



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0008014
(43) 공개일자 2019년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 30/62 (2006.01) G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 30/62 (2013.01)

G01N 30/8679 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0089841

(22) 출원일자 2017년07월14일

심사청구일자 2017년07월14일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김경현

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초동, 삼풍아파트)

조경문

경기도 성남시 분당구 장미로 55, 동부아파트 107동 1101호(야탑동 장미마을)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

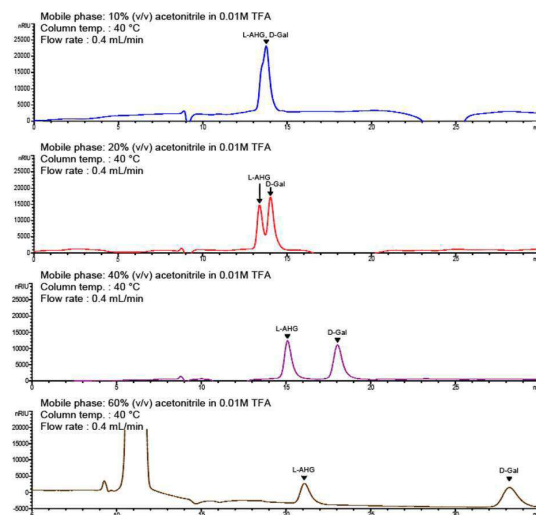
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 고성능액체크로마토그래피 및 시차굴절검출기를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법

(57) 요약

본 발명은 고성능액체크로마토그래피 및 시차굴절검출기를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법에 관한 것으로, 아가로스 또는 아가의 당화 산물인 L-AHG와 D-갈락토오스의 분자량과 구조가 유사하여 분리에 어려움이 있으나, 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기의 분리 조건을 제어하여 두 물질을 독립적으로 정량화할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 30/88 (2013.01)

G01N 2030/027 (2013.01)

G01N 2030/884 (2013.01)

(72) 발명자

윤은주

서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호(시흥동, 현대빌라)

김동현

부산광역시 사하구 감천로105번길 40, 2동 305호(감천동, 감천아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G01201606010524

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오의료기기산업핵심기술개발사업

연구과제명 미백·보습 기능의 바이오슈가 및 화장품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 분석 시료에서 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography)/시차굴절검출기(refractive index detector)를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정량하는 단계를 포함하고,

상기 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량은 이동상 용매로 15 내지 100%(v/v)의 아세토나이트릴 및 0.005 내지 0.015M의 트리플루오르아세트산의 혼합 용매를 사용하고, 0.1 내지 0.6mL/min의 유속 및 25 내지 45 °C의 컬럼 온도에서 수행하는 것인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

분석 시료는 아가로스 또는 아가의 당화 공정에서 얻어진 시료인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

분석 시료는 수용액 시료인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

이동상 용매는 20 내지 40%(v/v)의 아세토나이트릴 및 0.01 M의 트리플루오르아세트산의 혼합 용매인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

분석 시료 내 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 함량은 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기를 사용하여 동일한 분석 조건에서 표준물질의 정체시간의 농도별 면적 값을 계산하여 도출된 하기 식 1의 정량곡선을 이용하여 계산하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법:

[식 1]

$$y = 361648x - 5644.4$$

상기 식에서,

x는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 농도이고, y는 정체시간의 농도별 면적 값이다.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 아가로스 또는 아가의 당화 산물인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(L-AHG)와 D-갈락토오스(D-Galactose)의 단당 혼합물을 고성능액체크로마토그래피 및 시차굴절검출기를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정량하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 홍조류를 구성하는 세포벽 다당류는 셀룰로오스, 자일란, 만난, 아가 및 카라기난 등이 대표적이다. 홍조류 세포벽의 외층 및 세포간격을 구성하는 점성 다당류의 주성분은 아가이다. 아가는 단일당으로 형성된 다당류가 아닌 아가로스(약 80%)와 아가로펙틴(약 20%)의 혼합물이다. 아가 다당류 중의 아가로스 비율은 해조류의 종에 따라 다르며, 평균 80%를 차지한다.

