

약산성 다당의 선택적 분해 과정에서 얻어진 특이당 함유 Oligo당의 구조적 분석

신광순 · 이호

경기대학교 식품생물공학과

Structural Analysis of the Unusual Sugar-Containing Oligosaccharides Formed by the Selective Cleavage of Weakly Acidic Polysaccharide

Kwang-Soon Shin and Ho Lee

Department of Foods and Biotechnology, Kyonggi University

Abstract

By sequential degradation using partial acid hydrolysis of a weakly acidic polysaccharide (GL-4IIb2'), two acidic oligosaccharide fragments, PA-2' and PA-1-III were isolated and their structures were characterized. PA-2' consisted of almost equal proportion of a rhamnose (Rha) and an unusual sugar, 3-deoxy-D-manno-2-oc-turosonic acid (Kdo). When permethylated oligosaccharide-alditol derived from PA-2' was analyzed by GC-MS, the peak gave the fragment ions at m/z 189 (bA₁, 6-deoxyhexose) and at m/z 308 (aJ₂, alditol from Kdo). The peak also gave the characteristic ion at m/z 162 but it did not give the fragment ion at m/z 177, suggesting that Kdo is substituted at C5 but not at C4. Methylation analysis also indicated that PA-2' was composed mainly of terminal Rhap and 5-substituted Kdo. When the reduced product from PA-2' was analyzed by ¹H-NMR, it gave a signal at 5.09 ppm due to an anomeric proton of α -L-Rha. These results indicated that PA-2' mainly contained α -L-Rhap-(1→5)-Kdo. On the other hand, PA-1-III mainly comprised Rha and Kdo in addition to small proportions of arabinose (Ara) and 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (Dha). MS analysis of permethylated oligosaccharide-alditols from PA-1-III suggested that the major peak 1P was Rhap-(1→5)-Kdo whereas the minor peaks 2P and 3P possessed Araf-(1→5)-Dha unit and these peaks were produced as epimers during reduction of carbonyl groups in Dha.

Key words: structure, unusual-sugar, oligosaccharide, sequential degradation

서 론

탄수화물은 이제까지 생체 구조물질이나 에너지원으로써의 역할만이 강조되어 왔으나, 최근 세포 표면의 당단백질이나 당지질에 결합해 있는 당쇄(carbohydrate chains)가 세포간의 인식과 접촉을 통하여 세포의 분화, 세포 사이의 정보 전달, virus와 bacteria로 인한 감염 및 세포의 암화, 암전이 등을 포함한 생명 현상에 깊이 관여한다는 사실^(1,2)이 밝혀지고 있어 이에 대한 관심이 집중되고 있다. 또한 과거 식이섬유로써 밖에 그 기능을 평가받지 못했던 담자균류, 생약재, 식용식물 및 해조류 유래의 다당류(polysaccharides)에서

interferon 유도 활성⁽³⁾, 항보체 활성⁽⁴⁾, 항종양 활성^(5,6) 및 식작용 증강활성⁽⁷⁾ 등의 면역 조절기능과 항응고 활성⁽⁸⁾, 혈당강하 활성⁽⁹⁾ 등의 여러 약리 작용이 발견되고 있어 주목되고 있는데 이들은 주로 신체의 항상성(homeostasis) 유지와 기능의 조절 역할을 담당하는 biological response modifier (BRM)로써 작용하고 세포들의 receptor 기능을 조절함으로써 치료 효과를 낸다고 알려져 있다. 이들 당쇄 및 다당류가 갖는 생리활성의 규명과 그 작용기구의 해석에는 당쇄구조에 대한 연구가 필수적으로 요구되고 있지만 이들 연구는 다른 생체 고분자 화합물인 단백질 및 핵산에 비해 매우 복잡하여 신속한 연구의 진행이 어려운 부분으로 평가되고 있다⁽¹⁰⁾. 당쇄의 구조 결정은 구성당의 다양성, 배열순서(sequence), 아노머형태(anomeric configuration), 당류간의 연결위치(linkage position), 환의 크

Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Foods and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

기(ring size) 뿐만 아니라, 분지쇄(branching) 구조와 특정 잔기의 수식 등에 기인하여 상당히 복잡한 양상을 갖게 된다^(11,12). 당쇄의 구조 분석은 화학적, 효소적 방법에 의해 분석이 용이한 작은 단편을 조제하고, 이들을 대상으로 결합위치를 결정하기 위한 메틸화 분석과 입체 배치를 알기 위한 핵자기공명(NMR) 분석의 조합에 의해 연구되고 있다⁽¹⁰⁾. 이 중 가장 중요한 부분은 단편을 조제하는 단계로 효소적 방법의 경우, 다양한 결합을 하고 있는 당쇄를 가수분해할 수 있는 효소의 종류의 한계⁽¹³⁾가 있으며, 화학적 방법의 경우도 periodate oxidation, Smith degradation, Barry degradation, lithium degradation, chromium trioxide oxidation 및 β -elimination 등 다양한 방법⁽¹⁴⁾들이 발표되어, 이용되고 있지만 반복 부위가 거의 존재하지 않는 hetero 다당류의 경우, 그 응용에 큰 어려움을 안고 있다. 따라서 본 연구에서는 당쇄 중의 다양한 결합들이 산에 대한 감수성에 차이를 가질 수 있다는 사실에 기초하여, 대식세포(macrophage)의 Fc 수용체의 발현촉진 활성을 갖는다고 보고된 약산성 hetero 다당, GL-4IIb2^(15,16)를 대상으로 선택적 산 가수분해 과정을 행하였으며 이때 얻어진 oligo당의 구조에 대해 검토하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 다당시료의 조제용으로 사용된 인삼잎(the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer)은 중국 길림성 원산의 6년산으로, 건조 상태로 재래시장에서 구입하였다.

