

TLC를 이용한 올리고당 각 성분 총 당량의 빠르고 정량적인 분석

¹이진하 · ²이형우 · ³이형기 · ⁴조동련 · ⁵선우창신 · ⁶박기덕
⁷최정식 · ⁸김도원 · †^{1,5,7}김도만

¹전남대학교 공업기술연구소, ²산림자원 조경학부, ³물질·생물화학공학과
⁴응용화학공학부, ⁵생명과학기술학부, ⁶한국기초과학지원연구소 광주 분소
⁷동신대학교 산업용 가속기이용 생물연구센터, ⁸강릉대학교 물리학과
(접수 : 2004. 4. 3., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

Simple and Quantitative Analysis Method for Total Carbohydrate Concentration in Oligosaccharides by using TLC

Jin-Ha Lee¹, Hyung-Woo Lee², Hyung-Ki Lee³, Dong-Lyun Cho⁴, Chang-Sin Sunwo⁵,
Ki-Deok Park⁶, Jeong-Shik Choi⁷, Do-Won Kim⁸, and Doman Kim^{1,5,7†}

¹The Engineering Research Institute, ²Department of Forest Resources and Landscape Architecture

³Department of Materials and Biochemical Engineering, ⁴Faculty of Applied Chemical Engineering

⁵School of Biological Sciences and Technology and Research Institute for Catalysis

⁶Korea Basic Science Institute Gwang-Ju Branch, Chonnam National University, Gwang-Ju 500-757, Korea

⁷Biology Research Center for Industrial Accelerator, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Korea

⁸Department of Physics, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

(Received : 2004. 4. 3., Accepted : 2004. 6. 24.)

A simple, fast and reproducible quantitative analysis method for sugar concentration composed in oligosaccharide mixture was developed. Two glass TLC plates were prepared per sample. After dipping one plate into the copper bicinchoninate reagent and the other plate into 5% sulfuric acid solution, both plates were baked in microwave oven until sugar spots were developed or the surface temperature of TLC plate becomes 60 to 70 °C.

The corrective factor values [F value = (the value of total sugar concentration converted as glucose unit/the value of reducing sugar concentration converted as glucose unit)/(polymerization degree of sugar)] of different molecular weight sugars were determined. Within the concentration of 0.25~1.0 µg in each sample loaded, the fructose-F (corrective factor value of fructose) was 0.45, yet for the higher concentration (2.5~7.5 µg) fructose-F was 1.0. In case of glucose, in the range of 0.5~7.5 µg, glucose-F was same as fructose-F, 1.0. However, as the molecular weight of sugar was increased, the F values were decreased in both maltodextrin and isomaltodextrin oligosaccharides in 0.5~7.5 µg of each sample loaded. Interestingly, F values were equal for the same molecular weight sugars, although the structures were different from each other. Using F value of each sugar, we could determine and compare the exact total sugar concentration of different molecular weight maltooligosaccharide and isomaltooligosaccharide. We also could determine if the unknown sugar was a reducing or non-reducing compound by using optimized TLC with microwave oven method.

Key Words : Quantitative analysis, TLC, reducing value, total carbohydrate, microwave Oven

서론

Thin-layer chromatography (TLC)는 소량의 유기 혼합물을 신속히 분리, 확인하는데 사용되는 중요한 기술로써 이동상

과 고정상은 각각 액체와 고체이며, 액체에 혼합물을 녹여 이동시키면 움직이지 않는 고체에 흡착되는 정도가 각 물질마다 차이를 이용하여 분리한다. TLC 방법은 손쉽고 빠르게 분석할 수 있어 혼합물 조성의 1차적인 분석방법으로 사용되고 있고, 판 크로마토그래피 (Column Chromatography)를 위한 최적의 elution solvent를 찾는 데도 유용하게 사용되고 있으며 한번에 많은 시료를 분석할 수 있고, 발색 시약에 따라 적은 양의 시료도 확인할 수 있다는 장점이 있다(1-4). 특히, TLC는 당의 검출에서 상대적인 감도가 높아 저분자량

† Corresponding Author : School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwang-Ju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1844, Fax : +82-62-530-1844
E-mail : dmkim@chonnam.ac.kr

