



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0136441
(43) 공개일자 2011년12월21일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/26 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)
G01N 30/96 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0056459

(22) 출원일자 2010년06월15일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

삼성전자주식회사

경기도 수원시 영통구 매탄동 416

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

구현민

서울특별시 서초구 방배4동 현대아파트 107동
1106호

박성민

경기도 용인시 수지구 풍덕천동 1018번지 신정마
을 임광극동아파트 302동 201호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신창준, 김익환, 홍장원, 안상희

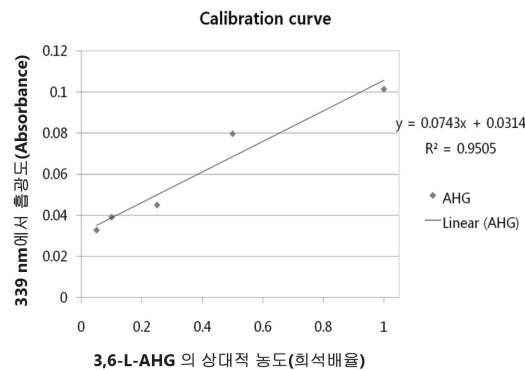
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 3,6-L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물, 이를 이용한 3,6-L-AHG 전환효소의 활성 측정방법
및 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물

(57) 요약

NADP에서 NADPH로의 환원을 통해 L-AHG 전환효소의 활성을 측정하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 전환효소의 활성측정용 조성물 및 이를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 전환효소의 활성측정 방법을 제공한다. 해조류 바이오매스 등 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 원료의 이용에 유용하게 사용될 수 있는 바 산업적으로 유용하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박재찬

경기도 용인시 기흥구 보정동 죽현마을 LG자이 아파트 104동 1101호

김경현

경기도 성남시 분당구 삼평동 744 봇들마을 907동 1704호

최인걸

서울특별시 동작구 사당1동 419 -92 201호

특허청구의 범위

청구항 1

조효소인 NADP^+ , 기질인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-L-AHG), 및 버퍼액을 포함하고, NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)로부터 NADPH 로의 환원을 통해 L-AHG 전환효소의 활성을 측정하는, 3,6-L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물.

청구항 2

임의의 효소 추출액과 제 1 항에 따른 3,6-L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물을 반응시키는 단계; 및 상기 반응에 의해 NADPH 로 환원되는지 여부를 측정하는 단계;를 포함하는 효소 추출액 중의 3,6-L-AHG 전환효소의 활성 측정방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,
상기 NADPH 로 환원되는지 여부는 339~340 nm 파장에서 흡광도를 측정하는, 측정방법.

청구항 4

3,6-L-AHG의 전환효소를 함유한 활성분획, 조효소인 NADP^+ , 및 버퍼액을 포함하는, 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
임의의 시료 내 3,6-L-AHG의 함량은 NADPH 의 함량에 비례하는, 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
상기 NADPH 의 함량은 339~340 nm 파장에서의 흡광도로 측정하는, 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,
상기 3,6-L-AHG는 도 1에 도시된 검정곡선(calibration curve)에서 339 nm파장에서의 흡광도(y축)에 대비하여 정량되는, 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물.

청구항 8

제 4 항에 있어서,
상기 3,6-L-AHG의 전환효소를 함유한 활성분획은 사카로파구스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)로부터 유래한, 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 활성분획은,
사카로파구스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 조추출액을 얻는 단계;
조추출액에 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 0-50%의 포화도로 첨가하여 침전시키는 단계;

침전에 의한 상등액에 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 50-70%의 포화도로 첨가하여 침전시키는 단계; 및

침전에 의한 침전물에 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 분획하는 단계; 를 통해 얻어지는, 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 최종 얻어진 활성분획의 비활성도(Specific activity)는 2.5 ~ 3.0인, 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 3,6- L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물, 이를 이용한 3,6- L-AHG 전환효소의 활성 측정방법 및 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전세계적으로 화석 연료의 과다 사용에 따른 자원 고갈 및 환경오염에 대한 우려가 증가함에 따라 안정적이고 지속적으로 에너지를 생산하는 신재생 대체에너지 개념이 화두가 되고 있다. 그러한 대체에너지 개발의 일환으로 바이오매스 자원으로부터 알코올을 생산하는 기술이 주목을 받고 있다.