시료의 일반분석

총당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법⁽¹⁷⁾으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법⁽¹⁸⁾으로, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry법⁽¹⁹⁾으로 각각 정량하였다. 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) 및 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (Dha)의 신속한 정량을 위해서는 York 등⁽²⁰⁾이 사용한 thiobarbituric acid (TBA) 비색정량법을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다. 한편 분자량 분석 및 정제도 측정에 사용한 HPLC는 Asahipak GS-320+ GS-220 (각 0.76×50 cm, Asahi Chemical Industry Co.)을 장착한 Shimadzu LC 6A를 사용하여 0.2 M NaCl를 용매로 용출하였으며 정제다당의 분자량은

standard pullulans (P-400, 200, 100, 50, 20, and 5; Showa Denko Co.)를 표준물질로 하여 얻어진 표준곡선과 비교하여 측정하였다.

구성당 분석

시료는 2 M trifluoroacetic acid (TFA)로 121°C에서 1.5시간 가수분해한 후, 그 가수분해물을 Dowex-1 (acetate form) resin에 의해 중성당과 산성당으로 분리하여 각각 alditol acetate 유도체⁽²¹⁾로 전환시킨 후, GC로 분석하였다. GC의 분석은 SP-2380 capillary column (0.2 μ m film, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco)이 장착된 Hewlett-Packard model 5890 series II를 이용하고 표준온도조건[60°C (1 min), 60°C→220°C (30°C/min), 220°C (12 min), 220°C→50°C (8°C/min), 250°C (15 min)]에서 실시하였다. 구성당의 mole %는 peak의 면적비와 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다. 한편 구성당 중 Kdo 및 Dha 함량의 GC 분석을 위해서는 York 등⁽²⁰⁾과 Stevenson 등⁽²²⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 시료를 약산 조건(1% acetic acid, 100°C, 2 시간)에서 가수분해하여 염기성 NaBD로 환원하여 Kdo를 보호하고, 0.1 M TFA로 100°C에서 1시간 재차 처리하고 NaBD로 환원하여 Dha부위를 보호하였다. 이때 2 M TFA로 121°C 1시간 가수분해하여 남아 있는 모든 결합을 절단하고 환원과 acetyl화를 거쳐 상기 조건 하에서 분석하였다.

약산성 다당 GL-4IIb2'의 추출 및 정제

건조한 인삼잎 2 kg에 10배 부피의 증류수를 가하고 3회 열수추출한 후, methanol 환류, ethanol 침전 및 투석을 거쳐 조다당 GL-2를 조제하였다(Fig. 1). GL-2는 양이온 계면활성제 Cetavlon (cetyltrimethyl ammonium bromide)으로 처리하여 이온 강도에 따른 3개획분(GL-3, -4, -5)으로 분리하였으며 이중 약산성 획분인 GL-4를 DEAE-Sepharose CL-6B (Cl⁻ form) column (4.0×25 cm)에 흡착시켰다. 본 column을 증류수로 세척하여 미흡착획분(GL-4I)을 얻었으며 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 M NaCl로 차례로 용출시켜 9개의 흡착획분(GL-4IIa, b1, b2, c, d, e, f, g 및 h)을 얻었다. 이 중 0.2 M NaCl 용출 2개 획분 중 GL-4IIb2는 색소물질의 제거를 위해 Q-Sepharose (CL- form) column (2.3×15 cm)에 loading하고 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 및 1.0 M NaCl 용액으로 용출시켰으며, 0.3 M NaCl용액에서 용출되는 주획분 GL-4IIb2'를 얻었다. GL-4IIb2'는 다시 50 mM acetate buffer (pH 5.2)로 평형화된 Bio-gel P-30 column (2.5×65 cm)을 사용하여