의 당과 그것의 유도체 및 유사체를 분석하는 데도 유용하게 사용되고 있다. 현재까지 aniline diphenylamine phosphoric acid(5), aniline phthalate(6), 변형된 Somogyi-Nelson 시약과 copper bicinchonate(7)를 이용하여 TLC상에서 환원당을 정량할 수 있는 방법이 연구·개발되어 왔다. Somogyi-Nelson 시약은 dinitrosalicylic acid (DNS)와 함께 액상에서 환원당을 정량적으로 검출하는데 사용되어 왔는데 검출할 수 있는 시료 중의 환원당량 범위는 1 mL당 글루코오스가 5~600 μg 이고(8, 9), copper bicinchonate 시약은 micro-sample plate reader를 이용하여 환원당을 검출하는데 사용되어 왔으며 검출할 수 있는 환원당량의 범위는 1 mL당 글루코오스의 경우 1~20 μg 이다(10).

TLC상에서 총 당을 정량 분석하기 위해서는 일반적으로 발색 시약을 TLC판에 뿌려주거나 발색 용액에 담근 후에 건열 오븐으로 110°C에서 10분 이상 가열한 후 샘플의 발색 정도를 확인한다. 하지만 TLC를 이용한 당의 환원성은 건열 오븐으로 가열하는 것은 TLC plate를 급속히 건조시켜 발색이 거의 되지 않고, 아주 높은 당 농도의 경우 약하게 발색되지만 정량적으로 분석하기 어렵다. 때문에, 김과 Sakano는 당 샘플을 TLC에 점적하고 Somogyi-Nelson 시약 혹은 copper bicinchonate 시약을 뿌려 microwave 오븐에서 1분에서 5분간 짧게 가열하여 환원성을 확인하는 기술을 제시하였다(7). 이 방법을 통하여 당의 종류에 따라 환원당은 파란색 spot 혹은 자주색 spot으로 발색되며, 글루코오스의 경우는 1 μg 까지 확인 가능하고, 총 당량의 경우도 5% (v/v) 황산을 포함한 메탄올을 이용하여 발색 시켰을 경우 검정색 spot으로 보이며 0.1 μg 까지 확인 가능하였다(7). 이 방법은 환원당량과 총 당량 모두를 빠른 시간 내에 측정할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 microwave oven을 이용한 정확한 발색 조건의 정보가 구체적이지 않아 실험 간에 재현이 어렵고, 일반적인 TLC를 이용한 정량 분석 방법에서처럼 당의 분자량이 다른 경우 같은 양이 있다고 하여도 발색 정도는 다르게 나타나 각 당들의 실제 양을 알기가 어렵다.

최근 새로운 기능의 올리고당을 합성하기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(11). 이 경우 반응 샘플의 수가 많아 생성 당 성분들의 초기 분석은 TLC 방법이 가장 효율적이며, 실험 중 각 당들의 정량적, 그리고 정성적인 결과를 직접 TLC상에서 확인하는 경우가 많다. 하지만 중합도가 다른 올리고당의 양을 직접 TLC 상에서 확인하면 같은 농도에서 보이는 발색 정도는 당의 종류보다는 중합도의 차이에 따라서 크게 달라, Densitometer로 당 양을 분석할 때 실제 양과는 다른 결과를 확인할 수 있다. 즉, 중합도가 큰 당은 작은 중합도의 당과 같은 양이 샘플에 있어도 총 당량의 절대 값이 적게 계산되어 나온다.

현재까지 한 가지 당만 들어 있는 시료를 TLC를 이용하여 절대 농도를 확인하는 연구는 수행되었지만, 다른 중합도를 갖는 당들이 한 시료 내에 섞여 있는 경우 각 구성 당들의 절대 양을 각각 확인하기 위한 방법은 제시된 바 없다(11). 따라서 본 연구에서는 다른 중합도의 글루코오스 화합물이 섞여 있는 올리고당의 각 성분들의 절대 당량을 구하기 위한 보정인자값 (corrective factor value)을 구조가

다른 말토올리고당과 이소말토올리고당을 이용하여 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

탄수화물 및 시약

보정인자값 결정에 사용한 당은 모두 환원말단을 가지고 있는 당으로 단당은 플라토오스와 글루코오스이며, 이당은 말토오스와 이소말토오스이고, 올리고당은 미국 아이오와 주립대학교의 탄수화물 효소 연구실의 John F. Robyt교수로부터 제공받은 말토올리고당 (글루코오스~말토펜타오스)과 이소말토올리고당 (글루코오스~이소말토펜타오스)을 사용하였다. TLC는 silica gel TLC plate (Whatman K5F, 150Å)를 사용하였다. 그 밖의 시약은 일반 등급의 시약을 사용하였다.

