

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0072958 (43) 공개일자 2011년06월29일
(51) Int. Cl. <i>C12P 19/02</i> (2006.01) <i>C07H 3/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0130081 (22) 출원일자 2009년12월23일 심사청구일자 2009년12월23일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 김경현 서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18동 703호 최인걸 서울특별시 중구 신당3동 남산타운아파트 8동 502호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인충현	

전체 청구항 수 : 총 9 항

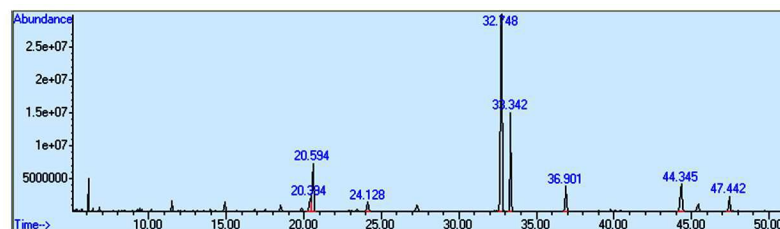
(54) 사카로파커스 테그러단스 2-40의 조효소를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법

(57) 요약

본 발명은 해양 미생물인 사카로파커스 테그러단스 2-40로부터 생산된 조효소액을 세포내 조효소액과 세포외 조효소액으로 분획화하는 단계, 상기 분획화된 조효소액으로 아가로를 분해하여 당화하는 효소의 활성을 측정하는 단계 및 최종 분해 산물인 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 기체 크로마토그래피/질량분석기를 이용하여 동시에 독립적으로 정량화하는 분석방법을 제공한다.

본 발명의 해양 미생물로부터 생산된 조효소액을 이용한 아가로를 분해하는 기법을 이용하면 아가로스 기질로부터 이를 구성하는 단당류인 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 분해 산물로 획득할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면 조효소에 의한 최종 분해 산물인 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 기체 크로마토그래피/질량분석법을 이용하여 독립적으로 정량화할 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

윤은주

서울특별시 금천구 시흥3동 현대빌라 14동 104호

신민혜

인천광역시 남동구 구월2동 신세계아파트 4동 407호

특허청구의 범위

청구항 1

사카로파거스 데그러단스 2-40을 배양하는 단계;

상기 배양된 사카로파거스 데그러단스 2-40에서 조효소를 분리하는 단계;

상기 분리된 조효소를 이용하여 기질을 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스로 분해하는 단계;

상기 분해된 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스를 N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아마이드로 유도체화시키는 단계; 및

상기 유도체화된 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스를 기체 크로마토그래피/질량분석하는 단계;를 포함하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배양된 사카로파거스 데그러단스 2-40에서 조효소를 분리하는 단계에서 조효소는 세포내 조효소 및 세포외 조효소로 분류화하여 분리되는 것을 특징으로 하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 사카로파거스 데그러단스 2-40은 아가로스, 아가 또는 우뭇가사리를 탄소원으로 배양되는 것을 특징으로 하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 사카로파거스 데그러단스 2-40은 아가를 탄소원으로 12 내지 20시간 동안 배양되는 것을 특징으로 하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 분해된 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스를 N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아마이드 유도체화시키기 전에 메톡심화하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 탄소원은 아가인 것을 특징으로 하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 유도체화된 3,6-안하이드로 갈락토오스는 질량분석기에서 247, 131 및 73에서 유의적인 피크가 관찰되는 것을 특징으로 하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 분리된 조효소를 이용하여 기질을 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스로 분해하는 단계 후에, 분해 산물의 일부를 박층 크로마토그래피로 분석하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법.

청구항 9

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 방법의 정량방법을 이용하여, 사카로파거스 테그리단스 2-40의 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생성 활성을 측정하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아가로스 분해산물의 생산 및 정량방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 조효소로 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하고, 생산된 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 정량화할 수 있는 정량방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 화석연료의 고갈과 지구 온난화 문제에 따라 대체 에너지의 개발에 대한 필요성이 커지고 있다. 대기 중의 이산화탄소 농도는 1957년 315ppm의 수준이었으나 2007년에는 380ppm로 증가되었고, 이에 따라 지구의 연평균 온도가 0.5℃ 상승하였다. 따라서 세계 각국은 온실가스 저감 및 신재생 에너지의 개발에 노력하고 있다.

[0003] 바이오매스의 이산화탄소 흡수력을 통한 온실가스의 저감 노력도 이 중 하나이다. 바이오 에탄올은 당질계, 전분질계 및 목질계 원료로부터 생산되는 에탄올로서 화석연료를 대체할 신 연료로 각광을 받고 있다. 당질계와 전분질계 원료는 식량자원과 연관되어 장기적인 관점에서 볼 때 원료 수급이 불안정하다는 문제점을 가지고 있으나, 목질계 원료는 폐목재나 임산 부산물이 원료를 이용할 수 있으므로 원료 수급의 안정성을 가지고 있다. 다만, 목질계 원료는 당질계와 전분질계보다 성분들이 복잡한 구조를 이루고 있어서 전처리 공정이 비교적 복잡하다. 특히 당화 공정을 하기 전에 리그닌 성분을 제거하는 전처리 과정이 반드시 수반되어야 하는데 이로 인한 전처리 공정의 비용과 셀룰로오스 기질의 구조적 특성으로 당화 수율이 낮다는 단점을 가지고 있다.

[0004] 새로운 바이오 에탄올의 원료로서 최근에는 해조류가 부각되고 있다. 해조류는 미세조류(microalgae; 클로렐라, 스피루리나 등)와 대형조류(macroalgae; 홍조류, 갈조류, 녹조류 등)로 나눌 수 있는데 원료로서 이용 가치가 높은 것은 대형조류이다. 홍조류, 갈조류 및 녹조류의 성분분석을 통해 보면 탄수화물 함량이 가장 높은 것은 홍조류이며 그 다음 갈조류, 녹조류 순이다(Jensen, A. (1993). Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia*, 261, 15-23).