[0004] 아가 다당체는 두 단당 D-갈락토오스(D-galactose)와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose, L-AHG)가 알파-1,3 결합(α -1,3-linkage)과 베타-1,4 결합(β -1,4-linkage)로 번갈아 가면서 연결된 중합체이다. 이중 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 항산화, 항염증, 미백 그리고 항암 효과와 같은 다양한 생리활성이 보고되어 있으며 이는 식, 의약 소재로서 식품 및 의약 산업 분야에 널리 사용 가능하다. 또한, 화장품 원료로 등록되어있는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 미백 기능성을 가진 물질로 화장품 소재의 적용이 가능하다.

[0005] 따라서 현재 다양한 생리활성을 가진 3,6-안하이드로 갈락토오스를 효소 반응을 통해서 얻는 방법과 이를 정량화하는 방법의 개발이 필요하다. 종래에 알려진 아가로스의 효소적 가수분해 방법으로, 먼저 엔도-타입 베타-아가라아제(endo-type β -agarase)인 Aga16B 반응을 통해 아가로스 중합체로부터 네오아가로올리고당을 얻고, 엑소-타입 베타-아가라아제(exo-type β -agarase)인 Aga50D 반응을 통해 이당체인 네오아가로바이오스를 얻으며, 최종적으로 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소(NABH) 반응을 통하여 단당체인 L-AHG와 D-갈락토오스를 얻는 방법이 있다. L-AHG와 D-갈락토오스는 레소르시놀(resorcinol)과 안쓰론(anthrone)의 발색 시약을 이용한 발색 반응을 통해 정량화 한다. 그러나, 이러한 방법들은 시료처리가 복잡하고, 분석을 위한 준비시간이 오래 소요되며, 정확도가 낮은 단점이 있다(Yaphe W.(1960). *Analytical Chemistry*, 32 (10), 1327-1330; Matsuhira B et al. (1983). *Carbohydrate Research*, 118, 276-279). 다른 방법으로는 혼합물의 분리 분석에 널리 이용되는 기체 크로마토그래피를 이용한 분석으로 개개의 화합물이 컬럼 내부에 머무르는 시간 차이를 이용하는 분석 방법이 있다(Jol CN et al. (1999). *Analytical Biochemistry*, 268 (2), 213-222; Hama Y et al. (1998). *Analytical Biochemistry*, 265 (1), 42-48; Ye FT et al. 2006. *Phytochemical Analysis*, 17 (6), 379-383). 그러나, 상기 문헌들은 단당류와 다당류의 분리 또는 단당류 중에서도 L-AHG와 D-갈락토오스를 직접 분석하지는 않으며, 이들이 비슷한 분자량과 구조를 갖고 있으므로 두 물질이 혼합되어 있을 때 독립적으로 각각 정량화하기가 어렵다고 기술하였다. 이를 독립적으로 각각 정량화한 특허문헌으로, 공개특허공보 제2011-0072958호 "사카로파거스 데그리단스 2-40의 조효소를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스 생산 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정량방법"이 있다. 하지만, 기체 크로마토그래피-질량분석기를 이용한 분석법은 시료의 정확한 유도체화율을 알기 어렵다는 점, 유도체화 과정 중에서 발생하는 열에 의한 노출은 열안정성에 약한 L-AHG의 변성을 야기하여 정확한 L-AHG의 정확한 양을 측정하는데 어려운 점 그리고 고가의 질량분석 장비와 유도체화용 고가의 시료를 사용하여야 한다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 공개특허공보 제2011-0072958호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Yaphe W.(1960). *Analytical Chemistry*, 32 (10), 1327-1330

(비특허문헌 0002) Matsuhira B et al. (1983). *Carbohydrate Research*, 118, 276-279

- (비특허문헌 0003) Jol CN et al. (1999). Analytical Biochemistry, 268 (2), 213-222
- (비특허문헌 0004) Hama Y et al. (1998). Analytical Biochemistry, 265 (1), 42-48
- (비특허문헌 0005) Ye FT et al. 2006. Phytochemical Analysis, 17 (6), 379-383