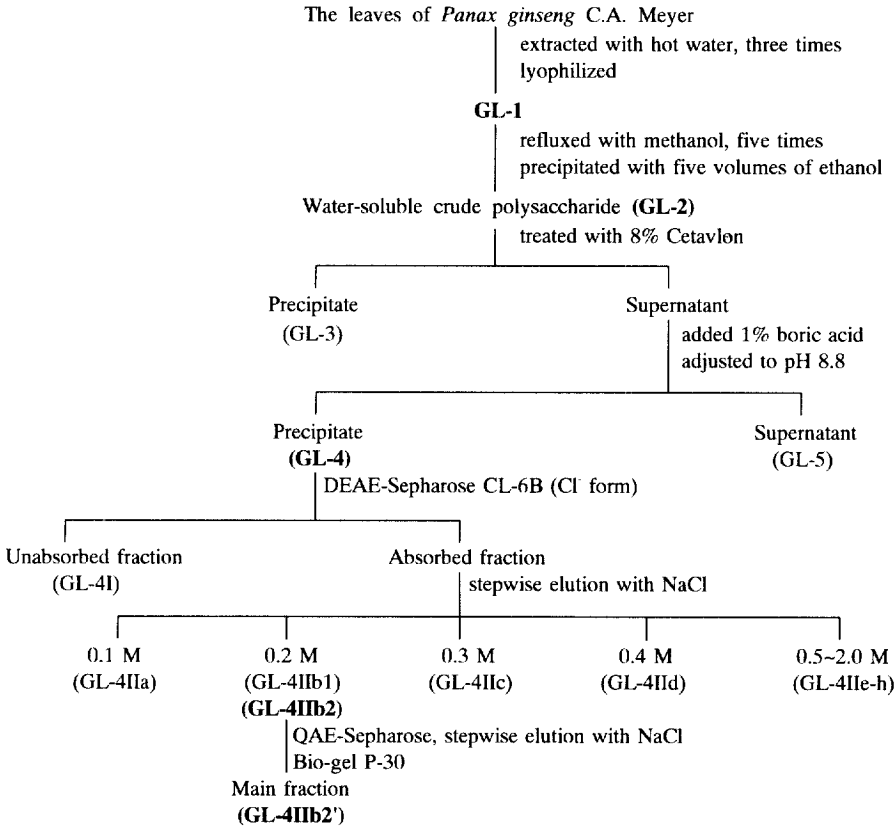


Fig. 1. Purification scheme of weakly acidic polysaccharide, GL-4IIb2' from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer.

분당 0.3 mL 유속으로 4°C에서 겔여과 크로마토그래피를 행한 결과, 대칭성이 유지되는 단일 peak를 나타내었으므로 투석 및 동결건조를 거쳐 본 실험의 정제 다당으로 사용했다(Fig. 1).

구조분석을 위한 선택적 가수분해 및 단편 oligo당의 조제

GL-4IIb2'로부터 구조분석이 용이한 분자량이 작은 oligo당을 유리시키기 위해 선택적 산 가수분해를 행하였다. 이때 사용한 산은 높은 휘발성으로 가수분해 후 산의 제거가 용이한 0.1 M TFA를 이용하였으며, 처리온도 및 시간을 조정하면서 단편 oligo당의 분리가 용이한 조건을 설정하였다. 이 과정에서 작은 oligo당의 생성이 용이한 2개의 연속 처리조건, 분해과정 1 및 분해과정 2를 결정하였다.

분해과정 1: GL-4IIb2'를 0.1 M TFA에 용해하고 60°C에서 30분간 처리하였다. 이 가수분해물은 50 mM acetate buffer (pH 5.2)로 평형화된 Bio-gel P-10 column (2.5×65 cm)을 이용, 고분자 획분(PA-1) 및 저분자 획분(PA-2)으로 분리하였으며, 이 중 단편 oligo당 획분

으로 기대되는 PA-2는 탈염과정을 거쳐 QAE-Sepharose A-25 column (formate form, 1.2×10 cm)을 이용하여 정제를 행하였다. 본 column에 흡착된 획분은 0 M 및 1.0 M ammonium formate (pH 7)용액으로 농도 구배에 의해 용출시켜 주요획분 PA-2'가 얻어졌으며, 탈염 및 동결 건조를 거쳐 구조분석을 위한 시료로 사용하였다.

분해과정 2: 분해과정 1에서 얻어진 고분자 획분 PA-1은 0.1 M TFA용액으로 40°C에서 24시간 재차 가수분해하여, 동일 조건에서 Bio-gel P-6 column (2.5×65 cm)으로 겔여과하였다. 이때 분자량이 서로 다른 3개 획분 PA-1-I, PA-1-II 및 PA-1-III를 얻을 수 있었으며 저분자 획분 PA-1-III를 탈염 및 동결건조 하여 구조분석에 이용하였다.

Methyl화 분석에 의한 결합위치 결정

다당시료 및 oligo당의 결합위치 결정을 위한 methyl화는 Hakomori 방법⁽²³⁾에 따라 실시하였다. 각 다당은 methyl화 이전에 0.2 M NaOH로 실온에서 2시간 처리하여 탈 ester화 하고, 반응중 β-elimination이 일

어나지 않도록 methyl화는 한차례만을 수행하였다. 그러나 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환되도록, 필요한 경우 methylsulfanyl carbanion을 수차례 첨가하였고 잔존량은 triphenylmethane으로 확인하였다. Methyl화 다당은 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용, 회수하였다. 이때 다당 시료 중의 산성당 부분의 결합위치를 확인하기 위해서는 tetrahydrofuran (THF)에 용해된 1 M lithium tetraborodeutride (Super deutride, Aldrich)를 이용, carboxyl기를 d₃로 표지 하여 질량분석을 용이하게 하였다. 한편 Kdo 및 Dha를 함유한 당쇄는 York등의 방법⁽²⁰⁾에 의해 NaBD₂에 의해 환원 후, methyl화 시켰다. Methyl한 다당 및 oligo당은 1 M TFA로 100°C에서 2시간 가수분해 후, 환원 및 acetyl화 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하여 GC 및 GC-MS로 분석하였다. GC 분석은 SP-2380 (0.2 µm film, 0.25 mm i.d. × 30 m, Supelco) capillary column이 장착된 Hewlett-Packard 5890A GC를 사용하여 최저온도 조건[60°C (1 min), 60°C → 180°C (30°C/min), 180°C → 250°C (1.5°C/min), 250°C (5 min)]에서 splitless injection mode로 분석하였으며, 한편 GC-MS는 동일 column을 장착한 Hewlett-Packard 5890A GC system과 5970 mass selective detector를 이용하여 최저온도 조건[60°C (1 min), 60°C → 150°C (30°C/min), 150°C → 250°C (1.5°C/min)]에서 분석하였다(He 압력: 0.5 mL/min). 각 peak는 MS에 의한 fragment ion 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며, 각 화합물의 mole %는 peak 면적과 응답계수로 부터 산출하였다⁽²⁴⁾.

