ACQUITY BEH Amide column에서 normal phase elution은 NAD+만이 바람직한 TF 값을 보였고(표 2), TIC의 전체 높이는 네 번째로 높았다(도 1). ZIC-pHILIC 컬럼의 순상 용리에서는 AMP, NAD+, NADH, NADPH, butyryl-CoA, crotonyl-CoA, hexanoyl-CoA, malonyl-CoA 등 9개의 cofactor만이 적절한 TF와 N 값을 보였다(표 2). 보조 인자의 k' 값은 바람직하지 않았으며(표 2), TIC의 전체 높이는 다섯 번째로 높았다(도 1).

[0062] **LoD** 및 **LoQ** 는 보조인자의 정량화를 위한 가장 중요한 기준이다. 세포 내 보조 인자의 농도는 대부분 낮기 때문에 낮은 **LoD** 및 **LoQ** 로 분석 조건을 미리 설정하는 것이 필수적이다. 따라서 다른 컬럼 및 용리 방법에서 **LoD** 및 **LoQ**를 계산하고 비교했다(하기 표 및 표 3). 역상 용리가 있는 3개의 컬럼은 모든 보조 인자에서 다양한 수준의 **LoD** 및 **LoQ**를 보여주었다(하기 표). 역상 용리를 사용한 Hypercarb 컬럼에서 모든 보조인자에 대한 **LoD** 및 **LoQ** 값은 다른 분석 방법과 비슷하거나 낮았다(하기 표). 특히, 역상 용리를 이용한 Hypercarb 컬럼은 CoA 대사체의 **LoD** 와 **LoQ** 값이 다른 분석법보다 최대 45.7배 낮은 값을 보였다. 순상 용리가 있는 3개 컬럼의 분석 조건에서 많은 보조인자가 정량화에 적용되지 않거나 매우 높은 **LoD** 및 **LoQ** 를 나타냈다(하기 표).

[0063] 역상 용리를 사용하는 Hypercarb 컬럼은 바람직한 TF, k' 및 N 값과 가장 낮은 **LoD** 및 **LoQ** 로 대부분의 보조 인자를 동시에 정량화하는 최적의 분석 방법이다. 우리가 비교한 분석 방법 중 역상 용리를 사용하는 Hypercarb 컬럼은 가장 낮은 **LoD** 및 **LoQ** (하기 표)로 모든 보조 인자(표 2)를 정량화할 수 있었다. 이는 모든 피크가 우수한 TF, k' 및 N 값을 보였고 Hypercarb 컬럼에서 역상 용리로 서로 분리되었기 때문이다(표 2). 우리의 분석 방법은 다른 연구에서 보고된 것보다 낮은 **LoD** 값으로 한 번에 더 많은 보조 인자를 정량화했을 뿐만 아니라 이온 페어링 시약을 사용하지 않고 음성 모드에서 보조 인자를 분석했다(표 4). 보조인자를 정확하고 지속적으로 분석하면서 MS의 오염을 최소화하였다. 따라서 보조인자에 대한 최적의 분석 방법으로 역상 용리를 사용하는 Hypercarb 컬럼을 개발하였다.

표.

다양한 분석 조건에서 보조 인자의 검출 한계(**LoD**;nM) 및 정량화(**LoQ**;nM)

Cofactor	Hypercarb				ACQUITY BEH Amide				ZIC-pHILIC			
	NP		RP		NP		RP		NP		RP	
	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ
AMP	N. A.	1.2	4.1		N. A.		3.8	12.7	69.2	230.7	1.5	5.0
ADP	N. A.	1.0	3.4		N. A.		1.1	3.6	N. A.		1.1	3.5
ATP	N. A.	1.2	4.1		N. A.		2.6	8.6	N. A.		1.7	5.7
NAD ⁺	N. A.	5.6	18.6	53.67	178.91		4.0	13.4	19.3	64.3	4.1	13.5
NADH	N. A.	1.6	5.2		N. A.		2.0	6.5	26.9	89.7	1.6	5.2
NADP ⁺	N. A.	0.8	2.5		N. A.		2.6	8.7	N. A.		2.2	7.2
NADPH	N. A.	2.3	7.7		N. A.		7.1	23.6	17.0	56.7	6.5	21.6
CoA	N. A.	11.0	36.6		N. A.		502.1	1673.7	N. A.		72.7	242.3
Acetyl-CoA	N. A.	0.7	2.3		N. A.		1.7	5.5	N. A.		3.4	11.2
Butyryl-CoA	N. A.	1.5	5.0		N. A.		1.5	5.0	275.0	916.7	3.3	11.1
DL- β -Hydroxybutyryl-CoA	N. A.	1.8	5.9		N. A.		9.8	32.7	N. A.		11.8	39.3
Crotonyl-CoA	N. A.	1.4	4.7		N. A.		2.1	7.0	421.6	1405.4	1.9	6.3
Hexanoyl-CoA	N. A.	1.7	5.7		N. A.		1.9	6.5	61.0	203.4	2.9	9.8
Malonyl-CoA	N. A.	0.8	2.7		N. A.		3.5	11.6	40.4	134.6	8.0	26.8
Succinyl-CoA	N. A.	2.4	8.0		N. A.		86.1	287.0	N. A.		99.3	330.9

*N.A. represents Not Applicable.