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 아가로스 또는 아가의 당화 과정에서 생산된 단당 혼합물로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정량하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 분석 시료에서 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정량하는 단계를 포함하고,
- [0012] 상기 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량은 이동상 용매로 15 내지 100%(v/v)의 아세트나이트릴 및 0.005 내지 0.015M의 트리플루오르아세트산의 혼합 용매를 사용하고, 0.1 내지 0.6mL/min의 유속 및 25 내지 45 °C의 컬럼 온도에서 수행하는 것인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명은 아가로스 또는 아가의 당화 산물인 L-AHG와 D-갈락토오스의 분자량과 구조가 유사하여 분리에 어려움이 있으나, 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기의 분리 조건을 제어하여 두 물질을 독립적으로 정량화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스 혼합물을 크기배제컬럼이 설치된 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기 분석 결과이다.
- 도 2는 사카로파거스 테그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T 유래 베타-아가레이즈 Aga16B, Aga50D 및 네오아가로바이오스 가수분해 효소 NABH를 pET21a 벡터를 사용하여 대장균(*Escherichia coli*) BL21(DE3)에 도입한 후 단백질을 발현하고, 정제된 SDS-PAGE 젤 결과이다.
- 도 3은 아가로스로부터 세 단계 효소반응을 통한 L-AHG 및 D-갈락토오스 생산을 보여주는 TLC 분석 결과이다.
- 도 4는 이동상 용매인 아세트나이트릴 농도별 L-AHG, D-갈락토오스의 두 단당의 분리도 확인 결과이다.
- 도 5는 이동상 용매인 아세트나이트릴의 유속별 L-AHG, D-갈락토오스의 두 단당의 정체시간 확인 결과이다.
- 도 6은 HPX-87H 컬럼의 온도별 L-AHG, D-갈락토오스의 두 단당의 정체시간 확인 결과이다.
- 도 7은 고성능액체크로마토그래피 수립조건에서의 두 표준물질 D-AHG와 D-Gal의 표준곡선이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0018] 본 발명은 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 분석 시료에서 고성능액체크로마토그래피/시

차굴절검출기를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정량하는 단계를 포함하고,

- [0019] 상기 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량은 이동상 용매로 15 내지 100%(v/v)의 아세트나이트릴 및 0.005 내지 0.015M의 트리플루오르아세트산 혼합 용매를 사용하고, 0.1 내지 0.6mL/min의 유속 및 25 내지 45 °C의 컬럼 온도에서 수행하는 것인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 방법에 관한 것이다.
- [0020] 아가로스 또는 아가의 당화 산물 중 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하, 'L-AHG'라고 함) 및 D-갈락토오스는 비슷한 분자량과 구조를 갖고 있기 때문에 크기배제컬럼(size exclusion column)을 이용한 고성능 액체 크로마토그래피/시차굴절검출기에서 L-AHG 및 D-갈락토오스의 피크가 유의적으로 분리되지 않는다(도 1 참조).
- [0021] 따라서, 본 발명은 아가로스 또는 아가의 당화 산물 중 L-AHG 및 D-갈락토오스의 단당 혼합물로부터 시료(L-AHG, D-갈락토오스 혼합물)를 유도체화 처리 없이 L-AHG만을 독립적으로 정량하기 위해, 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기의 분석 조건을 제어하여 L-AHG를 정량하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명의 L-AHG의 정량 방법에서, 분석 시료는 아가로스 또는 아가의 당화 공정에서 얻어진 시료일 수 있다.
- [0023] 상기 아가로스 또는 아가의 당화 공정은 전처리된 아가로스 또는 아가의 효소적 가수분해를 통해 수행되거나, 전처리 없이 아가로스 또는 아가의 효소적 가수분해를 통해 수행될 수 있다.
- [0024] 전처리 없이 아가로스 또는 아가의 효소적 가수분해를 수행하는 경우, 상기 효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T의 배양물로부터 분리 정제하거나, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0025] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다.
- [0026] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [0027] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.
- [0028] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈(예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.
- [0029] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T 유래의 엔도-타입의 베타-아가레이즈인 Aga16B, 엑소-타입의 베타-아가레이즈인 Aga50D, 네오아가로바이오스 가수분해 효소인 NABH의 핵산 서열을 발현 벡터에 삽입하여 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)에 형질전환시켜 재조합 Aga16B, Aga50D 및 NABH 효소들을 생산한다. 전처리 없이 기질로, 아가로스 또는 아가를 사용하여 상기 재조합 효소들과 순차적으로 반응시켜 L-AHG 및 D-갈락토오스를 포함하는 분석 시료를 제조한다. 구체적인 재조합 효소의 제조 기술은 대한민국 공개특허 제2012-0077339호(2012.07.10), 제2010-0040438호(2010.04.20), 제2013-0085017호(2013.07.26)를 참조할 수 있다.
- [0030] 상기에서 얻은 분석 시료는 액상 또는 수용액 시료일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0031] 상기 분석 시료에 대해 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기를 수행하는 경우, 이동상 용매로 15 내지 100%(v/v)의 아세트나이트릴 및 0.005 내지 0.015 M의 트리플루오르아세트산의 혼합 용매를 사용할 수 있다. 더 구체적으로, 20 내지 60%(v/v)의 아세트나이트릴 및 0.007 내지 0.012 M의 트리플루오르아세트산의 혼합 용매, 가장 구체적으로, 20 내지 40%(v/v)의 아세트나이트릴 및 0.01M의 트리플루오르아세트산의 혼합 용매를 사용할

