

고성능 액체 크로마토그래프를 이용한 내열성 효소반응 산물인 α -D-glucose-1-phosphate의 저농도 분석

신 현 재 · 신 영 숙 · 이 대 실
생명공학연구소 분자당생물학 연구실
(접수 : 1999. 4. 12., 게재승인 : 1999. 6. 3.)

Analysis of Low-level α -D-glucose-1-phosphate in Thermophilic Enzyme Reaction Mixture Using High pH Anion-exchange Chromatograph

Hyun-Jae Shin, Youngsook Shin¹, and Dae-Sil Lee[†]

Molecular Glycobiology Research Unit, KRIBB, P.O. Box 115 Yusong, Taejeon 305-600, Korea
¹Present Address: Department of Chemistry, University of California, Berkeley CA 94720-1460, USA.
(Received : 1999. 4. 12., Accepted : 1999. 6. 3.)

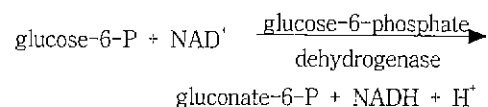
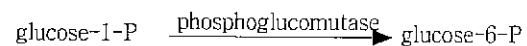
We have used high pH anion-exchange chromatography to analyze low level (below 20 μ M) α -D-glucose-1-phosphate (G-1-P) that can be used as a cytostatic compound, an antibiotic, and immunosuppressive drug. Our chromatographic method afforded excellent peak resolution and selectivity for glucose-6-phosphate and various maltooligosaccharides as well as G-1-P. The pulsed amperometric detector yielded linear response on G-1-P ranging from 2 - 20 μ M, giving slope of 4.8×10^4 (peak area/ μ M). The detection limit was 2 μ M. This method was applied to the purification of thermophilic α -glucan phosphorylase from *Thermus caldophilus*. The technique will be extremely useful in future studies concerning carbohydrate metabolism in living organisms.

Key Words :

서 론

α -D-Glucose-1-phosphate(G-1-P)는 glucose-6-phosphate(G-6-P)와 더불어 대부분의 생물체에 존재하는 생체대사 관련 물질로서 다수의 상업적 응용 가능성을 지니고 있다(1,2). 화학 원료로서의 G-1-P는 calcium complexant로서 사용되는 glucuronic acid 제조의 원료 및 선형 말토올리고당이나 트레할로스 합성의 기질로도 사용된다(3). 의약분야의 응용으로서는 심장 치료에 필수적인 cytostatic compound, 항생제, 면역억제제, 순환기계통의 치료제로서 널리 쓰인다(4). 효소를 이용하여 G-1-P를 생산하는 방법은 크게 sucrose phosphorylase를 이용하는 방법과(5) α -1,4-D-glucan phosphorylase를 이용하는 방법으로(6) 구분할 수 있다. 효소를 이용한 G-1-P의 효율적 생산에 있어서 대상 효소의 분리, 정제는 매우 중요하며 효소 분리, 정제의 효율을 증대시키기 위해서 적절한 활성측정법의 확립은 필수적이다. 특히 효소의 초기 활성이 낮은 경우, 높은 감도와 신뢰도를 나타내는 활성측정법의 선택은 전체 분리공정의 성패를 좌우한다고 할 수 있다.

기존의 G-1-P 분석에는 세가지 효소의 연속사용에 의한 자외선측정법(UV spectrophotometry)이 사용되어왔다(7). 그 분석원리는 아래 식에 나타난 바와 같이 효소반응으로 생성되는 NADH의 양을 자외선 파장 340 nm에서 측정하는 것이다.