[0064]

표 1. 15개 보조인자의 상세 정보

Cofactor metabolites	PubChem ID	Formula	monoisotopic mass (amu)	Polarity	Adduct	Charge State	Expected mass (m/z)	Observed mass (m/z)	mass delta (ppm)
AMP	6083	C10H14N5O7P	347.06308	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	346.0558	346.056	1.430
ADP	6022	C10H15N5O10P2	427.02941	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	426.0221	426.023	2.472
ATP	5957	C10H16N5O13P3	506.99574	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	505.9885	505.989	0.592
NAD+	5892	C21H27N7O14P2	663.10912	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	662.1018	662.103	2.254
NADH	439153	C21H29N7O14P2	665.12477	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	664.1175	664.119	2.210
NADP+	5886	C21H29N7O17P3	744.08328	Negative	Hydrogen-Loss(M-2H)	1	742.0682	742.070	2.722
NADPH	439153	C21H29N7O14P2	665.12477	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	664.1175	664.119	2.210
CoA	87642	C21H38N7O16P3S	767.11521	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	766.1079	766.102	-7.196
Acetyl-CoA	444493	C23H38N7O17P3S	809.12577	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	808.1185	808.120	2.303
Butyryl-CoA	122283	C25H42N7O17P3S	837.15707	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	836.1498	836.151	1.801
DL-β-Hydroxybutyryl-CoA	133655801	C25H42N7O18P3S	853.15199	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	852.1447	852.146	1.509
Crotonyl-CoA	5497143	C25H40N7O17P3S	835.14142	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	834.1342	834.136	2.128
Hexanoyl-CoA	449118	C27H46N7O17P3S	865.18837	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	864.1811	864.182	1.543
Malonyl-CoA	644066	C24H38N7O19P3S	853.1156	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	852.1083	852.110	1.943
Succinyl-CoA	92133	C25H40N7O19P3S	867.13125	Negative	Hydrogen-Loss(M-H)	1	866.1240	866.126	2.446

표 2. 서드 다른 분석 조건에서 각 피크에서 계산된 Tailing factor(TF), capacity factor(k'), 이론 단위(N) 및 머무름 시간(RT)

Cofactor metabolites		Hypercarb							
		Normal phase				Reverse phase			
Compound	m/z	TF	k'	N	RT	TF	k'	N	RT
AMP	346.05581			N.A.		0.71	2.97	7,707	4.48
ADP	426.02214			N.A.		0.94	3.02	2,199	4.55
ATP	505.98847			N.A.		1.25	3.02	2,199	4.58
NAD+	662.10184			N.A.		1.32	5.10	1,538	6.27
NADH	664.11749			N.A.		0.79	4.27	21,746	5.88
NADP+	742.06817			N.A.		0.45	3.82	2,118	5.34
NADPH	744.08382			N.A.		0.79	3.58	14,480	5.21
CoA	766.10793			N.A.		0.79	3.52	11,142	5.21
Acetyl-CoA	808.11850			N.A.		0.86	3.45	9,666	5.11
Butyryl-CoA	836.14980			N.A.		0.81	4.06	10,230	5.83
DL-β-Hydroxybutyryl-CoA	852.14471			N.A.		0.92	3.55	14,280	5.21
Crotonyl-CoA	834.13415			N.A.		1.07	4.30	9,587	6.08
Hexanoyl-CoA	864.18110			N.A.		1.11	5.04	8,203	6.91
Malonyl-CoA	852.10833			N.A.		0.92	2.96	14,127	4.58
Succinyl-CoA	866.12398			N.A.		0.64	3.04	14,878	4.63
Cofactor metabolites		ACQUITY BEH Amide							
		Normal phase				Reverse phase			
Compound	m/z	TF	k'	N	RT	TF	k'	N	RT
AMP	346.05581			N.A.		1.08	0.18	719	1.81
ADP	426.02214			N.A.		1.27	0.10	357	1.69
ATP	505.98847			N.A.		1.25	0.12	332	1.72
NAD+	662.10184	1.22	4.81	6,235	6.59	1.28	0.25	620	1.94
NADH	664.11749			N.A.		1.28	0.17	508	1.79
NADP+	742.06817			N.A.		1.28	0.12	493	1.72
NADPH	744.08382			N.A.		1.05	0.09	502	1.68
CoA	766.10793			N.A.		1.15	0.08	464	1.67
Acetyl-CoA	808.11850			N.A.		1.17	0.08	612	1.67
Butyryl-CoA	836.14980			N.A.		1.10	0.08	498	1.67
DL-β-Hydroxybutyryl-CoA	852.14471			N.A.		0.95	0.08	612	1.67
Crotonyl-CoA	834.13415			N.A.		1.17	0.08	569	1.67
Hexanoyl-CoA	864.18110			N.A.		1.22	0.08	496	1.67
Malonyl-CoA	852.10833			N.A.		0.88	0.07	644	1.65
Succinyl-CoA	866.12398			N.A.		0.95	0.07	484	1.65
Cofactor metabolites		ZIC-pHILIC							
		Normal phase				Reverse phase			
Compound	m/z	TF	k'	N	RT	TF	k'	N	RT
AMP	346.05581	0.92	1.65	7,173	11.01	0.96	0.10	2,581	3.8
ADP	426.02214			N.A.		1.00	0.08	1,255	3.72
ATP	505.98847			N.A.		0.87	0.11	701	3.84
NAD+	662.10184	0.88	1.65	17,778	11.01	0.83	0.14	1,824	3.95
NADH	664.11749	0.75	1.67	21,746	11.05	0.83	0.14	2,438	3.95
NADP+	742.06817			N.A.		0.89	0.06	1,804	3.66
NADPH	744.08382	1.28	1.83	2,779	11.74	0.93	0.12	2,189	3.85
CoA	766.10793			N.A.		0.77	0.07	1,788	3.7
Acetyl-CoA	808.11850			N.A.		0.83	0.08	2,070	3.83
Butyryl-CoA	836.14980	0.83	1.40	93,730	9.94	0.87	0.05	1,925	3.62
DL-β-Hydroxybutyryl-CoA	852.14471			N.A.		0.80	0.05	2,479	3.6
Crotonyl-CoA	834.13415	0.83	1.40	80,818	9.94	0.83	0.06	1,947	3.64
Hexanoyl-CoA	864.18110	0.83	1.40	93,730	9.94	0.78	0.06	1,834	3.83
Malonyl-CoA	852.10833	1.88	1.71	3,421	11.28	0.83	0.06	2,394	3.67
Succinyl-CoA	866.12398			N.A.		0.81	0.05	1,925	3.61