[0003] 현재 사탕수수 등의 당질계, 옥수수 등의 전분계를 이용한 제 1 세대 알코올이 생산되고 있으나, 이는 식품 및 가축 사료와의 경쟁, 재배 면적의 포화 등 많은 문제에 봉착되어 있다. 이에, 지구상에서 가장 풍부하고 고갈 없이 재생이 가능한 자원으로 대표되는 목질자원 리그노셀룰로오스(lignocelluloses)를 이용한 제 2 세대 알코올이 개발 중에 있다.

[0004] 최근에는 해조류(algae)를 이용한 알코올의 개발이 진행 중에 있다. 해조류는 성장속도가 빠르고, 광범위한 지역에서 재배가 용이하며, 이산화탄소 흡수 능력이 높기 때문에 효과적으로 이산화탄소를 고정화할 수 있어서 새로운 에너지 자원으로서 적절한 것으로 기대된다.

[0005] 또한, 해조류는 리그닌에 비해 치밀하지 않은 조직을 가지므로 제 1 세대, 제 2 세대 알코올에 사용되는 바이오매스에 비해 상대적으로 당화가 용이하며, 생산량도 매우 방대하다는 장점이 있다. 또한, 상대적으로 풍부한 해양자원을 활용할 수 있어 대단한 잠재력을 가지고 있다.

[0006] 해조류 중 하나인 홍조류 바이오매스는 주로 한천(agar)으로 이루어져 있다. 한천은 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-Anhydro-L-galactose, 이하, '3,6-L-AHG'로 약칭함)가 1,3- 결합 또는 1,4-결합으로 반복되어 있는 복합 다당류이다. 이 중 3,6-L-AHG는 희귀당으로서 통상적인 발효공정에서 사용되지 않으므로 그 이용이 제한되고 있다.

발명의 내용

[0007] 한천의 주요 구성성분 중의 하나인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 효과적으로 이용하기 위해서는 3,6-L-AHG의 반응 기작을 매개하는 3,6-L-AHG 전환효소의 활성을 측정하고, 3,6-L-AHG 를 정량할 수 있는 방법이 개발되어야 한다. 또한, D형의 3,6-안하이드로-갈락토오스와 구별하여 L형 만을 구별할 수 있어야 한다.

[0008] 이에 3,6-L-AHG 전환효소의 활성을 측정하기 위한 조성물 및 이를 이용한 활성 측정방법을 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명의 일 측면에 따르면, 조효소인 NADP^+ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), 기질인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-L-AHG), 및 버퍼액을 포함하는 3,6-L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물을 제

공한다. 여기서, NADP^+ 로부터 NADPH 로의 환원을 통해 L-AHG 전환효소의 활성을 측정할 수 있다.

[0010] 또 다른 측면에 따르면, 상술한 조성물을 이용한 3,6-L-AHG 전환효소의 활성 측정방법을 제공한다.

[0011] 일 예에서, 임의의 효소 추출액과 상기 조성물을 반응시키는 단계, 및 상기 반응에 의해 NADPH 로 환원되는지 여부를 측정하는 단계를 포함한다.

[0012] 상기 NADPH 로 환원되는지 여부는 339~340 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 알 수 있다.

[0013] 또 다른 측면에 따르면, 3,6-L-AHG의 전환효소를 함유한 활성분획, NADP^+ , 및 버퍼액을 포함하는 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 정량분석용 조성물을 임의의 시료와 반응시키는 경우 임의의 시료 내 3,6-L-AHG의 함량은 NADPH 의 함량에 비례한다. 상기 NADPH 의 함량은 339~340 nm에서의 흡광도로 측정할 수 있다.

[0015] 상기 3,6-L-AHG의 함량은 도 1에 도시된 검정곡선(calibration curve)에서 339 nm에서의 흡광도(y축)에 대비하여 정량될 수 있다.

[0016] 상기 3,6-L-AHG의 전환효소를 함유한 활성분획은 사카로파구스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)로부터 유래될 수 있다.