수 있다. 상기 아세트나이트릴의 농도가 15% 미만인 조건에서는 L-AHG 및 D-갈락토오스가 분리되지 않는다. 다만, 상기 아세트나이트릴의 농도가 40%를 초과하는 경우, L-AHG 및 D-갈락토오스가 유의적으로 분리될 수 있으나, 컬럼 허용 농도를 고려하면 아세트나이트릴 농도는 20 내지 40%(v/v)인 것이 좋다.

[0032] 또한, L-AHG와 D-갈락토오스 신호의 정체시간은 유속에 반비례하며, 유속은 0.1 내지 0.6mL/min에서 수행할 수 있다. 상기 유속이 0.6 mL/min를 초과하는 경우, 컬럼의 압력이 50 기압을 넘어가므로 컬럼에 무리가 갈 수 있고, 상기 유속이 0.1mL/min 미만인 경우 분석 시간이 길어지는 단점이 있다.

[0033] 컬럼 온도는 컬럼 압력과 반비례하며, 25 내지 45 ℃일 수 있다. 상기 컬럼 온도가 45 ℃를 초과하는 경우, 이 동상 용매인 트리플루오르아세트산의 휘발성으로 인해 컬럼이 손상될 수 있고, 25 ℃ 미만인 경우 컬럼 압력이 상승하여 컬럼이 손상될 수 있고 컬럼이 오염에 쉽게 노출된다.

[0034] 분석 시료 내 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 함량은 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기를 사용하여 동일한 분석 조건에서 표준물질의 정체시간의 농도별 면적 값을 계산하여 도출된 하기 식 1의 정량곡선을 이용하여 계산할 수 있다.

[0035] [식 1]

[0036] $y = 361648x - 5644.4$

[0037] 상기 식에서,

[0038] x는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 농도이고, y는 정체시간의 농도별 면적 값이다.

[0039] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0041] <실시예 1> Aga16B, Aga50D 및 NABH 재조합 효소 생산

[0042] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T 유래 엔도-타입의 베타-아가레이즈인 Aga16B 유전자, 엑소-타입의 베타-아가레이즈인 Aga50D 유전자 및 네오아가로바이오스 가수분해 효소 NABH 유전자를 pET21a 벡터를 사용하여 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)에 도입하였다. 각각의 유전자가 도입된 재조합 대장균을 전 배양(pre-culture)하기 위해 50 mL-conical tube에 엠페실린(ampicillin) 100 µg/mL이 포함된 10 mL의 LB broth에서 37 ℃, 9시간 배양하였다. 그 후 전 배양액 10 mL을 같은 배지 조성의 본 배양액 1 L에 접종한 후, 광학밀도분광기(spectrophotometer)를 이용하여 600nm에서의 흡광도 값이 미드익스포넨셜 단계(absorbance = 0.4~0.6)까지 자라면 0.1 mM 이소프로필-베타-D-췌오갈락토파이라노사이드(IPTG)를 넣고 16 ℃에서 16시간 동안 유도시켰다. 그 후 세포 배양액을 500 mL-tube에 옮겨 4 ℃에서 20분간 10,000rpm에서 원심분리를 한 뒤 세포를 수확하였다. 단백질의 변성을 방지하기 위하여 트리스 버퍼(20mM Tris-HCl, pH 7.4) 30 mL에 모은 세포를 다시 풀어주고 초음파기기(sonicator)를 이용하여 세포를 파쇄하였다(cell lysis). 이후 4 ℃에서 1시간 동안 16,000rpm에서 원심분리하였다. 히스트랩 컬럼(5mL GE Health Care)을 사용하여 단백질을 정제한 뒤, SDS-PAGE gel을 사용하여 정제된 각각의 단백질의 크기를 확인하였다(도 2).