이 방법은 (i) 측정감도가 낮아 컬럼을 이용한 효소의 분리, 정제시에 반응물이 희석되는 경우(생성되는 G-1-P의 농도가 낮아), 직접적인 사용이 어려우며 (ii) 온도나 습도와 같은 외부 요인에 쉽게 영향을 받으며 (iii) 분석에 사용되는 효소들이 고가이므로 분석단가가 높다는 등의 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하고 재현성있는 분석을 위해 고성능 액체 크로마토그래프가 대안이 될 수 있다. 주로 비휘발성 물질의 분리에 사용되는 고성능 액체 크로마토그래프의 하나인 이온교환 크로마토그래프중에서 특히 음이온교환 크로마토그래프(high pH anion-exchange chromatograph, HPAEC)는 탄수화물, 특히 당류 및 당알콜류의 분석 및 분리에 널리 사용되고 있다(8-14). HPAEC와 짝을 이루는 대표적 음이온 교환수지 컬럼인 CarboPac은 높은 소수

[†] Corresponding Author : Molecular Glycobiology Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea
Tel : 042-860-4110, Fax : 042-860-4597
e-mail : daesilee@kribb4680.kribb.re.kr, http://molca.kribb.re.kr

성의 알킬 4급 아민의 음이온교환그룹으로 이루어져 탄수화물 분석에 적당하다. 한편 단위전동전류 검출기(pulsed amperometric detector, PAD)는 전기화학적 검출기의 일종으로 백금 전극상에서의 산화, 환원력의 차이를 측정원리로 이용하는데, 높은 감도와 안정성으로 탄수화물, 알콜, 방향족화합물의 분석에 유리하다. 특히 기존의 당분석용 굴절도 검출기(reflective index detector, RID)와 비교하여 1,000배 이상의 월등한 감도를 나타낸다는 사실이 알려져 있다(8).

본 연구에서는 CarboPac 컬럼과 PAD 검출기를 장착한 고성능 액체 크로마토그래프(HPAEC-PAD)를 이용하여 내열성 효소반응액 중의 저농도 G-1-P의 분석을 시도하였다. 보정곡선을 작성하여 기존의 자외선측정법과 선형성 및 재현성을 비교하였고 실례로서 내열성 미생물인 *Thermus caldophilus* 유래 α -1,4-D-glucan phosphorylase에 의한 G-1-P 생산 및 정제에 응용하였다.

재료 및 방법

시약 및 균주

각종 maltooligosaccharide들, 초산나트륨 및 표준 glucose-1-phosphate는 미국의 Sigma사에서 구입하였으며 50% 수산화나트륨용액은 미국의 Fisher사로부터 구입하였다. 다른 시약과 재료는 모두 특급을 사용하였다. 자외선측정법에서 사용된 phosphoglucomutase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase는 독일의 Boehringer Mannheim사로부터 구입하였다. 효소액의 제조를 위해 사용된 균주 *Thermus caldophilus* GK24는 일본 동경대학 농학부의 T. Ohta 교수로부터 제공받았다.

균의 배양 및 효소액의 제조

균주 *T. caldophilus* GK24는 0.8% polypeptone, 0.4% yeast extract와 basal salt에서 pH를 7.2로 고정시키고 75 °C에서 진탕 배양하였다(15). 플라스크에서 배양된 1 리터의 발효조내에서 집중하여 12시간 동안 생육시켰다. 이때 앞선 집중용 균체의 배양은 동일한 조성의 배지에서 배양하였다. 최종 발효조건에서 키운 30 g의 균체를 4°C, 17,000 × g 에서 30분간 원심분리한 후 침전된 균체 덩어리를 75 ml의 50 mM 인산염 완충액(산도 7.0)에 분산한 후 4°C 저온하에서 초음파쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 균체 잔류물질은 17,000 × g에서 한시간 원심분리하여 제거하였다. 상등액에 황산 암모늄을 포화용해도의 30% 를 첨가하여 침전된 단백질을 상기조건으로 원심분리하였다. 침전물은 동일한 완충액에 녹인 후 투석을 거쳐 반응에 사용하기 위한 효소액을 제조하였다. 효소액에 포함된 총단백질농도는 Bradford 방법을 이용하여 분석하였으며(16) 내부 기준물질로는 알부민(*bovine serum albumin*)을 사용하였다.