*N.A. represents Not Applicable

표 3. 다양한 분석 조건에서 보조 인자에 대한 보정 데이터

Cofactor metabolites	Hypercarb					
	NP			RP		
	Calibration curve	Linear range (μM)	Linear coefficient R ²	Calibration curve	Linear range (μM)	Linear coefficient R ²
AMP		N. A.		Y = 2.888E3X - 5.267E4	0.00274-8.848	0.9990
ADP		N. A.		Y = 1.87E3X - 1.831E4	0.00234-2.928	0.9991
ATP		N. A.		Y = 2.281E3X - 2.093E4	0.00181-2.268	0.9989
NAD ⁺		N. A.		Y = 1.974E3X - 3.349E4	0.00730-7.295	0.9988
NADH		N. A.		Y = 1.278E3X - 1.087E4	0.00523-2.613	0.9996
NADP ⁺		N. A.		Y = 3.738E3X - 8.587E3	0.00135-0.874	0.9997
NADPH		N. A.		Y = 1.71E3X - 9.402E4	0.0106-8.283	0.9989
CoA		N. A.		Y = 7.288E2X - 7.328E4	0.0130-13.029	0.9992
Acetyl-CoA		N. A.		Y = 2.159E3X - 4.110E4	0.00124-3.088	0.9979
Butyryl-CoA		N. A.		Y = 3.242E3X - 5.207E4	0.00187-2.985	0.9985
DL-β-Hydroxybutyryl-CoA		N. A.		Y = 1.383E3X - 4.682E3	0.00287-0.574	0.9999
Crotonyl-CoA		N. A.		Y = 2.748E3X - 4.422E4	0.00183-2.929	0.9984
Hexanoyl-CoA		N. A.		Y = 2.518E3X - 1.829E4	0.00226-1.132	0.9999
Malonyl-CoA		N. A.		Y = 1.078E3X - 3.648E3	0.00117-0.888	0.9999
Succinyl-CoA		N. A.		Y = 7.507E2X - 2.73E3	0.00360-1.153	0.9999
Cofactor metabolites	ACQUITY BEH Amide					
	NP			RP		
	Calibration curve	Linear range (μM)	Linear coefficient R ²	Calibration curve	Linear range (μM)	Linear coefficient R ²
AMP		N. A.		Y = 4.438E3X + 4.421E4	0.012-0.3	0.9997
ADP		N. A.		Y = 4.012E4 - 7.754E4	0.012-0.3	0.9999
ATP		N. A.		Y = 7.57E3X - 3.842E4	0.02-0.5	1.0000
NAD ⁺	Y = 4.614E2X - 9.613E4	0.729-3.647	0.9842	Y = 3.257E3X - 6.574E4	0.04-1.0	0.9996
NADH		N. A.		Y = 8.48E3X - 2.43E4	0.008-0.2	0.9999
NADP ⁺		N. A.		Y = 5.515E3X - 2.42E4	0.008-0.2	1.0000
NADPH		N. A.		Y = 1.848E3X - 5.551E4	0.04-1.0	0.9997
CoA		N. A.		Y = 5.758E3X - 3.98E8	0.6-15	0.9977
Acetyl-CoA		N. A.		Y = 8.928E3X - 1.12E5	0.012-0.3	0.9975
Butyryl-CoA		N. A.		Y = 6.389E3X - 1.244E5	0.0100-0.410	0.9981
DL-β-Hydroxybutyryl-CoA		N. A.		Y = 2.875E3X - 0.640E4	0.010-0.4	0.9974
Crotonyl-CoA		N. A.		Y = 6.538E3X - 9.338E4	0.6-15	0.9985
Hexanoyl-CoA		N. A.		Y = 5.783E3X - 1.242E5	0.02-0.5	0.9984
Malonyl-CoA		N. A.		Y = 3.813E3X - 8.848E4	0.0113-0.281	0.9974
Succinyl-CoA		N. A.		Y = 1.317E3X - 2.16E5	0.12-3.0	0.9958
Cofactor metabolites	ZIC-pHILIC					
	NP			RP		
	Calibration curve	Linear range (μM)	Linear coefficient R ²	Calibration curve	Linear range (μM)	Linear coefficient R ²
AMP	Y = 1.189E3X - 3.982E4	0.109-1.095	0.9938	Y = 2.593E3X - 1.590E3	0.012-0.3	1
ADP		N. A.		Y = 2.084E4X - 7.857E4	0.012-0.3	0.9988
ATP		N. A.		Y = 4.799E3X - 2.362E4	0.02-0.5	1
NAD ⁺	Y = 1.064E3X - 2.931E4	0.0584-0.584	0.995	Y = 1.632E3X - 4.407E3	0.04-1.0	1
NADH	Y = 2.734E3X - 5.05E4	0.0523-0.523	0.9957	Y = 2.696E3X - 8.185E3	0.008-0.2	1
NADP ⁺		N. A.		Y = 2.953E3X - 1.051E4	0.008-0.2	0.9999
NADPH	Y = 1.908E3X - 3.544E4	0.035-0.350	0.9948	Y = 7.273E2X - 8.082E3	0.04-1.0	1
CoA		N. A.		Y = 1.88E3X - 8.777E5	0.6-15	0.9982
Acetyl-CoA		N. A.		Y = 1.992E3X - 1.993E4	0.012-0.3	0.9992
Butyryl-CoA	Y = 1.184E3X - 0.16E4	0.048-0.478	0.9963	Y = 2.033E3X - 1.522E4	0.0100-0.410	0.9999
DL-β-Hydroxybutyryl-CoA		N. A.		Y = 7.958E2X - 9.599E3	0.016-0.4	1
Crotonyl-CoA	Y = 5.404E2X - 3.202E4	0.0489-0.489	0.9917	Y = 2.048E3X - 1.51E4	0.6-15	0.9988
Hexanoyl-CoA	Y = 1.7E3X - 5.614E4	0.0453-0.453	0.9997	Y = 2.034E3X - 2.388E4	0.02-0.5	0.9985
Malonyl-CoA	Y = 8.885E2X - 6.114E4	46.881-488.815	0.9707	Y = 1.108E3X - 1.501E4	0.0113-0.281	0.9994
Succinyl-CoA		N. A.		Y = 3.043E2X - 3.533E4	0.12-3.0	0.9988