[0017] 이러한 활성분획은 예를 들어, 사카로파구스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 조추출액을 얻는 단계, 조추출액에 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 0-50%의 포화도로 첨가하여 침전시키는 단계, 침전에 의한 상등액에 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 50-70%의 포화도로 첨가하여 침전시키는 단계, 및 침전에 의한 침전물에 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 분획하는 단계를 통해 얻어질 수 있다. 이에 최종 얻어진 활성분획의 비활성도(Specific activity)는 2.5 ~ 3.0일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 3,6-L-AHG의 함량(x축) 대비 NADPH 의 함량(y축)을 나타낸 검정곡선(calibration curve)이다(x축: 3,6-L-AHG의 상대적 농도, y축: 339nm 에서의 흡광도);

도 2는 사카로파구스 데그라단스로부터 3,6-L-AHG의 전환효소를 함유한 활성분획을 얻는 과정의 모식도이다;

도 3은 실험에 1의 사카로파구스 데그라단스 조추출액의 분리정제 단계별 효소활성 측정 그래프이다(x축: 시간(min), y축: 339nm 에서의 흡광도).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명의 이점들과 특징들 및 이를 수행하는 방법들이 하기 실시예들에 대한 상세한 설명 및 첨부된 도면들을 참조함으로써 더욱 용이하게 이해될 수 있을 것이다. 그러나, 본 발명은 많은 다양한 형태로 실시될 수 있으며, 여기서 언급한 실시예들로부터 한정되어 구성되는 것은 아니다.

[0020] 또한, 본 발명의 명세서 및 청구항에 사용된 성분, 반응 조건 등의 수치를 나타내는 모든 숫자는 변형될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 상반된 언급이 없다면, 본 발명의 명세서 및 첨부된 청구항에 나타난 수적인 파라미터는 본 발명의 목적하는 바에 따라 달라질 수 있는 근사값이다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어는 별도의 언급이 없다면 하기와 같은 의미를 갖는다. 또한, 여기에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 명세서에서 별도의 언급이 없다면 당업자에게 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다.

[0022] 용어 '효소의 활성'은 일반적으로 반응기작에서 효소의 촉매능력을 의미하고, 본 명세서에서 '전환효소의 활성'은 조효소인 NADP^+ 로부터 NADPH 로의 환원을 통해 확인할 수 있다.

[0023] 용어 '조효소(Coenzyme)'는 주효소에 결합되어 있는 비단백질 성분으로, 효소반응 과정에서 그 화학구조가 변하면서 원자나 전자 등의 기능기를 반응기질에 전달하는 방식으로 효소반응을 보조하는 인자를 말하며, '보효소' 또는 '보조효소'라고도 한다. 조효소의 예로는 니코틴아미드아데닌 디뉴클레오티드(NAD), NADH, 니코

틴아미드아데닌 디뉴클레오티드인산(NADP), NADPH, 아데노신삼인산(ATP), 포스포아데닐산황산(PAPS), 우리딘이 인산(UDP), 시티딘이인산(CDP), 구아노신삼인산(GTP), 이노신삼인산(ITP), 조효소 A(CoA) 등을 들 수 있다. 다만, 본 발명의 예에 따른 L-AHG 전환효소의 활성 측정용 조성물 및 L-AHG의 정량용 조성물에는 NADP가 유효한 조효소로서 포함된다.

[0024] 용어 '기질'은 효소의 작용을 받는 물질을 총칭하고, 효소의 작용을 받아 그 화학구조가 변화하는 화합물을 포함한다.

[0025] 3,6-L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물

[0026] 본 발명의 일 측면에 따르면, 3,6-L-AHG 전환효소의 활성을 측정하는데 사용될 수 있는 활성측정용 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 조성물은 조효소인 NADP^+ , 기질인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-L-AHG), 및 버퍼액을 포함한다. 본 발명자들이 확인한 바에 따르면, 임의의 효소 추출액 내에 L-AHG 전환효소의 활성이 있는 경우 조효소인 NADP^+ 가 NADPH로 전환되면서, 반응 기질인 L-AHG의 전환반응이 매개된다. 따라서, NADP^+ 로부터 NADPH로의 환원을 통해 L-AHG 전환효소의 활성을 측정할 수 있다.

[0028] 여기서, 임의의 효소 추출액은 3,6-L-AHG 전환효소의 활성을 측정하고자 하는 효소 추출액을 의미한다.