자외선측정법

여러 농도의 glucose-1-phosphate 표준용액(1, 2, 4, 8, 10, 15, 20 μ M)을 제조한 후 각 용액 600 μ l를 200 mM Tris 완충액(pH 7.5), 10 mM 염화마그네슘, 30 pmol glucose-1,6-bisphosphate, 1.8 nmol NAD⁺, phosphoglucomutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase를 포함한 시약용액과 혼

합하고 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 파장 340 nm에서 생성된 NADH의 흡광도를 측정하였다. 측정된 NADH의 농도 표준곡선으로부터 glucose-1-phosphate의 농도를 결정하였다. NADH 농도표준곡선은 여러농도의 NADH 표준용액(0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1 mM)을 제조한 후 340 nm에서의 흡광도를 측정하여 작성하였다.

HPAEC-PAD 분석

보정곡선 작성하기 위해 다양한 농도의 glucose-1-phosphate 표준용액을 제조한 후 각 표준용액을 GP40 펌프와 PAD가 장착된 Dionex사의 AI-450 시스템을 이용하여 분석하였으며, 시료는 25 μ l의 시료주입루프를 통해 주입하였다. 사용된 컬럼은 CarboPac PA-1(4×250 mm)이었으며 100 mM 수산화나트륨에 초산나트륨 농도구배(0-2분, 100 mM; 2-14분, 100 mM에서 200 mM; 14-19분, 200 mM; 19-21분, 200 mM에서 250 mM; 21-31분, 250 mM에서 500 mM)로 1 ml/min의 유량을 사용하였다. 유출액은 PAD로 검출하여 분석하였다. 효소반응은 100 mM의 말토올리고당 용액 (7당, G7) 10 μ l에 90 μ l의 효소액을 첨가하여 70 °C 항온조내에서 한시간 반응시킨 다음 끓는 물에서 15분간 실활시킴으로 반응을 정지시킨 후 실활된 효소는 원심분리를 통해 제거하였다. 생성된 glucose-1-phosphate의 양은 표준용액의 분석에서와 같은 동일한 방법으로 분석하였다.

HPAEC-PAD를 이용한 시료의 분취

시료의 분취를 위해 사용컬럼은 CarboPac PA-1(9×250 mm)이었으며 200 mM 수산화나트륨에 초산나트륨 농도구배(0-30 분, 200 mM)로 분당 2 ml의 유량을 사용하였다. 분취된 시료는 anion micromembrane suppressor를 통하여 3N 황산으로 중화, 염 제거 후 동결건조하였다.

핵자기공명분석

분취된 시료의 구조를 파악하기 위하여 JEOL JNM-LA 400 핵자기공명기를 사용하여 분석하였다(수소는 400MHz, 탄소는 100MHz). 내부기준 물질은 sodium 2, 2-dimethyl-2-silapentane-5-sulphate(DSS)를 사용하였으며 분석결과는 기준물질에 대한 ppm의 상대수치로 표기하였다.

결과 및 고찰

자외선측정법과 HPAEC-PAD를 이용한 분석

서론에서 기술한 식에서와 같이 glucose-1-phosphate(G-1-P)로부터 phosphoglucomutase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase에 의해 생성된 NADH의 흡광도를 측정함으로써 용액중의 glucose-1-phosphate의 농도를 결정하는 자외선측정법은 G-1-P 표준용액 20 μ M 이하에서는 선형성을 나타내지 못했다(상관계수 $r^2=0.0013$, Figure 1). 한편, NADH 표준용액을 이용한 보정곡선 결과에 따르면 적어도 1 mM 농도 범위에서 선형성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Figure 1's insert). 그러나 HPAEC를 이용하여 glucose-1-phosphate를 정량하는 경우 Table 1에 요약한 바와 같이 glucose-1-phosphate는 최저 2 μ M 까지 검출이 가능하였다. Figure 2는 glucose-1-phosphate 2 μ M에서 20 μ M 까지 농도범위에서 HPAEC를 사용한 분석결과와 선형성을 나타내 주고 있다(상관계수

Table 1. Summary of UV and HPAEC-PAD methods for G-1-P assay

	the lowest detection level	linearity ¹⁾ (r^2)	standard ²⁾ error	assay time	reproducibility	remarks
UV-method	20 μ M	0.0013	± 0.5	30 min	low	suitable for concentrate sample
HPAEC-PAD	2 μ M	0.9987	± 0.01	20 min	high	suitable for dilute sample