*N. A. represents Not Applicable

표 4. 보조 인자의 검출 한계(LoD) 비교

Column/Phase MS	In this study Hypercarb LC/Orbitrap MS	Lu et al. (2018) Synergy Hydro-RP column LC/Orbitrap MS	Gilibili et al. (2011) Zorbax C8 column HPLC-ESI-TOF MS	Buescher et al. (2010) Waters Acquity T3 LC-QQQ-MS	Rost et al. (2020) Atlantis-HILIC LC-QQQ-MS
Ionization mode	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive
Ion pairing agents	Not reported	Not reported	TBA	Not reported	Not reported
Cofactor metabolites	LoD (nM)	LoD (nM)	LoD (nM)	LoD (nM)	LoD (nM)
AMP	1.24	Not reported	300	5.1	Not reported
ADP	1.02	Not reported	280	46	Not reported
ATP	1.23	Not reported	550	410	Not reported
NAD ⁺	5.57	4.4	770	1.7	0.8
NADH	1.56	4.20	2,501	410	6
NADP ⁺	0.75	3.80	Not reported	140	0.8
NADPH	2.31	2.60	610	1.7	3
CoA	10.99	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
Acetyl-CoA	0.70	Not reported	Not reported	1,230	Not reported
Butyryl-CoA	1.51	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
DL-β-Hydroxybutyryl-CoA	1.77	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
Crotonyl-CoA	1.41	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
Hexanoyl-CoA	1.70	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
Malonyl-CoA	0.80	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
Succinyl-CoA	2.41	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported

2.2 분석 중 보조 인자의 안정성에 대한 pH 및 용매의 영향

보조인자는 대사반응에서 에너지나 아실기를 전달하는 매개체로 고에너지 분자가 쉽게 부착되거나 분리된다. 보

조인자는 상대적으로 불안정하고 온도, pH 등 환경 조건 변화에 민감하다. 특히 NAD는 온도와 pH 변화에 매우 민감한 것으로 알려져 있다. 아세트산 암모늄을 첨가하거나 아세트 니트릴:메탄올:물(4:4:2, v/v/v)의 혼합물과 함께 용매를 사용하여 pH를 증가시키면 NAD의 안정성이 증가하고 대사체 간의 상호 전환을 억제한다. 그러나 아세트니트릴:메탄올:물의 혼합물이 다른 에너지 대사물이나 CoA 대사물에 미치는 영향은 보고된 바 없다. 따라서 양의 변화 없이 보조인자를 보존할 수 있는 최적의 용매를 결정하기 위해 증류수와 아세트니트릴:메탄올:물과 15 mM 암모늄 아세트산 암모늄의 혼합물에서 시간에 따른 15개의 보조 인자 농도를 다양한 pH 값에서 비교하였다.

[0074] 15개의 보조인자를 증류수(pH7) 그리고 15mM 아세트산 암모늄 완충액과 함께 아세트니트릴:메탄올:물에 다양한 pH 값으로 용해했다(용매 1: pH 7.77; 용매 2: pH 8.95; 용매 3: pH 10.00; 용매 2와 3은 에탄올아민을 첨가하여 조정). 그리고 상대적 양은 5시간마다 측정하였다(도 2). 보조인자 중 아데노신 인산염은 용매의 종류와 pH에 거의 영향을 받지 않았으며, 30시간 후에도 상대적 양을 90% 이상 유지하였다(도 2A). NADH, NADP⁺ 및 NADPH와 같은 NAD는 증류수에서 시간이 지남에 따라 쉽게 분해되었다(도 2A). NADP⁺ 및 NADPH의 각각 68.9% 및 20.4%만이 30시간 후에 증류수에 남아 있었다(도 2A). 대조적으로, 아세트니트릴:메탄올:물과 15 mM 아세트산 암모늄 완충액에서 NADs의 상대적인 양은 모든 pH 조건에서 30시간 후 > 80%로 유지되었다(도 2A). CoA 대사체는 증류수에서 가장 높은 안정성을 보였고 30시간 후에도 상대적인 양의 80% 이상을 유지했다(도 2B). 아세트니트릴:메탄올:물과 15mM 아세트산 암모늄 완충액에서 CoA 대사체의 안정성은 pH가 증가함에 따라 감소했다(도 2B). 용매 1(pH 7.77)은 증류수와 유사한 안정성을 보였지만, pH가 8.95 또는 10.00으로 증가하면서 CoA와 아실기가 쉽게 분리되었다(도 2B). 용매 2와 3에서 시간이 지남에 따라 CoA의 상대적 양이 증가한 것은 아실 그룹과 CoA의 분리 때문인 것으로 보인다(도 2B). Succinyl-CoA는 아세트니트릴:메탄올:물과 15mM 아세트산 암모늄 완충액에서 매우 불안정하고 증류수에서 빠르게 분해되어 보조인자 추출 후 빠른 분석이 필요하다(도 2B). 요약하면, 에너지 대사체와 CoA 대사체 그리고 관련 대사체 양을 초기 수준으로 유지하는 용매 1(아세트니트릴:메탄올:물, 15mM 아세트산 암모늄 완충액 포함, pH 7.77)이 보조인자와 이들의 최적 용매로 제안되었다.

