



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0117247
(43) 공개일자 2018년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/32 (2006.01) C12Q 1/54 (2006.01)
G01N 33/66 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/32 (2013.01)
C12Q 1/54 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0049768
(22) 출원일자 2017년04월18일
심사청구일자 2017년04월18일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

최인걸

서울특별시 동작구 남부순환로263길 34 501호 (사당동)

김경현

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

둘레파 파디라자

서울특별시 동대문구 안암로 20길 25-3 106호

(74) 대리인

특허법인다나

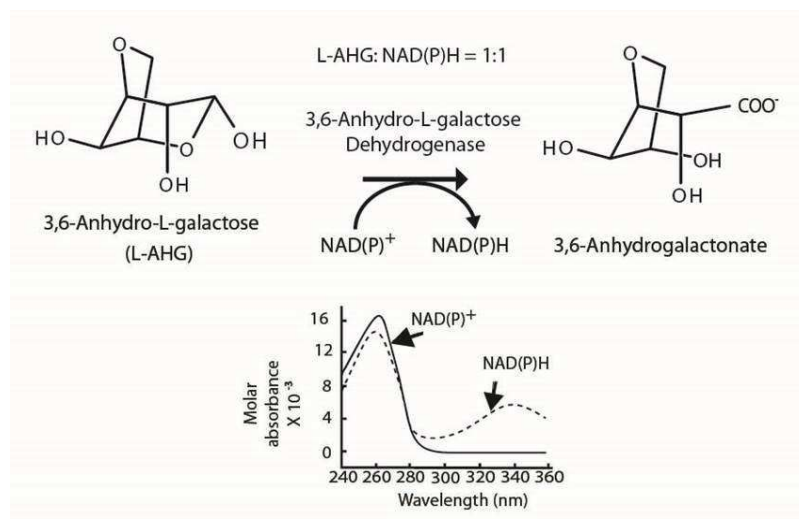
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 당 혼합물에서의 신속하고 정확한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 효소적 정량방법 및 응용

(57) 요약

본 발명은 당 혼합물에서의 신속하고 정확한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 효소적 정량방법 및 응용에 관한 것으로, 금속 킬레이트제 및 NAD(P)⁺의 존재 하에서 L-AHG 산화효소에 의해 L-AHG가 AHGD로 산화되면서 동시에 NAD(P)⁺를 NAD(P)H로 환원시키므로, 환원된 NAD(P)H의 함량이 L-AHG의 함량과 비례함을 통해 L-AHG의 정확한 함량을 정량화하는 방법을 제공한다. 본 발명은 AHG를 함유한 제품의 정량에 적용할 경우, 식품공전이나 약품공전의 기준 및 시험방법으로 등재가 가능하고, 효소센서나 전극을 이용할 경우, 휴대용 기기나 간단한 전기장치로 확장하여 현장에서 즉각 정량 가능한 분석방법으로 활용 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Y 102/01 (2013.01)

G01N 33/66 (2013.01)

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

3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase);

금속 킬레이트제;

NAD(P)⁺; 및

완충용액을 포함하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 함량은 NAD(P)⁺로부터 환원된 NAD(P)H의 함량에 비례하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 3,6-안하이드로갈락토네이트로 산화하는 효소인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소는 SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

금속 킬레이트제는 Ca²⁺, 또는 전이금속 킬레이트제인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

금속 킬레이트제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 에틸렌디아민, 비타민 B-12, N,N,N',N'-테라키스(2-피리딜메틸)에틸렌디아민(N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine), 에틸렌글리콜-O-O'-비스(2-아미노에틸)-N,N,N',N'-테트라아세트산(EGTA, Ethyleneglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid), 트리에탄올아민(TEA, triethanolamine), HEDTA(N-(2-Hydroxyethyl)ethylenediamine-N, N', N'-triacetic acid Trisodium salt), 니트릴로트리아세트산(Nitrilotriacetic acid), 2,2'-바이피리딜(2,2'-Bipyridyl), 다이머캡토프로판올(Dimercaptopropanol), 아이오노포어 니트릴로아세트산(Ionophores

Nitrilotriacetic acid), 니트릴로아세트산 오쏘-페난트롤린(NTA ortho-Phenanthroline), 살리실산(Salicylic acid), 테트라피롤(Tetrapyrrols), 페리옥사민(Ferrioxamines), 그라미시딘(gramicidin), 모넨신(monensin), 발리노마이신(valinomycin), BAPTA(1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid), 알파-리포산(alpha-lipoic acid) 및 니코틴아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석용 조성물.

청구항 7

금속 킬레이트제 및 NAD(P)^+ 의 존재 하에서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 시료와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 반응시키는 단계; 및

상기 반응에 의해 NAD(P)^+ 에서 환원된 NAD(P)H 의 함량을 측정하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소는 SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열로 표시되는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

금속 킬레이트제는 Ca^{2+} , 또는 전이금속 킬레이트제인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

금속 킬레이트제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 에틸렌디아민, 비타민 B-12, *N,N,N',N'*-테라키스(2-피리딜메틸)에틸렌디아민(*N,N,N',N'*-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine), 에틸렌글리콜-O-O'-비스(2-아미노에틸)-*N,N,N',N'*-테트라아세트산(EGTA, Ethyleneglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid), 트리에탄올아민(TEA, triethanolamine), HEDTA(*N*-(2-Hydroxyethyl)ethylenediamine-*N,N',N'*-triacetic acid Trisodium salt), 니트릴로트리아세트산(Nitrilotriacetic acid), 2,2'-바이피리딜(2,2'-Bipyridyl), 다이머캡토프로판올(Dimercaptopropanol), 아이오노포어 니트릴로아세트산(Ionophores Nitrilotriacetic acid), 니트릴로아세트산 오쏘-페난트롤린(NTA ortho-Phenanthroline), 살리실산(Salicylic acid), 테트라피롤(Tetrapyrrols), 페리옥사민(Ferrioxamines), 그라미시딘(gramicidin), 모넨신(monensin), 발리노마이신(valinomycin), BAPTA(1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid), 알파-리포산(alpha-lipoic acid) 및 니코틴아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

반응은 15 내지 25°C, 5분 내지 2시간, pH 8 내지 11에서 수행하는 것인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량 분석방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

NAD(P)H의 함량은 340 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 얻는 것인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 하기 식 1에 따라 정량되는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법.

[식 1]

3,6-안하이드로-L-갈락토오스 함량(mM)=(340 nm 파장에서의 흡광도)/0.11

청구항 14

제7항에 있어서,

3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 함량은 NAD(P)⁺로부터 환원된 NAD(P)H의 함량에 비례하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당 혼합물에서의 신속하고 정확한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 효소적 정량방법 및 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 한천으로부터 얻는 한천무수당(AHG)의 기존의 정량방법은 대개 크로마토그래피(예) 기체크로마토그래피, HPLC 등)를 이용해 AHG를 분리하고, 표준물질과 비교하여 흡광도나 질량분석(Mass spectroscopy)을 통해 농도를 측정하는 방법이다. 박막크로마토그래피(Thin layer chromatography)를 사용하는 경우도 있지만, 기존의 정량방법과 마찬가지로 표준물질을 필요로 하고, AHG에 해당하는 전개위치의 색깔과 크기에 의존하므로 정확도는 앞서의 GC/MS, HPLC/MS보다 현저하게 떨어진다. 정밀한 기기분석방법에 의존하더라도, AHG가 포함된 상업용 제품(화장품, 기능성식품)이나 여러 개의 당이 혼합된 당 혼합물에서 AHG 만을 특이적으로 검출하고 정량하기 위해서는 시료의 전처리가 필수이고 정량에 비해 상대적으로 많은 시간이 소요되기도 한다.

[0004] 종래기술의 단점으로 1) 고가의 분석기기(HPLC, MS 질량분석기)를 사용한다, 2) 기기분석적에 시간과 비용이 소모되는 시료의 전처리를 필요로 한다, 3) 고순도의 순수한 표준물질을 요구한다는 점 등이 있다.