¹⁾ linearity was estimated from the standard curve of 1 μ M to 20 μ M of G-1-P

²⁾ standard error was measured at the lowest detection level

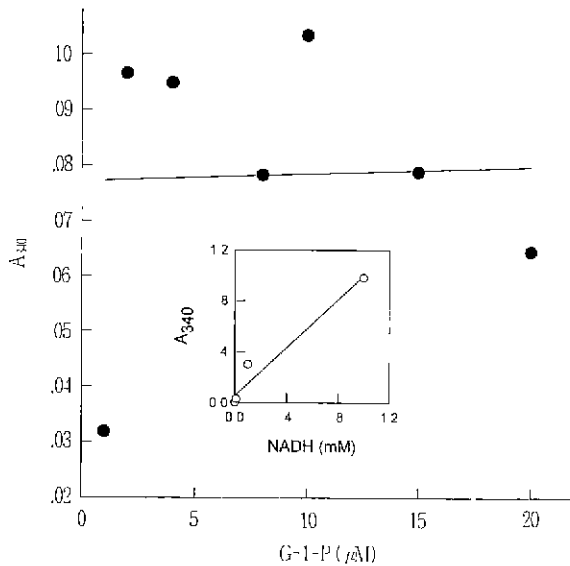


Figure 1. Linearity (absorbance vs. concentration) determined with glucose 1-phosphate (G-1-P) and NADH (insert)

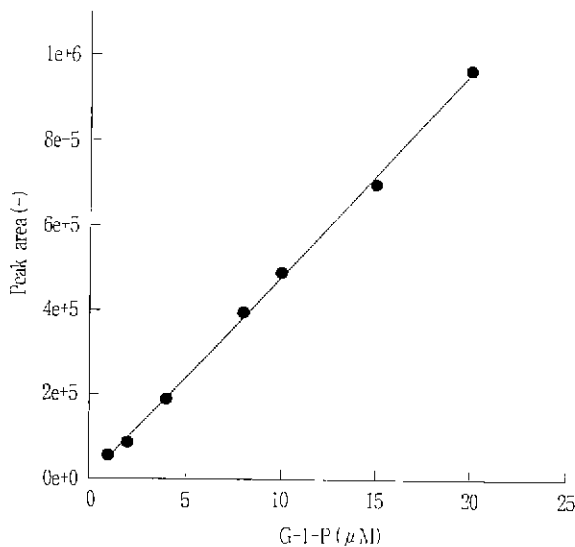


Figure 2. Effect of glucose 1-phosphate (G-1-P) concentration on integration area of peak generated by pulsed amperometric detector (PAD).

$r^2=0.9987$). 기존의 자외선측정법의 경우 20 μ M이하의 농도범위에 있는 glucose-1-phosphate의 분석에서는 선형성을 보여주지 못하므로, 따라서 효소반응결과 생성된 glucose-1-phosphate의

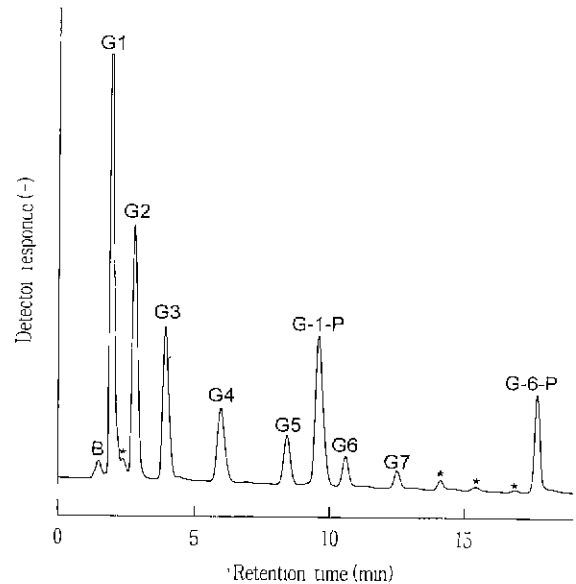


Figure 3 High pH anion-exchange chromatograph (HPAEC) chromatogram of enzyme reaction mixture after 6h of reaction. B and * means buffer and unidentified peaks, respectively. Analyses conditions are described in Materials and Methods.