[0029] 상기 기질인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-L-AHG)는 우뚝가사리 등 다수의 홍조류에 존재하는 한천(Agar)의 구성성분이므로 홍조류로부터 수득될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 상기 조효소인 NADP^+ 는 NAD의 인산화형으로서 339~340 nm에서 흡수극대 파장을 갖는다.

[0031] 상기 버퍼액은 일반적으로 효소의 활성이 가장 활발할 수 있는 최적 조건을 유지하도록 하기 위한 것이다. 또한, NADP^+ 로부터 NADPH로의 환원이 비가역적으로 일어나는 것을 유지한다. 버퍼액의 예로는 Tris-HCl (pH 8.0)을 들 수 있다.

[0032] 상기 활성측정용 조성물을 이용하면, 3,6-L-AHG 전환효소의 활성을 효과적으로 측정할 수 있다. 이에, 상기 활성측정용 조성물은 임의의 효소 추출액 내에 L-AHG 전환효소의 활성이 존재하는지 여부를 확인하고자 하는 경우에 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 활성측정용 조성물을 효소 추출액에 첨가한 후 NADP^+ 로부터 NADPH로의 환원이 발생했는지 여부를 통해 확인할 수 있다.

[0033] NADPH로의 환원을 관찰하는 방법은 특별히 제한되지 않으며 예를 들어, 분광학적 방법에 의해 339~340 nm의 파장에서 흡광도를 측정할 수 있다. 이 경우 상기 조성물에는 NADP^+ 이외의 339~340 nm에서 흡수파장을 갖는 조효소(예를 들어, NADH) 등이 포함되지 않아야 한다.

[0034] 3,6-L-AHG 전환효소의 활성 측정방법

[0035] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상술한 3,6-L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물을 이용한 3,6-L-AHG 전환효소의 활성 측정방법을 제공한다.

[0036] 일 예에서, 측정방법은 임의의 효소 추출액과 상술한 3,6-L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물을 반응시키는 단계, 및 상기 반응에 의해 NADPH로 환원되는지 여부를 측정하는 단계를 포함한다.

[0037] 상기 NADPH로 환원되는지 여부는 339~340 nm에서의 흡광도를 측정할 수 있다. 여기서, NADPH로 환원되었다는 것은 3,6-L-AHG가 전환되었음을 의미하고, 따라서 3,6-L-AHG 전환효소의 활성이 있는 것으로 판단할 수 있다.

[0038] 상기에서 단위시간 당 NADPH의 함량을 측정하는 경우 효소의 활성을 반응속도로서 측정할 수 있을 것이다.