[0005] 삼면이 바다로 둘러싸여 있고 국토면적이 좁은 우리나라의 지형적 특성을 고려해 볼 때 해양 유래 바이오매스를 이용하여 바이오 에탄올을 생산하는 것이 적합하다고 할 수 있다. 일본에서도 Ocean Surice Project라 하여 동해안의 배타적 경제수역에서 해조류를 배양하여 일본 자동차 연료의 30%에 해당하는 에탄올을 생산하고자 하는 프로젝트가 계획 중에 있고 (Aizawa M, Asaoka K, Atsumi M, Sakou T.(2007). Seaweed Bioethanol Production in Japan - The Ocean Sunrise Project. 2007 OCEANS Conference. pp. 345-349, IEEE), 2009년에 미국에서도 에너지부의 ARPA-E(Advanced Research Project Agency-Energy)를 통해 Du Pont과 워싱턴대학교의 벤처업체에 대형의 연구비를 투자하여 홍조류와 같은 대형조류(macroalage)로부터 바이오연료를 생산하는 연구를 시작하였다(U.S department of energy. (2009). Research projects-Biomass energy. <<http://arpa-e.energy.gov/projects/BIO.html>>).

[0006] 홍조류를 구성하는 세포벽 다당류는 셀룰로오스(cellulose), 자일란(xylan), 만난(mannan), 아가(agar) 및 카라기난(carrageenan) 등이 대표적이며 셀룰로오스는 그다지 많지 않다. 홍조세포벽의 외층 및 세포간격을 구성하는 점성 다당류의 주성분은 아가이다. 아가는 단일당으로 형성된 다당류가 아니고 아가로스(약 70%)와 아가로펙틴(약 30%)의 혼합물이다. 아가 다당류 중의 아가로스 비율은 해조류의 종에 따라 다르며, 평균 70%를 차지한다(박재일, 우희철, 이재화. (2008). 해양조류로부터 바이오에너지 생산: 현황 및 전망. *Korean Chem. Eng. Res.*

46, 833-844.).

- [0007] 아가 다당체는 갈락토오스(galactose)와 3,6-안하이드로 L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose, AHG)를 단위체로 하여 알파 1,3 결합(α -1,3-linkage)과 베타 1,4 결합(β -1,4-linkage)로 번갈아 가면서 연결된 중합체이다(Kazlowski B, Pan CL, Ko YT. (2008). Separation and quantification of neoagaro and agaro-oligosaccharide products generated from agarose digestion by beta agarase and HCl in liquid chromatography systems. *Carbohydrate Research*, 343, 2443-2450). 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스가 알파 1,3-결합을 이루고 있는 단위체를 네오아가로바이오스라고 명명하며, 이 물질을 NMR 분석을 통해 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스로 확인한 논문이 보고된 바 있다 (Kim HT, Lee S, Lee D et al. (2009). Overexpression and molecular characterization of Aga 50D from *saccharophagus degradans* 2-40. *Applied microbiology and biotechnology*, 1432-0614 (Online)).
- [0008] 아가를 분해하는 능력을 가진 미생물은 1902년 그랜에 의해 해양 미생물인 바실러스 젤라티쿠스가 처음으로 보고된 후로, 아가리보란스, 알테로모나스, 사이토파가 그리고 마이크로블비퍼 등과 같은 속들이 알려져있다 (Swartz MN, Nancy G. (1958). Agarase from an agar-digesting bacterium. *Journal of bacteriology*, 77, 403-409.).
- [0009] 사카로파거스 테그리단스 2-40은 호기성, 간균이며 감마서브그룹 프로테오 박테리움으로 아가로스를 비롯한 복잡한 다당류를 분해하는 능력이 뛰어난 균으로 알려져있다(Ekberg NA, Gonzalez JM, et al. (2005). *Saccharophagus degradans* gen. nov., sp. Nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides. *International journal of systematics and evolutionary microbiology*, 55, 1545-1549.). 이 전에는 마이크로 블비퍼 속으로 분류되었으나 2005년 사카로파거스 테그리단스 2-40으로 정식 명명되었으며, 2008년 이 균주에 대한 유전체 서열(U.S. Department of Energy Joint Genome Institute)이 밝혀졌다(Weiner RM, Talyor LE, Henrissat B, et al. (2008). Complete genome sequence of the complex carbohydrate -degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* strain 2-40, *PLOS Genetics*, 4, e1000087). 이 균주에 대한 유전체 서열은 밝혀졌으나 대사 경로나 조절 기작은 보고된 바가 거의 없으며, 다양한 탄소원으로 균주를 배양하였을 경우 발현되는 효소 및 대사체 프로파일에 대한 연구도 미비한 실정이다(Shin MH, Lee DY, et al. (2009). Global metabolic profiling of plant cell wall polysaccharide degradation by *saccharophagus degradans*. *Biotechnology and bioengineering*, online published.).
- [0010] 해조류 바이오 매스로부터 바이오 에탄올을 생산하는 연구를 하기 위해서는 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 정량화하는 방법의 개발이 선행되어야 한다. 이를 통해 전 처리와 당화 공정에서 생산되는 발효 가능한 단당들을 정량하여 당화 공정의 수율과 그 다음 과정인 발효를 통한 생성물의 수율을 계산할 수 있으며, 3,6-안하이드로 갈락토오스의 가수분해를 통해 발효가 가능한 갈락토오스로 전환하는 신규효소 등의 개발 등 원천기술 개발을 위한 연구도 가능하다.
- [0011] 우리나라 신성장동력사업 17개 중의 한 분야인 신재생에너지에 포함된 해양바이오연료분야의 핵심은 우뭇가사리와 같은 홍조류로부터 에탄올과 같은 바이오연료를 생산하는 것이다. 우뭇가사리 건조중량의 80%는 탄수화물이고, 이중 80%는 아가로스와 같은 갈락탄이며, 갈락탄을 구성하는 것이 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스이다. 2007년에 한국생산기술연구원에서 개발한 홍조류로부터 바이오에탄올 생산공정은 홍조류의 일종인 우뭇가사리를 황산으로 산가수분해를 하여 당화한 후에 갈락토오스, 3,6-안하이드로 갈락토오스, 글루코오스 등이 포함된 그 가수분해물을 효모를 이용하여 발효하여 에탄올을 생산하는 것이다(김경수 외. (2007) 해조류를 이용한 바이오에너지 생산 다당성 연구. 에너지○자원기술개발 사업 최종 보고서 초록). 이러한 산가수분해 전처리 및 당화공정을 이용하게 되면 산처리 과정에서 생성되는 부산물인 하이드록시퍼피랄 및 퍼필랄 등과 같은 당과 분해 산물로 인해 에탄올 발효가 전혀 되지 않거나 에탄올 수율이 아주 낮아지는 단점이 있다(Sun Y, Cheng Y. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour technology*. 83, 1-11.; Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied microbiology and biotechnology*. 11, 10-26). 따라서 갈락탄을 단당류로 분해할 수 있는 효소를 사용하여 당화하는 효소적 당화공정의 개발이 필요하다. 우뭇가사리와 같은 홍조류로부터 에탄올이나 부탄올과 같은 발효로 얻어지는 연료생산을 위해서는 반드시 아가를 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스로 전환해야 한다. 또한, 효모 등에 의해 발효가 되지 않는 당인 3,6-안하이드로 갈락토오스를 가수분해하여 발효성 당으로 전환하거나 직접 발효하는 대상을 찾는다면 바이오연료 생산수율이 약 두 배로 증대시킬 수 있다. 따라서 이러한 연구를 위해서는 3,6-안하이드로 갈락토오스의 정확한 정량방법은 필수적으로 개발되어야 한다. 현재까지 3,6-안하이드로 갈락토오스