Methyl화 oligosaccharide-alditol의 GC-MS 분석

상기 방법으로 조제된 methyl화 oligosaccharide-alditol은 분해 및 acetyl화 과정을 거치지 않은 채 별도로 분석을 행하였다. 시료를 SP-2380 capillary column (0.2 µm film, 0.25 mm i.d. × 15 µm, Supelco)을 장착한 동일 GC-MS 장치에 on-column 상태로 주입하고 최적 온도조건[100°C (1 min), 100°C → 150°C (30°C/min), 150°C → 270°C (2°C/min)]에서 분리시켰다. Methyl화 oligosaccharide-alditol의 구조분석은 Kochetkov등의 방법에 의해 MS fragment ion [A, J 및 alditol(ald)]⁽²⁵⁾을 분석하여 결정하였다.

Nuclear magnetic resonance(NMR) 분석

¹H-NMR (300 MHz) 분석은 시료 10 mg을 0.5 mL의 중수(D₂O)에 용해하여 Varian XL-300 spectrometer를 이용하여 내부온도 50°C에서 실시하였다.

결과 및 고찰

정제다당의 화학적 특성

인삼잎(the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer)의 열수추출물로 부터 정제한 GL-4IIb2'는 Bio-gel P-30에 의한 겔여과 시, 좌우 대칭이 유지되는 단일 peak를 나타냈으며 중성당과 산성당 peak가 일치하는 특성을 보여 주었다(Fig. 2). 또한 Asahipak GS-320+GS-220 column을 이용한 HPLC에서도 단일 peak를 보여 주었으며 표준 pullulan들과 비교 측정한 결과, 분자량 12,000으로 나타났다(Fig. 2). GL-4IIb2'은 중성당 64.1%, 산성당 33.7% 및 미량의 단백질(2.2%)로 구성되어 있었으며 acetyl기를 0.82% 함유하는 약산성 다당이었다. 구성당은 fucose 4.0%, arabinose 9.1%, xylose 0.5%, rhamnose 17.1%, mannose 1.4%, galactose 10.5%, glucose 1.6%, glucuronic acid 7.8% 및 galacturonic acid 25.2%으로 rhamnose와 galacturonic acid가 특히 높은 비율로 함유되어 있는 rhamnagalacturonan⁽²⁶⁾의 일종으로 추정되었다. 또한 GL-4IIb2'에는 일반적인 식물 유래의 다당에서는 좀처럼 관찰되지 않는 특이당류인 2-methylfucose, 2-methylxylose, apiose, aceric acid와 팔당당과 칠탄당의 일종인 Kdo 및 Dha를 각각 5.3%, 3.9%, 4.4%, 1.7%, 6.9% 및 0.5%의 비율로 함유되어 있었으며 따라서 총 15종의 구성당으로 이루어진 상당히 복잡한 다당임을 추정할 수 있었다. 이러한 특이당을 함유한 다당류는 상당히 드문 예로써 Albersheim

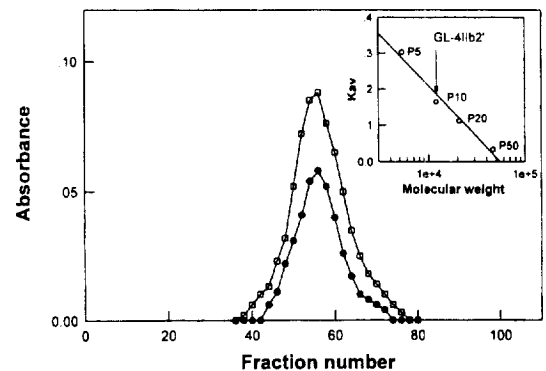


Fig. 2. Homogeneity of GL-4IIb2' on Bio-gel P-30 and the molecular weight determination by HPLC. The column (2.5×65 cm) of Bio-gel P-30 was eluted with 50 mM acetate buffer (pH 5.2). HPLC was performed on a Shimadzu LC 6A instrument equipped with columns (0.76 × 50 cm, each) of Asahi-pak GS-320+GS-220 developed with 0.2 M sodium chloride. A molecular mass calibration curve was made from the elution volumes of standard pullulans (P-400, 200, 100, 50, 20, and 5). ●—●: Total sugar (490 nm), □—□: Uronic acid (520 nm).

등이 무화과(*Acer pseudoplatanus*)⁽²⁷⁾ 및 벼(*Oryza sativa*)⁽²⁸⁾ 등의 액체 세포배양액에서 추출한 rhamnogalacturonan II와 유사한 구조를 갖고 있음을 시사하였으나, 이들은 분자량 약 6,000이며, 곰팡이 유래의 endopolygalacturonase 처리에 의해 얻어진 반면, 본 실험에서 사용한 GL-4IIb2'의 경우는 분자량이 약 2배이며 열수추출에 의해 직접 분리되는 등, 많은 차이점을 소유하고 있었다. 이처럼 비교적 작은 분자량을 가진 다당이 15종의 서로 다른 구성당을 함유한다는 사실은 당쇄결합에 있어 거의 반복단위(repeating unit)를 가지지 않는다는 사실을 반증하므로, 그 구조분석에 있어서도 이제까지 알려진 여러 분해방법^(10,13,14)으로는 그 진행이 불가능할 것으로 판단되었다. 따라서 이후의 실험에서는 선택적 산 가수분해 과정에 의해 얻어진 oligo당의 구조분석에 의해 전체 구조의 해석을 도모하였다.