- [0039] 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물
- [0040] 현재 3,6-L-AHG의 분석은 정성적으로는 박막크로마토그래피와 분광분석법이 이용되고, 기타 액체크로마토그래피 등을 사용하여 정량분석하는 방법이 알려져 있다. 그러나, 표준화된 방법은 존재하지 않으며 상기 방법들은 광학이성질체인 D형의 3,6-AHG를 구분하지 못한다는 문제점을 가지고 있다.
- [0041] 이에, 3,6-L-AHG를 효과적으로 정량할 수 있고, L형의 3,6-L-AHG를 구별할 수 있는 정량분석용 조성물을 제공하고자 한다.
- [0042] 일 예에서, 상기 정량분석용 조성물은 3,6-L-AHG의 전환효소를 함유한 활성분획, NADP^+ , 및 버퍼액을 포함한다.
- [0043] 임의의 시료 내에 3,6-L-AHG가 존재하는 경우, 3,6-L-AHG 전환효소에 의해 3,6-L-AHG가 전환되고, 이 과정에서 NADP^+ 가 NADPH로 환원된다. 이 때, 시료 내 3,6-L-AHG의 함량 변화율은 NADPH의 함량 변화율에 비례한다. 즉, 하나의 NADP^+ 가 NADPH로 전환되면서 3,6-L-AHG 하나를 전환시킨다.
- [0044] 여기서, 임의의 시료는 3,6-L-AHG의 존재 및 정량을 확인하고자 하는 대상 시료를 의미한다.
- [0045] 따라서, 시료 내의 3,6-L-AHG를 정량하고자 하는 경우, 본 발명의 예에 따른 정량분석용 조성물을 첨가하여 반응시킨 후 NADPH의 함량을 측정하면 된다. 상기 NADPH의 함량은 339~340 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 알 수 있다.
- [0046] 이와 관련하여 도 1은 3,6-L-AHG의 함량(x축) 대비 NADPH의 함량(y축)을 나타낸 검정곡선(calibration curve)이다. 여기서, 339 nm에서의 흡광도(y축)가 NADPH의 함량을 의미한다. 따라서, 상기 3,6-L-AHG의 함량은 도 1에 도시된 검정곡선에서 339 nm에서의 흡광도(y축)에 대비하여 정량될 수 있다. 예를 들어, 임의의 시료에 상기 정량분석용 조성물을 반응시키면 3,6-L-AHG의 전환효소에 의해 시료 내 3,6-L-AHG의 함량 변화에 비례하여 NADPH가 생성된다. 이에, NADPH의 함량을 339 nm파장에서의 흡광도를 측정하여 구할 수 있다. 측정된 흡광도 값을 도 1의 y축 좌표에 대입하면 그에 대응하는 x축의 3,6-L-AHG의 함량이 구해질 수 있을 것이다.
- [0047] 상기 3,6-L-AHG의 전환효소를 함유한 활성분획은 특별히 제한되지 않으며, 3,6-L-AHG를 대사에 이용하는 다양한 균주로부터 얻어질 수 있을 것이다. 예를 들어, 본 발명자들은 사카로파구스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 활성분획에 3,6-L-AHG의 전환효소가 존재함을 확인하였다.
- [0048] 상기 사카로파구스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 활성분획을 얻는 방법은 특별히 제한되지 않으며 공지된 효소 분획방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0049] 예를 들어, 황산암모늄 분획법(염석), 유기용매침전법, pH처리법, 막분획법 등의 조분획; 친화성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 겔 또는 여과 크로마토그래피, 등의 크로마토그래피법, 및 SDS-PAGE법, 등전점 전기영동법, 이차원 전기영동법 등의 전기영동법 등을 들 수 있고, 이들 분획방법은 2종 이상 복합적으로 이용될 수 있다.
- [0050] 도 2에는 사카로파구스 데그라단스로부터 3,6-L-AHG의 전환효소를 함유한 활성분획을 얻는 방법이 예시적으로 도시되어 있다. 도 2를 참조하면, 상기 활성분획은 사카로파구스 데그라단스 조추출액을 얻는 단계(S1), 조추출액에 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 0-50%의 포화도로 첨가하여 침전시키는 단계(S2), 침전에 의한 상등액에 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 50-70%의 포화도로 첨가하여 침전시키는 단계(S3), 및 침전에 의한 침전물에 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 분획하는 단계(S4)로 얻어질 수 있다.
- [0051] 이러한 방법으로 얻어진 활성분획은 비활성도(Specific activity)가 2.5 ~ 3.0일 수 있다. 효소의 활성을 나타내는 비활성도는 단백질 밀리그램 당 단위수(Unit)로 표현된다.
- [0052] 이하, 본 발명의 제조예 및 실험예에 따라 본 발명을 상술한다.
- [0053] [제조예 1] 사카로파구스 데그라단스 조추출액
- [0054] 단일 콜로니로부터 배양한 10 ml의 사카로파구스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40 (이하

'sde')를 0.2% 한천이 포함된 1L의 최소배지에 넣고 30℃에서 24시간 동안 배양하여 4000rpm으로 30분간 원심분리하여 5g의 생균체를 확보하였다.

[0055] 생균체는 초음파 파쇄기(Sonifier 450, Branson, USA)를 사용하여 파쇄한 후, 4℃에서 15000rpm으로 1시간동안 원심분리하여 0.45μm 여과지(Sartorius stedim biotech, Germany)를 사용하여 여과하여 조추출액을 얻었다.

[제조에 1] 사카로파구스 테그라단스 조추출액의 분리정제

[0056] 제조예 1에서 얻은 조추출액을 황산암모늄((NH₄)₂SO₄) 분획법을 사용하여 0-50% 포화도로 활성분획하였다. 그런 다음, 침전에 의한 상등액에 황산암모늄((NH₄)₂SO₄)을 50-70%의 포화도로 활성분획하였다. 50-70%의 활성분획을 HiTrap™ Q 컬럼(GE healthcare, USA)을 사용하여 음이온 교환 크로마토그래피방법으로 다시 활성분획하였다. 최종 분획한 단백질의 활성은 표 1와 같다.