표준물은 D-form만 영국의 dextra laboratories에서 고가로(100mg 당 100 파운드) 구입이 가능하며 홍조류의 아가의 구성성분인 L-form은 표준물을 제조되고 있지 않아 구입이 불가능한 실정이다. 따라서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 효소적 생산과 정량분석 방법의 개발에 대한 중요성이 급격히 증대되고 있다.

[0012] 아가로스를 구성하는 단당체인 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 정량 법에 관한 연구는 주로 레소시놀(resorcinol)과 안쓰론(anthrone)과 같은 발색 시약을 이용한 발색 반응을 통해 이루어져 왔다(Yaphe W. (1960). colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides. *Analytical Chemistry*, 32 (10),1327-1330.; Matsuhira B, Zanlungo AB. (1983). Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides from red seaweeds. *Carbohydrate Research*, 118, 276- 279.). 다만, 이러한 방법들은 시료처리가 복잡하고, 분석을 위한 준비시간이 오래 소요되며, 정확도가 낮은 단점이 있다. 혼합물의 분리 분석에 널리 이용되는 기체 크로마토그래피는 개개의 화합물이 컬럼 내부에 머무르는 시간 차이를 이용하는 분석방법이다(Jol CN, Neiss TG, Penninkhof B et al. (1999). A novel high-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose. *Analytical Biochemistry*, 268 (2), 213-222.; Hama Y, Nakagawa H, Kurosawa M, Sumi et al. (1998). A gas chromatographic method for the sugar analysis of 3,6-anhydrogalactose -containing algal galactans. *Analytical Biochemistry*, 265 (1),42-48.; Ye FT, Yan XJ, Xu JL et al. (2006). Determination of aldoses and ketoses by GC-MS using differential derivatisation. *Phytochemical Analysis*,17 (6), 379-383.). 상기 보고된 논문들에 따르면, 단당류와 다당류의 분리 또는 단당류 중에서도 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 직접 분석하지는 않았으며, 이들이 비슷한 분자량과 구조를 갖고 있으므로 두 물질이 혼합되어 있을 때 독립적으로 각각을 정량화하기가 어렵다.

[0013] 도 1은 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 고성능 액체 크로마토그래피 결과이다. 도 1을 참조하면, 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 피크가 유의적으로 분리되지 않는다는 것을 알 수 있다. 이는 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스는 비슷한 분자량과 구조를 갖고 있기 때문이며, 결과적으로 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 독립적으로 각각을 정량하기 어려운 문제점을 가지고 있다. 따라서, 아가로의 분해산물인 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 동시에 정량화할 수 있는 기술에 대한 필요성이 크다.

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

[0014] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 해양미생물인 사카로파거스 데그리단스 2-40의 조효소액을 이용하여 아가로를 분해함으로써 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하고, 이들 각각을 독립적으로 정량화할 수 있는 분석방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 사카로파거스 데그리단스 2-40의 조효소액을 이용하여 아가로를 분해하는 효소의 활성을 측정하는 것이다.

과제 해결수단

[0016] 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 달성하기 위하여, 사카로파거스 데그리단스 2-40을 배양하는 단계, 상기 배양된 사카로파거스 데그리단스 2-40에서 조효소를 분리하는 단계, 상기 분리된 조효소를 이용하여 기질을 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스로 분해하는 단계, 상기 분해된 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스를 N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아마이드로 유도체화시키는 단계 및 상기 유도체화된 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스를 기체 크로마토그래피/질량분석하는 단계를 포함하는 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 배양된 사카로파거스 데그리단스 2-40에서 조효소를 분리하는 단계에서 조효소는 세포내 조효소 및 세포외 조효소로 분획화되어 분리될 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 사카로파거스 데그리단스 2-40은 아가로스, 아가 또는 우뭇가사리를 탄소원으로 배양될 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 사카로파거스 데그리단스 2-40은 아가를 탄소원으로 12 내지 20시간 동안 배양될 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 분해된 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스를 N-메틸-N-(트리

메틸실릴) 트리플루오로아세트아마이드 유도체화시키기 전에 메톡심화하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄소원은 아가린 것이 바람직하다.

[0022] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 유도체화된 3,6-안하이드로 갈락토오스는 질량분석기에서 247, 131 및 73에서 유의적인 피크가 관찰될 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 분리된 조효소를 이용하여 기질을 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스로 분해하는 단계 후에, 분해 산물의 일부를 박층 크로마토그래피로 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명은 상기 두 번째 과제를 달성하기 위하여, 상기의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법을 이용하여, 사카로파거스 데그라단스 2-40의 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생성 활성을 측정하는 방법을 제공한다.