분해과정 1에서 얻어진 oligo당의 구조분석

당쇄 중의 다양한 결합들이 산에 대한 감수성에 차이를 갖을 수 있다는 사실에 기초하여 예비실험을 거쳐 단편 oligo당의 분리가 용이한 조건을 설정하였다. GL-4IIb2'는 0.1 M TFA용액에서 60°C, 30분간 처리하고 Bio-gel P-10 column에 의해 고분자 획분(PA-1)과 oligo당 획분(PA-2)으로 분리하였다[Fig. 3(A)]. PA-2 획분은 저분자 획분으로 전체 TBA 양성물질의 약 35%가 이 획분중에 함께 용출 되었으며, 따라서 Kdo 및 Dha와 같은 ketose 물질을 함유하고 있음을 추측할 수 있었다. PA-2 획분은 QAE-Sephadex A-25를 이용한 이온교환 chromatography를 거쳐, Fig. 3(B)에서 보는 바와 같이 단일 peak를 나타내는 PA-2'로 정제하였다. 일반적으로 Kdo는 산 용액 중에서 상당히 불안정한 것으로 보고⁽²⁰⁾되고 있는 바, 이후의 실험 조건에서 PA-2'가 안정성을 유지 할 수 있도록 NaBD₂로 환원하였다. PA-2'는 구성당 분석 결과, Rha와 Kdo가 각각 46.0% 및 38.2%의 높은 비율로 검출되었으며, 그 외 미량의 타 구성당을 함유하고 있었다(Table 1). Kdo는 Gram 음성 세균의 lipopolysaccharide에서만 발견되는 것으로 알려져 왔으나⁽²⁹⁾, 최근 고등식물의 1차 세포벽에서도 그 존재가 보고⁽²⁰⁾되고 있다. 고등식물 유래 다당 중의 Kdo의 존재는 그 동안, 분리 및 분석방법이 타 당류에 비하여 어렵다는 점과 Kdo가 산에 대해 극히 불안정하다는 점 때문에 실제적 진행이 어려웠던 부분으로, 본 실험에서는 이러한 산에 대한 불안정성이 오히려 선택적 산 가수분해 과정을 통한 Kdo함유 oligo당의 분리를 용이하게 한 것으로 사료된다. 한편

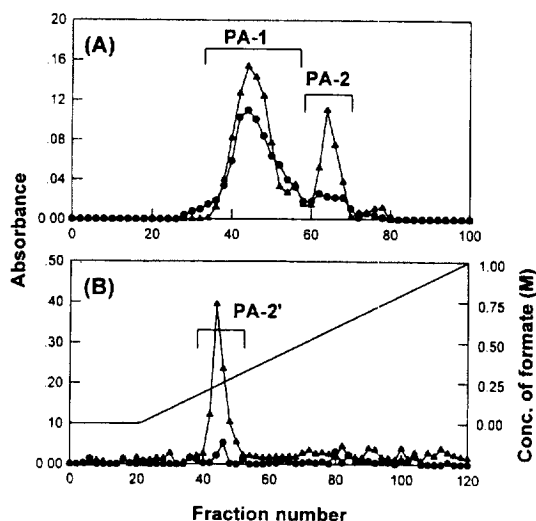


Fig. 3. Bio-gel P-10 (A) and QAE-Sephadex A-25 chromatography (B) of the products derived from GL-4IIb2' by mild acid hydrolysis. Samples were applied to a column (2.5×65 cm) of Bio-gel P-10 and eluted with 50 mM acetate buffer (pH 5.2). PA-2 fraction was rechromatographed on the column (1.2×10 cm) of QAE-Sephadex A-25 and eluted with linear concentration gradient of 0.0→1.0 M ammonium formate, pH 7.0. ●—●: Total sugar (490 nm), ▲—▲: TBA-positive material (548 nm).

Table 1. Component sugars of PA-2' and PA-1-III obtained by sequential degradation of GL-4IIb2'

Component sugar	Mole % ⁽¹⁾	
	PA-2'	PA-1-III ⁽²⁾
2-Methyl-fucose	- ⁽³⁾	4.8
Rhamnose	46.0	37.6
Arabinose	3.2	4.8
Apiose	-	1.2
Dha	-	1.4
Kdo	38.2	30.8
Galactose+Galacturonic acid	5.7	12.4
Glucose+Glucuronic acid	7.0	4.9

⁽¹⁾Component sugars of PA-2' and PA-1-III were analyzed by alditol acetate method.

⁽²⁾Data of the minor component sugars, which were detected less than 1.0%, were not shown.

⁽³⁾Not detected.