총 당량의 측정

단당과 이당의 경우 각 당은 0.1~7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 준비하여 TLC plate (10 x 10 cm)에 1 μl 씩 점적한 후 acetonitrile : water (85 : 15 - v/v) 전개용액에서 2번 전개시키고, 0.3% (w/v) N-(1-naphthyl)-1-ethylenediamine과 5% (v/v) 황산을 포함한 메탄올 용액에 담근 즉시 드라이어를 이용하여 완전히 말린 후, 적당한 습기가 유지되도록 2 mL 증류수를 적신 휴지를 Pyrex container (222-R, 2L, 21 x 21 x 5 cm, Pyrex, USA)에 넣고, TLC plate가 젖지 않도록 plate를 유리막대를 이용하여 바닥에서 띄운 후, 랩으로 완전히 덮어 microwave 오븐 [(주) 건조기술 - 500 W; dimension: 30 x 30 x 40 cm, H x D x W; 온도 측정 - 적외선 온도 센서]을 이용하여 1-2분간 가열 하였다(7, 12, 13). 가장 좋은 발색을 나타 낼 때의 TLC plate 표면 온도는 60~70°C였다. 올리고당의 경우는 0.5~7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 만들어 TLC plate에 점적한 후에 nitromethane : 1-propanol : water (2 : 5 : 1.5 - v/v/v) 전개용액으로 2번 전개한 후에 단당 측정 방법과 동일한 방법으로 spot의 위치와 발색 정도를 확인하였다. 발색한 TLC plate는 NIH Image Program을 사용하여 분석하였다(12, 13).

환원당 양의 측정

실험에 사용한 당들은 총 당량 측정에서 사용한 농도로 만들어 같은 조성의 용매로 전개하였다. Fox 등의 방법으로 제조한 copper bicinchonate solution A와 solution B (10)를 1 : 1 (v/v)로 혼합한 용액에 TLC plate를 담근 후, 더운 공기로 건조시킨 후 총 당량 측정 방법과 동일한 방법으로 microwave 오븐을 이용하여 spot들이 확인이 될 때까지 가열하였고 (TLC plate 표면 온도 - 60~70°C) 생성된 spot들의 양을 NIH Image Program을 사용하여 분석하였다.

올리고당의 보정인자값 결정

NIH Image Program을 사용하여 0.5~7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도의 범위에서 총당과 환원당 값을 정량 분석하였을 때 99% 이상의 신뢰도로 각 올리고당을 구성하는 당들의 정량 분석이 가능하였다. 각 당의 절대량 비교를 위해서는 각 당들의

양을 글루코오스의 양으로 환산하여 얻은 총 당량 기울기를 글루코오스의 양으로 환산한 각 당들의 환원당량의 기울기로 나누어서 각 당의 “실험적인 중합도”를 얻고, 이 값을 “실제 중합도”로 나눈 수치를 올리고당의 “보정인자값 (F)”으로 정하였다.

즉, 보정인자값 (F) = (각 당의 실험적 중합도/각 당의 실질적 중합도), 여기서 실험적 중합도 = (실험에서 얻은 총 당 값의 농도에 따른 변화율/실험에서 얻은 환원당 값의 농도에 따른 변화율)이다.