[0076] 2.3 *S. cerevisiae*에서 보조인자 추출을 위한 용매와 켄칭 방법 최적화

[0077] *S. cerevisiae*에서 보조인자를 편리하게 추출하기 위해서는 기존에 저온 메탄올 켄칭을 이용하여 대사 활성을 정지시키고 순수 메탄올 또는 끓는 에탄올을 추출 용매로 사용하여 대사체를 추출하였다. 그러나 저온 메탄올 켄칭 과정에서 메탄올은 *S. cerevisiae*의 세포막을 손상시키고 투과성을 증가시키며 대사체가 세포 밖으로 유출되게 한다. 순수한 메탄올이나 끓는 에탄올은 물을 함유한 용매에 비해 극성 대사물질 추출에 상대적으로 낮은 추출 효율을 보이는 것으로 알려져 있으며, 끓는 에탄올의 고온은 특정 보조인자를 분해한다. 따라서 우리는 기존의 저온 메탄올 켄칭의 추출 효율을 막 유출없이 *S. cerevisiae*에서 대사체를 추출하는 것으로 알려진 고속 여과의 추출 효율과 비교했다. 또한 저온 메탄올 켄칭 과정에서 메탄올은 *S. cerevisiae*의 세포막을 손상시키고 투과성을 증가시키며 대사체가 세포 밖으로 유출되도록 한다. 이러한 추출 용매에는 아세트니트릴:메탄올:물(AMW; 4:4:2, v/v/v) 혼합물, 아세트니트릴:물(50ACN; 1:1, v/v) 혼합물 그리고 물:이소프로판올:메탄올(2:2:5, v/v/v) 혼합물과 같이 부분적으로 물을 포함하는 다양한 용매가 포함되고 뿐만 아니라 *S. cerevisiae*에서 사용하기 위한 추출 용매인 순수 메탄올도 있다.

[0078] 두 가지 켄칭 방법의 추출 효율을 비교하기 위해 *S. cerevisiae*를 YPD에서 12시간 동안 대사활동이 가장 활발한 중간 대수기에 배양한 다음 저온 메탄올 켄칭과 고속 여과를 했다. 보조인자의 변화를 방지하기 위해 이전에 용매로 최적화된 용매 1(도 2)을 두 켄칭 방법의 추출 용매로 사용했다. AMP, ADP, ATP, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH 및 아세틸-CoA의 8가지 보조인자가 효모의 세포내 대사체 샘플에서 식별 및 정량화되었다(도 3). 에너지 대사체와 달리 대부분의 CoA 대사체는 특정 대사 과정에서만 생산되므로 우리의 야생형 효모의 배양 조건에서는 감지할 수 없는 것으로 보인다. 켄칭 방법에 따라 보조 인자의 중요한 변화를 찾기 위해 Student's t-test와 FDR (False Discovery Rate Correction)을 수행했다(표 5). 두 가지 켄칭 방법에서 보조인자의 추출 효율을 비교한 결과, AMP, ADP, ATP, NAD⁺, NADP⁺는 저온 메탄올 켄칭 방법보다 고속 여과 방법에서 상당히 높았다(도 3). 저온 메탄올 켄칭 방법에서 NADPH의 농도는 고속 여과법 보다 상당히 높았다(도 3).

표 5. 저온 메탄올 퀀칭과 빠른 여과 사이의 보조인자 농도 비교에 대한 스튜던트 t 검정 결과

Cofactor metabolites	t value	p value	FDR adjusted p value	Fold change (fast filtration/cold methanol quenching)
AMP	6.76	4.62.E-06	9.24.E-06	43.61
ADP	48.00	1.01.E-18	8.08.E-18	9.31
ATP	2.44	2.65.E-02	3.53.E-02	2.01
NAD+	9.13	9.58.E-08	2.56.E-07	2.73
NADH	0.76	4.58.E-01	4.58.E-01	1.22
NADP+	28.83	3.21.E-15	1.28.E-14	6.31
NADPH	-2.93	9.86.E-03	1.58.E-02	0.51
Acetyl-CoA	2.06	5.58.E-02	6.38.E-02	1.46

[0079]

[0080]

고속 여과는 *S. cerevisiae*에서 보조인자 추출을 위한 최적의 퀀칭 방법이 될 수 있으며, 세포막 손상을 최소화하고 대사체의 유출을 방지한다. 우리의 이전 연구들은 추출 단계 이전에 세포 유출을 최소화하고 세포내 대사체를 최대한 보존하는 방법으로 고속 여과가 보고되었다. 고속 여과 방법은 저온 메탄올 퀀칭 방법보다 대사 활동을 멈추는 데 약간 더 오래 걸린다. 그러나, 1) 모든 단계를 수행하는데 걸리는 시간이 20~30초 이내로 매우 짧아 대사체의 변화를 방지하기에 충분하고, 2) 세포막의 유출로 인한 손실을 최소화함으로써, 대사체를 최대한 추출할 수 있다. 본 연구에서는 고속 여과법이 *S. cerevisiae*의 세포막 손상을 최소화하고 저온 메탄올 퀀칭 방법 보다 대부분의 보조인자 추출효율이 더 높은 것으로 나타났다(도 3). 저온 메탄올 퀀칭 방법에서는 고속 여과법에 비해 NADPH만 다른 보조인자보다 상당히 높았다(도 3). 저온 메탄올 퀀칭법은 고속 여과법 보다 더 빨리 대사 활동을 멈추기 때문에 NADPH의 급격한 변화를 방지하고 높은 수율을 얻을 수 있습니다. 대신에, 저온 메탄올 퀀칭은 배양 배지를 적절하게 씻어내지 못하기 때문에 (대개 대사체의 과도한 유출을 방지하기 위해 생략됨) 고속 여과에서보다 저온 메탄올 퀀칭에서 약간 더 높은 NADPH 농도(8.44 nM)는 배지에서 유입된 잔류량일 것이다.

