

최        종  
연구보고서

식용작물로부터 생리활성물질의  
분리생산에 관한 연구

Studies on the purification and production of the  
D-pinitol and D-*chiro*-inositol from soybean and  
buckwheat.

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식용작물로부터 생리활성물질의 분리생산에 관한 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2004 년 9 월 일

주관연구기관명 : 수원대학교  
총괄연구책임자 : 박 환 범  
협동연구기관명 : 고려대학교  
협동연구책임자 : 정 남 현  
협동연구기관명 : 리젠바이오텍  
협동연구책임자 : 박 인 철

# 요 약 문

## I. 제 목

식용작물로부터 생리활성물질의 분리생산에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

D-pinitol 또는 D-*chiro*-inositol은 *myo*-inositol의 유도체로써 식물체가 stress (drought, salinity)를 받는 경우 수분유지를 위해 삼투 용질로써 축적된다. 또한 D-pinitol 또는 D-*chiro*-inositol은 인슐린 비의존성 당뇨병인 경우 혈당강하 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 이에 본 연구는 콩에서 *myo*-inositol로부터 D-pinitol로 전환되는 과정에 관여하는 두 효소, *myo*-inositol methyltransferase와 ononitol epimerase 유전자를 cloning하고 두 유전자를 효모에 전이시켜 pinitol의 대량 생산 가능성을 제시하고자 하였다. D-pinitol과 D-*chiro*-inositol이 다량으로 함유되어 있다고 보고 된바 있는 대두와 메밀에서 품종별로 D-pinitol과 D-*chiro*-inositol의 함유량을 측정하여 가장 우수한 품종을 선발하고자 하였다. 또한 두부제조 과정에서 버려지는 순물을 이용하여 D-pinitol과 D-*chiro*-inositol의 회수 공정을 개발하고자 하였다. 이러한 과정이 확립된다면 순물의 폐기로 인하여 발생하는 환경오염을 해결할 수 있고 폐기물을 재활용한다는 측면에서 고부가가치의 식품소재 창출이 가능할 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 콩으로부터 *myo*-inositol methyltransferase와 ononitol epimerase 유전자를 cloning하고 두 유전자를 효모에 도입시켜 형질 전환된 효모에서 pinitol의 함량을 측정하였다. 또한 순물로부터 D-pinitol과 D-*chiro*-inositol의 분리, 정제 방법을 확립하였고 D-*chiro*-inositol의 함량이 높은 우수 콩 품종을 선별하였다. D-*chiro*-inositol의 galactosyl 유도체의 함량을 조사하여 함량이 높은 우수 메밀 품종을 선별하였고 이 galactosyl 유도체로부터 D-*chiro*-inositol을 효소적, 화학적 방법으로 획득하는 방법을 개발하였다. 두부 순물에서 D-pinitol과 D-*chiro*-inositol을 회수하는 공정을 확립하였고 HPLC를 통하여 정량 후 동물실험과 독성실험을 수행하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

콩에서 *myo*-inositol methyltransferase와 ononitol epimerase 유전자의 발현이 염 stress하에서 증가한다는 점에 착안하여 염 처리한 cDNA library에서 제작한 EST를 검색하여 두 유전자를 cloning하였다. *Myo*-inositol methyltransferase와 ononitol epimerase 유전자의 cloning은 고등식물에서는 처음이다. 두 유전자를 효모에 도입하여 pinitol의 함량을 측정할 결과 현저히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 현재 두 유전자에 대한 국제특허를 준비 중에 있다.

두부순물에서 pinitol과 *D-chiro*-inositol 등의 유효성분 최대화 방법을 확립하였으며 이를 바탕으로 순물에서 최대의 유효성분을 얻을 수 있는 콩의 종류를 알아내기 위해 12종의 두부콩 중 실파달콩이 가장 높은 유효성분을 발생시킴을 알아내었다. 유효성분을 메밀로부터 얻어 낼 수 있는 가능성을 알아내기 위해 3가지 종류의 국산메밀을 비교한 결과 양절메밀 2호에서 가장 높은 수준의 fagopyritol B1(유효성분 *D-chiro*-inositol의 복합체)을 가지고 있음을 알 수 있었다. 메밀로부터 얻은 fagopyritol B1로부터 *D-chiro*-inositol을 얻기 위해 산 가수분해법, 효소고정화법 등을 이용해 비교한 결과 두 방법에서 거의 동등한 효율성을 확인할 수 있었으며 효소고정화법의 경우는 부산물이 적게 생기는 장점이 있었다.

.두부순물에서 pinitol과 *D-chiro*-inositol을 회수하는 공정설치에 있어 흡착제를 사용하는 방법이 경제성이 없어 거대분자들을 규조토 통과를 이용해 제거한 후 농축하여 냉동건조한 후 분쇄하여 분말화된 샘플을 얻었다. 이를 HPLC를 통하여 분석한 결과 약 10 %의 pinitol이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌고 *D-chiro*-inositol은 전혀 검출되지 않았다.

독성실험 결과 아무런 이상을 관찰할 수 없었다. 당뇨를 유발한 쥐를 가지고 pinitol 투여 후 혈당을 측정할 결과 혈당감소가 그리 크지 않았다.

# SUMMARY

## (영문 요약문)

### I. Title

Studies on the purification and production of the D-pinitol and D-*chiro*-inositol from soybean and buckwheat.

### II. Background and the purpose of the research

D-pinitol and D-*chiro*-inositol is accumulated upon drought and salinity stress as osmoprotectant in plants. D-pinitol and D-*chiro*-inositol has the effect on glucose homeostasis in type II diabetes. Accordingly we want to clone the cDNAs coding for the two enzymes, *myo*-inositol methyltransferase and ononitol epimerase which are involved in the conversion from *myo*-inositol to pinitol in soybean. These two genes will be introduced into the yeast and check the pinitol concentration in transformed yeast. We want to compare the D-pinitol and D-*chiro*-inositol content in Korean soybean and buckwheat varieties. By using the soybean cured wastewater after making tofu, we want to set up the purification system for the recovery of D-pinitol and D-*chiro*-inositol. This purification system will help to decrease the water contamination.

### III. Content of the research

We have cloned the two genes coding for *myo*-inositol methyltransferase and ononitol epimerase in soybean. These two genes were introduced into the yeast to check the concentration of D-pinitol. We have selected the best breed which has the most amount of D-pinitol and D-*chiro*-inositol in soybean. In case of buckwheat, we have selected the breed which has the most amount of fagopyritol B1 which is the galactoside of *chiro*-inositol. We have developed the enzymatic and chemical method to produce *chiro*-inositol from Fagopyritol B1. After setting up the purification system from the wastewater, we have quantified the amount of D-pinitol and D-*chiro*-inositol by HPLC. We have conducted the toxic test and animal test with these purified D-pinitol and D-*chiro*-inositol.

### III. Results and suggestion for application

The genes for *myo*-inositol methyltransferase and ononitol epimerase are expressed upon the salinity and drought stress in soybean. By searching the EST database which are made from the salt treated roots of soybean, we can clone the cDNAs for the two enzymes, *myo*-inositol methyltransferase and ononitol epimerase. After introducing the two genes into the yeast, we can find that the pinitol peak in GC-FID data.

Sinpaldal soybean has the most amount of D-pinitol and D-chiro-inositol among 12 soybean varieties. Yangjul buckwheat has the most amount of Fagopyritol B1 among 3 buckwheat varieties. To produce D-*chiro*-inositol from Fagopyritol B1, we have conducted enzymatic and chemical methods. The efficiency of the two methods is almost same. There was not much of by-products in case of the enzymatic method.

The macromolecules in the wastewater have been removed by using diatomaceous earth filter. The supernatant has been concentrated and lyophilized. The HPLC analysis has revealed that the concentration of pinitol in the lyophilized powder was around 10 %, and there was not any D-chiro-inositol peak. The toxic test results with this lyophilized powder was negative. The animal test with the diabetes induced rats was not very effective.