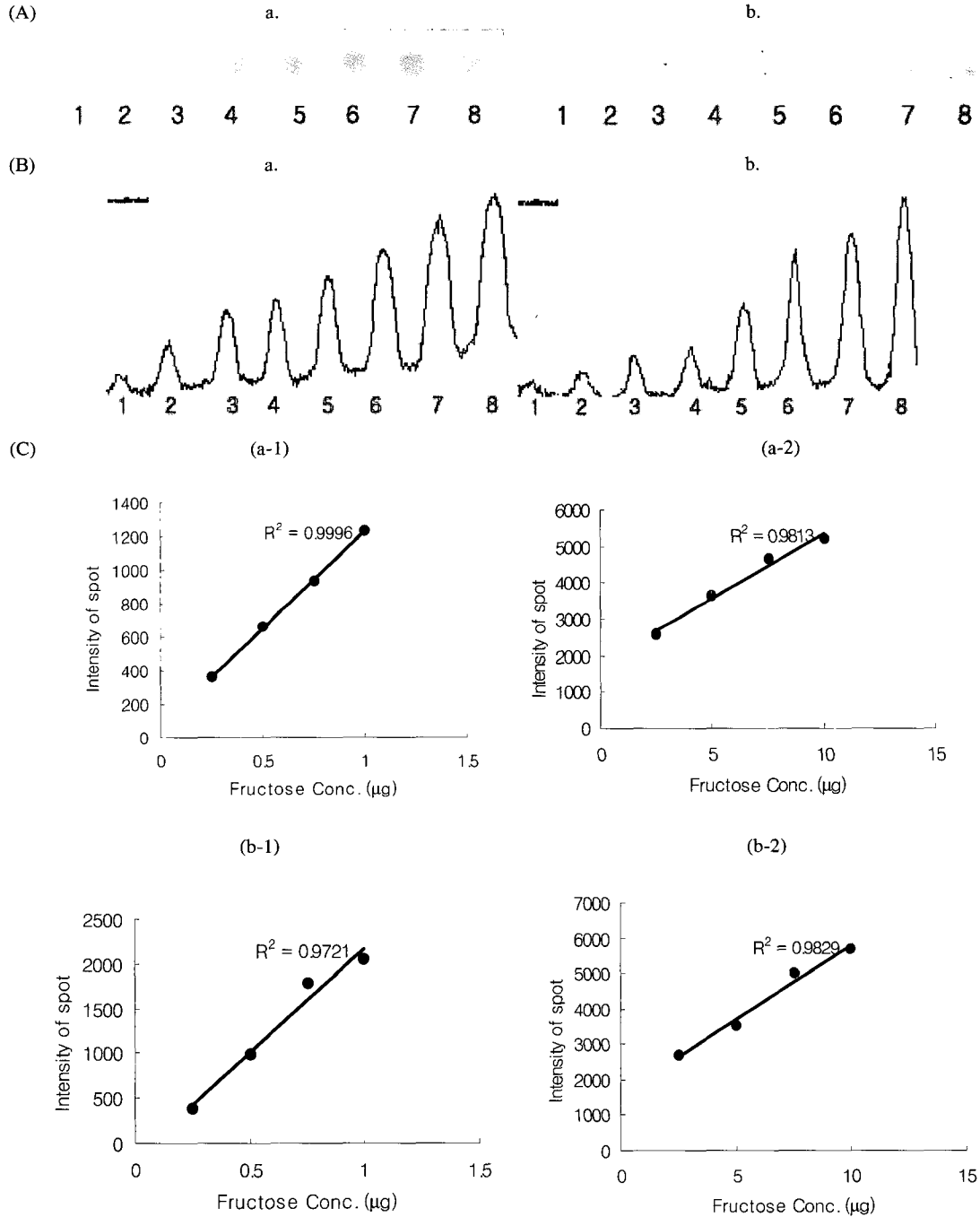


Figure 1. Fructose standard curves obtained by using TLC analysis method. 0.25~10.0 µg/µl fructose was applied for total sugar and reducing sugar value determination on TLC plate. A-a: Analysis of various concentrations of fructose by copper bichinonate reagent, A-b: Analysis of various concentrations of fructose by sulfuric acid in methanol. Lanes 1 to 8: Fructose concentrations were 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 µg/µl, respectively. B-a: NIH image program tracing of fructose spots obtained from A-a, B-b: Image Analysis profile of spots obtained from A-b. C-a-1: Area of each peak determined from (B-a, lanes 1 to 4), C-a-2: Area of each peak determined from (B-a, lanes 5 to 8), C-b-1: Area of each peak determined from (B-b, lanes 1 to 4), C-b-2: Area of each peak determined from (B-b, lanes 5 to 8).