PA-2'의 일부분은 permethylated oligosaccharide-alditol로 전환시키기 위해 NaBD₂로 환원 후, methyl화하고 분해과정 없이 GC-MS로 분석하였다. Fig. 4(A)에서 보는바와 같이 약 95%이상의 물질이 retention time 25.02분 경에 단일 peak로 용출 되었으며, 이는 표준 permethylated oligosaccharide-alditol의 결과와 비교하였을 때, PA-2'가 이당류임을 시사하는 내용이었

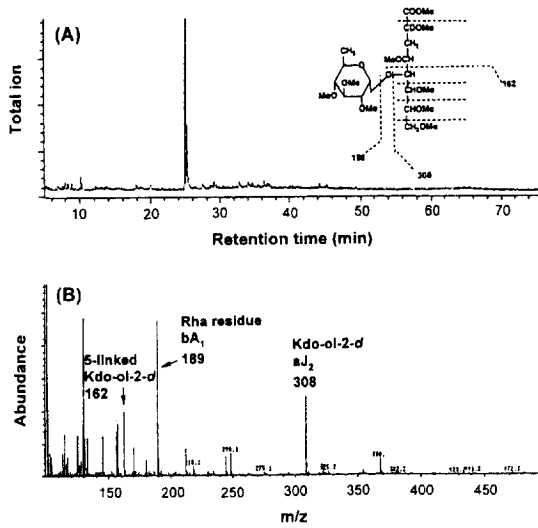


Fig. 4. Total ion chromatogram (A) and fragment ions (B) on GC-MS of permethylated oligosaccharide-alditol derived from PA-2'.

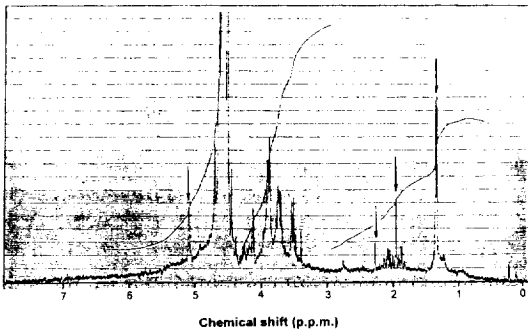


Fig. 5. ¹H-NMR spectra of the reduced product from PA-2'. ¹H-NMR spectra of reduced product from PA-2' were recorded for solutions in D₂O with Varian XL-300 spectrometer, at 300 MHz and 50°C. Arrowed peaks include anomeric and reporter groups.

다. 이 peak의 MS spectrum은 Fig. 4(B)에서 나타난 바와 같이, permethylated 6-deoxyhexose를 의미하는 m/z 189 (bA₁) ion과 permethylated Kdo를 지적하는 m/z 308 (aJ₂)의 대표적인 ion이 관찰되었으며, PA-2'의 aJ₂ fragment가 m/z 368 위치에서 관찰되었다. 또한 m/z 162 peak의 존재와 m/z 177 peak의 부재로부터, Kdo는 C4 위치가 아닌 C5 위치에서 다른 당 잔기로 치환되어 있음을 추론할 수 있었으며 이 spectra는 Schmidt 등⁽²⁹⁾이 병원성 *E. coli*의 LPS에서 분리한 oligo당의 구조와 일치하였다. 또한 PA-2'는 결합위치를 확인하기 위하여 methyl화 분석을 행한 결과, 비환원 말단 rhamnopyranoside (Rhap) 잔기와 C5 위치가 치환

Table 2. Glycosyl linkage composition of PA-2' obtained by partial acid hydrolysis of GL-4IIB2'

Glycosyl residue	Position of methyl group	Deduced glycosidic linkage	PA-2' ¹⁾ (Mole %) ²⁾
2-Methyl-xylose	3.4	2-Me-Xylf-(1→	4.2
Rhamnose	2.3.4	Rhap-(1→	43.2
	2.4	→3)-Rhap-(1→	5.1
	3.4	→2)-Rhap-(1→	0.8
Galactose	2.3.4.6	Galp-(1→	3.3
	3.6.	→2,3)-Galp-(1→	2.6
Kdo	2.4.6.7.8	→5)-Kdo	40.8

¹⁾Prerduced with NaBD4 before methylation.

²⁾Calculated from the peak areas and molecular response factors of the each partially methylated alditol acetate in GC and GC-MS.

된 환원 말단 Kdo 잔기가 각각 43.2% 및 40.8 % (약 1:1)의 높은 비율로 검출되었다(Table 2). 이러한 사실로부터 PA-2'는 Rhap-(1→5)-Kdo의 이당류임을 알 수 있었다. 한편 환원시킨 PA-2'를 대상으로 ¹H-NMR을 행한 결과(Fig. 5), δ 5.09 ppm에서 α-L-Rha의 anomeric proton에 기인한 단일 signal⁽²⁹⁾이 관찰되었다. 또한 δ 1.34 ppm 부근에서 Rha의 methyl proton에 기인한 signal이 관찰되었으며 δ 1.96 ppm 및 2.28 ppm에서는 Kdo의 axial (H-3a) 및 equatorial proton (H-3e)에 의한 signal이 각각 관찰되었다. 이상의 결과로부터 PA-2'는 주로 α-L-Rhap-(1→5)-Kdo로 구성되었다는 사실을 알 수 있었다.

분해과정 2에서 얻어진 oligo당들의 구조분석

분해과정 1의 고분자 획분 PA-1로부터 산에 대한 감수성이 상이한 oligo당을 재차 분리하기 위해, 분해과정 2 (0.1 M TFA, 40°C, 24시간)를 행하고 Bio-gel P-6 column에 의해 분자량이 서로 다른 3개 획분(PA-1-I, PA-1-II 및 PA-1-III)으로 분리하였다(Fig. 6). 이 단계에서 다량의 TBA 양성물질을 함유한 저분자획분 PA-1-III를 구조분석에 이용하였다. PA-1-III는 Rha (37.6%), Ara (4.8%), Kdo (30.8%) 및 Dha (1.4%)를 비롯한 8종의 구성당을 함유하고 있었다(Table 1). 또한 PA-1-III는 Kdo 및 Dha등의 ketose를 산분해 가능성으로부터 보호하기 위해 NaBD₄로 환원하고 methyl화 과정을 수행하였는데, 이때 생성된 PA-1-III 중의 permethylated oligosaccharide-alditol을 GC에 의해 분리하여 Fig. 7(A)에서 보여 주는 바와 같이 3개의 disaccharide-alditol peak (1P, 2P 및 3P)를 얻을 수 있었다. PA-1-III의 주된 peak 1P는 분석 결과, PA-2'획분의 MS spectrum과 완전 일치하였으며, 따라서 Rhap-(1→