# CONTENTS

Part 1 Outline of Research Program.....	8
Part 2 Current Status of This Research Program.....	10
Part 3 Results and Contents.....	12
Part 4. Accomplishment and Major Contribution.....	78
Part 5. Utility of This Research.....	81
Part 6 Information Obtained Oversea during Research.....	82
Part 7 References.....	83

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	10
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	12
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	78
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	81
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	82
제 7 장	참고문헌.....	83



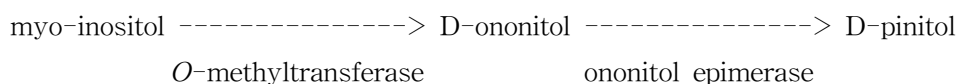
# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 필요성

#### 가. 기술적 측면

- 1) D-pinitol (3-*O*-methyl-D-chiro-inositol) 또는 D-chiro-inositol은 myo-inositol의 유도체로써 식물체에서의 역할이 최근에 밝혀지고 있다. D-pinitol은 식물체가 stress (drought, salinity)를 받는 경우 수분유지를 위해 삼투 용질로써 축적되는 것으로 밝혀진 바 있다 (Loewus and Murthy, 2000).
- 2) D-pinitol 또는 D-chiro-inositol은 여러 식물체에 다양하게 분포되어 있는데, 식용작물 중에서는 콩과식물 특히 콩나물에 다량으로 존재하고 있는 것으로 알려졌다 (Hong and Pak, 1999).
- 3) 최근 D-chiro-inositol이 혈당조절의 신호전달 과정 중에 관여하는 인자로서의 역할이 밝혀지면서 많은 주목을 받고 있다. 인슐린 비의존성 당뇨병인 경우 D-chiro-inositol의 투여로 인해 혈당강하 효과가 있는 것으로 밝혀졌다 (Pak et al., 1993; Asplin et al., 1993). 이러한 이유로 인해 D-chiro-inositol이 인슐린 비의존성 당뇨병인 경우에 하나의 지표로 이용되어지고 있다 (Pak et al., 1998).
- 4) 인슐린 비의존성 당뇨병에 의한 다낭성 난소질환(polycystic ovary syndrome)인 경우도 D-chiro-inositol의 투여로 인해 정상적인 배란이 일어나는 것으로 보고 되었다 (Nestler et al., 1999).
- 5) 식물체에서 D-pinitol의 합성경로가 밝혀졌는데 경로는 다음과 같다.



콩에서는 이러한 경로만 밝혀졌을 뿐 이 생합성에 관여하는 효소나 그 유전자가 분리된 바가 없고 또한 동물체에서는 이러한 경로를 통해 D-pinitol이 생성되는 것이 보고된 바 없다.

- 6) 메밀의 발아 과정 중에서는 myo-inositol이 이러한 중간 대사 과정을 거치지 않고 직접 D-chiro-inositol로 전환되는 것으로 추측되고 있다(Horbowicz et al., 1998).
- 7) 두부를 제조하고 버리는 순물에 회수장치를 설치하여 isoflavone과 saponin을 회수하는 공정이 확립되어 있어 여기에 D-pinitol이나 D-chiro-inositol을 회수하는 공정을 쉽게 추가시킬 수 있다.
- 8) D-pinitol이나 D-chiro-inositol이 다량으로 함유된 콩, 메밀 품종을 선별할 필요성이 있다.

- 9) 콩에서 D-pinitol 생합성 과정 중에 관여하는 효소를 분리하고 그 유전자를 cloning 하여 myo-inositol을 다량으로 함유하고 있는 효모에 도입시켜 효모에서 많은 D-pinitol이나 D-chiro-inositol을 생산하게 한다.
- 10) D-chiro-inositol은 천연물로서 기존의 경구용 혈당 강하제들이 갖고 있는 저혈당 증상, 위장장애, 간장장애와 같은 부작용이 전혀 없다.

#### 나. 경제·산업적 측면

- 1) 당뇨병과 같은 퇴행성 질환으로 인하여 오는 경제적, 산업적 손실을 개선할 수 있다.
- 2) 제조 공정상의 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 지니는 중소기업형 산업으로 분류가 가능하다.
- 3) 질병 예방용 식품의 수요증가와 함께 거대 수출 품목으로 예상된다.
- 4) 폐수 발생을 근원적으로 해결할 수 있어 폐수처리 비용의 절감은 물론 고부가가치의 소재 창출이 가능하다.
- 5) 식품 중에 함유되어 있는 물질로 유기합성에 의한 신규물질들 보다 안전성의 확보가 용이하다.

#### 다. 사회·문화적 측면

- 1) 식품소재를 통하여 성인병을 예방할 수 있다.
- 2) 본 연구과제의 최종목표인 성인병 치료 또는 예방용 소재의 개발과 이를 주성분으로 한 기능성 식품화는 미시적으로는 국민 개개인의 건강장수 욕구를, 거시적으로는 정부의 의료보건정책을 충족시킬 수 있는 하나의 대안이 될 수 있다.
- 3) 순물의 폐기로 인하여 발생하는 환경오염을 완벽하게 해결할 수 있다.
- 4) 질병치유 혹은 예방에 대한 새로운 접근방법을 제시할 수 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

#### 가. 국내

- 1) 국내에서는 콩, 메밀 등에 대한 연구가 행해졌으나 주로 총탄수화물, 단백질, 회분, 지질 등의 함량에 대해 개괄적인 연구가 있을 뿐 D-pinitol과 inositol유도체의 함량과 분리에 대해 연구된 적이 없다 (김 et al., 1994; 심 et al., 1998).
- 2) 특히 콩과 관련되어 국내에서 다량으로 소비되고 있는 두부의 제조폐액 (순물)은 버려지고 있는데, 수용성당류가 대두로부터 두부로 이행되는 것은 소량이며 대부분 순물을 통해 손실됨으로 이의 활용연구가 기대된다 (진, 1994; 강 et al., 1993).
- 3) 메밀의 처리에 따른 식이요법의 효과에 대해 연구한 적이 있으나 메밀의 주요 성분인 inositol 유도체의 구체적인 분리에 대해 연구가 없다 (이 et al., 2000; 최 et al., 1991).
- 4) 이미 세계 최초로 두부 순물에서 isoflavone과 saponin을 회수 하는 공정을 설치하여 가동하고 있음

#### 2. 국외

- 1) 콩에 대해 비교적 활발한 연구가 이루어지고 있고 콩과 콩의 성장에 따른 각종 탄수화물의 성분에 변화에 대한 연구가 이루어지고 있다 (Obendorf et al., 1998; Kuo et al., 1997).
- 2) 일반적으로 콩은 6-17%의 수용성 탄수화물을 포함하고 있고 D-pinitol과 myo-inositol를 주요 cyclitol로 포함하고 있다. 하지만 콩의 종류에 따라 D-pinitol과 같은 cyclitol의 함량이 많이 변화함을 보고하였다 (Kuo et al., 1997; Guo and Ossterhuis, 1997).
- 3) 콩은 또한 D-pinitol과 소량의 D-chiro-inositol, D-ononitol, myo-inositol과 함께 galactopinitol A, ciceritol, galactopinitol B, fagopyritol B1등의 D-chiro-inositol을 포함하는 galactosyl 유도체를 포함하고 있다. 하지만 galactosyl 유도체로부터 D-chiro-inositol을 분리·획득하는 방법은 연구되지 않고 있다 (Obendorf et al., 1998).
- 4) 현재 뉴질랜드의 한 제약회사가 D-chiro-inositol을 콩으로부터 추출하여 D-pinitol의 형태로 제품화하여 당뇨병환자를 위한 혈당개선제로 판매하고 있는 상태이다.
- 5) D-pinitol과 inositol 유도체를 얻기 위한 방법으로 콩 또는 탈지대두로부터 추출하는 방법과 유기합성하는 방법 그리고 kasugamycin으로부터 조제하는 방법이 있으나 공정이 복잡하거나 고가의 원료물질로 인해 비실용적이다 (Acena et al., 1996; Kornienko and d'Alarcao, 1997; US Pat. 5,091, 596).
- 6) 메밀은 콩과 달리 D-pinitol이나 pinitol 유도체를 포함하지 않지만 D-chiro-inositol을 포함하는 fagopyritol A1, A2, B1, B2, B3등을 다량함유하고 있다. 특히

fagopyritol B1은 수용성 탄수화물의 40%를 차지한다 (Horbowicz et al., 1998).

- 7) D-pinitol 생합성에 관련하는 효소의 하나인 myo-inositol methyltransferase(IMT) cloning은 유일하게 염생식물인 *Mesembryanthemum*에서 되었고 ononitol epimerase (OEP)는 현재 어떤 생명체에서 그 실체가 밝혀진 바가 없다 (Rammesmayer et al., 1995; Nelson et al., 1999).

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 수행 내용

#### 1. 최종 목표

- 가. 콩으로부터 *myo*-inositol *O*-methyltransferase와 ononitol epimerase의 분리 및 유전자 cloning
- 나. 콩, 메밀로부터 *D*-pinitol과 *D-chiro*-inositol의 분리, 정제 및 *D-chiro*-inositol의 함량이 높은 우수 품종 선별
- 다. 두부의 제조과정에서 버려지는 순물에서 *D*-pinitol 및 *D-chiro*-inositol의 회수공정 확립

#### 2. 1차 연도 목표

##### <제1세부과제>

- 가. *Myo*-inositol methyltransferase 유전자 분리 및 발현
  - 1) IMT 유전자의 분리 및 발현을 통한 기질 특이성 확인  
염생식물인 *Mesembryanthemum*의 IMT와 아미노산 서열이 유사한 2개의 clone을 찾아 아미노산 서열을 결정하였고 *E.coli*에서 발현을 통해 기질 특이성을 확인하였다.
- 나. Ononitol 과 pinitol 의 분리
  - 1) OEP의 기질인 ononitol과 산물인 pinitol을 구별하는 방법을 확립하였다.