TLC 상에서의 환원당과 비환원당 확인

모르는 구조의 수용체 탄수화물을 TLC상에 점적하여 nitromethane : 1-propanol : water (2 : 5 : 1.5 - v/v/v) 용매에 2회 전개한 후 황산 발색시약과 환원당 발색 시약을 이용하여 그 탄수화물의 환원당 여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

단당의 종류, 농도 그리고 보정 인자값의 관계

플락토오스와 글루코오스의 총 당량을 황산시약으로 발색하고 확인한 결과 당들은 검은 spot으로 나타났으며, copper bicinchoninate 시약을 이용한 환원당 측정의 경우 자주색의 spot으로 확인되었다. 당의 농도 범위를 달리하여 TLC를 이용하여 실험적으로 얻은 총 당량을 실제 당의 농도 값과 비교하였다. 플락토오스의 경우 상대적으로 낮은 농도의 구간 (0.25~1.0 µg/µl의 농도)에서는 발색 정도로 확인한 실험적 중합도와 실질적 중합도 간의 보정인자값이 0.45(±0.01)로 일정하였다. 즉, 이 농도 범위에서는 실험적으로 얻어진 총 당의 양이 실제 실험에 사용한 당 값의 0.45배만큼만 확인되었다. 따라서, 이 농도 범위에서 플락토오스의 절대 양을 실험에서 얻은 당량으로부터 환산하기 위해서는 실험 당량을 0.45로 나누어 주면 된다. 상대적으로 높은 농도의 구간 (2.5~7.5 µg/µl의 농도)인 경우 보정인자값이 1.00(±0.01)으로 실험적으로 얻은 당의 양과 실제 양 간에 차이가 없었다(Fig. 1). 글루코오스 경우는 0.25~7.5 µg/µl의 농도 구간에서 모두 같은 보정인자 값인 1.00(±0.01)을 보였다(Fig. 1).

말토올리고당 및 이소말토올리고당의 중합도에 따른 보정인자값

말토올리고당은 단당인 글루코오스부터 말토헵타오스(G7)까지로 구성되어있고, 이소말토올리고당은 글루코오스부터 이소말토펜타오스(G5)까지로 구성되어있었다. 말토올리고당의 경우, 중합도의 보정인자값은 농도가 0.5~7.5 µg/µl인 경우, 이 구간에서 단당인 글루코오스는 1.0이고, 글루코오스가 한 개씩 증가되어감에 따라 말토헵타오스까지 일정하게 보정인자값이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 흥미롭게도 이소말토올리고당의 경우도 같은 중합도의 경우 크기에 따라 말토올리고당의 구성 당과 같은 보정인자값을 가졌다 (Fig. 2). 즉, 이당에서 칠당 (이소말토택트린의 경우는 오당)까지의 보정인자값은 각각 0.74 (이당), 0.53 (삼당), 0.34 (사당), 0.30 (오당), 0.25 (육당) 그리고 0.21 (칠당)이었다.

하지만 환원당량 값의 경우는 말토올리고당이나 이소말토올리고당을 구성하는 모든 당의 경우 당의 종류 (결합 구조, 크기)에 상관없이 같은 농도인 경우 일정한 값을 보였다 (결과 보이지 않음). 즉 0.5~7.5 µg/µl 농도 범위의 시료인 경우 같은 몰수의 당은 모두 같은 환원당량을 보였다. 이 결과로부터 크기가 다른 당의 경우 Densitometer를 이용한 총 당량을 확인하고 그 당의 중합도에 해당하는 보정인자값으로 나누어 주면 그 크기의 실제 총 당량을 확인·비교 할 수 있겠다. 즉, 각 당의 TLC상에서의 발색 정도

를 글루코오스를 기준 당으로 하여 그 양을 환산하고, 이 값을 그 중합도에 해당하는 보정인자값으로 나누어 주면 글루코오스 (이 경우 보정인자값이 1.0임) 농도로 표현할 수 있는 실질적인 총 당량(즉 그 당의 실제 농도)을 결정할 수 있겠다. 이로부터 한 시료 내에 혼합되어 있는 다른 크기의 당들의 실질적인 양 비교가 가능하겠다.