[표 1] 사카로파구스 테그라단스 2-40조추출액으로부터의 분리정제

활성분획 (Fraction)	전체활성도 (Total Activity)*	전체단백질 (Total protein)	비활성도 (Specific activity)**	단백질수율
	U	mg	U/mg	%
조추출액	455.4	635	0.72	100
50-70%(NH ₄) ₂ SO ₄	75.4	35.33	2.13	16.56
음이온교환	26.7	9.36	2.85	5.86

* 단위수(U)는 테스트조건 하에서 분(min) 당 1 nM의 NADP⁺의 환원을 촉매하는 양

** 비활성도는 단백질 밀리그램 당 단위수(U)를 나타냄

[실시에 1] 3,6-L-AHG 전환효소의 활성측정용 조성물의 제조

[0061] 5mM의 NADP⁺, 20 μg의 3,6-L-AHG, 및 20mM의 Tris-HCl(pH 8.0) 버퍼액을 혼합하여 100 μl의 활성측정용 조성물을 제조한다.

[실험예 1] 사카로파구스 테그라단스 조추출액의 분리정제 단계별 효소활성 측정

[0063] 사카로파구스 테그라단스 조추출액의 분리정제 단계별로 3,6-L-AHG의 전환효소의 활성을 측정한다. 이를 위해 실시예 1에 따라 제조된 활성측정용 조성물에 제조예 1에 따른 조추출액, 제조예 2에서 50-70%(NH₄)₂SO₄ 처리 후의 활성분획, 및 음이온교환 크로마토그래피 후의 활성분획을 각각 10 μl씩 첨가한다. 그런 다음, NADPH의 함량을 측정하기 위해, 339nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 스펙트로포토미터(microplate spectrophotometer, Bio-Tek Instruments, Inc.)를 사용하여 End-point UV법에 따라 시간대 별로 측정하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0064] 도 3을 참조하면, 조추출액, 황산암모늄 처리 후의 활성분획, 및 음이온교환 크로마토그래피 처리한 후의 활성분획 모두에서 NADPH 환원이 이루어졌음을 확인할 수 있다.

[비교실험예 1]

[0066] 실시예 1에서, 조효소로서 NADP^+ 대신에 NAD^+ , NADH, NADPH 를 각각 첨가한다. 각각의 조성물에 대해 실시예 1에 따라 제조된 활성측정용 조성물에 제조예 2에서 최종 수득한 활성분획 $10 \mu\text{l}$ 첨가한다. 그런 다음, NADPH의 환원을 339nm에서의 흡광도를 측정하고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0067] 표 2를 참조하면, NADP^+ 를 제외한 조효소에 대해서는 3,6-L-AHG의 전환효소의 활성이 없음을 알 수 있다.

[0068] [표 2] 흡광도(ΔA_{339})에 의한 효소활성에 대한 조효소의 효과

첨가한 조효소 (Cofactors added)	활성(Activity)
NAD^+	n.d.
NADP^+	+++
NADH	n.d.
NADPH	n.d.

*n.d.: not detected

[0069]

[0070] [실시예 2] 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물

[0071] 제조예 2에서 얻은 최종 활성분획 $7.5 \mu\text{l}$, 0.1 mM의 NADP^+ , 및 50mM의 Tris-HCl(pH 8.0)를 혼합하여 $100 \mu\text{l}$ 의 정량분석용 조성물을 제조한다.