농도가 20 μ M 이하인 경우는 분석이 불가능하였다. 그러나 HPAEC를 이용한 분석의 경우는 최저 2 μ M에서 20 μ M 의 넓은 농도범위에서 선형성을 보여줌으로 전체적인 측정감도는 HPAEC가 10배가량 우수함을 알 수 있었다. 일반적으로 혼합물 가운데 원하는 물질을 얻기 위해서는 물질상호간의 분리능을 증가시켜야 하는데, 이를 위해서는 수산화나트륨과 초산나트륨의 이온강도를 감소시키거나 초산나트륨의 농도구배 기울기를 감소시켜야 한다 그러나 이러한 분리능의 향상은 기준선의 떨림과 분리시간의 증가를 가져오므로 두 상호 인자간의 보완이 필요하다. 실제로 N,N',N'',N'''-tetraacetylchitotetraose와 그 탈아세틸화합물인 chitotetraose의 분리를 위하여 20 mM의 수산화나트륨 용액을 사용하였는데, 이 경우는 기준선이 불안정하여 지속적인 분석이 불가능하였다(17)

효소반응에 의한 G-1-P의 생산 및 분리

말토올리고당을 *T. caldophilus* GK24 유래 효소액과 반응시킨 후 그 반응혼합물을 음이온교환수지컬럼인 CarboPac PA상에서 상기한 용리방법을 사용하여 분석하였다. 이 분석조건에서 G-1-P는 여러종류의 올리고당들로부터 분리되어 9.6분에서 용리되었으며 반응의 부산물인 glucose-6-phosphate는 17.7분에 용리되었다(Figure 3) 제조된 효소반응액을 동결건조 후 3 ml의

Table 2. Comparison of ¹³C-NMR data (ppm) of G-1-P purified with those of authentic sample.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G-1-P purified	96.32 96.39	74.72 74.66	75.77	72.50	74.80	63.48
Authentic G-1-P	96.39 96.33	74.94 74.79	75.94	72.54	75.03	63.50

중류수에 녹여 분취하였다 최종적으로 얻어진 시료의 순도는 분석피크의 면적비로 90% 였다. 분취된 G-1-P의 탄소핵자기 공명을 실제 G-1-P 시료와 비교해본 결과 동일한 물질로 판명되었다(Table 2). 한편, 분취시에 단점으로 지적되어온 염의 제거는 in-line desalting이라는 방법으로 극복될 수 있음이 최근에 보고되었다(13).

응용가능성

일반적으로 크로마토그래피의 성패를 결정하는 요인은 선형성, 감도(혹은 최저 측정농도), 재현성, 정확도, 내구성의 다섯가지이다. HPAEC-PAD는 이 요인들을 모두 만족시킬 뿐만 아니라 분석하려는 시료의 전처리가 필요없고 사용할 이동상에 첨가제를 사용할 필요가 없다는 등의 부가적인 장점도 지니고 있다. 또한 기존의 분리방법인 이온교환 수지나 젤여과법과 병행하여 사용할 경우 대부분의 생체내에 존재하는 중성 및 산성 올리고당의 분리 및 분취에 이용될 수 있다. 근래에 이르러서 일반적으로 알려진 O-linked 올리고당 뿐만 아니라 N-linked 올리고당의 분리도 가능해져 생체내에 존재하는 탄수화물 및 그 유도체의 분리 및 분취가 가능해졌다(10). 특히 생체 대사의 연구에는 이성질체의 분리가 필수적인데, 본 시스템을 이용하면 탄수화물의 입체 및 위치 이성질체 분리가 수월해진다. 최근 fructan의 대사를 연구하기 위해서 본 시스템이 사용된 것이 그 좋은 예이다(9). 현재 본 연구실에서는 내열성 미생물 *Thermus caldophilus*의 탄수화물 대사연구가 진행중이다.