##### <제2세부과제>

- 가. 두부로부터 나온 순물에서 *D-chiro*-inositol 등의 유효성분 최대화 방법 확립
  - 1) 유효성분 추출방법 확립  
일반적으로 두부제조에 사용되고 있는 US. No. 1 품종을 대상으로 두부제조 시 획득되는 순물에서 pinitol, *D-chiro*-inositol, *myo*-inositol을 최대로 포함하는 조건을 확립하기 위하여 수침시간, 마쇄시간, 간수의 변화를 통해 최적의 조건을 확립하였다.
- 나. 콩으로부터 pinitol과 *D-chiro*-inositol의 분리, 정제
  - 1) 콩의 품종별 유효성분 조사

위에서 확립되어진 유효성분의 최대 함유 조건에 따라 한국산 콩 12품종(진품콩, 소담콩, 보광콩, 진품2호, 만리콩, 무한콩, 황금콩, 대원콩, 신팔달콩, 장수콩, 단백콩, 태광콩)의 유효성분을 조사하였다.

<제3세부과제>

가. 흡착 수지를 이용한 순물에서 D-chiro-inositol 분리방법 확립하였고 흡착수지 선택, flow rate, 온도, column 조건 설정을 통해 이온교환조건의 최적화였다.

## 2. 2차 연도 목표

<제1세부과제>

가. Ononitol epimerase 유전자의 분리

1) 염 stress하에서 발현하는 NAD 의존적 epimerase EST 분석을 통하여 ononitol epimerase 유전자를 분리 하였다.

나. Ononitol epimerase 유전자의 발현 및 기질 특이성 확인.

1) Ononitol epimerase 유전자를 *E. coli*에서 발현시켜서 최적 발현시간을 확인하였고 이를 분리하여 효소반응을 시킨 후 GC-FID를 통하여 기질 특이성을 확인하였다.

2) 염 stress하에서 이 유전자의 발현 양상을 확인하기 위하여 염 stress를 받은 콩의 조직을 갈아서 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 통하여 발현 양상을 확인 하였다.

<제2세부과제>

가. 메밀로부터 fagopyritol B1 표준물질 추출 및 정제

1) 메밀로부터 fagopyritol B1 표준물질 추출 및 정제 및 최대화

메밀에는 총 5개의 galactosyl 유도체인  $\alpha$ -galactosyl-D-chiro-inositol을 함유하고 있음이 알려져 있다. 즉, fagopyritol A1, fagopyritol B1 (monogalactosyl D-chiro-inositol의 이성체), fagopyritol A2, fagopyritol B2 (digalactosyl D-chiro-inositol의 이성체), 그리고 fagopyritol B3 (trigalactosyl D-chiro-inositol)이다. 이 중 fagopyritol B1이라고 명명된 O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-D-chiro-inositol 은 메밀의 배에서 주된 soluble carbohydrate(전체의 40%)로 확인되었다.  $\alpha$ 위치에서 galactosyl 결합의 화학적 또는 효소적 가수분해에 의한 fagopyritol의 분해는 메밀로부터 D-chiro-inositol의 대량생산을 의미한다. 그러므로 메밀 함유 성분 중 주요 수용성 탄수화물인 fagopyritol을 분리하며, 특히 이 중에서도 거의 대다수를 차지하는 fagopyritol B1을 최대로 분리 정제하는 방법의 개발을 목적으로 하였고, 또한 메밀 품종별 fagopyritol B1의 함량을 조사하였다.

<제3세부과제>

가. 음이온 및 양이온교환수지를 이용한 분리방법

isoflavone과 saponin이 회수된 순물을 음이온과 양이온교환수지에 순차적으로 통과시켜 D-pinitol 및 D-chiro-inositol 유도체를 회수하는 공정의 개발

1) 이온교환조건의 최적화: 이온교환수지 선택, flow rate, 온도, column의 조건 설정

2) 탈착조건의 최적화: 탈착용매 및 용질의 선택 및 최적화

\*정제공정의 도식화

순물--->원심분리---->여과----->흡착수지----->음이온/양이온수지---->농축  
(이소플라본/사포닌) (CI/CI유도체)

풀무원 두부공장에서 위생배관수집을 통해 탱크에 모은 순물을 연속식 원심분리기 6800rpm; 독일 Westfalia사의 Model SA 20-47-076)를 이용하여 고형물을 제거하고 흡착수지를 통과시켜 이소플라본과 사포닌을 회수하였다. 상기를 공정을 통과한 순물을 음이온/양이온수지를 통과해서 전하를 가진 불순물을 제거하고자 하거나 활성탄을 이용한 분리방법/ 제올라이트를 이용한 분리 방법과의 비교를 통하여 최종적으로 공정을 확립하고자 한다.

나. 불순물 제거 농축방법을 이용한 분리 방법

1) 정제공정의 도식화

순물 수집 -> 원심분리 -> 흡착레진 통과 -> 규조토 여과 -> (한외여과)  
-> 진공농축 -> 냉동건조

상기한 가. 에서의 방법의 경제성이 낮음에 따라 상기와 같은 방법으로 정제공정을 확립을 시도하였다. 규조토 여과는 고분자 물질인 전분과 셀룰로스 등을 제거하는데 효율적이고 한외여과지는 더 작은 분자량 10,000 이상의 물질을 제거하는데 효율적이다. 한외여과 후 natural circulate type의 진공농축기를 이용하여 55℃에서 1시간 정도 농축하여 냉동건조기를 이용해 최종 분말을 얻었다.

### 3. 3차 연도 목표

#### <제1세부과제>

가. *Myo*-inositol methyl transferase 유전자의 효모로의 도입

- 1) *Myo*-inositol methyltransferase 유전자 분리 후 yeast expression vector에 삽입 후 효모 형질전환 하였다.
- 2) 형질전환 된 효모를 분쇄하여 *Myo*-inositol methyltransferase 유전자가 작용하여 ononitol을 생성하는지 GC-FID를 통해 확인하였다.

나. *Myo*-inositol methyltransferase 유전자와 ononitol epimerase 유전자를 효모에 도입

- 1) *Myo*-inositol methyltransferase 유전자와 ononitol epimerase 유전자 분리 후 yeast expression vector에 삽입 후 효모 형질전환 하였다.
- 2) 형질전환 된 효모를 분쇄하여 *Myo*-inositol methyltransferase 유전자와 Ononitol epimerase 유전자가 작용하여 ononitolo과 pinitol을 생성하는지 GC-FID를 통해 확인 하고 생성물의 정량 분석을 하였다.

#### <제2세부과제>

가. 메밀의 galactosyl 유도체로부터 *D-chiro*-inositol 획득방법 확립

- 1) Fagopyritol의 효소적 처리에 의한 가수분해  
모든 fagopyritol은 green coffee bean으로부터 나오는  $\alpha$ -galactosidase에 의해 쉽게 가수분해 되어지는 것으로 알려져 있으므로 상업적으로 생산되고 있는 green coffee bean으로 부터의  $\alpha$ -galactosidase를 사용하여 fagopyritol의  $\alpha$ -galactosyl linkage를 끊어서 galactosyl 유도체(fagopyritol)로부터 *D-chiro*-inositol을 얻어낼 수 있다. 이 효소가 fagopyritol로 부터 *D-chiro*-inositol을 얻어낼 수 있는 최적조건을 확립한다.
- 2) Fagopyritol의 산 처리에 의한 가수분해  
Fagopyritol의 산처리에 의한 가수분해는 trifluoroaceticacid(TFA)에 의해 수행 되어진다. 산처리 시 처리 온도와 시간 산의 농도를 변화시켜서 fagopyritol로부터 *D-chiro*-inositol 을 얻기 위한 최적 조건을 수립하고 효소적 처리에 의한 가수분해의 결과와 비교 분석한다.
- 4)  $\alpha$ -galactosidase의 고정화:  
 $\alpha$ -galactosidase의 고정화방법을 확립하고, galactosyl 유도체로부터 *D-chiro*-inositol을 분리하여 화학적 방법으로 사용된 산처리에 의한 가수분해 방법과 고정화



과정을 거치지 않은  $\alpha$ -galactosidase 처리 시의 D-chiro-inositol 분리의 효율성을 비교하여 본다. 아래 Fig. 1은 효소고정화의 방법들을 보여 주고 있으며, Fig. 2는 cross-linking에 가장 흔하게 쓰이는 시약을 작용기작을 보여 주고 있다.