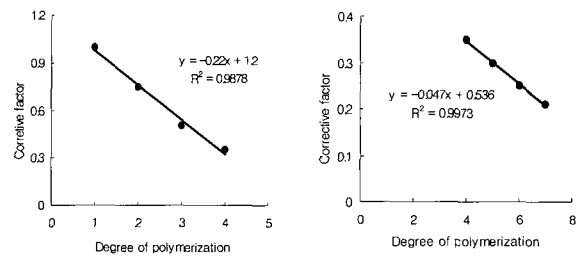


Figure 2. The corrective factor of polymerization of maltooligosaccharide and isomaltooligosaccharide series. In the concentration of 0.5~7.5 µg, the amounts of total carbohydrates and reducing carbohydrates in maltooligosaccharide and isomaltooligosaccharide were measured on TLC plate. The corrective factor of polymerization (F) was [(the value of total sugar concentration converted as glucose unit)/(the value of reducing sugar concentration converted as glucose unit)]/(polymerization degree of sugar).

Microwave 오븐을 이용한 TLC plate 가열 시간최적 조건

Microwave 오븐은 500 W로 출력을 일정하게 유지하고, 가열 시간에 따른 TLC plate의 온도 증가를 측정하였으며, 가장 재현성 있는 총 당량과 환원당량의 실험 결과는 TLC plate의 표면 온도가 60~70°C일 때 얻을 수 있었다.

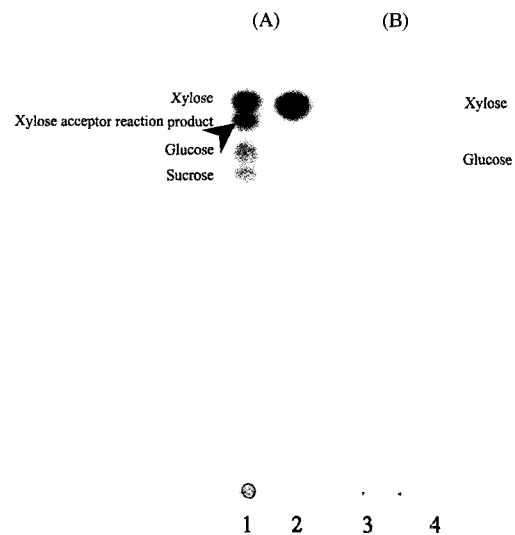


Figure 3. Identification of xylose acceptor reaction product on a TLC plate by microwave oven analysis using copper bicinchoninate reagent. Xylose acceptor reaction product was produced by the transfer reaction of fructosyltransferase. The arrow indicates the acceptor reaction compound. Developed with (A), reagent containing 5% sulfuric acid in methanol; and with (B), copper bicinchoninate reagent. lane 1 and 3: xylose acceptor reaction product, lane 2 and 4: xylose

모르는 구조 당의 환원성과 비환원성 확인

플락토실트랜스퍼레이즈의 수용체 반응에서 설탕과 수용체로 자일로스를 사용하여 얻은 수용체 산물을 TLC plate를 이용하여 전개 [nitromethane:1-propanol/water (2 : 5 : 1.5 - v/v/v)]한 후 황산 발색시약으로 확인한 결과, 새로운 수용체 반응 산물이 검정색으로 확인되었고(Fig. 3), 환원당 측정 시약인 copper bicinchoninate 시약을 이용하여 발색한 경우에는 그 위치에 환원당으로 확인되지 않아, 플락토실트랜스퍼레이즈의 수용체 반응으로 얻어진 수용체 산물은 자일로의 탄소 1번 위치에 있는 자유-OH기에 플락토오스가 전이되어 비환원당의 구조로 이루어진 물질임을 알 수 있었다(Fig. 3).

본 연구의 결과로부터 얻어진 보정인자 값과 본 연구에서 개발된 TLC와 microwave 오븐을 이용하여 환원당을 확인 하는 방법의 적정 조건은 여러 가지 중합도의 당이 섞여 있는 시료 중의 각 당의 총 당량을 절대적인 양으로 비교할 수 있게 하고, 생산된 당의 환원성과 비환원성을 쉽고 빠르게 확인할 수 있게 하여 새로운 구조의 탄수화물의 정성적이고 정량적인 분석을 위한 기초자료를 확보하는데 유용하게 사용될 수 있겠다. 또한 이 방법은 건열 오븐을 이용하여 발색하는 경우에도 다른 크기의 당들 간의 총 당량을 비교하는데도 활용할 수 있겠다.