[0005] 효소를 사용하여 특정 물질을 정량하는 방법은 효소가 기질특이적으로 반응하여 특이성과 정확도가 매우 높다는 장점이 있다. 대표적인 정량방법이 혈중 포도당 농도를 측정하는 효소정량법이다. 혈중 포도당 농도를 측정하는 효소정량방법은 효소센서나 전극으로 개발되어 소형화된 전자기기를 사용해 그 수치(정량값)를 읽기도 한다.

[0006] 당 혼합물 중의 종래기술(기기분석)을 이용한 AHG의 정량은 시료를 분석하기에 적합하게 전처리(pretreatment)해야 한다. 전처리한 시료를 크로마토그래피 등을 통해 순수하게 분리한 다음 다양한 검출방법(발색, 굴절율, 질량분석)을 이용하고 표준물질을 사용해 상대적으로 정량한다.

- [0007] 기기분석의 경우 전처리 시간을 포함해서 수 시간(hour)에서 수 일(day)의 시간이 필요하다.
- [0008] 이에 반하여 효소적 정량방법을 사용하면 시간과 비용이 드는 전처리 과정을 건너뛰거나 단순화할 수 있다. 효소 방법의 경우, 수 분(minute)으로도 충분하다. 표준물질을 필요로 하지 않아 표준물질 구입비용도 절감하여 분석시간, 비용, 노력을 단축할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2011-0136441호 (2011.12.21)
- (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2012-0085364호 (2012.08.01)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 AHG를 함유한 상업용 제품이나 당 혼합물에서 AHG 만을 특이적으로 검출하고 정량하는 간단한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase); 금속 킬레이트제; NAD(P)^+ ; 및 완충용액을 포함하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 금속 킬레이트제 및 NAD(P)^+ 의 존재 하에서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 시료와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 반응시키는 단계; 및 상기 반응에 의해 NAD(P)^+ 에서 환원된 NAD(P)H 의 함량을 측정하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 금속 킬레이트제 및 NAD(P)^+ 의 존재 하에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소에 의한 NAD(P)^+ 의 NAD(P)H 로의 환원이 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 함량에 비례함을 확인하고 환원된 NAD(P)H 의 함량을 측정하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정량하는 방법을 제공하는 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 AHG를 함유한 제품에서 AHG를 정량하고자 할 때, 식품공전이나 약품공전의 기준 및 시험방법으로 등제가 가능하고, 효소센서나 전극을 이용할 경우, 휴대용 기기나 간단한 전기장치로 확장하여 현장에서 즉각 정량 가능한 분석방법으로 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소(*Ve*jAHGD)를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량을 도시한 개념도이다.
- 도 2는 Ni^{2+} 하전된 His-결합 수지에서 $6 \times \text{His-Ve}$ jAHGD의 정제 결과를 나타낸 SDS-PAGE 젤 사진도이다. 레인 1은 정제 전 총 단백질 추출물; 레인 2는 *Ve*jAHGD의 반-정제 분획; 레인 3은 Ni^{2+} 하전된 His-결합 수지에서 정제된

V_{ej} AHGD이다.

도 3은 V_{ej} AHGD 활성에 대한 온도 및 pH의 효과를 나타낸 것으로, a)는 V_{ej} AHGD의 활성에 대한 pH의 효과, b)는 V_{ej} AHGD의 활성에 대한 온도의 효과이다(V_{ej} AHGD의 활성은 1mM AHG 및 5 mM $NADP^+$ 의 존재 하에서 4°C 내지 75°C의 온도 범위에서 측정하고, pH는 3 내지 13의 범위에서 측정함)

도 4는 V_{ej} AHGD의 pH 및 열적안정성을 나타낸 것으로, a)는 V_{ej} AHGD의 안정성에 대한 온도의 효과(효소를 일정 pH에서 온도 별로 인큐베이션하고, V_{ej} AHGD의 잔여 활성을 시간대 별로 측정함), b)는 V_{ej} AHGD의 안정성에 대한 pH의 효과이다(효소를 일정 온도에서 pH 별로 인큐베이션 하고, V_{ej} AHGD의 잔여 활성은 시간대 별로 측정함).

도 5는 기질로 L-AHG 및 보조소로 NAD^+ 를 사용한 V_{ej} AHGD의 효소 카이네틱스를 표시하는 Lineweaver-Burk 곡선을 나타낸 것이다.

도 6은 이중 혼합물에서 V_{ej} AHGD의 활성에 대한 다른 당의 효과를 나타낸 것으로, a)는 V_{ej} AHGD의 활성에 대한 다른 C_6 및 C_5 당의 효과, b)는 V_{ej} AHGD의 활성에 대한 이당류 및 올리고당의 효과이다(V_{ej} AHGD의 활성은 1mM AHG 및 1mM의 다른 당의 존재 하에서 V_{ej} AHGD의 활성을 측정함).

도 7은 GC-MS 및 V_{ej} AHGD 분석에 의한 AHG 농도의 비교 결과이다. 5개의 다른 샘플에서 AHG의 농도는 GC-MS에 의해 얻고, 그들의 농도를 V_{ej} AHGD 분석으로 측정하였다. 이때, 참조로 GC-MS에서 얻은 각각의 농도를 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0020] 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase); 금속 킬레이트제; $NAD(P)^+$; 및 완충용액을 포함하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석용 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 현재 L-AHG의 분석은 정성적으로는 박막크로마토그래피와 분광분석법이 이용되고, 기타 액체크로마토그래피 등을 사용하여 정량분석하는 방법이 알려져 있다. 그러나, 표준화된 방법은 존재하지 않으며 상기 방법들은 광학 이성질체인 D형의 3,6-AHG를 구분하지 못한다는 문제점을 가지고 있다.
- [0022] 이에, L-AHG를 효과적으로 정량할 수 있고, L형의 AHG를 구별할 수 있는 정량분석용 조성물을 제공하고자 한다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소에 의한 보조소 $NAD(P)^+$ 의 $NAD(P)H$ 로의 환원이 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하, 'L-AHG'라 함)의 함량에 비례함을 확인하고 환원된 $NAD(P)H$ 의 함량을 측정하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정량하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 3,6-안하이드로갈락토네이트로 산화하는 효소로, 보조소 $NAD(P)^+$ 를 화학양론적(stoichiometrically)으로 $NAD(P)H$ 로 환원시킬 수 있다.
- [0025] 상기 보조소인 $NAD(P)$ 는 340 nm에서 흡수극대 파장을 가지므로, 간단한 UV-분광광도계(spectrophotometer)로 쉽게 정량될 수 있다. 일 구체예에 따르면, 검출 범위에 있는 시료의 경우, 최소 검출 한계는 ~0.2 mM이며, 분광광도계로 측정할 경우 최대 1 mM까지 검출이 가능하다.
- [0026] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소가 수행하는 반응이 산화환원반응이므로 효소전극/센서로 활용 가능하다. 효소적 전기 생산에 사용 가능하다.
- [0027] 용어 '효소의 활성'은 일반적으로 반응 기작에서 효소의 촉매능력을 의미하고, 본 명세서에서 '3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소의 활성'은 보조소인 $NAD(P)^+$ 로부터 $NAD(P)H$ 로의 환원을 통해 확인할 수 있다.
- [0028] 용어 '보조소(Coenzyme)'는 주효소에 결합되어 있는 비단백질 성분으로, 효소반응 과정에서 그 화학구조가 변하면서 원자나 전자 등의 기능기를 반응기질에 전달하는 방식으로 효소반응을 보조하는 인자를 말하며, '조효소'라고도 한다. 보조소의 예로는 니코틴아미드아데닌 디뉴클레오티드(NAD), NADH, 니코틴아미드아데닌 디뉴클레오티드인산(NADP), NADPH, 아데노신삼인산(ATP), 포스포아데닐산황산(PAPS), 우리딘이인산(UDP), 시티딘이인산(CDP), 구아노신삼인산(GTP), 이노신삼인산(ITP), 보조소 A(CoA) 등을 들 수 있다. 다만, 본 발명의 예에 따른 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소의 활성 측정용 조성물 및 L-AHG의 정량용 조성물에는 $NAD(P)^+$ 가 유효한

보호소로서 포함된다.