효 과

[0025] 본 발명에 따르면, 사카로파거스 데그라단스 2-40에서 생성된 조효소액으로 아가로를 분해하여 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산할 수 있고, 기체 크로마토그래피/질량분석법을 이용하여 분해 산물을 분석하여 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 양을 독립적으로 정량화할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면 효소로 분해된 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 독립적으로 정량화할 수 있으므로, 효소에 의한 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 생성 활성을 독립적으로 파악할 수 있다. 따라서, 다양한 탄소원으로 배양된 효소의 활성 비교를 통해 구체적인 배양조건을 결정할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0027] 본 발명은 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법에 관한 것으로서, 사카로파거스 데그라단스 2-40을 배양하는 단계, 상기 배양된 사카로파거스 데그라단스 2-40에서 조효소를 분리하는 단계, 상기 분리된 조효소를 이용하여 기질을 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스로 분해하는 단계, 상기 분해된 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스를 N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아마이드로 유도체화시키는 단계 및 상기 유도체화된 갈락토오스 및 3,6-안하이드로 갈락토오스를 기체 크로마토그래피/질량분석하는 단계를 포함한다.

[0028] 사카로파거스 데그라단스 2-40(*Saccharophagus degradans* 2-40)은 다당류를 분해하는 능력이 뛰어난 균이며, 탄소원에 따라 유도되는 효소가 상이하다. 다당류를 탄소원으로 사카로파거스 데그라단스 2-40을 배양하면, 다당류를 분해하는 효소를 통해 에너지원으로 이용 가능한 단당류로 분해시키는 능력을 갖고 있다. 사카로파거스 데그라단스 2-40의 이러한 특성은 해조류 바이오 매스의 상당 부분을 차지하고 있는 아가로를 분해하는데 이용 가능하고, 또한 여러 가지 효소가 조합된 조효소(crude enzyme)를 통해 아가로스 중합체로부터 아가로를 구성하는 단당류인 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 한 번의 과정을 통해 생산할 수 있는 장점을 갖고 있다. 이와 같이, 사카로파거스 데그라단스 2-40은 배양에 이용되는 탄소원의 종류에 따라 특성이 다른 조효소가 생성되므로 동일한 아가로스일지라도 분해생성물인 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 특성과 혼합비율이 달라지게 된다.

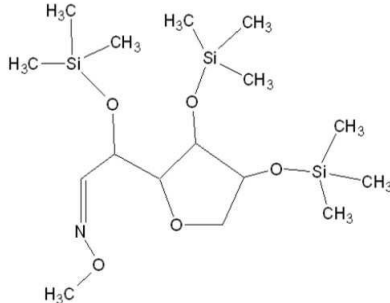
[0029] 본 발명의 일 구현예에서는 다양한 종류의 탄소원으로 사카로파거스 데그라단스 2-40을 배양하고, 사카로파거스 데그라단스 2-40에서 분리된 세포내 조효소 및 세포외 조효소로 기질을 분해하고, 생성된 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 기체 크로마토그래피/질량분석법을 이용하여 정량화하였다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 기체 크로마토그래피/질량분석법을 이용하여 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 정량화하기 위한 표준화가 이루어질 수 있다. 이 과정을 설명하면 다음과 같다. 먼저, 3,6-안하이드로 갈락토오스 샘플을 진공 농축기(centrifugal vacuum concentrator)를 이용하여 건조시키고, 메톡심화(methoximation)시켰다. 메톡심화 과정은 질량분석법에서 당 물질에 대한 피크가 여러 개로 분산되는 것을 방지하기 위한 것으로, 알데하이드나 케토그룹의 산소에 질소와 메틸기가 결합하며 당이 링 형태로(cyclization) 전환되는 것을 억제한다.

[0031] 이어서, N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아마이드(N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide)를 이용한 유도체화 반응을 통해 유도체화 생성물의 휘발도를 높여주었다. 유도체화 반응은

N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아마이드와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 반응시켜 3,6-안하이드로 갈락토오스의 활성수소를 트리메틸실릴기로 치환시키는 과정이다. 유도체화된 3,6-안하이드로 갈락토오스의 구조식은 아래의 화학식 1과 같다.

화학식 1



유도체화된 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스는 휘발도가 높아지게 되는데, 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스가 유도체화되는 효율이 서로 상이하므로 기체 크로마토그래피에서 분리된 피크를 나타내게 된다. 이와 같이 3,6-안하이드로 갈락토오스를 기체 크로마토그래피/질량분석법으로 정량화하고, 상용화된 장비에서 정량화된 갈락토오스에 대한 데이터 베이스를 이용하면 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스 모두를 독립적으로 정량화할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기의 표준화된 정량화 방법에 의하여 다양한 조건에서 배양된 사카로파거스 데그리단스 2-40의 기질 분해 특성을 분석할 수 있다. 사카로파거스 데그리단스 2-40은 글루코오스, 갈락토오스, 아가로스, 아가, 우뚝가사리와 같은 다양한 탄소원을 이용하여 배양될 수 있고, 배양된 사카로파거스 데그리단스 2-40은 세포내 조효소와 세포외 조효소로 분리될 수 있다. 사카로파거스 데그리단스 2-40에서 조효소를 분리하는 과정은 다음과 같다. 먼저, 원심분리법으로 배양액을 원심분리하여 세포와 상등액으로 분리한다. 이어서, 세포 부분을 초음파 처리하고 원심분리하여 세포내 조효소를 얻는다. 이어서, 원심분리한 배양액의 상등액을 침전법으로 단백질을 농축하고 버퍼용액으로 투석하여 세포외 조효소를 얻는다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 다양한 탄소원으로 배양된 사카로파거스 데그리단스 2-40에서 분리시킨 세포내 조효소와 세포외 조효소의 AHG 생성 활성을 측정할 수 있다. AHG 생성 활성의 측정은 AHG 생성의 부피 활성(volumetric AHG generation activity, units/L culture broth)과 AHG 생성의 비활성(specific AHG generation activity, units/g protein)을 측정함으로써 수행된다. 이 과정에서 상기에서 설명한 내용의 기체 크로마토그래피/질량분석법을 이용한 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스 정량화 방법이 이용될 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 사카로파거스 데그리단스 2-40의 배양 시간별로 효소의 활성을 측정할 수 있다. 이 과정에서도 기체 크로마토그래피/질량분석법을 이용한 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스 정량화 방법이 이용될 수 있다.