[0081]

AMW, 50ACN, WiPM, 순수 메탄올의 4가지 추출 용매를 비교하기 위해 대수기까지 *S. cerevisiae*를 배양한 후 고속 여과방법을 이용하여 세포를 분리하고 각각의 추출 용매를 이용하여 보조인자를 추출하였다. 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드의 안정성을 높이기 위해 각 추출 용매에 15mM 아세트산 암모늄을 가했다. AMP, ADP, ATP, NAD+, NADH, NADP+, NADPH 및 acetyl-CoA의 8가지 보조 인자를 정량화했다. 추출 용매에 따라 보조 인자의 중요한 변화를 찾기 위해 ANOVA와 Fisher의 LSD를 수행했다(표 6). 4가지 추출 용매의 추출 효율을 비교할 때, 모든 보조인자의 추출량이 순수한 메탄올에서 가장 낮았다(도 4). 대부분의 보조인자의 추출량은 50ACN에서 가장 높았다(도 4). NADH의 추출량은 AMW에서 가장 높았다(도 4).

표 6. 4가지 추출 용매 간의 보조 인자 농도 비교에 대한 ANOVA 결과

Cofactor metabolites	f value	p value	FDR adjusted p value	Fisher's least significant differences
AMP	4.53	9.28.E-03	9.28.E-03	50ACN - PM; WiPM - PM
ADP	30.79	1.48.E-09	2.37.E-09	50ACN - AMW; 50ACN - PM; AMW - PM; WiPM - AMW; WiPM - PM
ATP	40.85	4.73.E-11	1.89.E-10	50ACN - AMW; 50ACN - PM; 50ACN - WiPM; AMW - PM; WiPM - PM
NAD+	30.24	1.83.E-09	2.44.E-09	50ACN - PM; AMW - PM; WiPM - PM
NADH	15.97	1.60.E-06	1.82.E-06	AMW - 50ACN; 50ACN - PM; AMW - PM; AMW - WiPM; WiPM - PM
NADP+	35.98	2.29.E-10	6.10.E-10	50ACN - AMW; 50ACN - PM; AMW - PM; WiPM - AMW; WiPM - PM
NADPH	34.13	4.34.E-10	8.68.E-10	50ACN - AMW; 50ACN - PM; AMW - PM; WiPM - AMW; WiPM - PM
Acetyl-CoA	42.52	2.85.E-11	1.89.E-10	50ACN - PM; 50ACN - WiPM; AMW - PM; AMW - WiPM; WiPM - PM

[0082]

[0083]

*S. cerevisiae*에서 cofactors를 추출하기 위해서는 50ACN이 최적의 추출용매로 기존 추출용매인 순수한 메탄올 보다 추출효율이 높다. 대사체 추출에 있어서 용매와 대사체의 극성 유사성과 용해도가 주요 요소이다. 대부분의 보조 인자는 극성이 높고 물에 용해된다. 순수한 메탄올의 추출 효율은 모두 물을 함유한 추출 용매인 AMW, WiPM, 50ACN의 추출 효율보다 현저히 낮았다(도. 4). 비특허문헌 3에서 *S. cerevisiae*의 극성 대사체 추출 효율은 물을 함유한 용매인 50ACN과 AMW 보다 순수 메탄올과 끓는 에탄올에서 현저히 낮았다. 이는 물(극성: 25℃에서 1.000)이 추출 용매에서 극성이 높은 보조 인자의 용해도를 증가시키기 때문일 수 있다. 기존 용매인 끓는 에탄올과 다른 용매의 추출 효율을 비교하지는 않았다. 끓이는 과정에서 용매가 증발하기 때문에 건조 및 재구성하고 같은 바람직하지 않은 추가 단계가 정량화에 필수적이다. 그러나 끓는 에탄올은 낮은 극성(25℃에서 0.654)과 높은 끓는점(78.37℃로 인해 보조인자의 추출 효율이 매우 낮을 것으로 예상된다. 끓는 에탄올은 극성 대사체 추출에 적합하지 않으며, NAD는 41℃에서도 1시간 이내에 반감되는 것으로 보고되었다. 50ACN이 대부분의 보조인자에 대해 가장 높은 추출 효율을 보였지만, AMW는 NAD+와 NADH에 대해 가장 높은 추출 효율을 보였다(도 4). 실험의 목적이 *S. cerevisiae*의 NAD+/NADH 비율을 측정하는 것이라면 추출 용매로 AMW를 사용하는 것이 좋다. 요약하면, 최적 분석 방법으로 15 mM 아세트산 암모늄 완충액(pH 7.77)를 포함하는 AMW와 역상 용리

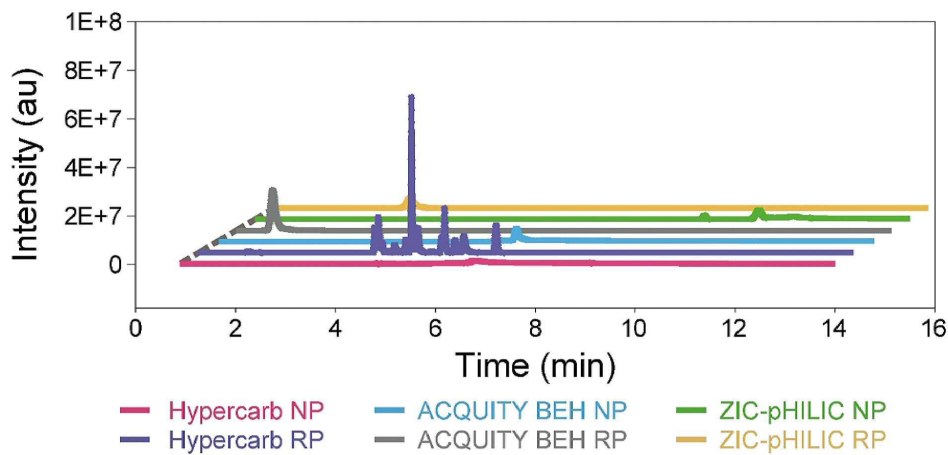
Hypercarb 컬럼을 사용하여 음성 모드에서 LC/MS 분석과 *S. cerevisiae*의 최적의 보조인자 추출 방법으로 고속 여과와 50ACN을 사용하는 것을 개발하였다.