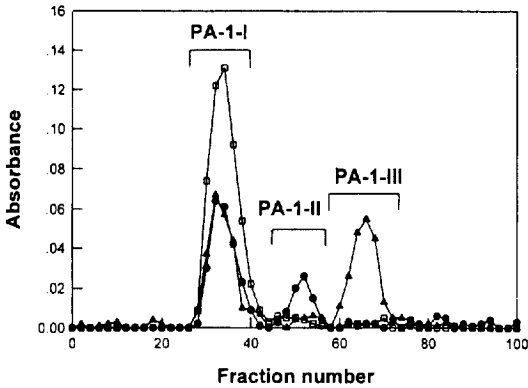


Fig. 6. Bio-gel P-6 chromatography of the products derived from PA-1 by partial acid hydrolysis. Samples were applied to a column (2.5×65 cm) of Bio-gel P-6 and eluted with 50 mM acetate buffer (pH 5.2). ●—●: Total sugar (490 nm), □—□: Uronic acid (520 nm), ▲—▲: TBA-positive material (548 nm).

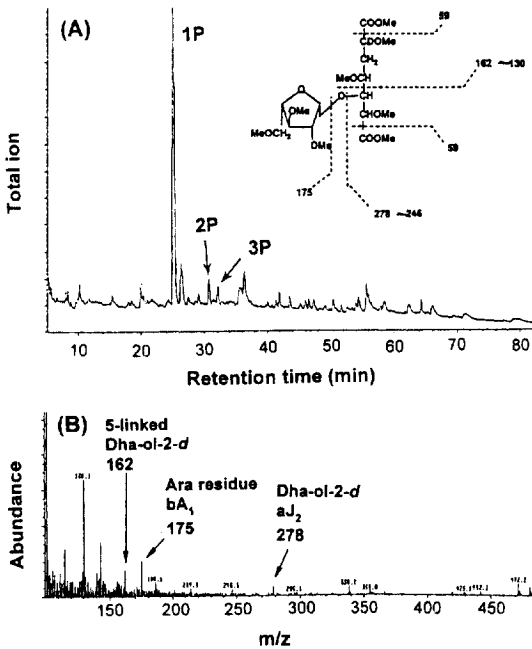


Fig. 7. Total ion chromatogram (A) on GC-MS of permethylated oligosaccharide-alditols derived from PA-1-III and fragment ions (B) of the peaks, 2P and 3P.

5)-Kdo로 동정하였다. 한편 2P의 MS spectrum은 비 환원말단의 permethylated Ara 단편에 기인하는 m/z 175 ion과 환원말단 permethylated Dha 잔기에 기인하는 m/z 278 ion이 검출되었으며 m/z 162 이온의 존재로부터 Dha는 C5 위치에서 다른 당 잔기로 치환되어

있음(30)을 확인할 수 있었다[Fig. 7(B)]. 한편 3P의 MS 분석 결과는 2P의 결과와 완전히 일치하였는데, 이는 oligo당의 환원말단에 존재하는 Dha의 carbonyl 기 환원과정 중 유도된 2개의 이성체(epimer)로 판단되었다. 이상의 결과로부터 2P 및 3P는 Araf-(1→5)-Dha의 구조를 갖는 것으로 확인되었다.

요 약

약산성 다당 GL-4IIIb2'에 대해 연속적 부분 산가수 분해 과정을 거쳐, 2종의 oligo당획분 PA-2' 및 PA-1-III를 분리하고 그들의 구조분석을 행하였다. PA-2'는 주요 구성당으로 Rha와 특이당 Kdo를 동일한 비율로 함유하고 있었으며, permethylated oligosaccharide-alditol로 전환시켜, GC-MS로 분석한 결과, m/z 189 (bA₁) 및 m/z 308 (aJ₂)에서 6-deoxyhexose와 Kdo에 기인하는 fragment ion이 관찰되었다. 이 peak는 m/z 162에서 특징적인 ion을 나타낸 반면 m/z 177 ion이 관찰되지 않음으로써 Kdo의 C4 위치가 아닌 C5 위치가 치환되어 있음을 알 수 있었다. 또한 methyl화 분석 결과, PA-2'는 환원말단 Rhap와 5-substituted Kdo가 높은 비율로 검출되었으며 환원 형태의 PA-2'를 대상으로 ¹H-NMR 분석을 하였을 때 δ 5.09 ppm에서 α-L-Rhap의 anomeric proton에 기인한 단일 signal이 관찰되었다. 이상의 결과로부터 PA-2'는 주로 α-L-Rhap-(1→5)-Kdo로 구성되었다는 사실을 알 수 있었다. 한편, PA-1-III는 소량의 Ara 및 Dha와, 다량의 Rha 및 Kdo가 주요 구성당으로 나타났으며, PA-1-III획분의 permethylated oligosaccharide-alditol 유도체는 GC상에서 3개의 peak (1P, 2P 및 3P)로 분리되었다. 이들의 MS 분석 결과, 높은 비율로 검출된 1P는 Rhap-(1→5)-Kdo의 구조로 나타났으며 반면 낮은 비율의 2P 및 3P는 Araf-(1→5)-Dha의 동일구조를 갖는 것으로 확인되었는데 이는 Dha의 carbonyl 환원과정 중 생성된 epimer로 판단되었다.