이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

실시예 1-1(사카로파거스 데그리단스 2-40의 배양과 조효소의 추출)

사카로파거스 데그리단스 2-40을 최소배지에서 배양하였다. 배지는 2.3% 농도의 해수염, 0.1% 농도의 추출된 이스트(yeast extract), 0.05%의 암모니움 클로라이드(ammonium chloride) 및 50mM의 Tris-HCl(pH 7.4)를 사용하였다. 탄소원으로는 0.2%(w/v) 농도의 글루코오스, 갈락토오스, 아가로스, 아가 및 우뚝가사리를 사용하였다. 각각의 탄소 원으로 균주를 레이트-익스포넨셜 페이즈(late-exponential phase)까지 배양 후 샘플링 하였으며, 조효소는 세포 내 조효소와 세포 외 조효소로 분리하였다.

조효소를 분리하는 과정은 다음과 같다. 먼저, 배양액을 원심 분리(5000 rpm, 30분, 4℃)하여 세포와 상등액으

로 분리하였고, 세포부분은 초음파 처리 후 다시 원심 분리 (16,000 rpm, 30분, 4℃)하여 상등액 부분을 취함으로써 세포내 조효소를 얻었다. 세포의 조효소는 원심 분리한(5000 rpm, 30분, 4℃) 배양액의 상등액을 암모늄 설페이트(ammonium sulfate) 침전법으로 단백질을 농축하고 50 mM의 tris-HCl(pH 7.4) 버퍼(buffer)로 투석(dialysis) 처리하여 얻었다. 위의 과정을 거친 조효소들은 10 kDa 막 여과(membrane filtration)를 통해 효소 내 존재하는 염과 당 성분을 여과하였다. 효소 반응 시 조건은 30 ℃, pH 7.4였고, 반응은 세포내 효소는 40분, 세포의 효소는 2시간 반응 시켰다.

[0042] 실시예 1-2(실시예 1-1에 따라 배양된 사카로파커스 테그리단스 2-40의 아가레이즈 활성측정)

[0043] 실시예 1-1에 따라 제조된 사카로파커스 테그리단스 2-40의 아가레이즈 활성을 측정하였다. 가수분해는 0.25%(w/v) 농도의 저융점 아가로스(low melting point agarose)를 이용하여, 50mM의 Tris-HCl 버퍼(buffer, pH 7.4)로 30℃의 온도에서 세포 내 효소는 40분, 세포 외 효소는 2시간 동안 진행하였다. 효소활성은 부피 활성(volumetric activity, units/L culture broth)과 비활성(specific activity, units/g protein)으로 나타내었다. 이때, 1 유닛(unit)은 효소 반응 시 단위시간(분) 당 1 마이크로 몰의 갈락토오스가 생성되는 것을 기준으로 정의하였다. 당 정량시 갈락토오스를 기준 물질로 하여 DNS 법을 이용하였다. 도 2는 다양한 탄소원으로 배양된 사카로파커스 테그리단스 2-40에서 얻은 세포 내 조효소(a)와 세포 외 조효소(b)에 대한 아가레이즈 활성을 측정한 결과이다.

[0044] 실시예 2-1(기체 크로마토그래피/질량분석법을 위한 시료의 준비)

[0045] 3,6-안하이드로 갈락토오스(D-형) 샘플을 진공 농축기(centrifugal vacuum concentrator)를 이용하여 건조시키고, 2%(w/v) 농도의 메틸 하이드록시 아민 하이드로 클로라이드(O-methylhydroxylamine hydrochloride, Fluka, 67546)에 피리딘(Pyridine, Aldrich, 270407) 50 μ l를 넣은 후 75℃에서 30분간 메톡심화(methoximation)시켰다. 이어서, 80 μ l의 N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아마이드(N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, Fluka, 69479)를 넣은 후 40℃에서 30분간 150rpm에서 유도체화 반응을 시켰다. 갈락토오스에 대해서도 유도체화시켜 시료를 제조하였다. 일반적인 단당류를 GC/MS로 분석한 연구는 많이 이루어져 있으므로 샘플을 유도체화 시키는 방법은 다음의 논문들을 참고하였다. (Ye, F. T., Yan, X. J., Xu, J. L., & Chen, H. M. (2006). Determination of aldoses and ketoses by GC-MS using differential derivatisation. *Phytochemical Analysis*, 17(6), 379-383.; Sanz, M. L., Diez-Barrio, M., Sanz, J., & Martinez-Castro, I. (2003). GC Behavior of disaccharide trimethylsilyl oximes. *Journal of Chromatographic Science*, 41(4), 205-208.)

[0046] 실시예 2-2(기체 크로마토그래피/질량분석을 이용한 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 정량화)

[0047] 실시예 2-1에 따라 제조된 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 분석용 시료를 GC 바이알(vial)에 옮기고 기체 크로마토그래피/질량분석(agilent technologies, 5975C, wilmington, DE, USA)을 수행하였다. 기체 크로마토그래피/질량분석 조건은 하기의 표 1과 같다.