[0043] Desalting 컬럼을 사용하여 단백질 정제에 사용하였던 염(Imidazole)을 제거하였다. 염이 제거된 재조합 단백질 효소는 BCA 분석 방법으로 농도를 정량하였다.

[0045] <실시예 2> Aga16B, Aga50D 및 NABH의 효소반응

[0046] Aga16B 효소 반응 시 기질은 5%(w/v) 농도의 아가로스를 사용하였으며 20mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)에서 55℃, 200rpm 조건에서 10시간 동안 반응을 실시하였다.

[0047] Aga16B 효소 반응 산물인 네오아가로올리고당을 기질로 하여 Aga50D 효소 반응을 실시하였으며 25℃, 200rpm 조건에서 24시간 동안 효소 반응을 실시하였다.

[0048] 마지막으로 NABH 효소반응은 Aga50D 효소 반응 산물이 네오아가로바이오스를 기질로 하여 30℃, 200rpm 조건에서 12시간 동안 효소 반응을 실시하였다.

[0049] 각 단계별 효소 반응 후 반응 산물은 thin layer chromatography(TLC)를 통해 분석하였다. TLC 분석 조건은 고

정상인 실리카 겔 플레이트에 1 μ l의 효소 반응산물(product)을 로딩(loading)하고, 이동상 용매로는 n-부탄올:에탄올: 물=3:1:1 (v/v/v)로 하여 1시간 동안 전개시킨 뒤 에탄올에 녹인 10% 황산과 에탄올에 녹인 0.2%의 1,3-디하이드록시나프탈렌을 사용하여 발색시켰다(도 3).

[0050] 도 2에서 나타낸 바와 같이 엔도-타입의 베타-아가레이즈인 Aga16B 효소 반응을 통해 아가로스 기질은 네오아가로올리고당으로 분해되었으며, 이때 주요 산물은 중합도(degree of polymerization, DP)4와 DP6에 해당하는 네오아가로테트라오스와 네오아가로헥사오스였다. 그 후 엑소-타입의 베타-아가레이즈 II인 Aga50D 효소 반응을 통해 이당체인 네오아가로바이오스가 생성이 되었으며, NABH 효소 반응을 통해 AHG와 D-갈락토오스가 생성되었다(도 3).

[0052] <실시예 3> 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기(HPLC/RID)를 이용하기 위한 이동상 용매와 시료준비 및 기기 안정화

[0053] 고성능액체크로마토그래피의 이동상(mobile phase) 용매로는 0.01M TFA에 녹인 40% (v/v) 아세트나이트릴을 사용하며 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 598.86 mL의 3차 증류수(Distilled water)에 1.14mL의 트리플루오르아세트산(TFA, Sigma Aldrich)와 400mL의 아세트나이트릴(ACN, J.T.Baker)을 1L 비커에서 혼합하였다. 이후 마그네틱바를 사용하여 3분간 충분히 교반하였다. 0.45 μ m 나일론 막여과기(Nylon Membrane Filters, GE Healthcare Life Science)를 사용하여 이동상(mobile phase)을 여과하였다(filtration). 90분 동안 초음파처리(sonication)하여 내부에 잔존하는 잔여 기포를 제거하였다.

[0054] 시료 준비는 다음과 같다. 고순도(>95%)의 정제, 건조된 L-AHG 샘플을 물에 희석하여 2mg/mL이 되도록 하였다. 고성능액체크로마토그래피 분석용 바이알에 인서트를 넣고 인서트 내부에 기포가 들어가지 않게 하여 최소 45 μ l 이상을 준비하였다. 고순도(>98.5%)의 D-Gal 시약을 물에 희석하여 2mg/mL이 되도록 하였다. 고성능 액체 크로마토그래피 분석용 바이알에 인서트를 넣고 인서트 내부에 기포가 들어가지 않게 하여 최소 45 μ l 이상을 준비하였다. 2 mg/mL 농도의 L-AHG와 D-Gal을 50 μ l씩 섞어 1 mg/mL의 D-Gal, L-AHG 혼합 시료(mixed sample)를 준비하였다.