- [0029] 용어 '기질'은 효소의 작용을 받는 물질을 총칭하고, 효소의 작용을 받아 그 화학구조가 변화하는 화합물을 포함한다. 본 발명은 기질로, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 사용하며, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 우뚝가사리 등 다수의 홍조류에 존재하는 한천 또는 아가로스의 구성성분이므로 홍조류로부터 수득될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 이당류, 오탄당, 육탄당, 아가로올리고당 등이 존재하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소의 산화 반응에서 효소 활성화에 대해 이들 당이 경쟁적 또는 비-경쟁적으로 영향을 주지는 않으므로, 이종의 당 혼합물에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 특이적으로 정량할 수 있다.
- [0030] 용어 '3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소'는 비브리오 에스피(*Vibrio* sp.) strain EJY3 유래의 SEQ ID NO: 1 또는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40 유래의 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열에 대해 80% 이상, 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 및 더 바람직하게는 95% 이상(예를 들어, 98% 이상)의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 단백질의 상동성 검색은 단백질의 아미노산 서열의 데이터 베이스(예컨대, SWISS-PROT 및 PIR), DNA서열의 데이터 베이스(예컨대, DDBJ, EMBL 및 Gene-Bank), 또는 DNA 서열로부터 추론한 아미노산 서열의 데이터 베이스에 대해 예컨대 인터넷을 통해 BLAST 및 FASTA와 같은 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0031] 본 발명은 SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질의 상동체를 추가적으로 포함한다.
- [0032] 여기서, '상동체'라 함은 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된, SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질로서, SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동등한 단백질을 말한다. 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소 상동체는 SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열 내에 예를 들어, 100 아미노산 잔기 이하, 전형적으로는 50 잔기 이하, 바람직하게는 30 잔기 이하, 보다 바람직하게는 15 잔기 이하, 더욱 바람직하게는 10 잔기 이하, 및 가장 바람직하게는 5 잔기 이하의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일반적으로, 단백질의 기능을 보유하기 위해서는 단백질의 아미노산이 원래의 아미노산과 유사한 성질을 갖는 아미노산으로 치환된다. 그러한 아미노산 치환은 '보존적 치환(conservative substitution)'이라 부른다. 예를 들어, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe 및 Trp는 전부 비극성(non-polar) 아미노산의 군으로 분류되고, 유사한 특성을 갖는다. 비-하전된(non-charged) 아미노산은 Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn 및 Gln을 포함한다. 산성 아미노산은 Asp 및 Glu를 포함한다. 염기성 아미노산은 Lys, Arg 및 His를 포함한다.
- [0033] 여기서, 'SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동등한'이라 함은 단백질이 상기 본 발명의 효소적 특성을 갖는 것을 의미한다. 당업자는 사이트-유도 변이(site-directed mutagenesis) 등을 이용하여(Nucleic Acid Res., 10, 6487 (1982); Method in Enzymol., 100, 448 (1983); 'Molecular Cloning 2nd Edition', Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); 및 'PCR A Practical Approach', IRL Press, 200(1991)) 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드로 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가를 적절히 도입함으로써 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소의 상동체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다. SEQ ID NO: 1 또는 2의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소의 상동체는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소의 상동체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 숙주내로 도입하고 발현시켜 얻을 수 있다.
- [0034] 또한, 여기서, '3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소의 상동체'라 함은 SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 및 더 바람직하게는 70% 이상의 상동성을 갖는 단백질을 말한다. BLAST 및 FASTA와 같은 프로그램을 이용하여 여러 가지 아미노산 서열 데이터베이스 및 DNA 데이터베이스에 대해 단백질 상동성 검색을 행할 수 있다. 이용 가능한 데이터베이스로는 SWISS-PROT 및 PIR과 같은 단백질의 아미노산 서열 데이터베이스; DDBJ, EMBL 및 Gene-Bank와 같은 DNA 서열 데이터베이스; 및 DNA 서열로부터 추론한 아미노산 서열의 데이터베이스를 포함한다. 모든 상기 데이터베이스는 인터넷을 통해 이용할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 효소는 비브리오 에스피(*Vibrio* sp.) strain EJY3에 의해 유래된 것이 바람직하나 상기 효소를 발현하는 모든 형질전환체 등을 포함하고, 이에 한정되지 아니한다.
- [0036] 또한, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소는 금속 이온에 의해 효소 활성이 영향을 받을 수 있다. 일 구체예에 따르면, Mg^{2+} 에 의해서는 효소 활성이 영향을 받지 않으나, Ca^{2+} 는 20% 정도, Mg^{2+} 는 30% 정도, Co^{2+} , Ni^{+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 및 Cd^{2+} 등의 전이금속 이온은 효소 활성을 완전히 억제한다. 따라서, 상기 보호소의 환원 반응은 금속 킬레이트제 하에서 수행함으로써 정량 민감도를 높일 수 있다.

- [0037] 상기 금속 킬레이트제는 바람직하게는, Ca^{2+} 킬레이트제; 또는 Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 등의 전이금속 킬레이트제일 수 있다. 상기 금속 킬레이트제는 예컨대, 에틸렌글리콜-0-0'-비스(2-아미노에틸)-N,N,N',N'-테트라아세트산(EGTA, Ethyleneglycol-0, 0'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid), 트리에탄올아민(TEA, triethanolamine), HEDTA(N-(2-Hydroxyethyl)ethylenediamine-N, N', N'-triacetic acid Trisodium salt), 니트릴로트리아세트산(Nitrilotriacetic acid), 2,2'-바이피리딜(2,2'-Bipyridyl), 다이머캡토프로판올(Dimercaptopropanol), 아이오노포어 니트릴로아세트산(Ionophores Nitrilotriacetic acid), 니트릴로아세트산 오쏘-페난트롤린(NTA ortho-Phenanthroline), 살리실산(Salicylic acid), 테트라피롤(Tetrapyrrols), 페리옥사민(Ferrioxamines), 그라미시딘(gramicidin), 모넨신(monensin), 발리노마이신(valinomycin), BAPTA(1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), 알파-리포산(alpha-lipoic acid), 또는 니코틴아민 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0038] 또한, 상기 완충용액은 일반적으로 효소의 활성이 가장 활발할 수 있는 최적 조건을 유지하도록 하기 위한 것이다. 또한, NAD(P)^{+} 로부터 NAD(P)H 로의 환원이 비가역적으로 일어나는 것을 유지한다. 완충용액의 예로는 Tris-HCl(pH 8.0 내지 10.0)을 들 수 있다.
- [0039] NAD(P)H 로의 환원을 관찰하는 방법은 특별히 제한되지 않으며 예를 들어, 분광학적 방법에 의해 340 nm의 파장에서 흡광도를 측정할 수 있다. 이 경우 상기 조성물에는 NAD(P)^{+} 이외의 340 nm에서 흡수파장을 갖는 보효소(예를 들어, NADH) 등이 포함되지 않아야 한다.
- [0041] 본 발명은 또한 금속 킬레이트제 및 NAD(P)^{+} 의 존재 하에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 시료와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 반응시키는 단계; 및 상기 반응에 의해 NAD(P)^{+} 에서 환원된 NAD(P)H 의 함량을 측정하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량분석방법을 제공한다.
- [0042] 임의의 시료 내에 L-AHG가 존재하는 경우, L-AHG 산화효소에 의해 L-AHG가 3,6-안하이드로갈락토네이트로 전환되고, 이 과정에서 NADP^{+} 가 NADPH로 환원된다. 이때, 시료 내 L-AHG의 함량 변화율은 NADP의 함량 변화율에 비례한다. 즉, 하나의 NADP^{+} 가 NADPH로 환원되면서 L-AHG 하나를 전환시킨다.
- [0043] 상기 환원 반응은 L-AHG 산화효소의 활성이 90% 이상인 조건, 예컨대, 15 내지 25°C, 5분 내지 2시간, pH 8 내지 11에서 수행할 수 있다. 더 구체적으로, 18 내지 22°C, 25분 내지 1시간, pH 8 내지 11에서 수행할 수 있다.
- [0044] 여기서, 임의의 시료는 L-AHG의 존재 및 정량을 확인하고자 하는 대상 시료를 의미한다. 예컨대, L-AHG를 함유하는 제품 또는 당 혼합물일 수 있다.
- [0045] 따라서, 시료 내의 L-AHG를 정량하고자 하는 경우, 금속 킬레이트제 및 NAD(P)^{+} 의 존재 하에서 L-AHG 산화효소를 첨가하여 반응시킨 후 NAD(P)H 의 함량을 측정하면 된다. 상기 NAD(P)H 의 함량은 340 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 알 수 있다.
- [0046] 이와 관련하여 L-AHG는 하기 식 1에 따라 정량될 수 있다:
- [0047] [식 1]
- [0048] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 함량(mM)=(340 nm 파장에서의 흡광도)/0.11
- [0049] 여기서, 340 nm에서의 흡광도가 NAD(P)H 의 함량을 의미한다
- [0050] 예컨대, 120 μl 의 VeJAHGD 완충용액(20mM Tris, 1mM EDTA), 50 μl 의 2.5 mM NAD(P)^{+} , 10 μl 의 VeJAHGD 효소(10U / μl), 20 μl 의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 20°C에서 10분간 반응시키고, 340 nm에서의 흡광도를 측정할 수 있다.
- [0051] 340 nm에서 $\beta\text{-NADPH}$ 의 mM 여기 계수는 6.22이고, 340 nm에서 NADH의 분자흡광계수는 $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이다. $1 \mu\text{mol}$ NADH/mL은 6.3의 흡광도를 가진다. 따라서, 0.016 μmol NADH/mL은 0.1의 흡광도와 같다. 그러므로, $\text{OD } 0.1=0.016 \mu\text{mol NADH/mL}=0.016 \mu\text{mol L-AHG/mL (mM)}$