[0048] 표 1

파라미터(Parameter)	조건(Condition)
캐리어 기체(Carrier gas)	Helium
오븐 온도(Oven temperature)	100° C for 3.5 min 80-160° C at 15° C/min, held for 20 min 160-200° C at 15° C/min, held for 15min 200-280° C 20° C/min, held for 5 min
인젝터 온도(Injector temperature)	250° C
스플릿 비율(Split ratio)	01:09.6
인젝터 부피(Injection volume)	1 μ l

전자 충격(Electronic impact)	70 eV
스캔 범위(Scan range)	50-600 m/z
계면 온도(Interface temperature)	280° C
컬럼(Column)	DB-5MS capillary column (30 mx25 mm, 0.25 µm film thickness)
이온 소스 온도(Ion source temperature)	230° C

[0050] 도 3은 3,6-안하이드로 갈락토오스 0.1mg에 대한 전체 이온 크로마토그램(total ion chromatogram of 3,6-anhydro-D-galactose)의 결과이고, 도 4는 3,6-안하이드로 갈락토오스에 대한 질량 스펙트럼(mass spectrum of 3,6-anhydro-D-galactose) 결과이다. 도 3을 참조하면, 전체 이온 크로마토그램 결과를 통해 가스 크로마토 그래피 상의 리텐션 타임을 확인 할 수 있다. 또한 도 4를 참조하면, 질량 스펙트럼 결과로 유도체화된 3,6-안하이드로 갈락토오스의 형태와 이온화되어 분리되는 질량 패턴(mass fragmentation pattern)상의 각 피크의 고유한 질량 값을 알 수 있다. 3,6-안하이드로 갈락토오스의 유니크 이온 질량(unique ion mass)은 247, 131, 73이 주요한 피크로 나왔으며 이를 토대로 유도체화 된 3,6-안하이드로 갈락토오스의 구조는 화학식 1과 같이 예측된다. 갈락토오스에 대한 정보는 컴퓨터 상에 저장된 라이브러리를 이용하여 바로 동정할 수 있었다. 토탈 이온 크로마토그램 상에서 3,6-안하이드로 갈락토오스의 리텐션 타임은 20분대였고, 갈락토오스는 32.8분과 33.3분대의 리텐션 타임을 나타내었다. 갈락토오스 피크의 리텐션 타임이 두개로 나온 이유는 알파와 베타 형태의 아노머를 갖고 있기 때문이다.

[0051] 도 5는 다양한 농도에 따른 3,6-안하이드로 갈락토오스의 전체 이온 크로마토그램(overlaid total ion chromatograms of 3,6-anhydro-D-galactose)을 중첩시켜 비교한 결과이다. 도 5를 참조하면, 크로마토그램의 피크 크기는 3,6-안하이드로 갈락토오스의 농도에 비례하였고, 유도체화 효율은 갈락토오스가 3,6-안하이드로 갈락토오스에 비해 더 높은 결과를 나타내었다.

[0052] 도 6은 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 함께 유도체화시켜 기체 크로마토그래피/질량분석법으로 분석한 결과(total ion chromatogram)이다. 사용된 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 양은 0.05mg이었다. 도 6을 참조하면, 기체 크로마토그래피 상으로 리텐션 타임이 10분 정도 차이가 나므로, 이들 각각의 물질을 독립적으로 분석하는 것이 가능하다는 것을 알 수 있다.

[0053] 도 7은 다양한 농도 별로 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스에 대한 기체 크로마토그래피/질량분석을 수행하여 얻은 정량화 직선이다. 정량화 직선을 얻기 위하여 기체 크로마토그래피/질량분석의 피크 면적을 비교하였다. 도 7을 참조하면, 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스에 대한 정량화 직선에 피크 면적을 대입하면 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 양을 도출할 수 있다.

[0054] 실시예 3(탄소원에 따른 사카로파거스 데그리단스 2-40의 3,6-안하이드로갈락토오스 생성 활성 측정)

[0055] 실시예 1-1에 따라 분리시킨 세포내 조효소와 세포외 조효소를 이용하여 실시예 2-2의 정량화 방법으로 탄소원 별 3,6-안하이드로 갈락토오스 생성 활성을 측정하였다. AHG 생성 활성은 volumetric AHG generation activity (units/L culture broth)와specific AHG generation activity(units/g protein)로 표현하였으며 1unit은 효소 반응 시 단위 시간 (min)당 1 마이크로 몰의 3,6-안하이드로갈락토오스가 생성되는 것을 기준으로 정의하였다. 도 8은 탄소원에 따른 사카로파거스 데그리단스 2-40의 3,6-안하이드로갈락토오스 생성 활성 측정 결과이다.

[0056] 실시예 4(사카로파거스 데그리단스 2-40 조효소의 아가로스 분해 패턴 분석)

[0057] 실시예 1-2에서의 반응과 동일한 조건에서 시간 별 반응 산물 분석을 통해 사카로파거스 데그리단스 2-40의 세포내 효소와 세포외 효소의 효소반응 시 기질을 분해하는 패턴을 비교하였다. 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 이용하여 3,6-안하이드로 갈락토오스의 생성 여부를 확인하였고, 고성능액체크로마토그래피 분석을 통해 반응 산물로 생성된 당의 중합도를 확인하였다. 가수분해는 0.25%(w/v) 농도의 저융점 아가로스(low melting point agarose)를 이용하여, 50mM의 Tris-HCl 버퍼(buffer, pH 7.4)로 30℃의 온도에서 진행하였고, 조효소의 농도는 0.5 mg/ml였다. 조효소는 0.2%(w/v) 농도의 아가에서 배양되었다. 도 9와 도 10은 각각 세포내 조효소와 세포외 조효소를 이용하여 얻은 TLC 결과(도 9의 (a), 도 10의 (a))와 고성능액체크로마토그래

피 분석 결과(도 9의 (b), 도 10의 (b))이다. 도 9 및 도 10을 참조하면, 세포 내 효소의 반응 산물의 패턴은 반응 초기에는 DP2가 생성이 되며 시간이 지남에 따라 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스가 생성이 되는 것을 확인 할 수 있으며, 중합도가 큰 당은 생성되지 않는 것을 확인할 수 있다. 각 DP들은 다음의 물질들을 뜻한다. DP1은 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스, DP2는 네오아가로바이오스, DP4는 네오아가로테트라오스, DP6는 네오아가로헥사오스를 뜻하며 이를 간략히 중합도를 나타내는 DP로 표현하였다. 또한 세포의 효소 반응 산물의 패턴은 세포내 효소와는 달리 반응 초기에 중합도가 큰 당들이 생성되며 시간이 지남에 따라 점차적으로 중합도가 낮은 당이 생성되는 것을 확인 할 수 있다. 효소의 반응성은 세포내 효소가 세포외 효소보다 높게 나타났다.