[0055] 고성능액체크로마토그래피 기기 안정화는 HPLC의 전원을 켜고 컴퓨터와 연결한 후, HPX-87H가 설치된 고성능액체크로마토그래피 기기를 준비된 0.01M TFA에 녹인 40%(v/v) 아세트나이트릴에 연결하였다. 0.1 mL/min의 유속에서 컬럼 온도(column temperature)와 시차굴절검출기(RID)의 온도를 조건에 맞게 변경하였다. 유속을 올릴 때에는 압력, 다이오드 균형과 RI 신호가 충분히 안정화된 이후에 각 안정화 마다 유속을 0.1mL/min씩 올려 최종 유속 조건에 맞추도록 하였다.

[0057] <실시예 4> 고성능액체크로마토그래피/시차굴절검출기를 이용한 두 단당류 L-AHG와 D-갈락토오스의 분리 조건 수립

[0058] 가장 경제적인 용매 소비로 두 단당류의 분리 가능 조건을 찾기 위하여 이동상의 아세트나이트릴 농도를 10, 20, 40, 60%(v/v)으로 달리하여 실험을 하였다.

[0059] 도 4에 나타난 바와 같이, 측정한 20% 아세트나이트릴 농도에서 분리가 이미 시작되고 있음을 알 수 있으며, 40% 또는 60% 아세트나이트릴 농도에서 L-AHG와 D-갈락토오스가 유의적으로 분리된 것을 확인하였다. 하지만, 본 실시예의 컬럼에서 권장하는 아세트나이트릴 농도는 최대 40%이다. 따라서 가장 적합한 분석 방법은 40%의 아세트나이트릴 조건이다.

[0060] 다음으로, 컬럼에서의 이동상 유속을 0.1, 0.2, 0.3, 0.4mL/min으로 달리 흘려주었을 때, L-AHG와 D-갈락토오스 신호의 정체시간이 유속에 반비례하여 나타났다 (도 5). 같은 이동상을 흘려주었을 때, 0.4mL/min에서도 피크가 유의적으로 분리됨을 알 수 있고 낮은 정체시간은 샘플의 분석 시간을 낮춰 주는 장점이 있다. 0.5mL/min 이상의 조건에서는 컬럼의 압력이 50기압을 넘어가므로 컬럼에 무리가 갈 수 있다. 따라서 가장 빠른 시간내의 분석 방법은 컬럼 유속이 0.4mL/min일 때이다.

[0061] 다음으로 HPX-87H 컬럼의 온도를 25, 30, 35, 40 $^{\circ}$ C로 변경하였을 때, L-AHG와 D-갈락토오스의 정체 시간은 동일하였다 (도 6). 하지만, 컬럼의 온도가 낮을수록 컬럼에 걸리는 압력이 반비례하여 증가하고, 컬럼의 온도가 45 $^{\circ}$ C를 초과할 경우 트리플루오르아세트산의 휘발성으로 인하여 컬럼 압력이 증가할 수 있으므로 HPX-87H의 최적

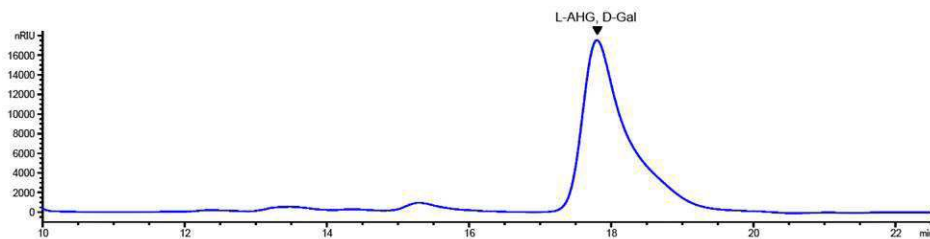
컬럼 온도는 40 °C이다.