[0085] 3. 결론

[0086] 보조인자는 살아있는 유기체의 대사 상태 및 병목현상을 이해하는 데 가장 중요한 세포 내 대사체다. 현재까지 *S. cerevisiae*에서 특정 보조인자의 LC/MS 분석 및 보조인자 추출을 위한 몇 가지 방법이 보고되었다. 그러나 이러한 방법들은 여러 가지 한계가 있고 체계적으로 비교되지 않았기 때문에 보조인자에 대한 최적의 분석 조건 및 추출 방법은 제시되지 않았다. 본 발명에서는 보조인자 분석 조건으로 역상 용리 Hypercarb 컬럼과 15mM 아세트산 암모늄 완충액(pH 7.77)을 포함하는 아세토니트릴:메탄올:물 혼합물(4:4:2; v/v/v)을 최적화하였다. 또한 최적의 켄칭 방법으로 고속 여과를, 최적의 추출용매로 아세토니트릴:물 혼합물(1:1; v/v)을 확립하였다. 최적화된 방법은 보조 인자의 LC/MS 분석 및 *S. cerevisiae*에서 보조 인자 추출을 위한 표준 프로토콜로 사용할 수 있다.

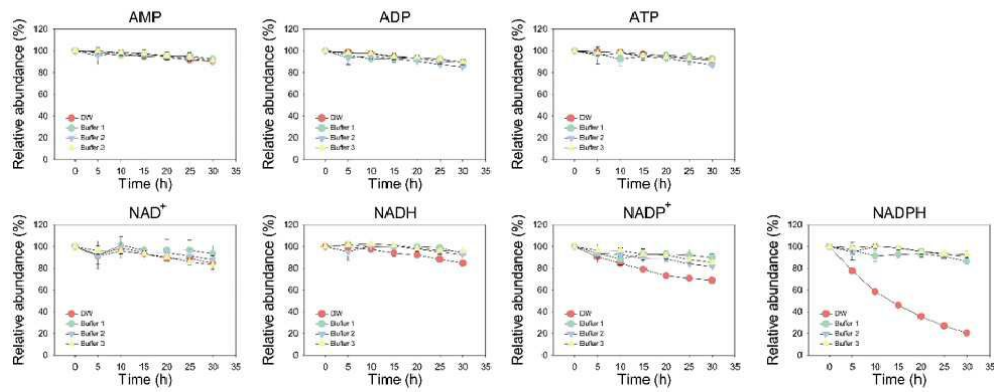
도면

도면1

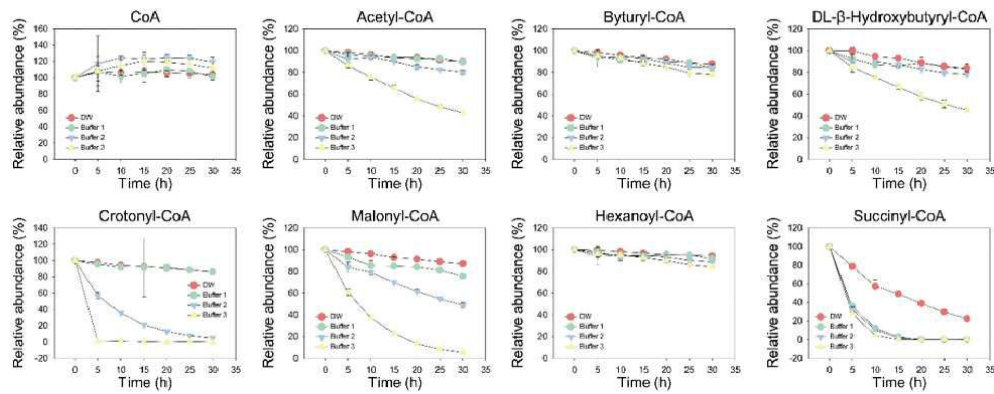


도면2

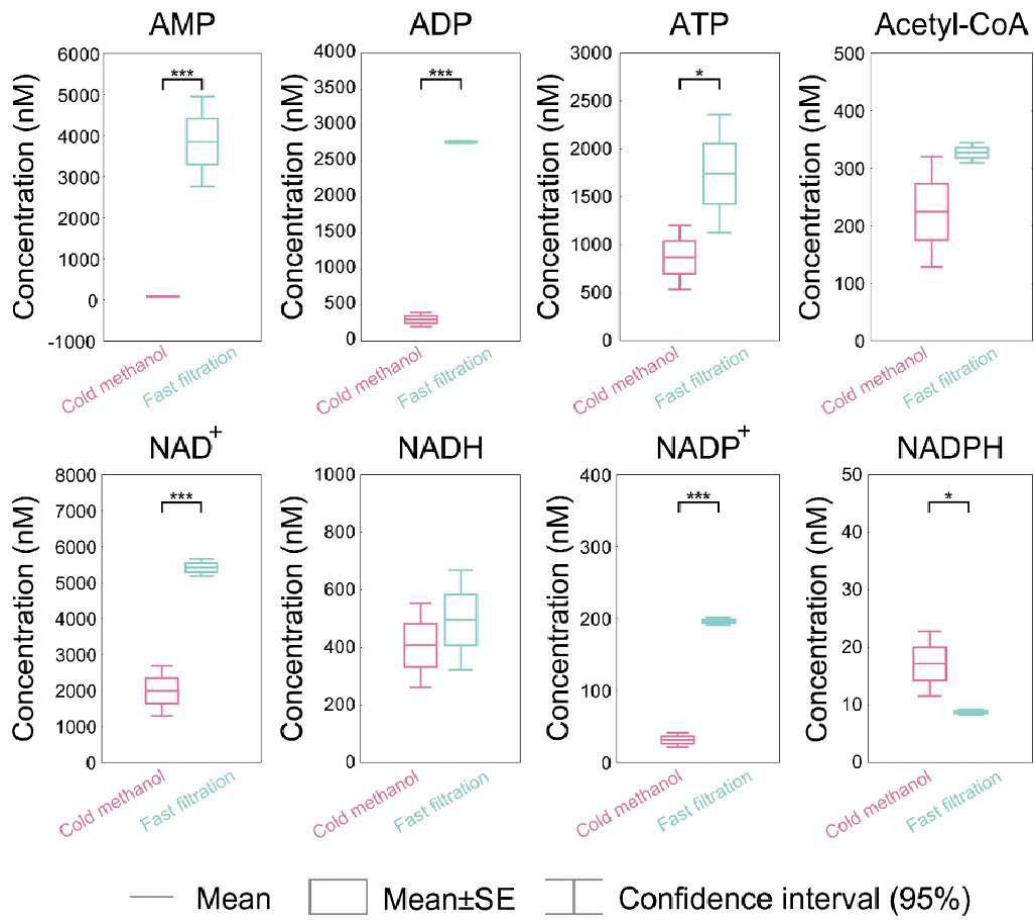
A



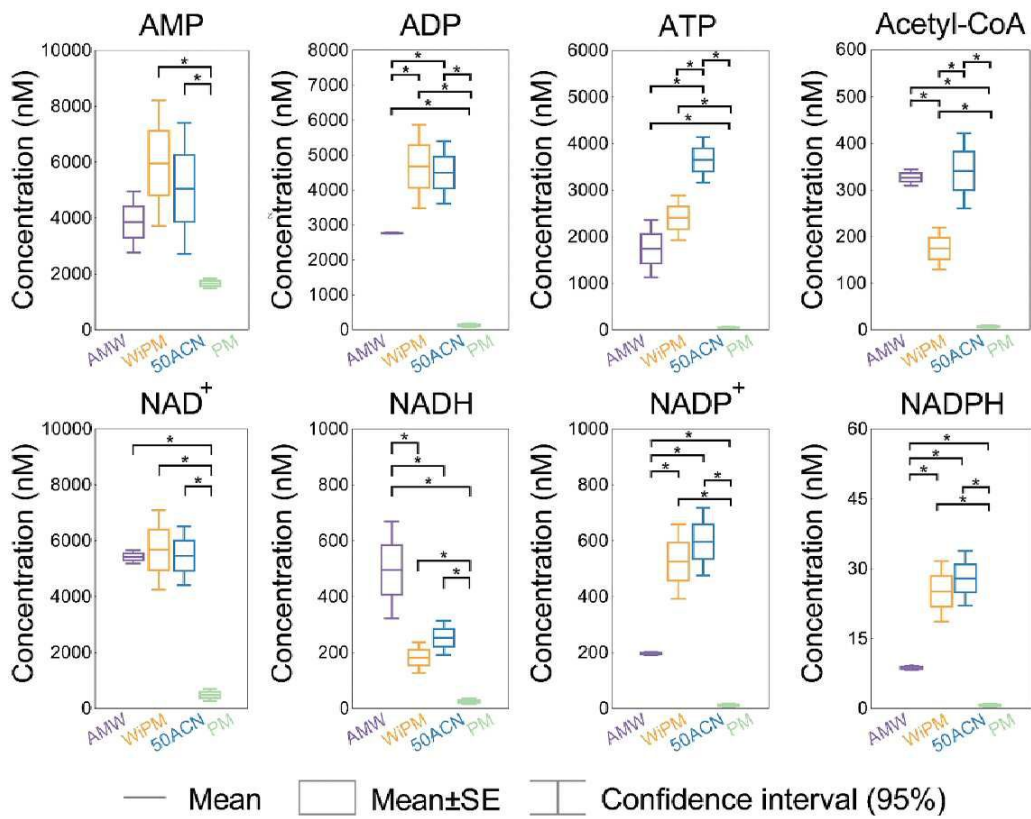
B



도면3



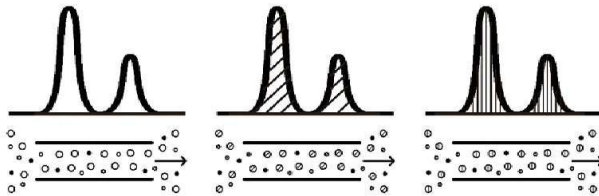
도면4



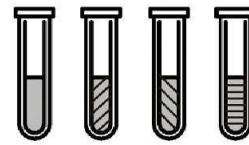
도면5

A. Setting for analytical conditions

1) Comparison of columns and elution conditions



2) Comparison of solvents



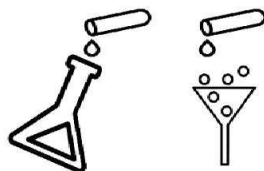
*Optimal analytical conditions

Columns and elution: Hypercarb with reverse phase elution

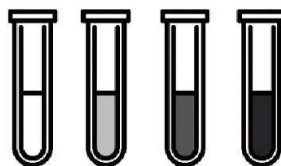
Solvent: Acetonitrile:methanol:water mixture (4:4:2; v/v/v) containing 15 mM ammonium acetate buffer (pH 7.77)

B. Setting for extraction methods from *S. cerevisiae*

1) Comparison of quenching methods



2) Comparison of extraction solvents



*Optimal extraction methods

Quenching method: Fast filtration

Extraction solvent: Acetonitrile:water mixture (1:1; v/v)