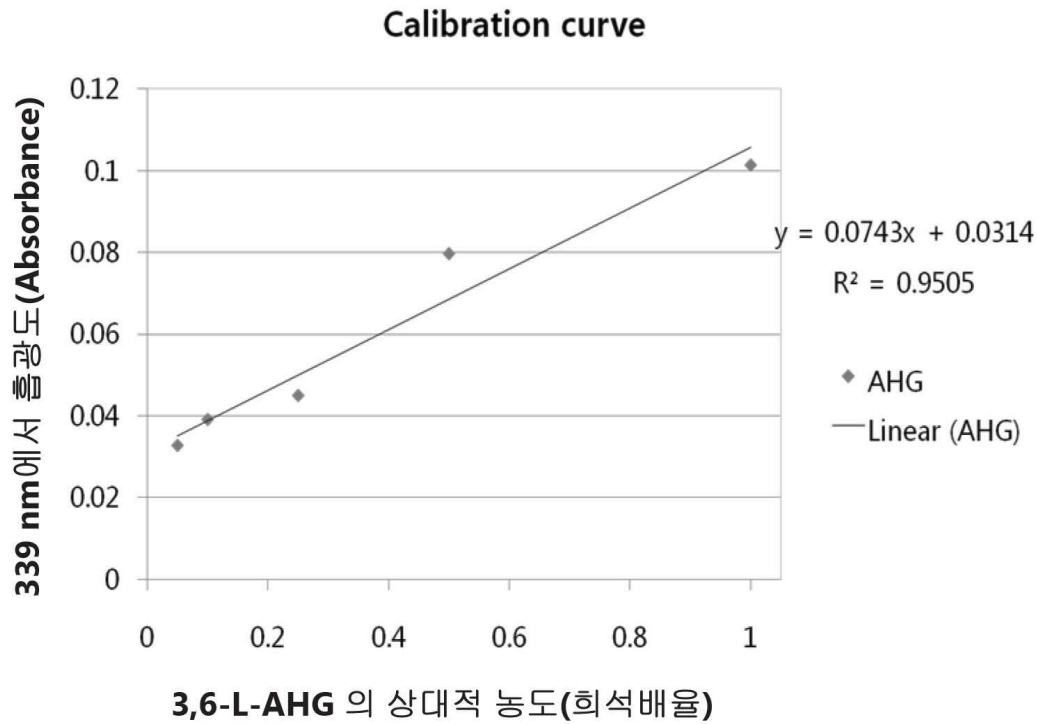
[0072] [실험예 2]

[0073] 실시예 2에서 얻은 3,6-L-AHG의 정량분석용 조성물에 3,6-L-AHG를 상대적 농도(Relative concentration)로서 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 의 희석배율(dilution factor)로 첨가한다. 50분 동안 반응을 수행한 후 마이크로플레이트 스펙트로포토미터(Bio-Tek Instruments, Inc.)를 사용하여 End-point UV법에 따라 339nm에서의 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

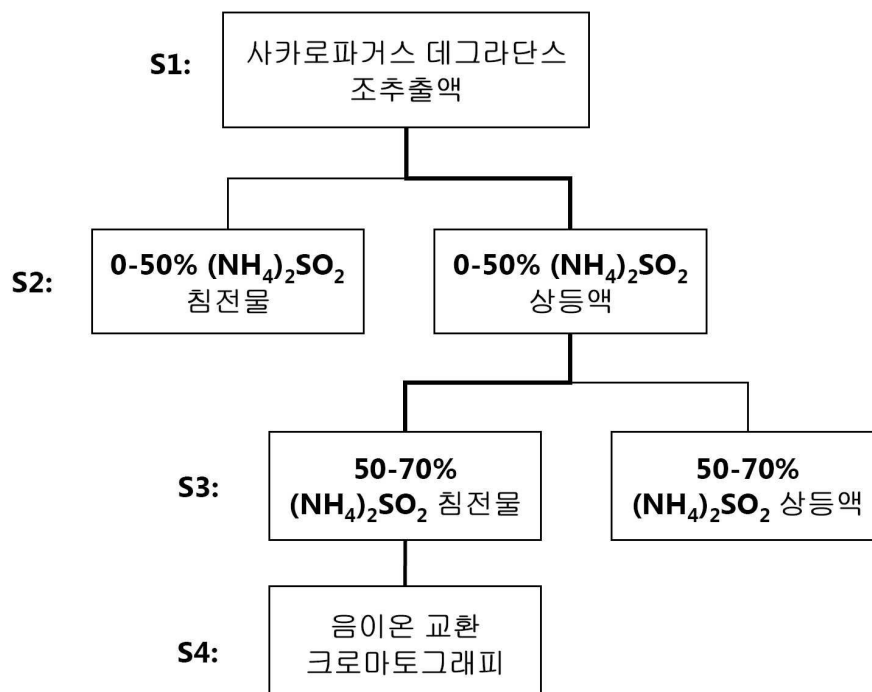
[0074] 본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주 내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