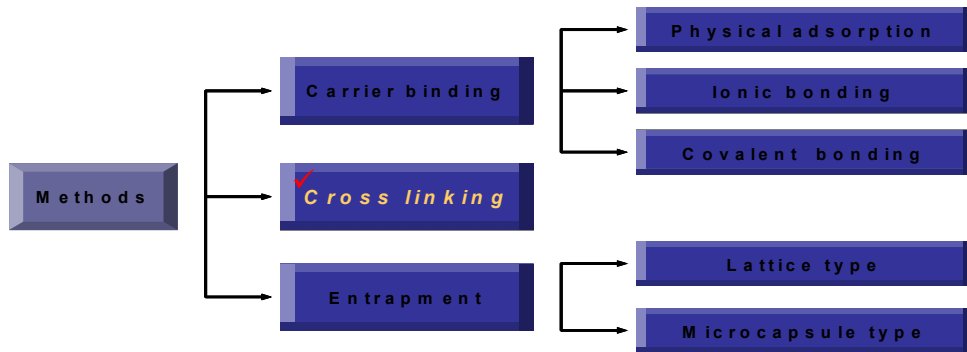


Fig. 1. Methods for enzyme immobilization

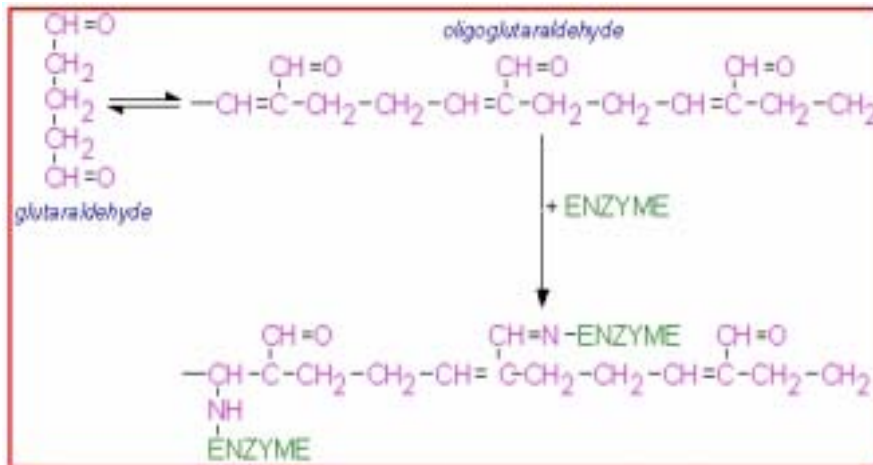


Fig. 2. The most common reagent used for cross-linking

<제 3과제>

가. 순블로부터 분리된 D-chiro-inositol의 정량 및 동물실험

나. HPLC 및 GC-MS를 이용하여 D-chiro-inositol 및 D-pinitol 정량하였다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### <제1세부과제>

#### 1. Myo-inositol methyltransferase (IMT) 유전자의 분리

가. 염생식물인 *Mesembryanthemum*에서 cloning 된 IMT와 아미노산 서열 특히 기질 결합 부위가 유사한 대두 EST를 NCBI에서 검색한 후 해당 EST를 확보하여 DNA 염기서열 결정을 통해 full sequence를 확인한 후 번역하여 *Mesembryanthemum*의 IMT와 매우 유사한 두 개의 clone을 선발하였다. 선발된 EST를 PCR로 증폭한 후 *E. coli* expression vector에 cloning 한 후 대량 발현을 하였다. 발현된 단백질을 SDS-PAGE를 통해서 확인한 후 GC-FID를 통하여 기질 특이성을 확인하였다.

#### 2. Ononitol 과 pinitol 의 분리

가. OEP를 분리하기 위하여 OEP의 기질과 ononitol과 산물인 pinitol을 구별할 필요성이 있다.

1) 순수 ononitol과 pinitol을 구입한 후 circular dichroism (CD)를 통해서 이성질체인 두 물질을 구별할 수 있었다.

#### 3. Ononitol epimerase (OEP) 유전자의 분리

가. ononitol epimerase (OEP) 유전자가 염, 가뭄 스트레스에 의해 induction된다는 사실에 근거하여 soybean EST homepage (<http://129.186.26.94>)에서 염 처리한 library와 가뭄 처리한 library에서 많이 발현하는 EST를 검색하였다. 그 중 NAD-dependent epimerase를 하나 검색하였고 NCBI에서 제공하는 2BLASTN을 통하여 full length EST clone과 sequence를 확보하였다. 또한 full length EST clone을 Iowa State University의 Dr. Shoemaker로부터 제공받아 염기서열을 분석한 결과 *in silico* 상에서 찾은 full length sequence와 일치하는 것을 확인하였다

나. Putative OEP cDNA의 specific한 primer를 제작하고, PCR을 통해 증폭한 후 여러 단계의 cloning을 거친 후 최종적으로 *E. coli* expression vector에 삽입한 후 대량 발현시켜 SDS-PAGE를 통해서 확인하였다. 이후 GC-FID를 이용하여 기질특이성을 확인하였다.

#### 4. IMT 유전자와 OEP 유전자를 효모로의 도입

IMT 유전자와 OEP 유전자 분리 후 yeast expression vector에 삽입 후 효모를 형질 전환 하였다. 이후 GC-FID를 통하여 형질 전환체의 활성을 확인하였다.

## <제2세부과제>

### 1. 두부와 콩으로부터 pinitol과 D-chiro-inositol의 최대화 추출분리방법 확립

두부 제조 시 세 가지 공정의 변화를 통하여 두부로부터 순물로 이행되는 pinitol, D-chiro-inositol, myo-inositol의 함량의 차이를 알아보고자 하였다. 첫 번째로는 두부 제조 시 대두의 수침시간에 따른 수용성 당류의 이행과 두부수율의 변화에 관한 보고를 참조하였다. 예를 들면, glucose의 경우 수침시간이 증가함에 따라 현저히 증가하며, raffinose의 경우 수침시간이 감소함에 따라 감소하여 대두에서 두유로 이동함을 보여주고 있다. 따라서 수침시간에 따라, pinitol, D-chiro-inositol, myo-inositol 등의 수용성 당류의 함량이 변화할 가능성이 있다고 예상되었다. 수침시간은 1시간, 3시간, 5시간, 10시간, 15시간, 20시간으로 구분하여 수침시켰다. 현재 시중에서 두부제조에 많이 이용되는 US. No. 1 품종을 대상으로 위와 같이 수침시간을 변경시켜 보았다.

두 번째로는 대두를 수침 시킨 후 마쇄정도에 따라 유효성분의 수용성당류가 순물로 이동되는 함량변화를 관찰하였다. 마쇄정도는 2분, 4분, 6분으로 구분하여 공정을 변화시켰다. US. No. 1 품종을 대상으로 위와 같이 마쇄시간을 변경시켜보고, 가장 최적화된 마쇄시간을 확립하여 한국산 콩 12품종에 적용시켜 유효성분의 정량분석을 실시하였다.

세 번째로는 응고제로서  $\text{CaCl}_2$ 와  $\text{MgCl}_2$ 를 사용하였다. US. No. 1 품종을 대상으로 응고제를 변경시켜보고, 가장 적당한 응고제로 한국산 콩 12품종에 적용시켜 유효성분의 정량분석을 실시하였다. 예비실험에서는  $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ 도 응고제로서 사용하였으나 물에 불용성염을 형성함으로 인하여 두유에 적절히 섞이는데 문제점이 있음에 따라서 유효성분이 순물로 이행되는 정도가 불규칙이어서 사용하지 않았다. 상기 실험에서 확립된 최적의 수침시간, 마쇄시간과 응고제를 사용하여 한국산 콩 12품종에 적용시켜 유효성분의 정량분석을 아래와 같이 실시하였다.

#### 가. 두부제조 및 순물 획득

US No. 1 품종의 대두 100 g을 500 ml의 증류수에 수침시간 1시간, 3시간, 5시간으로 10시간, 15시간, 20시간으로 각각 구별하여 수침시켰다. 수침 후 콩에 다시 500 ml의 증류수를 부어 총 대두의 양에 10배가 되게 가수한다. 믹서에서 2분, 4분, 6분으로 구분하여 마쇄한다. 마쇄된 콩을  $90\sim 100^\circ\text{C}$ 에서 10분 동안 계속 교반하면서 가열한다. 가열된 두미와 두유를 여과하여 두유만 획득하여 두유에  $\text{CaCl}_2$  혹은  $\text{MgCl}_2$ 를 원래 콩 무게의 2%(2 g)을 넣어주고  $70\sim 75^\circ\text{C}$ 에서 다시 20분 동안 가열하여 응고시킨다. 아래의 Fig. 3과 같이 높이 360 mm, 지름 50 mm인 PVC관에 지름 49 mm(950g)의 추로 20분 동안 압축하여 두부를 성형하고 PVC관 아래로 순물을 분리한다.