[0052] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0054] <실시예> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소(*VejaHGD*)를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량

[0055] 도 1에 도시된 *VejaHGD*를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 정량법에 따라 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정량하였다.

[0057] <실시예 1> 재조합 *VejaHGD*의 생산

[0058] (효소의 클로닝 및 발현)

[0059] 주형으로 비브리오 에스피(*Vibrio* sp.) strain EJY3의 게놈 DNA를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 산화효소 코딩 유전자(*Vejahgd*, NCBI gene ID: 11666893)를 증폭하였다. 유전자, *Vejahgd*를 pBAD/myc-His 벡터에 클로닝하고 대장균(*E. coli*) BW25113에 형질전환시켰다. 균주, 플라스미드 및 프라이머는 표 1 및 2에 나열하였다.

[0060] 세포는 100 μ g/mL의 암피실린(Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)를 포함하는 Luria-Bertani 배지(LB; BD, Sparks, MD, USA)에서 세포가 지수기에 도달할 때까지 성장시켰다. 최종 농도 0.1%(w/v)까지 20%(w/v) 아라비노오스(Sigma-Aldrich, st. Louis, MO, USA)를 첨가하여 재조합 단백질의 과발현을 유도하였다. 세포는 16 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 180rpm의 웨이킹 플랫폼에서 인큐베이션 하였다.

표 1

[0061] 프라이머 리스트

타겟 서열(<i>Vejahgd</i>)	프라이머 서열(5'-3')
F_ahgd	GAAGGAGATATAAGGATGAAACGTTACCAAATGTACGTTG
R_ahgd	ATGATGGTGTATGGTGGTCGAAATTCACATAGAATGTCTT

표 2

[0062] 균주 및 플라스미드 리스트

명칭	설명	참고문헌
균주		
<i>Vibrio</i> sp. EJY3	<i>Vibrio</i> sp., an agarolytic marine bacterium metabolizing 3,6-anhydro-L-galactose	Roh <i>et al.</i> , <i>J. bacteriol.</i> Vol. 194, pp. 2773-2774 (2012)
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺) and λ ⁻	Grant <i>et al.</i> , <i>PNAS</i> , vol.87(12), pp.4645-4649(1990)
<i>E. coli</i> DH5 α _ <i>Vejahgd</i>	DH5 α harbouring <i>Vejahgd</i> in pBAD/myc His	본 발명
<i>E. coli</i> BW25113	F ⁻ , DE(<i>araD-araB</i>)567, <i>lacZ</i> 4787(<i>del</i>)::rrnB-3, LAM ⁻ , <i>rph-1</i> , DE(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , <i>Mol. Syst. Biol.</i> Vol. 2, p.1(2006)
<i>E. coli</i> BW25113_ <i>Vejahgd</i>	<i>E. coli</i> BW25113 harbouring <i>Vejahgd</i> in pBAD/myc His	본 발명
플라스미드		
pBAD/myc His	<i>araBAD</i> promoter, <i>rrnB</i> terminator, pBR322 origin and Amp ^r	Lee <i>et al.</i> , <i>PNAS</i> , vol.78(2), pp.752-756(1981)
pBAD/myc His_ <i>Vejahgd</i>	pBAD cloned <i>Vejahgd</i> of EJY3	본 발명

- [0064] (재조합 효소의 추출 및 정제)
- [0065] 세포를 원심분리하여 회수하고, 20 mM Tris-Cl(pH 8.0), 200 mM 소듐 클로라이드, 5 μ M β -머캅토에탄올 및 5% 글리세롤을 포함하는 라이시스 완충용액에서 재현탁하였다. 세포를 저온에서 초음파처리하여 파쇄하고, 용해성 및 불용성 분획은 4℃에서 30분 동안 3500rpm에서 원심분리하여 분리하였다. 재조합 단백질 *VejAHGD*는 His-Trap column(GE Healthcare, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE로 정성적으로 분석하였다. 조추출물 내 총 단백질의 함량은 표준물질로서 소혈청알부민(BSA)(Takara, CA, USA)을 이용하여 브래포드 단백질 분석으로 측정하였다.
- [0066] 도 2는 대장균에서 과발현되어 정제된 6×His-*VejAHGD*의 정제 결과를 나타낸 SDS-PAGE 젤 사진도로, *VejAHGD*는 약 45kDa에서 확인되었다.
- [0068] <실시예 2> *VejAHGD*의 최적 pH 및 온도
- [0069] *VejAHGD* 효소 분석을 위해, 30 μ g의 순수 재조합 효소를 0.5 mM L-AHG 및 2.5 mM NADP^+ 를 포함하는 20 mM Tris buffer (pH 9.0)에서 20℃에서 인큐베이션 하였다. 반응은 30분 동안 수행하였고, NADPH의 농도는 340nm에서 분광도계로 측정하였다(분자흡광계수 = $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 1 유닛의 *VejAHGD*은 20℃ 및 pH 8.0에서 분당 효소에 의해 산화된 AHG의 μ g으로 정의한다.
- [0070] *VejAHGD*의 3.0 내지 13.0의 범위에서 pH의 효과를 측정한 결과, 도 3a에 나타나 바와 같이, *VejAHGD*는 pH8.0에서 최대 활성을 보여주었다. 효소 활성은 pH 8.0 내지 11.0에서 최대 활성의 90%를 갖는 것으로 관찰되었다. pH 5 미만에서, 효소 활성은 극적으로 감소하였다.
- [0071] 유사하게, *VejAHGD*의 활성에 대한 온도의 효과는 4 내지 75℃의 범위에서 측정하였다. *VejAHGD*의 최대 활성은 20℃에서 관찰되며, 활성은 온도가 증가할수록 극적으로 감소하였다(도 3b).
- [0073] <실시예 3> *VejAHGD*의 pH 안정성 및 열적안정성
- [0074] *VejAHGD*의 pH 안정성을 점검하기 위해, 순수 효소를 pH 4 내지 13의 완충용액과 인큐베이션 하고, 온도는 일정하게 유지하였다. 효소를 0℃에서 12시간까지 인큐베이션하고, 효소의 잔여 활성을 시간대별로 측정하였다.
- [0075] 도 4a에 나타난 바와 같이, *VejAHGD*의 안정성은 pH 8-10 이내의 약간 알칼리 pH에서 최대인 것으로 나타났다. 반면, pH 5 아래에서, 효소의 안정성은 극적으로 감소하였다. pH 5 아래에서 효소의 응고가 관찰되었다. 이는 약 알칼리 pH(pH 8-10)가 *VejAHGD*의 기능 및 저장 측면에서 가장 유리한 조건임을 시사하는 것이다.
- [0076] *VejAHGD*의 열적안정성을 점검하기 위해, 순수 효소를 0 내지 60℃의 범위의 온도별로 인큐베이션 하고, 배지의 pH는 일정하게 유지하였다. 인큐베이션 시기는 20 mM Tris buffer(pH 8.0)에서 12시간까지였다. 잔여 활성은 인큐베이션 시기가 끝난 후에 측정하였다. *VejAHGD*는 강한 온도 민감도를 보여주었다.
- [0077] 도 4b에 나타난 바와 같이, 효소의 잔여 활성은 온도가 증가할수록 감소하였다. 0℃에서 *VejAHGD*는 감소 없이 거의 일정한 잔여 활성을 유지하면서 최대 안정성을 보여주었다. 효소 활성을 위한 최적 온도 범위(20 내지 30℃)에서, 효소는 상당히 높은 안정성을 보여주었다. 20℃에서 효소의 반감기는 12시간인 것으로 측정되었다(20℃에서 $t_{1/2} = 12 \text{ hrs}$). 반면, 50℃에서, 효소의 반감기는 10분 미만(50℃에서 $t_{1/2} < 10 \text{ min}$)으로, 50℃ 이상의 온도에서 매우 불안정함을 시사한다.
- [0079] <실시예 4> *VejAHGD*의 카이네틱 파라미터
- [0080] *VejAHGD*의 카이네틱 파라미터는 기질로 L-AHG와 보조소로 NADP^+ 를 사용하여 측정하였다.
- [0081] 도 5는 기질로 L-AHG 및 보조소로 NAD^+ 를 사용한 *VejAHGD*의 효소 카이네틱스를 표시하는 Lineweaver-Burk 곡선