[0058] 실시예 5(사카로파거스 데그리단스 2-40의 배양 시간에 따른 세포 내 조효소의 아가레이즈 활성과 3,6-안하이드로 갈락토오스 생성 활성 분석)

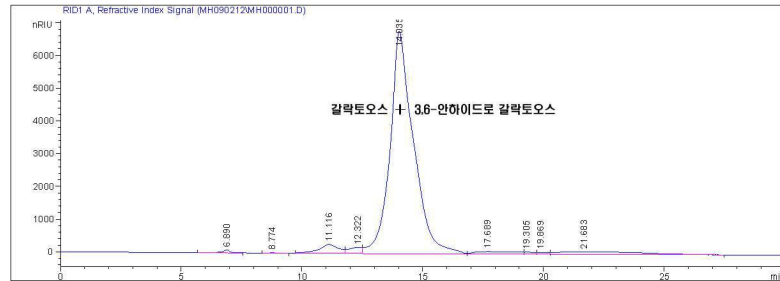
[0059] 실시예 1-2와 실시예 3을 통해 아가레이즈 활성과 3,6-안하이드로 갈락토오스 생성 활성이 가장 높게 나타난 아가를 탄소원으로 사카로파거스 데그리단스 2-40을 배양했을 때 배양 시간에 따른 효소 활성을 측정하였다. 발효는 온도와 pH가 조절된 5L 크기의 발효조에서 진행되었으며, 발효조에는 0.2%(w/v) 농도의 아가가 탄소원으로 포함된 최소배지가 1.5L 채워진 상태였다. 도 11은 배양 시간에 따른 아가레이즈의 부피 활성과 3,6-안하이드로 갈락토오스 생성 활성을 분석한 결과이다. 도 11을 참조하면, 아가레이즈 활성은 레이트-익스포넨셜 페이즈(late-exponential phase)에서 가장 높게 나타났으며 3,6-안하이드로 갈락토오스 생성 활성은 미드-익스포넨셜 페이즈(mid-exponential phase)에서 스테이셔너리 페이즈(stationary phase)까지 일정하게 높게 나타났다. 따라서 효소활성 측정 시 최적의 샘플링 시기는 레이트-익스포넨셜 페이즈이다.

도면의 간단한 설명

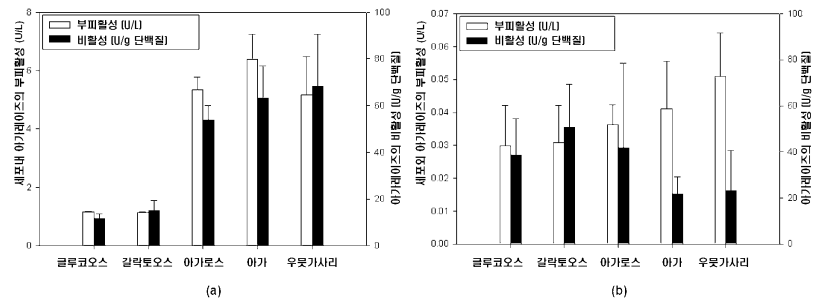
- [0060] 도 1은 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스의 고성능 액체 크로마토그래피 결과이다.
- [0061] 도 2는 다양한 탄소원으로 배양된 사카로파거스 데그리단스 2-40에서 얻은 세포 내 조효소와 세포 외 조효소에 대한 아가레이즈 활성을 측정한 결과이다.
- [0062] 도 3은 3,6-안하이드로 갈락토오스 0.1mg에 대한 전체 이온 크로마토그램의 결과이다.
- [0063] 도 4는 3,6-안하이드로 갈락토오스에 대한 질량 스펙트럼 결과이다.
- [0064] 도 5는 다양한 농도에 따른 3,6-안하이드로 갈락토오스의 전체 이온 크로마토그램을 중첩시켜 비교한 결과이다.
- [0065] 도 6은 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스를 함께 유도체화시켜 기체 크로마토그래피/질량분석법으로 분석한 결과이다.
- [0066] 도 7은 다양한 농도 별로 갈락토오스와 3,6-안하이드로 갈락토오스에 대한 기체 크로마토그래피/질량분석을 수행하여 얻은 정량화 직선이다.
- [0067] 도 8은 탄소원에 따른 사카로파거스 데그리단스 2-40의 3,6-안하이드로갈락토오스 생성 활성 측정 결과이다.
- [0068] 도 9와 도 10은 각각 세포 내 조효소와 세포 외 조효소를 이용하여 얻은 TLC 결과와 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- [0069] 도 11은 배양 시간에 따른 아가레이즈의 부피 활성과 3,6-안하이드로 갈락토오스 생성 활성을 분석한 결과이다.