#### 나. 두부 순물의 분석

두부 제조로부터 만들어진 순물을 에탄올과 1:1로 혼합하여 3000 rpm에서 25분 동안 원심분리하여 상등액을 취한다. 이 상등액을 다시 10,000 M.W. cut-off filter를 통해 2000g로 원심분리 시킨다. 이 여과액의 1.4 ml을 1.5 ml screw cap tube에 옮기고

internal standard로 phenyl- $\alpha$ -D-glucoside (20  $\mu$ g)을 각각의 시료에 첨가한다. 각각의 시료를 진공 증발기(speed vac)를 사용하여 물을 제거하고, 다시 phosphorus pentoxide와 함께 dry oven에서 overnight하여 수분을 완전히 제거한다. 수분제거 후 trimethylsilyl-imadazole:pyridine mixture (1:1, v/v)를 처리시킨 후 22°C에서 20분 이상 방치한다. Derivatization되어진 시료를 gas-chromatography(Hewlett Packard 5890A)를 이용하여 분석하는데, split mode injector(1:70)

**Fig. 3. 두부성형틀--->**

에서 1 $\mu$ l를 injection하였다. Gas-chromatography의 column으로 HP-1capillary column(25m length, 0.25mm ID, 0.25 $\mu$ m film thickness)을 사용하였고, 초기온도 150°C에서 3°C/min의 속도로 200°C까지 맞추어 5분간 유지한 다음, 다시 7°C/min의 속도로 300°C까지 맞추어 10분을 유지시킨다.



## 2. 메밀로부터 fagopyritol B1 표준물질 추출 정제 및 최대화

### 가. 메밀로부터 유효성분 추출

시중에서 판매되는 메밀을 구입하여, 2분 동안 마쇄하여 메밀 분말을 획득하였다. 획득한 분말은 완전히 균질화 하여 각각 마쇄 시간별로 메밀 10g을 칭량하여 EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1, V/V) 50ml로 8시간 이상 shaking 하여 수용성 성분들을 추출한다. 추출 후, 25°C에서 3200rpm으로 30분 동안 원심 분리하여 상층액만 분리한다. 분리 후 에탄올 성분을 제거하고 추출액의 부피를 줄이기 위하여 40°C에서 vacuum evaporator를 사용하여 메밀 성분을 추출한 50% EtOH 용액을 농축하였다.

### 나. Non-carbohydrate components 제거

농축한 메밀 추출액을 diatomaceous earth plate filter에 통과시킨 후, non-carbohydrate components를 제거하기 위하여 polyvinylpolypyrrolidone(PVPP)를 처리하고 원심 분리하여, 다시 10,000 M.W. cut-off filter를 통해 2000g로 원심분리시킨 후, bentonite와 ion-cxchange resin을 통과시킨다. Ion-cxchange resin은 주로 전하를 띤 각종 수용성 단백질 및 peptide를 제거하기 위하여 사용되는데, mixed strong anionic and cationic resin인 Amberlite MB-150(sigma)을 사용하였다. Column bed는 25×900mm를 사용하였으며, 이러한 양쪽성 전하를 가진 resin을 24inch 까지 충전시켜 사용하였다 (Fig. 4). Non-carbohydrate components를 제거한 메밀 추출액은 5일 동안 동결 건조하여 수분을 완전히 제거하였다.

### 다. Fagopyritol B1 분리 정제

단백질 등의 non-carbohydrate components를 제거한 메밀 추출액의 동결건조물을 최소한의 증류수에 녹이고, baker's yeast로 37°C에서 하루 incubation 시켜서 sucrose를 제거한다. Soluble carbohydrate가 포함된 sample을 carbon(Darco G60)과 celite 545-AW(supelco), 1:1(v:v)의 고정상으로 충전된 43×360mm column 상에서

chromatography를 실시한다 (Fig. 5). Monosaccharide를 제거하기 위하여 1.0L의 물로 elution하며, 다시 4%의 EtOH로 elution하여 galactinol과 fagopyritol B1을 얻어낸다. Galactinol과 fagopyritol B1을 포함한 sample을 evaporation하여 EtOH 성분을 제거하고 다시 동결 건조하여 최소한의 증류수에 녹여서 carbon(Darco G60)과 celite 545-AW (supelco), 1:1(v:v)의 고정상으로 충전된 25×900mm column상에서 다시 chromatography를 실시하였다.

#### 라. 국내산 메밀 3 품종에 대한 fagopyritol B1 최대 추출

한국산 메밀 3품종(양절메밀2호, 양절메밀, 대산메밀)에서 함유하고 있는 fagopyritol B1을 최대로 분리하기 위하여, 추출하기 전 마쇄시간을 1분, 2분, 4분으로 구분하여 sample을 준비하였다. 각각의 마쇄시간별로 준비된 sample을 완전히 균질화 하여 각각 마쇄 시간별로 메밀 10g을 칭량하여 EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1, V/V) 50ml로 8시간 이상 shaking 하여 수용성 성분들을 추출한다. 추출 후, 25℃에서 3200rpm으로 30분 동안 원심 분리하여 상층액만 분리한다. 분리 후 에탄올 성분을 제거하고 추출액의 부피를 줄이기 위하여 40℃에서 vacuum evaporator를 사용하여 메밀 성분을 추출한 50% EtOH 용액을 농축한다. 농축한 메밀 추출액을 diatomaceous earth plate filter에 통과시킨 후, non-carbohydrate components를 제거하기 위하여 polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)를 처리하고 원심 분리하여, 다시 10,000 M.W. cut-off filter를 통해 2000g로 원심분리 시킨 후, bentonite와 ion-exchange resin을 통과시킨다. non-carbohydrate components를 제거한 메밀 추출액은 5일 동안 동결 건조하여 수분을 완전히 제거하였다.

#### 마. Gas-chromatography를 통한 각 품종별 fagopyritol B1 함유량 분석

품종별, 마쇄시간별로 준비되어 동결 건조된 각각의 sample을 다시 1ml의 증류수에 녹여 완전히 균질화 한 후, silylation vial(supelco)로 옮기고, internal standard로 phenyl- $\alpha$ -D-glucoside(20 $\mu$ g)을 각각의 시료에 첨가한다. 옮겨진 각각의 sample을 nitrogen evaporator(mini-vap 6-port, supelco)를 사용하여 물을 제거한다. 잔여 수분을 완전히 제거하기 위하여, phosphorus pentoxide (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)가 담긴 desiccator에서 overnight 시킨다. 수분제거 후 trimethylsilyl-imadazole : pyridine mixture (1:1, v/v)를 처리시킨 후 70℃ heating block에서 30분간 반응시켜 silylation후 20분 이상 상온에서 방치한다. Derivatization되어진 시료를 gas-chromatography(Hewlett Packard 5890A)를 이용하여 분석하는데, split mode injector(1:50)에서 1 $\mu$ l를 injection하였다. Gas-chromatography의 column으로 HP-1 capillary column(25m length, 0.25mm ID, 0.25 $\mu$ m film thickness)을 사용하였고, 초기온도 150℃에서 3℃/min의 속도로 200℃까지 맞추어 5분간 유지한 다음, 다시 7℃/min의 속도로 300℃까지 맞추어 10분을 유지시킨다. injector 온도는 280℃에서 수행되었고 detector 온도는 300℃에서 수행되어졌다.

### 3. 메밀의 bran으로부터 fagopyritol B1 최대 추출 및 정제

메밀의 bran에는 비교적 높은 농도의 fagopyritol이 있다. 2차 연도 실험에서는 메밀의 전체 성분에서 fagopyritol을 분리하여 함량성분이 낮았으며 이 때문에 3차 연도에서는 hull을 제거한 메밀의 bran만 따로 획득하여서 실험에 사용하였다.