[0063] <실시예 5> 고성능 액체 크로마토그래피/시차굴절검출기를 이용한 최적 조건에서의 두 단당류 3,6-안하이드로-D-갈락토오스와 D-갈락토오스의 표준물질 정량 곡선

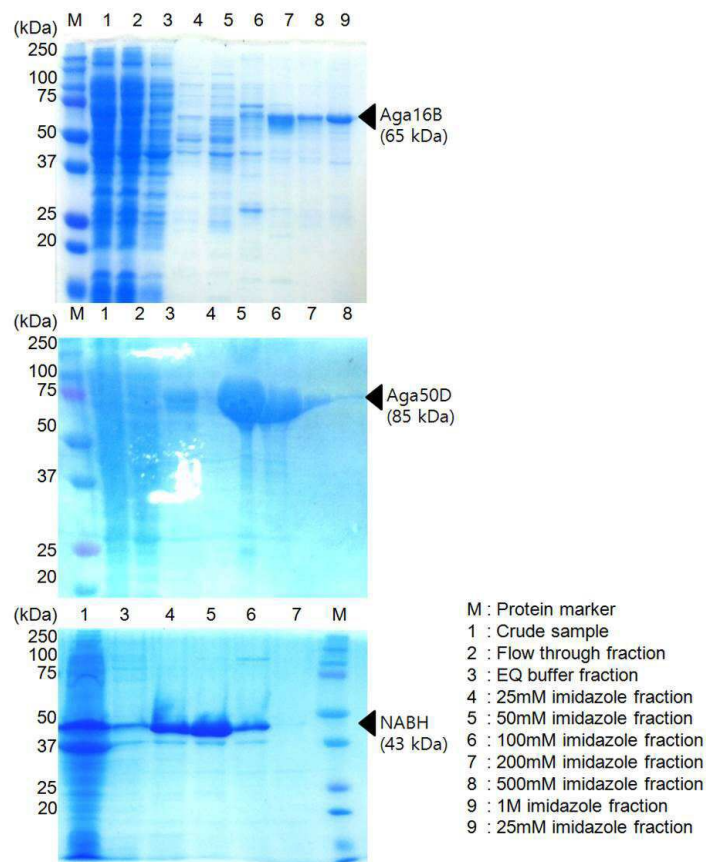
[0064] 0.4mL/min의 유속(flow rate), 40°C의 HPX-87H 컬럼 온도(column temperature) 그리고 45 °C의 시차굴절검출기(RID)가 안정화가 된 이후 표준물질인 D-AHG와 D-갈락토오스를 증류수에 0.125, 0.25, 0.5, 1mg/mL 농도로 고성능 액체 크로마토그래피 바이알에 300 μ L를 준비하였다. 기기의 순서에 알맞게 작성한 후 준비된 샘플의 20 μ L를 HPLC/RID 기기에 주입하였다. 해당 이동상과 컬럼으로부터 나오는 표준물질의 농도별 샘플 신호의 정체시간(retention time)에 대한 정보를 기입하고 표준물질의 특정 정체시간의 농도별 면적(Area)을 계산하여 정량곡선을 만들었다(도 7).