을 나타낸 것이다.

[0082] K_m 및 V_{max} 는 각각 0.19 ± 0.01 mM (SD, n=3) 및 0.36 ± 0.01 mg/min(SD, n=3)인 것으로 측정되었다. L-AHG를 이용한 $VejAHGD$ 의 촉매 효율(K_{cat})은 0.357 ± 0.014 min⁻¹(SD, n=3)인 것으로 측정되었으며, K_{cat}/K_m 는 1.91 ± 0.05 mM⁻¹ min⁻¹ (SD, n=3)인 것으로 나타났다(표 3).

표 3

[0083] 기질로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 보조소로 NAD⁺를 사용한 $VejAHGD$ 의 카이네틱 파라미터

파라미터	Value $\pm$ SD (n=3)
K_m	0.19 ± 0.01 mM
V_{max}	0.36 ± 0.01 mg/min
K_{cat}	0.357 ± 0.014 min ⁻¹
K_{cat}/K_m	1.91 ± 0.05 mM ⁻¹ min ⁻¹

[0085] <실시예 5> $VejAHGD$ 의 기질 특이성

[0086] $VejAHGD$ 효소의 기질 특이성은 다양한 단당류, 이당류 및 올리고당 기질에 대해 시험하였다. $VejAHGD$ 의 기질 특이성을 측정하기 위해 $VejAHGD$ 의 원래 기질인 L-AHG 외에 몇몇 다른 당 기질을 시험하였다. 이들은 원래의 기질의 광학이성질체인 3,6-안하이드로-D-갈락토오스; 일반적으로 발견되는 육탄당, 예컨대, D-글루코오스, D-갈락토오스, D-프루토오스; 이당류, 예컨대, 수크로오스 및 말토오스; 아라비노오스 및 자일로오스를 포함하는 오타당을 포함한다. 아가로-올리고당(아가로헥사오스 및 아가로테트라오스) 및 네오아가로바이오스와 같은 아가 유래 기질을 또한 기질로 시험하였다.

[0087] 흥미롭게도, L-AHG 외에 이들 기질 중 어느 것도 $VejAHGD$ 의 기질로 사용되지 않았다. 이들 결과는 $VejAHGD$ 이 L-AHG에 매우 특이적임을 시사하는 것이다.

[0089] <실시예 6> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 대한 다른 당의 효과

[0090] AHG는 당의 이중 혼합물에서 종종 발견된다. 따라서, 다른 당의 간섭 효과를 시험할 필요가 있다. 다른 당 기질이 $VejAHGD$ 의 활성 부위에 결합하여 경쟁적 억제 효과를 행사할 수 있는지를 확인하기 위해, 이중 당 혼합물에서 $VejAHGD$ 의 활성을 측정하였다. 육탄당, 오타당 및 아가 유래의 올리고당 기질은 L-AHG와 함께 1mM의 농도에서 사용하였다.

[0091] 도 6a-b에 나타난 바와 같이, 혼합물에서 고농도의 다른 당의 존재에도 불구하고, 이들 당에 의해서는 무시할만한 간섭을 행사하였다. 순수 L-AHG 및 혼합물 둘 다 같은 카이네틱 거동을 보여주었다. 경쟁적 또는 비경쟁적 억제 프로파일은 L-AHG가 당의 이중 혼합물에서 사용될 때 관찰되지 않았다.

[0092] 추가로, 기질로 각 이중 당 혼합물에 대한 V_{max} 및 K_m 값을 계산하고 순수 기질로 L-AHG에 대한 이들 값을 비교하였다(표 4).

[0093] 측정과 연관된 실험 오차를 고려하면, 이중 당 혼합물에 대한 V_{max} 값은 순수 AHG 기질에 대한 V_{max} 값의 $\pm 7.5\%$ 범위 이내였다. 유사하게, 이중 당 혼합물에 대한 K_m 값 역시 순수 L-AHG 기질에 대한 K_m 값의 7.5% 범위 이내였다. 이들은 이중 혼합물에서 다른 당 화합물이 $VejAHGD$ 의 활성에 대해 어떤 경쟁적 또는 비-경쟁적 효과를 행사하지 않음을 시사하는 것이다.

표 4

[0094] $VejAHGD$ 에 대한 기질로 순수 AHG 및 이중 당 혼합물에서의 AHG의 대한 V_{max} 및 K_m 값의 비교(이중 혼합물에서 다

른 당의 농도는 1mM로 사용됨)

조성	$V_{\max}$ (mg/min)	K_M (mM)
	Value $\pm$ SD (n=3)	Value $\pm$ SD (n=3)
AHG 단독	0.36 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01
AHG + D-글루코오스	0.37 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
AHG + D-갈락토오스	0.34 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
AHG + D-프루토오스	0.34 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.01
AHG + 아라비노오스	0.38 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01
AHG + 자일로오스	0.37 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01
AHG + 3,6-D-AHG	0.37 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01
AHG + 말토오스	0.33 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.01
AHG + 수크로오스	0.35 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01
L-AHG + D-갈락투론산	0.35 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
L-AHG + D+갈락투론산	0.36 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
AHG + 네오아가로바이오스	0.37 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01
AHG + 아가로올리고당	0.37 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01

[0096] <실시예 7> 염의 효과

[0097] V_{ej} AHGD의 활성화에 대한 다양한 염의 효과를 시험하였다. V_{ej} AHGD의 활성화에 대한 효과를 측정하기 위해 일반적으로 발견되는 1가, 2가 양이온 및 전이금속 이온을 선택하였다.