요 약

TLC와 microwave 오븐을 이용하여 여러 가지 분자량의 당들의 농도, 그리고 구조에 따른 보정인자값 [보정인자값 (F) = [각 당의 실험적 중합도/각 당의 실질적 중합도], 여기서 실험적 중합도 = [실험에서 얻은 총 당량의 농도에 따른 변화율/실험에서 얻은 환원당량의 농도에 따른 변화율]을 결정하였다. 플락토오스의 경우 0.25~1.0 μg 농도를 TLC에 점적한 경우에는 보정인자값이 약 0.45로 일정하였고, 2.5~7.5 μg 인 경우에는 1.0 이었다. 글루코오스의 경우는 0.25~7.5 μg 의 농도 구간에서 1.0으로 같은 값이 확인되었다. 말토올리고당과 이소말토올리고당 혼합물은 0.5~7.5 μg 농도의 구간에서 보정인자값이 글루코오스를 1.0으로 하여 중합도가 커질수록 말토크토포오스와 이소말토펜타오스까지 일정하게 감소하는 것을 확인하고 그 값을 정해주었다. 또한 새로운 구조의 탄수화물의 환원성과 비환원성 여부를 TLC상에서 쉽게 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구로부터 얻은 결과는 다수의 탄수화물들이 한 가지 시료에 섞여 있는 경우에도 각 구성 당의 실제적 중합도를 아는 경우 절대적 당량을 계산할 수 있고, 탄수화물들 중 환원성 당과 비환원성 당의 구별에 쉽게 활용할 수 있겠다.

감 사

본 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 (KRF-Y00-290) 되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Guen, S. H., Y. S. Guen, Y. S. Kim, G. C. Park, Y. J. Yun, G. Y. Cha, and H. S. Choi (1999), The principle of instrument analysis, *Liberty Academy*, 789-893.
- Choi, J. S. (1994), The introduction of instrument analysis, *Shin-Gwang*, 282-375.
- Park, C. I. and C. H. Lee (1993), The theory and practice of HPLC, *Liberty Academy*, 1-7.
- Choi, M. H., K. S. Cho, H. K. Kang, J. S. Yun, E. S. Seo, H. W. Ryu, S. H. Chang, S. H. Yoon, and D. Kim (2003), Simple and quantitative analysis method for lactic acid by TLC, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 70-73
- Bailey, R. W. and E. J. Bourne (1960), Colour reagents given by sugars and diphenylamineaniline spray reagents on paper chromatograms, *J. Chromatogr.* **4**, 206-213.
- Peschke, W. (1963), Beitrag zur dmschicht-chromatographie der anionen von halogensauerstoffsuren: Trennung der halogenite, halogenate und perhalogenate auf kieselgel-sowie modifizierten kieselgur-aluminium-oxid-schichten, *J. Chromatogr.* **20**, 571-579.
- Kim, Y. K. and Y. Sakano (1996), Analyses of reducing sugars on a thin layer chromatographic plate with modified Somogyi and Nelson reagents and with copper Bicinchoninate, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 594-597.
- Somogyi, M. (1952), Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
- Nelson, N. (1944), A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380.
- Fox, J. D. and J. F. Robyt (1991), Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader, *Anal. Biochem.* **195**, 93-96.
- Lee, I. S., D. Kim, and P. S. Chang (1999), Production and characterization of new structured-oligosaccharides from mixed-enzyme of dextransucrase and α -amylase, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 707-712.
- Kim, D., Y. M. Kim, M. R. Park, H. J. Ryu, D. H. Park, and J. F. Robyt (1999), Enzymatic modification of cellulose using *Leuconostoc mesenteroides* B-742CBM dextransucrase, *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 529-533.
- Baek, J. S., D. Kim, J. H. Lee, P. S. Chang, N. S. Han, and J. F. Roby (1998), Enzymatic synthesis of new oligosaccharide using glucansucrases, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 179-186.