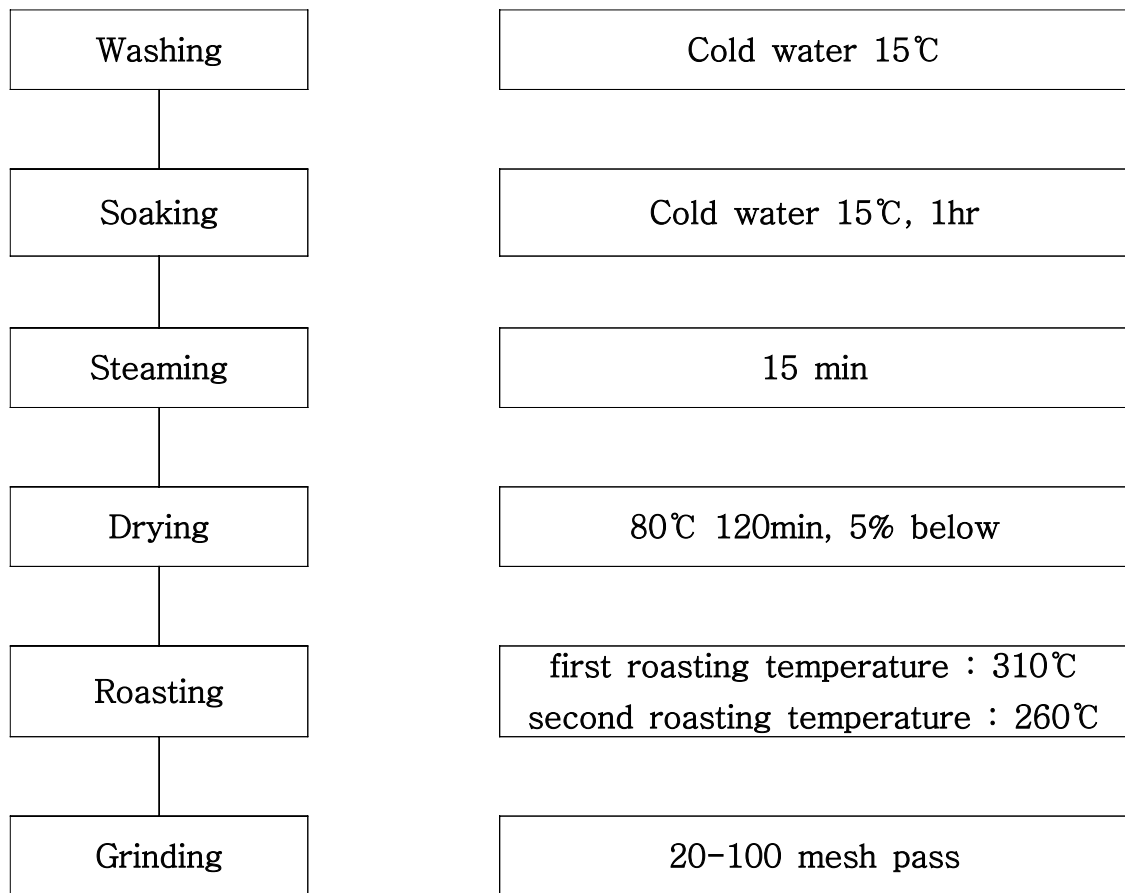


Fig. 4. Scheme for preprative process of buckwheat bran

가. 메밀의 볶음(roasting) 조건

메밀 원료를 전처리하는 15분간 세척하여 15°C 냉수로 침지하여 불순물을 제거하고, 찹솔에서 15분간 증자한 후 건조하였다. 건조는 드라이오븐 80°C에서 2시간 건조 후 실온에서 17시간 실시하였다. 볶음은 popping 효과를 주는 1차 볶음을 310°C에서 하고 2차 볶음은 260°C에서 각각 15분간 실시하였다. 볶음공정 후 blender (Waring, USA)으로 볶음 메밀을 분쇄하였다. 분쇄된 분말을 20mesh sieve를 통과한 시료 중 100mesh sieve를 통과하지 않은 것을 사용하였다 (Fig. 4). 상기한 시료는 이전의 방법 보다 농축된 bran을 가지고 있는 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

나. 메밀의 유효성분 추출

상기한 선별된 분말은 internal standard인 phenyl- $\alpha$ -D-glucoside(25mg)과 함께 완전히 균질화 하여 각각 마쇄 시간별로 메밀 5g을 칭량하여 10개의 cornical tube(총50g의 sample)에 옮겨 담은 후, EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1, V/V) 25ml으로 맞추고 shaking 하여 수용성 성분들을 추출한다. 같은 과정을 두 번 반복하여 총 500ml추출 후, 25°C에서 3200rpm으로 30분 동안 원심 분리하여 상층액만 분리한다. 분리 후 에탄올 성분을 제

거하고 추출액의 부피를 줄이기 위하여 40℃에서 vacuum evaporator(EYELA, Japan)를 사용하여 메밀 성분을 추출한 50% EtOH 용액을 농축하였다.

#### 다. Non-carbohydrate components 제거

농축한 메밀 추출액을 diatomaceous earth를 30mm×100mm의 coloum에 충전시켜 통과시킨 후, 메밀에 다량 함유된 small phenolic compounds를 제거하기 위하여 polyvnylpyrrolidone(PVPP, SIGMA)를 처리한다. PVPP는 sample 0.2g/100ml의 농도로 처리하였으며, 충분히 shaking후 37℃에서 3시간 이상 incubation한 후, 25℃에서 15,000rpm으로 30분간 원심 분리하여 상등액만을 취하여 PVPP를 제거하여 준다. 불순물과 여러 가지 phenolic compounds를 제거한 sample을 10,000 M.W. cut-off filter를 통해 2000g로 원심분리 시킨 후 여과된 smaple을 다시 ion-cxchange resin을 통과시킨다. Ion-exchange resin은 주로 전하를 띤 각종 수용성 단백질 및 peptide를 제거하기 위하여 사용되는데, mixed strong anionic and cationic resin인 amberlite MB-150(SIGMA)을 사용하였다. Column bed는 25×900mm를 사용하였으며, 이러한 양쪽성 전하를 가진 resin을 24inch 까지 충전시켜 사용하였다. Non-carbohydrate components를 제거한 메밀 추출액은 5일 동안 동결 건조하여 수분을 완전히 제거하였으며, 동결건조물을 용해할 수 있는 최소량의 3차 증류수로 녹여서 non-carbohydrate components를 제거한 sample을 만들었다.

#### 라. Fagopyritol B1 분리 정제

단백질 등의 non-carbohydrate components를 제거한 메밀 추출액의 동결건조물을 최소한의 증류수에 녹이고, baker's yeast로 37℃에서 하루 incubation 시켜서 sucrose를 제거한다. Soluble carbohydrate가 포함된 sample을 carbon(Darco G60)과 celite 545-AW(supelco), 1:1(v:v)의 고정상으로 충전된 43×360mm column 상에서 chromatography를 실시한다. Monosaccharide를 제거하기 위하여 1.0L의 물로 elution 하며, 다시 4%의 EtOH로 elution하여 galatinol과 fagopyritol B1을 얻어낸다. Galatinol과 fagopyritol B1을 포함한 sample을 evaporation하여 EtOH 성분을 제거하고 다시 동결 건조하여 최소한의 증류수에 녹여서 carbon(Darco G60)과 celite 545-AW(supelco), 1:1(v:v)의 고정상으로 충전된 25×900mm column상에서 다시 chromatography를 실시하였다. 위의 과정을 거친 sample은 다시 동결 건조하여, gas-chromatography를 통한 분석과 산 혹은 효소에 의한 가수분해를 위하여 최소량의 액상으로 보관한다.

#### 마. gas-chromatography를 통한 Fagopyritol B1 및 D-chiro-inositol 함유량 분석

Derivatization과정은 위에서 기술된 바와 동일하게 이루어지며, Derivatization되어진 시료를 gas-chromatograpy(Simazu-17A, JAPAN)를 이용하여 분석했는데, split mode injector(1:50)에서 1 $\mu$ l를 injection하였다. Gas-chromatograpy의 column으로 DB-5 capillary column(30m length, 0.25mm ID, 0.25 $\mu$ m film thickness)을 사용하였고, 초기 온도 150℃에서 3℃/min의 속도로 200℃까지 맞추어 5분간 유지한 다음, 다시 7℃/min의 속도로 300℃까지 맞추어 10분을 유지시킨다. Injector 온도는 280℃에서 수행되었고 detector 온도는 300℃에서 수행되어졌다.

#### 4. 산 가수분해에 의한 galatosyl 유도체로부터의 D-chiro-inositol 획득

여러 가지 정제과정을 통해 분리된 galatosyl 유도체인 fagopyritol을 함유한 액상을 100ul를 취하여 silylation vial로 옮기고, 2N trifluoro acetic acid(TFA)를 100ul 처리하여 30분 동안 70°C의 water bath에서 incubation 시켜서 가수분해를 시킨다. TFA의 처리에 의하여 fagopyritol B series(Fig. 5)의  $\alpha$ -galactosyl linkage을 분해함으로써 D-chiro-inositol을 얻을 수 있다.