도면

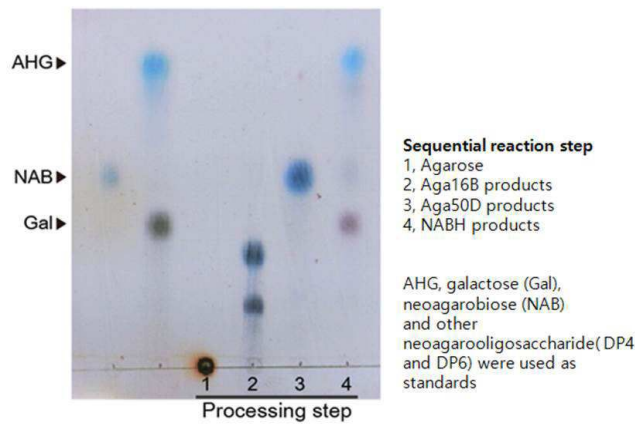
도면1



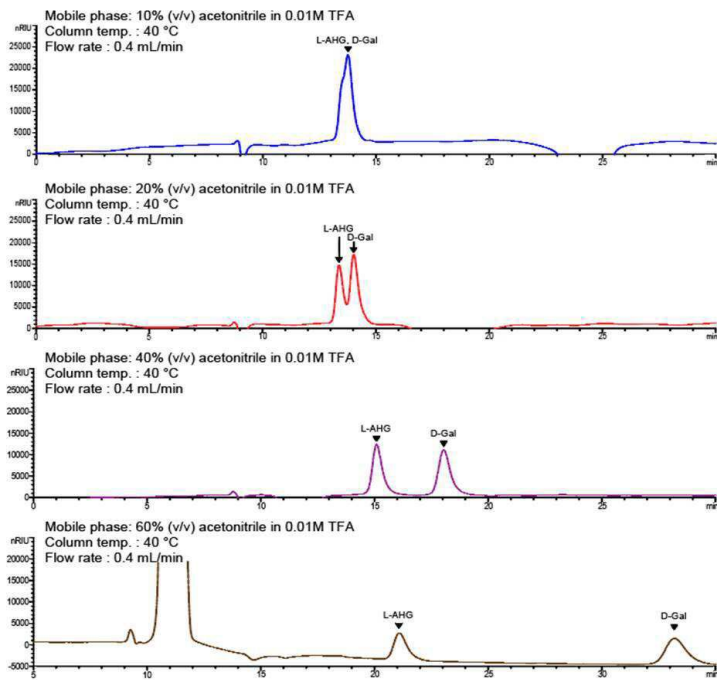
도면2



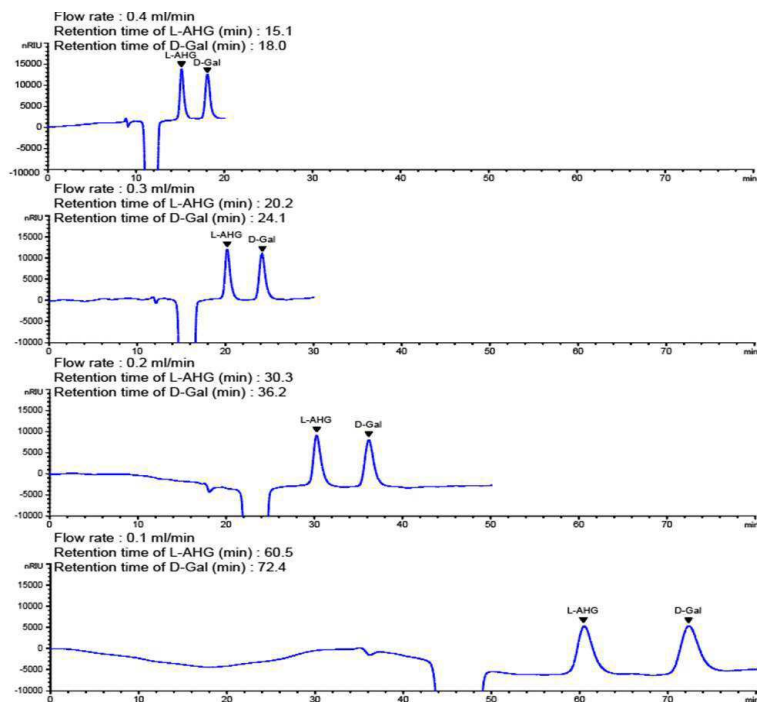
도면3



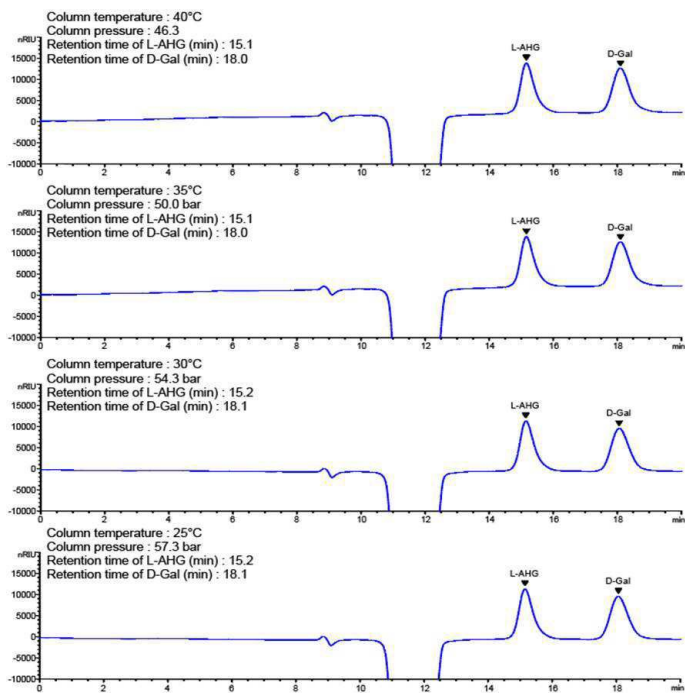
도면4



도면5



도면6



도면7