[0098] 표 5에서와 같이, 이온의 최종 농도는 1mM로 유지하였다. 1가 양이온, Na^+ 및 K^+ 는 V_{ej} AHGD의 활성화에 영향을 미치지 않았다. 2가 양이온의 경우, Mg^{2+} 는 활성화에 영향을 미치지 않으나, Ca^{2+} 는 20%로 활성을 감소시켰다. 전이금속 이온 중, Mn^{2+} 는 30%로 활성을 감소시키나, Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 및 Cd^{2+} 는 효소를 완전히 억제하였다. 추가로, 1mM EDTA를 사용하여 킬레이팅제의 효과를 시험한 결과, 효소 활성화에 영향을 미치지 않았다.

[0099] 효소는 전이금속에 의해 쉽게 불활성화될 수 있다. 따라서, 5개의 전이금속에 대해 시험한 결과, 그들 모두 영구적으로 효소를 불활성화시켰다. 그러나, 다른 일반적으로 발견되는 양이온들, 예컨대, Na^+ , K^+ 및 Mg^{2+} 또는 금속 킬레이팅제는 효소 활성화에 영향을 미치지 않았다. 그러므로, 혼합물이 전이금속을 포함하는 것으로 의심이 들면 1mM EDTA를 사용할 것을 제안한다.

표 5

[0100] 여러 금속이온 및 킬레이팅제의 존재에서 V_{ej} AHGD의 상대 활성화(순수 V_{ej} AHGD의 활성화는 100% 활성화로 간주)

카테고리	금속 이온/킬레이팅제	상대 활성화(%)
금속이온이 없음		100%
1가 양이온	Na^+	109.1 $\pm$ 1.3 %
	K^+	101.7 $\pm$ 1.5 %
2가 양이온	Mg^{2+}	96.3 $\pm$ 0.8 %
	Ca^{2+}	80.8 $\pm$ 1.1 %
전이금속	Mn^{2+}	68.2 $\pm$ 4.6 %
	Co^{2+}	완전 억제
	Ni^{2+}	완전 억제
	Cu^{2+}	완전 억제
	Zn^{2+}	완전 억제
	Cd^{2+}	완전 억제

킬레이팅제	EDTA	132.2 ± 3.9 %
-------	------	---------------

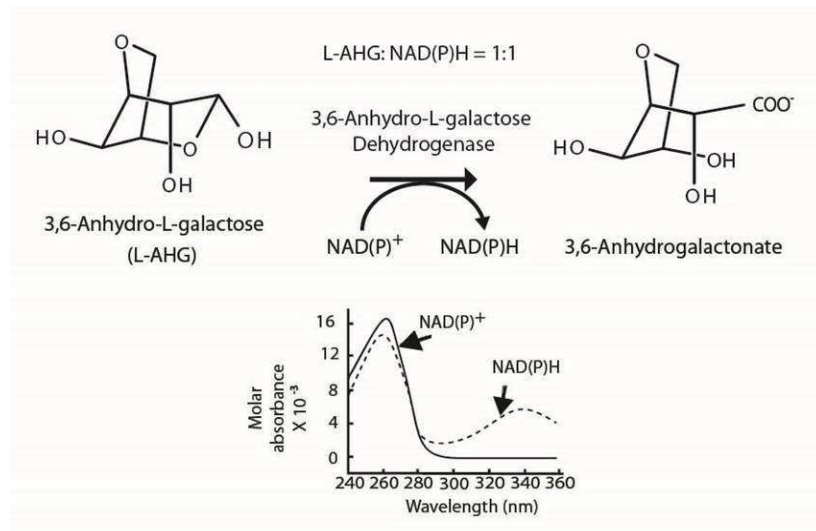
- [0102] <실시예 8> *Ve*jAHGD 효소 분석
- [0103] 아가는 L-AHG의 주요 공급원이므로, 종종 아가로테트라오스 및 아가로헥사오스 같은 아가로올리고당과 D-갈락토오스의 혼합물로 발견된다. 추가로, 활성 성분으로 AHG를 이용하는 화장품은 많은 다른 간접 물질들을 포함할 수 있다. 그러므로, L-AHG의 정량화에 사용될 어떤 분석 방법은 매우 특이적이고 다른 화합물들에 의해 최소한의 간섭을 받아야 한다. 뿐만 아니라, 낮은 검출 한계, 낮은 샘플 투입 및 빠른 분석 시간 같은 고도의 분석 처리량의 요구를 충족해야 한다.
- [0104] 일반적으로 이용 가능한 분석법인 DNS 분석으로는 L-AHG의 정확한 함량을 정확하게 측정할 수 없다. GC/MS 또는 LC를 포함하는 보다 정확한 방법을 표준참조, 샘플의 전처리 및 복잡한 기구를 필요로 한다.
- [0105] L-AHG의 정량적 분석과 연관된 어려움을 극복하기 위해, 본 발명자들은 비브리오 에스피(*Vibrio* sp.) strain EJY3의 안하이드로갈락토오스 산화효소(*Ve*jAHGD)를 사용하여 매우 특이적이고 풍부한 효소적 분석을 개발하였다. 상기 분석은 AHG 이화 경로의 1차 효소인 NAD(P)⁺ 의존적인 AHG 산화효소를 이용한다. 이 효소 반응은 NADP⁺를 환원하면서 AHG를 선택적으로 산화한다. 환원된 NADPH의 함량은 340nm에서 분광광도계에서 쉽게 측정할 수 있다.
- [0106] *Ve*jAHGD는 다른 일반적으로 발견되는 당당류, 이당류 및 아가로올리고당보다 L-AHG에 높은 특이성을 보여주었다. 추가로, 이들 기질은 활성 부위에 경쟁적으로 결합하여 효소 활성에 대한 억제제로서 작용하지 않았다. *Ve*jAHGD 효소의 기질 특이성으로 인해, L-AHG의 함량은 혼합물의 구성에 상관 없이 정확하게 측정될 수 있다. 이들 특징은 *Ve*jAHGD이 최소한의 위양성 반응으로 AHG를 정량화하는데 이상적이다. 비록 L-AHG가 보통 아가의 당화 산물로 발견된다고 해도, 이 방법이 당화 혼합물에서 L-AHG를 정량화하는데 제한되지는 않는다. 화장품 및 약품 같은 어떤 이종 혼합물에서 L-AHG를 정량화하는 것으로 확장될 수 있다.
- [0107] *Ve*jAHGD 효소 분석은 몇몇 장점을 가진다. DNS 분석 및 LC 또는 GC/MS 둘 다의 구조적 특징들이 결합되어 있다. DNS 분석과는 달리, AHG의 정확한 함량이 정확하게 측정될 수 있다. 분석 시 정량화 전에 LC 또는 GC/MS 방법들에서 필요한 다루기 힘든 샘플 준비를 하지 않으므로, 샘플 준비가 필요 없다. 이 방법은 고 처리량 샘플 분석에도 적합하다. 고 처리량 샘플 분석을 위해 96-웰 플레이트에서 사용되는 방법을 최적화 하였다. 이 분석은 L-AHG의 마이크로-규모의 분석에 사용할 수 있다. 0.2mM의 최소 검출 한계를 가지므로 저 농도의 L-AHG를 검출할 만큼 충분히 민감하다. 분광광도법이 이 분석에 사용되기 때문에, 최대 한계는 1mM로 제한된다. 또한, 분석은 혼합 단계가 거의 필요 없어 반응은 5분 이내에 완료될 수 있다. 이 분석의 최적 온도는 20℃이므로 반응을 실온에서 수행할 수 있다. 그리고, 효소는 일반적으로 발견되는 완충용액, 예컨대 pH 8.0의 Tris 완충용액에서 양립할 수 있다.
- [0108] 최적화된 분석 조건 하에서 이 방법의 정확성을 확인하기 위해, *Ve*jAHGD 분석을 사용하여 농도별로 GC-MS로 정량화된 순수 AHG 샘플을 사용하여 *Ve*jAHGD 분석을 통해 AHG의 함량을 정량화 하였다.
- [0109] GC-MS에 의한 L-AHG의 분석은 선행 보고에서 기재된 방법으로 수행하였다(E. J. Yun et al. Process Biochem. 46 (2011) 88-93). 건조된 당 샘플을 농도별로 메톡시화 및 트리메틸실화하였다. 유도체화된 샘플을 스플릿 인젝션 모드(split injection mode) (the split ratio = 9.6)로 Agilent 7890A GC/5975C MSD system (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)에 주입하였다. DB-5MS capillary column (30m×0.25mm, 0.25 μm film thickness, Agilent Technologies)에서 분리하였다. 질량 스펙트럼은 전자 충돌의 70 eV에서 스캔 범위 50-600m/z에서 기록하였다. L-AHG는 상업적으로 이용할 수 없으므로, D-형의 3,6-안하이드로갈락토오스(D-AHG; Dextra Laboratories, Berkshire, UK)를 참조표준으로 사용하였다. 마지막으로, L-AHG의 함량은 총 이온 크로마토그램에서 각 화합물의 피크를 기반으로 조정하였다.
- [0110] 도 7에 나타난 바와 같이, *Ve*jAHGD 분석에서 얻은 L-AHG 농도는 GC-MS에서 얻은 농도의 분석 범위 내에 있었다. *Ve*jAHGD 분석의 정확도는 GC-MS의 것과 유사하나, GC-MS 보다 훨씬 간편함을 입증한다.
- [0111] *Ve*jAHGD 효소적 분석은 현재 이용 가능한 AHG 정량법의 단점을 제거하고 장점을 결합하여 개발한 것이다. 견고함과 편의성을 겸비한 *Ve*jAHGD 분석은 이종 혼합물에서 L-AHG의 정량적 분석을 위한 이상적인 방법으로 제안될