문 헌

1. Ruoslahti, E.: Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13369 (1989)
2. Paulson, J.C.: Glycoprotein: What are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 272 (1989)
3. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.-C., Kojima, Y., Kumazawa, Y. and Otsuka, Y.: Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Part I. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Medica*, **50**, 163 (1984)
4. 신광순, 라경수, 성하진, 양한철: 식물성 식품재료로 부

- 터 보체계 활성화 다당의 검색 및 그 활성검토. 한국식품과학회지, **25**, 197 (1993)
5. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.: Fractionation and purification of the polysaccharides with marked anti-tumor activity from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.*, **30**, 2776 (1970)
 6. Iino, K., Ohno, N., Suzuki, I., Miyazaki, T. and Yamada, T.: Structural characterization of a neutral anti-tumor β -D-glucan extracted with hot sodium hydroxide from cultured fruit bodies of *Grifora frondosa*. *Carbohydr. Res.*, **141**, 111 (1985)
 7. Ohtani, K., Mizutani, K., Hatono, C., Kasai, R., Sumino, R., Shiota, T., Ushijima, M., Zhou, J., Fuwa, T. and Tanaka, O.: Sanchinan A, a reticuloendothelial system activating arabinogalactan from sanchi-ginseng (roots of *Panax notoginseng*). *Planta Medica*, **53**, 166 (1987)
 8. 이현순, 권미향, 임왕진, 성하진, 양한철 : 구름버섯 알카리 추출물에서 분리한 항응고성 다당류. 한국식품과학회지, **29**, 369 (1997)
 9. Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y. and Hayashi, T.: Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderan A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica*, **51**, 339 (1985)
 10. Aspinall, G.O.: Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In *The Polysaccharides*, Aspinall, G.O. (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 1, p.35 (1982)
 11. Pazur, J.H.: Neutral polysaccharide: a practical approach. In *Carbohydrate Analysis*, IRL Press, Washington, p.55 (1987)
 12. Lee, C.K. and Gray, G.R.: A general strategy for the chemical sequencing of polysaccharides. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1292 (1988)
 13. McCleary, B.V. and Matheson, M.K.: Enzymatic analysis of polysaccharide structure. *Carbohydr. Chem. Biochem.*, **44**, 147 (1986)
 14. Aspinall, G.O.: Chemical modification and selective fragmentation of polysaccharide. *Acc. Chem. Res.*, **20**, 114 (1987)
 15. Sun, X.B., Matsumoto, T. and Yamada, H.: Purification of immune complex clearance enhancing polysaccharide from the leaves of *Panax ginseng*, and its biological activities. *Phytomedicine*, **1**, 225 (1994)
 16. Shin, K.S., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada, H.: Structural characterization of a novel rhamnogalacturonan II with macrophage Fc receptor expression enhancing activity from the leaves of *Panax ginseng*. C.A. Meyer. In *Pectins and Pectinases*, Visser, J. and Voragen, A.G.J. (Ed.), Elsevier Science, Amsterdam, p.623 (1996)
 17. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
 18. Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G.: New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54**, 484 (1973)
 19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 20. York, W.S., Darvill, A.G., McNeill, M. and Albersheim, P.: 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr. Res.*, **138**, 109 (1985)
 21. Jones, T.M. and Albersheim, P.: A gas chromatographic methods for the determination of aldose and aldonic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol.*, **49**, 926 (1972)
 22. Stevenson, T.T., Darvill, A.G. and Albersheim, P.: 3-Deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell wall rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.*, **179**, 269 (1988)
 23. Hakomori, S.: A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulphonyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205 (1964)
 24. Sweet, D.P., Shapiro, R.H. and Albersheim, P.: Quantitative analysis by various g.l.c. response factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.*, **40**, 217 (1975)
 25. Kochetkov, N.K. and Chizhov, O.S.: Mass spectrometry of carbohydrate derivatives. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **21**, 39 (1966)
 26. Albersheim, P., An, J., Freshour, G., Fuller, M.S., Guillen, R., Ham, K.S., Hahn, M.G., Huang, J., O'Neill, M., Whitcombe, A., Williams, M.V., York, W.S. and Darvill, A.G.: Structure and function studies of plant cell wall polysaccharide. *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 374 (1994)
 27. Darvill, A., McNeill, M. and Albersheim, P.: Structure of plant cell walls. VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.*, **62**, 418 (1978)
 28. Thomas, J.R., Darvill, A.G. and Albersheim, P.: Isolation and structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II from the walls of suspension-cultured rice cells. *Carbohydr. Res.*, **185**, 261 (1989)
 29. Schmidt, M.A. and Jann, K.: Structure of the 2-keto-3-deoxy-D-manno-octonic-acid-containing capsular polysaccharide (K12 antigen) of the urinary tract infective *Escherichia coli* O4:K12:H. *Eur. J. Biochem.*, **131**, 509 (1983)
 30. Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T., Choma, A. and Mayer, H.: Identification of 3-deoxy-lyxo-2-heptulosaric acid in the core region of lipopolysaccharides from Rhizobiaceae. *FEMS Microbiol. Lett.*, **84**, 337 (1991)