요 약

단위전동전류 검출기를 장착한 고성능 액체 크로마토그래프를 이용하여 생체내에 저농도로 존재하며 항생제 및 면역억제제로 그 사용이 주목받고 있는 glucose-1-phosphate (G-1-P)를 분리, 분석하였다. 기존의 분석방법인 세 가지 효소의 혼합사용을 이용한 자외선분석법과 선형성 (2 - 20 μM 범위에서 기울기는 4.8×10⁴ 피크면적/μM) 과 재현성을 비교한 결과 본 분석법이 더 효율적임을 알 수 있었다. 최저 측정한계는 2 μM이었다. 실제 내열성 효소반응액을 이용한 분석에서 G-1-P 및 부산물인 glucose-6-phosphate도 분리되었다. 본 분석방법은 생체내에 존재하는 여러 형태의 탄수화물 이성질체의 분리를 가능케 해, 생체내 탄수화물 대사연구에 효율적으로 이용될 수 있다.

참 고 문 헌

1. Burchell, A and R. Hume (1995), The glucose-6-phos-

phate system in human development, *Histology and Histopathology*, **10**, 979-993.
 2. Frydman, R.B. and E. Slabnik (1973), The role of phosphorylase in starch biosynthesis, *Annals of New York Academy of Sciences*, **210**, 153-169.
 3. Weinhausel, A., B. Nidetzky, C. Kysela and K.D. Kulbe (1995), Application of *Escherichia coli* maltodextrin-phosphorylase for the continuous production of glucose-1-phosphate, *Enzyme and Microbial Technology*, **17**, 140-146.
 4. Parish, C., W.B. Cowden and D.O. Willenborg (1990), Phosphoglucan-based anti-inflammatory and/or immunosuppressive drugs. *World Patent*, WO 90/01938. Int. Cl. A61K31/725, 31/71, C07H 11/04.
 5. Vandamme, E., J. van Loo, L. Machtelmclx and A. de Laporte (1987), Microbial sucrose phosphorylase fermentation, process properties, and biotechnical applications, *Advances in Applied Microbiology*, **32**, 163-201.
 6. Takata, H., T. Takaha, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka (1998), Purification and characterization of α-glucan phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus* *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **85**, 156-161.
 7. Beutler, H.O. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 639-645, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.
 8. Paskach, T.J., H.-P. Lieker, P.J. Reilly and K. Thielecke (1991), High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions, *Carbohydrate Research*, **215**, 1-14
 9. Slaughter, L.H. and D.P. Livingston III (1994), Separation of fructan isomers by high performance anion exchange chromatography, *Carbohydrate Research*, **253**, 287-291.
 10. McGuire, J.M., M. Douglas and K.D. Smith (1996), The resolution of the neutral N-linked oligosaccharides of IgG by high pH anion-exchange chromatography, *Carbohydrate Research*, **292**, 1-9
 11. Kunz, C., S. Rudloff, A. Hintelmann, G. Pohlentz and H. Egge (1996), High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides, *Journal of chromatography B*, **685**, 211-221.
 12. Murray, D.B., Y. Hayashida and K. Nishimura (1997), Trehalose analysis using ion exchange HPLC coupled with electrochemical detection, *Biotechnology Techniques*, **11**, 269-270.
 13. Thayer, J.R., J.S. Rohrer, N. Avdalovic and R.P. Gearing (1998), Improvements to in-line desalting of oligosaccharides separated by high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Analytical Biochemistry*, **256**, 207-216.
 14. Rohrer, J.S., J. Thayer, M. Weitzhandler and N. Avda-

- lovic (1998), Analysis of the N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid contents of glycoproteins by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Glycobiology*, **8**, 35-43.
15. Ko, J.H., C.H. Kim, D.-S. Lee and Y.S. Kim (1996), Purification and characterization of a thermostable ADP-glucose pyrophosphorylase from *Thermus caldophilus*-GK24, *Biochemical Journal*, **319**, 977-983.
16. Bradford, M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
17. Tokuyasu, K., H. Ono, M. Ohmushi-Kameyama, K. Hayashi and Y. Mori (1997), Deacetylation of chitin oligosaccharide of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*, *Carbohydrate Research*, **303**, 353-358.