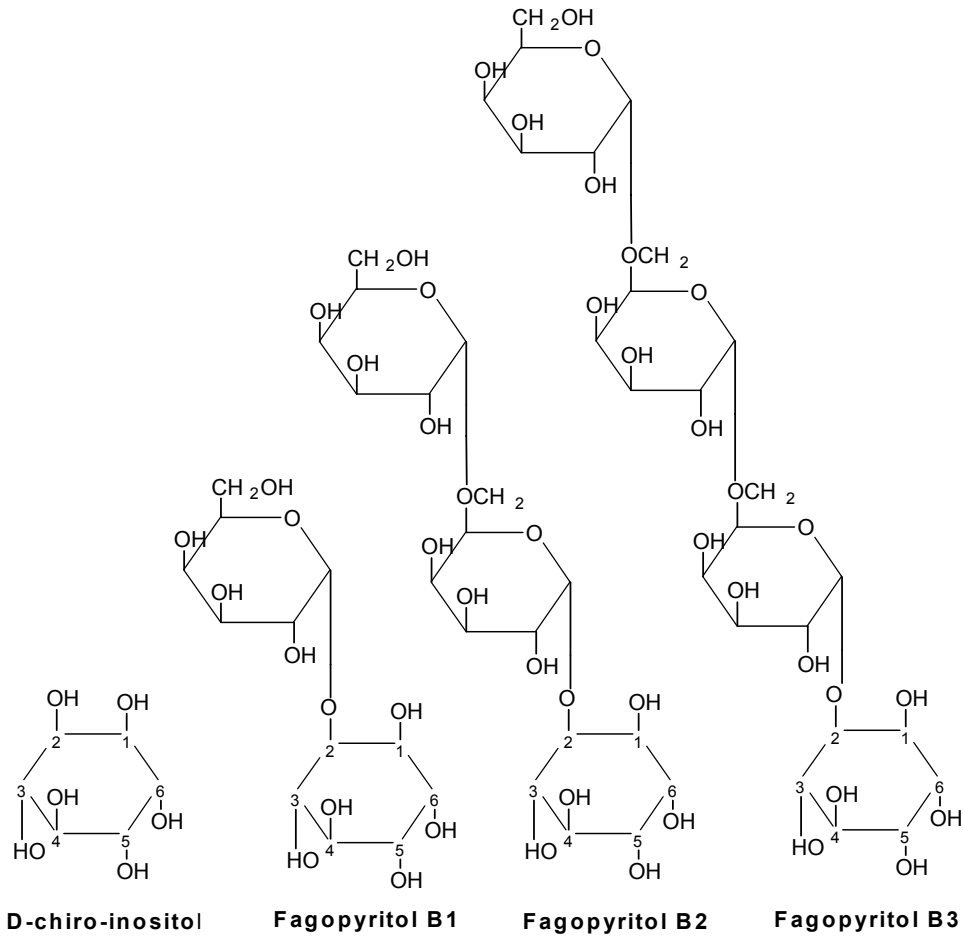


Fig. 5. Fagopyritol B series

#### 5. $\alpha$ -Galactosidase assay

가. pH와 온도의 효과에 따른  $\alpha$ -galactosidase의 기능

$\alpha$ -galactosidase(Sigma, USA)의 활성은 *p*-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-galactoside assay에 의해 실험되었다. 50mU/ul 농도의  $\alpha$ -galactosidase 5ul를 95ul의 서로 다른 pH (pH= 5.5, 6.4, 7.5)를 나타내는 50mM의 potassium phosphate에 희석했다. 이렇게 희석된 효소 100ul에서 24ul를 취하여, 1176ul의 서로 다른 세 가지 pH를 가진 50 mM의 potassium phosphate buffer에 다시 희석하고, *p*-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-galactoside(1mM, 300ul)를 반



응시켜 실험하였다. pH=6.5에서 15°C, 25°C, 40°C 세 가지 온도 범위에서 시간의 따른 효소 활성과, 25°C에서 pH=5.5, 6.5, 7.4의 세 가지 pH 범위로 효소의 활성을 405nm에서 흡광도를 측정하여 실험하였다.

## 6. $\alpha$ -Galactosidase immobilization

### 가. $\alpha$ -Galactosidase의 cross-linking method

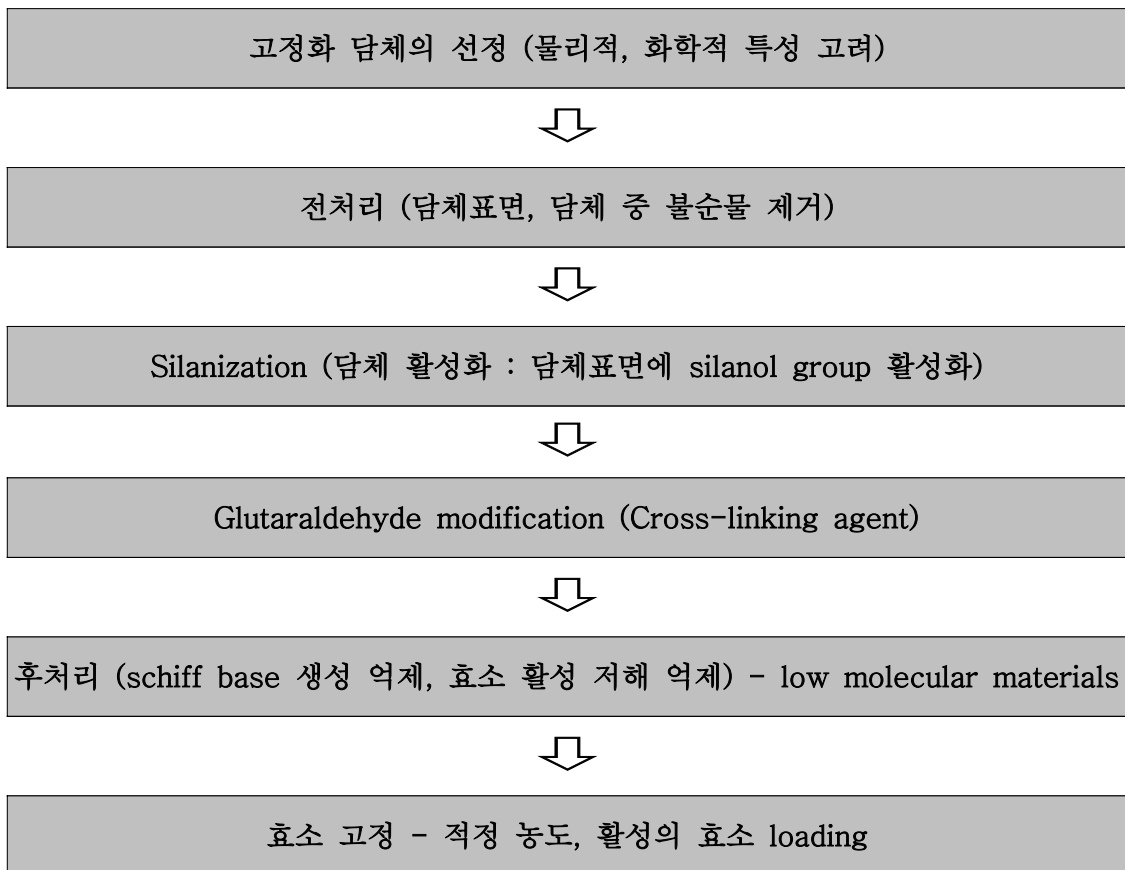


Fig. 6.  $\alpha$ -Galactosidase의 cross-linking method scheme

### 나. 고정화 step 별 최적 조건 수립

#### 1) 담체 전처리

전처리는 담체 표면이나 담체와 섞여 있을 수 있는 불순물을 제거하기 위한 목적으로 행해진다. 몇 가지 시약에 대해서 전처리를 수행하고, silanization yield와 glutaraldehyde modification yield를 관찰함으로써 최적의 조건을 수립하고자 하였다. 실험은 11개의 종류와 농도가 각각 다른 전처리 시약에 대한 silanization과 glutaraldehyde modification 수율을 구하여 보았다. Silanization과 glutaraldehyde modification yield는 담체를 실제로 효소와 binding 하기 전에 처리해 주는 과정으로,

효소 고정화의 수율에 직접적인 연관이 있다.

## 2) Silanization

Silanization 과정은 담체 표면에 silane group을 형성해 줌으로써 실제로 효소가 binding 될 수 있도록 담체를 활성화(activation)시키는 과정이다. 가장 많이 사용되고 있는 silanization reagent 인 3-APTES 와 3-APTMS를 처리하여 효소 고정화를 마친 뒤 효소의 활성을 비교하여 보았다. 전처리 과정을 마친 담체를 silica-gel의 산화를 막을 수 있는 온도인 120℃에서 완전히 건조시킨 다음, acetone을 용매로 하여 3-APTES (3-AminoPropylTriEthoxylSilane) 10% 용액으로 50℃, 2시간 동안, shaking water bath에서 150 oscillation/min 으로 반응시켰다.