수 있다.

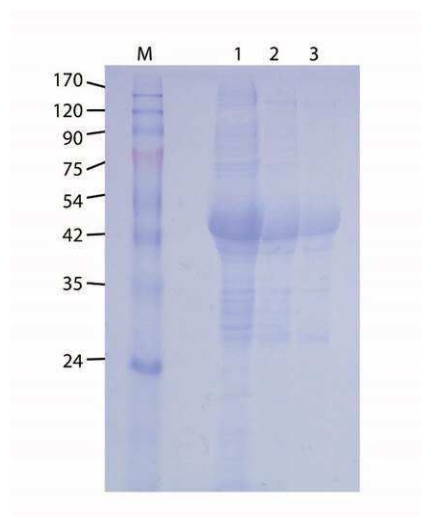
[0112] 결론적으로, 안하이드로갈락토오스 산화효소 분석은 L-AHG에 매우 특이적이며, 이중 당 혼합물에서 이의 이성질체를 포함한 다른 당에 의해 최소한의 간섭을 받을 뿐이다. 안정성은 주위 조건에서의 분석 기간 동안 일정한 수준을 유지하기에 충분하다. L-AHG의 3,6-안하이드로갈락토네이트로의 효소적 산화는 동시에 340nm에서 분광광도계로 측정할 수 있는 1:1 몰 비율의 NADP^+ 에서 NADPH로 환원시킨다. 그러므로, AHGD 분석은 이중 혼합물에서 L-AHG의 정량적 분석을 위한 견고하고 가장 편리한 분석 방법이다.

도면

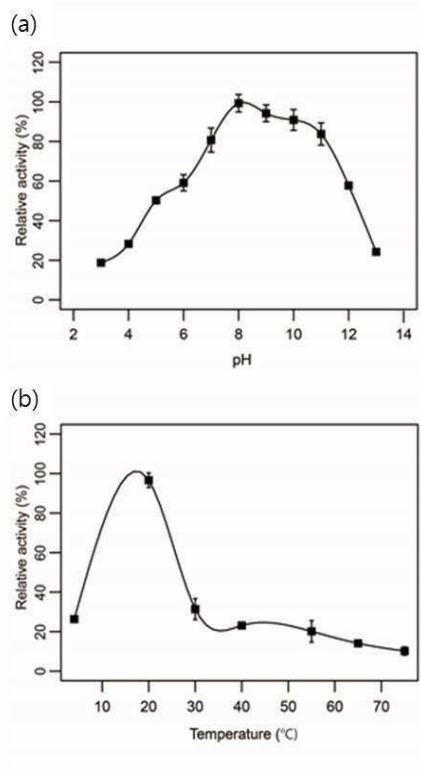
도면1



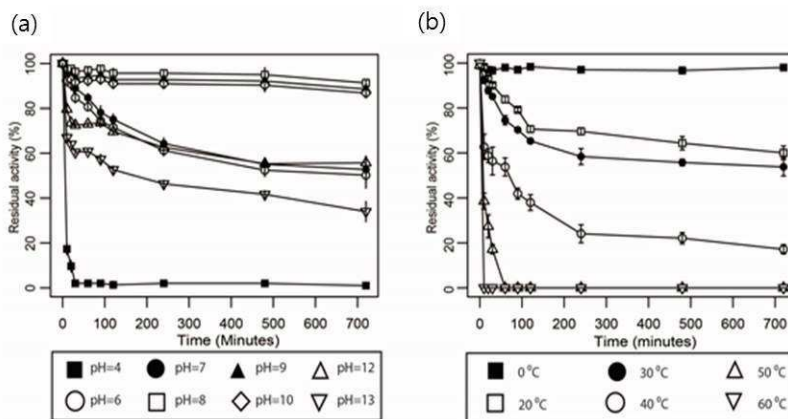
도면2



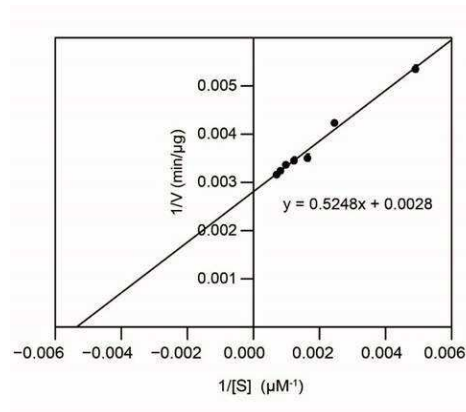
도면3



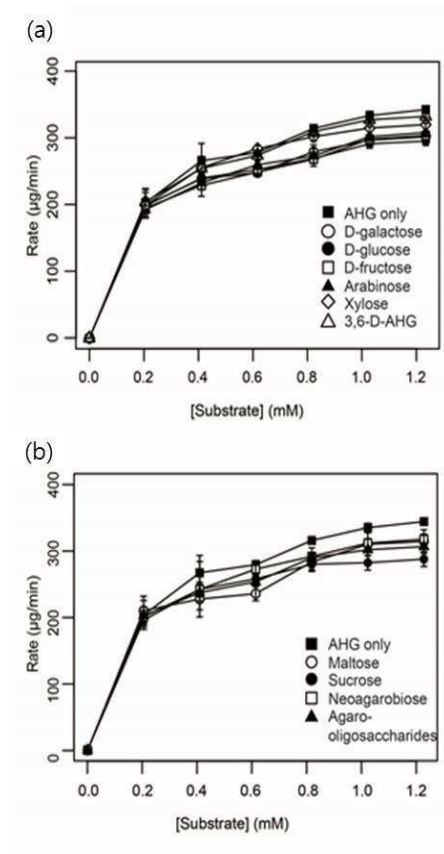
도면4



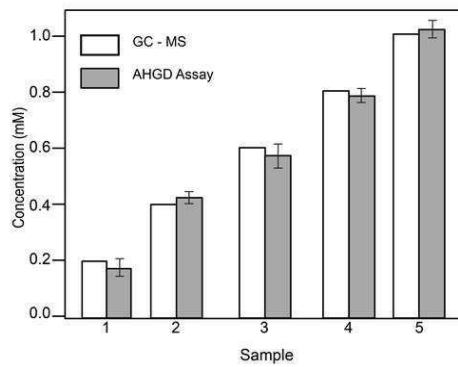
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Rapid and robust enzymatic determination of
3,6-anhydro-L-galactose in heterogeneous sugar mixture and its
application
- <130> P17U13C0196
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 480
- <212> PRT
- <213> Vibrio sp. strain EJY3
- <400> 1