도면

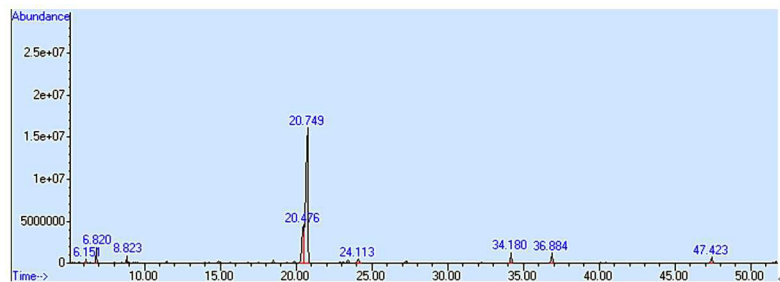
도면1



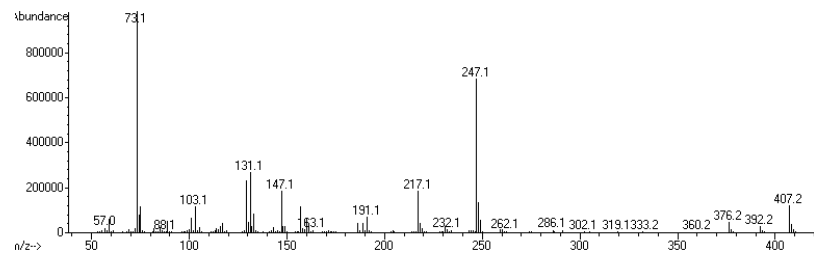
도면2



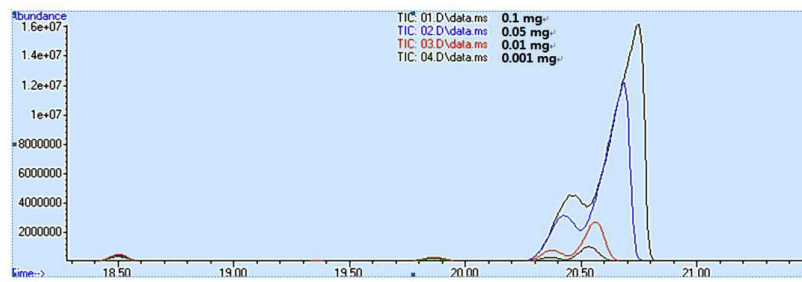
도면3



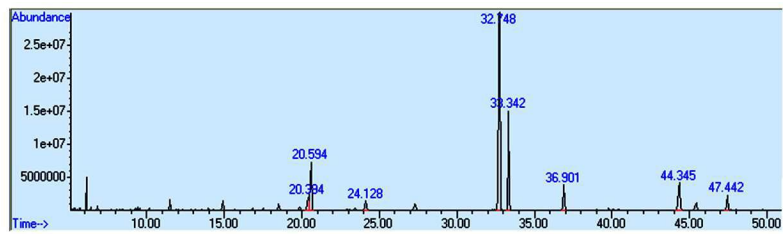
도면4



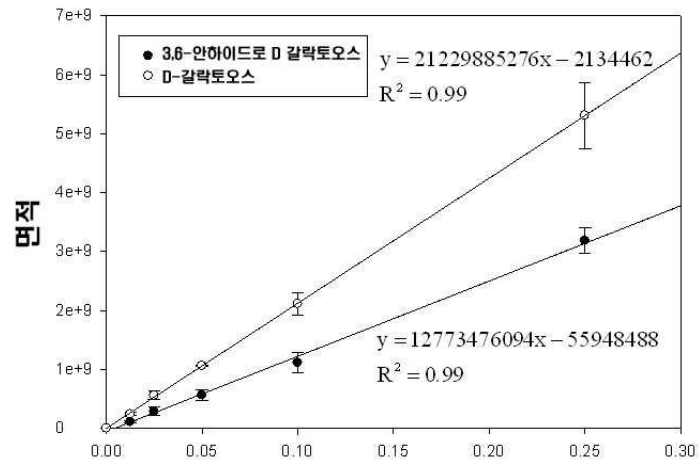
도면5



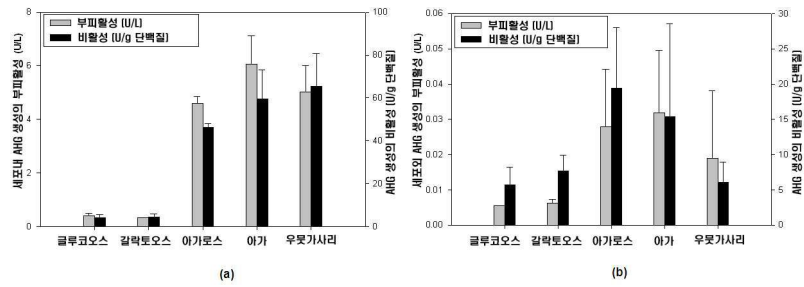
도면6



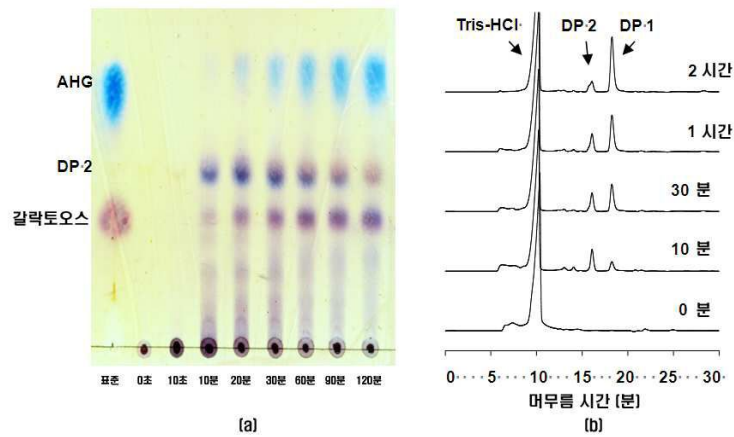
도면7



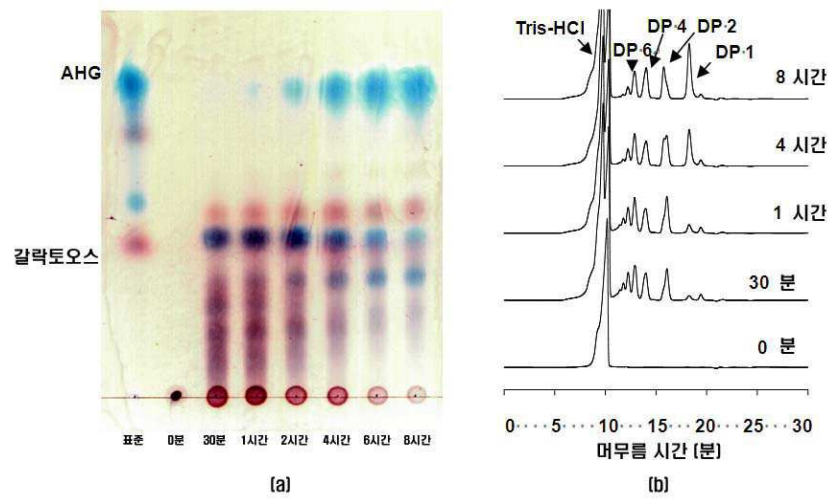
도면8



도면9



도면10



도면11