Met Lys Arg Tyr Gln Met Tyr Val Asp Gly Gln Trp Ile Asp Ala Glu

1 5 10 15

Asn Gly Lys Val Asp Gln Val Ile Asn Pro Ser Thr Glu Glu Val Leu

20 25 30

Ala Glu Ile Gln Asp Gly Asp Gln Asp Asp Ala Glu Arg Val Leu Ser

35 40 45

Val Ala Lys Arg Ala Gln Ser Asp Trp Lys Arg Val Pro Ala Arg Gln

50 55 60

Arg Ala Glu Leu Leu Arg Lys Phe Ala Gln Glu Ile Arg Asn Asn Arg

65 70 75 80

Glu His Leu Ala Glu Leu Leu Val Ser Glu Gln Gly Lys Leu Tyr Arg

85					90					95						
Val	Ala	Leu	Gly	Glu	Val	Asp	Val	Ala	Ala	Ser	Phe	Ile	Glu	Tyr	Ala	
100					105					110						
Cys	Asp	Trp	Ala	Arg	Gln	Met	Asp	Gly	Asp	Ile	Val	Gln	Ser	Asp	Asn	
115					120					125						
Val	Asn	Glu	His	Ile	Trp	Ile	Gln	Lys	Ile	Pro	Arg	Gly	Val	Val	Val	
130					135					140						
Ala	Ile	Thr	Ala	Trp	Asn	Phe	Pro	Phe	Ala	Leu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	
145					150					155					160	
Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Ala	Gly	Asn	Thr	Ile	Val	Val	Lys	Pro	Thr	Ser	
165					170					175						
Glu	Thr	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly	Tyr	Ile	Ala	Glu	Lys	Val	
180					185					190						
Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Leu	Asn	Ile	Val	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	
195					200					205						
Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	His	Arg	Tyr	Thr	Asn	Met	Val	Thr	Met	
210					215					220						
Thr	Gly	Ser	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gln	Ile	Ile	Lys	Ala	Ser	Ala	Asn	
225					230					235					240	
Asn	Met	Ala	His	Val	Gln	Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro	Phe	Ile	
245					250					255						
Val	Met	Glu	Asp	Ala	Asp	Leu	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	His	
260					265					270						
Ser	Arg	Phe	Asp	Asn	Cys	Gly	Gln	Val	Cys	Thr	Cys	Asn	Glu	Arg	Met	
275					280					285						
Tyr	Val	His	Ser	Ser	Val	Tyr	Asp	Glu	Phe	Met	Ala	Ile	Phe	Met	Glu	
290					295					300						
Lys	Val	Gln	Asn	Ile	Lys	Val	Gly	Asn	Pro	Met	Asp	Pro	Glu	Ser	Asp	
305					310					315					320	
Met	Gly	Pro	Lys	Val	Asn	Lys	Arg	Glu	Leu	Asp	His	Met	Glu	Ala	Leu	
325					330					335						

Val Ala Gln Ala Leu Lys Glu Gly Ala Gln Leu Leu His Gly Gly Lys
340 345 350

Arg Leu Thr Glu Gly Glu Phe Gly Lys Gly Phe Trp Phe Glu Pro Thr
355 360 365

Ile Leu Gly Asn Val Gln Gln Ser Met Thr Ile Val His Glu Glu Ala
370 375 380

Phe Gly Pro Ile Leu Pro Val Ile Lys Phe Asp Thr Phe Glu Glu Val
385 390 395 400

Ile Asp Tyr Ala Asn Asp Ser Glu Tyr Gly Leu Ala Thr Met Ile Cys
405 410 415

Thr Arg Asn Met Lys Tyr Val His Arg Leu Thr His Glu Leu Glu Cys
420 425 430

Gly Glu Ile Tyr Val Asn Arg Gly His Gly Glu Gln His Gln Gly Phe
435 440 445

His Asn Gly Tyr Lys Leu Ser Gly Thr Gly Gly Glu Asp Gly Lys Tyr
450 455 460

Gly Phe Glu Gln Tyr Leu Glu Lys Lys Thr Phe Tyr Val Asn Phe Asp
465 470 475 480

<210> 2

<211> 481

<212> PRT

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 2

Met Lys Ile His Asn Met Lys Asn Phe Ile Asn Gly Glu Tyr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Ala Asp Gly Ala Ile Asp Val Leu Ser Pro Ser Thr Gly Lys
20 25 30

Lys Val Gly Asp Ile Pro Ala Gly Cys Val Glu Asp Ala Gln Leu Ala
35 40 45

Leu Asp Thr Ala Asn Ala Ala Gln Lys Leu Trp Ala Lys Lys Thr Asn
50 55 60

Arg Glu Arg Ala Lys Ile Leu Arg Val Phe Ala Ala Asn Ile Arg Ala

65	70							75							80
Ala	Ala	Asp	Asp	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Val	Ser	Glu	Gln	Gly	Lys	Leu
				85			90				95				
Leu	Ser	Val	Ala	Gln	Met	Glu	Val	Glu	Ala	Thr	Ala	Thr	Phe	Ile	Glu
				100			105				110				
Tyr	Ala	Cys	Asp	Asn	Ala	Leu	Thr	Ile	Glu	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Ser
				115			120				125				
Asp	Asn	Pro	Asn	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ile	His	Lys	Val	Pro	Arg	Gly	Val
				130			135				140				
Val	Val	Ala	Ile	Thr	Ala	Trp	Asn	Phe	Pro	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Arg
145				150			155				160				
Lys	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Thr	Gly	Asn	Ala	Ile	Val	Val	Lys	Pro
				165			170				175				
Thr	Gln	Glu	Thr	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Gly	Glu	Leu	Ala	Asn
				180			185				190				
Ala	Ala	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Leu	Asn	Ile	Val	Asn	Gly	Arg	Gly
				195			200				205				
Ser	Val	Val	Gly	Gln	His	Leu	Cys	Glu	Ser	Pro	Ile	Thr	Arg	Leu	Ile
				210			215				220				
Thr	Met	Thr	Gly	Ser	Thr	Pro	Ala	Gly	Gln	Arg	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser
225				230			235				240				
Ala	Asp	His	Leu	Thr	Pro	Val	Met	Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro
				245			250				255				
Phe	Ile	Val	Met	Glu	Asp	Ala	Asn	Leu	Glu	Ser	Ala	Val	Glu	Ala	Ala
				260			265				270				
Phe	Thr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asn	Cys	Gly	Gln	Val	Cys	Thr	Cys	Ala	Glu
				275			280				285				
Arg	Leu	Tyr	Val	His	Glu	Ser	Ile	Tyr	Pro	Ala	Phe	Met	Asp	Lys	Leu
290				295			300								
Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Lys	Val	Gly	Asp	Pro	Met	Ala	Ala	Asp
305				310			315				320				

Thr Asp Met Gly Pro Lys Val Asn Gln Ser Glu Ile Glu Asn Ile Asp
325 330 335

Ala Leu Val Lys Lys Gly Ile Glu Gln Gly Ala Thr Leu Leu His Gly
340 345 350

Gly Lys Arg Ala His Val Pro Gly Phe Glu Gly Gly Asn Trp Tyr Glu
355 360 365

Pro Thr Leu Leu Gly Asp Val Gln Gln Ser Asn Ile Leu Val His Glu
370 375 380

Glu Thr Phe Gly Pro Ile Leu Pro Val Val Lys Ile Asn Ser Ile Glu

385 390 395 400

Gln Ala Ile Glu Tyr Thr Asn Asp Ser Glu Tyr Gly Leu Ser Thr Tyr
405 410 415

Leu Phe Thr Gln Asn Leu Lys Tyr Ile His Gln Tyr Ile Ala Glu Val
420 425 430

Glu Ala Gly Glu Val Tyr Val Asn Arg Gly Ile Gly Glu Gln His Gln
435 440 445

Gly Phe His Asn Gly Trp Lys Leu Ser Gly Ala Gly Gly Glu Asp Gly
450 455 460

Arg Tyr Gly Leu Glu Gln Tyr Leu Glu Lys Lys Thr Val Tyr Phe Ala
465 470 475 480

Glu