## 3) Glutaraldehyde modification

Glutaraldehyde는 효소 고정화에 있어서 cross-linking agent로 널리 쓰이고 있다. 그러나 glutaraldehyde 용액에 있는 어떤 불순물이나, 작용기들끼리 서로 결합하여 생기는 schiff base들은 고정화된 후의 효소의 활성이나, 그 활성 재생에 영향을 줄 수 있다. 또, 반응의 조건들에 따라서도 효소의 활성에 큰 영향을 줄 수 있기 때문에, 그에 대한 최적점을 찾는 것이 필요했다. 선행 연구자의 연구 결과를 참조하여 25분, 60℃, pH 7, glutaraldehyde 2% 용액을 기준값으로 취하여 실험을 수행하였다.

## 4) 후처리

Glutaraldehyde는 Schiff base를 형성할 수 있고, 자체적으로 독성을 가지고 있다. 만약, 효소의 특정 부분이 아민기들이 담체 표면의 glutaraldehyde 표면에 결합하지 않는다면, 결합되지 않은 glutaraldehyde 작용기들은 이미 고정화되어 있는 효소의 임의의 부분에 결합하여 효소의 활성을 떨어뜨리는 주요 원인이 된다고 알려져 있다. 적절한 reducing reagent의 첨가는 schiff base의 형성을 방해하고, 적정 수준의 glutaraldehyde 작용기를 유지할 수 있게 해주므로 후처리는 필수 불가결한 과정이라고 할 수 있다. L-lysine, Ethanolamine, glycin, BSA(Bovin Serum Albumin) 등의 비활성 저분자물질들을 이용하여 미반응 glutaraldehyde 작용기를 제거하여 주어 효소 활성의 향상과 안정성을 증대시킨다.

## 5) $\alpha$ -galactosidase immobilization

각각의 고정화 step에서의 최적화된 조건 하에서 상용효소인  $\alpha$ -galactosidase(from green coffee bean, sigma)를 고정화 하였다. 35% 과산화수소를 이용, 25℃에서 2시간동안 전처리한 담체를 10% 3-APTES, 50℃조건에서 담체의 activation 과정을 거치고, 2% glutaraldehyde를 60℃에서 처리하여 마지막으로 담체에  $\alpha$ -galactosidase를 loading하였다. 이와 같은 실험 과정을 거쳐  $\alpha$ -galactosidase를 silica-gel에 고정화 하였다.

## 7. Free $\alpha$ -galactosidase 와 immobilized $\alpha$ -galactosidase 의 stability 비교

Free  $\alpha$ -galactosidase 와 immobilized  $\alpha$ -galactosidase를 각각 40℃와 25℃에서 incubation 시키고 0시간부터 30시간까지의 stability를 측정하였다. 각각의 시간별 sample을 취하여 25℃에서 5분간 기질과 반응시켜서 상대 속도를 측정하였다.

8. Free  $\alpha$ -galactosidase에 의한 galactosyl 유도체로부터의 D-chiro-inositol 획득  
상업적으로 판매되는  $\alpha$ -galactosidase의 경우에는 3.2M의 ammonium sulfate에 보관되어 있는데 ammonium sulfate는 gas chromatography를 이용한 분석시에 수행되어지는 silylation 반응을 방해하여 부정확한 분석결과를 도출하기 때문에 제거되어야 하는데, 통상적으로 사용되는 염을 제거하는 dialysis의 경우에 enzyme의 손실이 예상되며, 또한 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 본 실험에서는 염을 제거하기 위해 10,000 cut-off spin column을 사용하며, 증류수로 5-7회 elution과정을 거쳐서 ammonium sulfate를 제거한다. ammonium sulfate가 제거된 enzyme 0.1ml와 물에 녹아있는 수용성 당류 0.1ml를 위에서 확립되어진  $\alpha$ -galactosidase의 최적화 조건 pH=6.5, 25℃에서 24시간동안 반응시킨다. 반응물에 internal standard를 첨가하고, 물을 제거하여 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.
9. Immobilized  $\alpha$ -galactosidase에 의한 galactosyl 유도체로부터의 D-chiro-inositol 획득  
위에서 확립된 조건으로 immobilization 되어진  $\alpha$ -galactosidase를 통해 galactosyl 유도체로부터 D-chiro-inositol을 획득하였다. 0.1g의 silica에 immobilization 되어진  $\alpha$ -galactosidase는 위에서 확립된 가수분해 최적 조건에 따라 실험하였으며, free enzyme의 분해능과 비교하여 보았다.

### <제3세부과제>

#### 1. pinitol 분리방법

콩 중에서 inositol의 이성질체 중의 하나인 pinitol이 상대적으로 많이 함유되어 있으므로 이 pinitol을 분획하여 효소 반응시켜 D-chiro-inositol을 생산 할 수 있다. 이점에 착안하여 pinitol을 공업적으로 경제성이 있는 수집방법을 먼저 개발하였다

- ① 순물 원수를 20 내지 30 ℃에서 수집하여 균질화 시킨다.
- ② 60℃ 내지 80℃로 살균한다.
- ③ 살균된 혼합물의 온도를 30 내지 40 ℃로 냉각한다.
- ④ 혼합물을 흡착수지에 흡착시키고, 60 내지 80 ℃의 물을 이용하여 수세한다.

예비 실험 단계에서 이온교환수지는 극성이 너무 커서 양이온, 음이온 수지 모두 적합하지 않아 비극성 수지인 흡착수지 HP 20, SP 825 (Samyang Co. Koea), XAD-7(Rhom & Hass co. USA)를 본 실험에 이용하였다.

- ⑤ 컬럼을 통과한 순물 여액을 30 내지 40 ℃로 유지시키면서 규조토 여과기로 통과 시킨다.

이때 규조토 여과기에 사용된 규조토는 파라셀 441과 파라셀 771 (Samson Co, Korea) 혼합 분말 (1kg, 무게 비 3 : 7)을 사용하였다. 이 과정에서의 도핑시간은 5-10분이 걸리고, 총 여과시간은 2-3시간이 소요된다.

- ⑥ 통과된 여액을 진공농축하고 이를 진공 건조한다.

## 2. Pinitol의 정제 방법

순물 (A)---> 살균---->여과----->레진 흡착----->규조토 여과---->농축  
여과 후 여액 (B) 흡착 후 여액 (C) 규조토 여과 후 여액 (D)

A, B, C, D 시점에서 샘플을 채취하여 pinitol 함량을 분석한 결과 모두 같은 값을 가졌다. 이는 생물학적 산소요구량 (BOD) 와 화학적 산소요구량 (COD)을 측정할 근거로 계산하면 약 30배 정제되어 있음을 알 수 있다.

## 3. 음이온 및 양이온교환수지를 이용한 분리방법

isoflavone과 saponin이 회수된 순물을 음이온과 양이온교환수지에 순차적으로 통과시켜 D-pinitol 및 D-chiro-inositol 유도체를 회수하는 공정의 개발

\*이온교환조건의 최적화: 이온교환수지 선택, flow rate, 온도, column의 조건 설정

\*탈착조건의 최적화: 탈착용매 및 용질의 선택 및 최적화

\*정제공정의 도식화

순물--->원심분리---->여과----->흡착수지----->음이온/양이온수지----->농축  
(이소플라본/사포닌) (CI/CI유도체)

풀무원 두부공장에서 위생배관수집을 통해 탱크에 모은 순물을 연속식 원심분리기 (6800rpm; 독일 Westfalia사의 Model SA 20-47-076)를 이용하여 고형물을 제거하고 흡착수지를 통과시켜 이소플라본과 사포닌을 회수하였다. 상기를 공정을 통과한 순물을 음이온/양이온수지를 통과해서 전하를 가진 불순물을 제거하고자 하거나 활성탄을 이용한 분리방법/ 제올라이트를 이용한 분리 방법과의 비교를 통하여 최종적으로 공정을 확립하고자 한다.

## 4. 불순물 제거 농축방법을 이용한 분리 방법

\*정제공정의 도식화

순물 수집 -> 원심분리 -> 흡착레진통과 -> 규조토 여과 -> (한외여과) -> 진공농축  
-> 냉동건조

상기한 가. 에서의 방법의 경제성이 낮음에 따라 상기와 같은 방법으로 정제공정을 확립을 시도하였다. 규조토 여과는 고분자 물질인 전분과 셀룰로스 등을 제거하는데 효율적이고 한외여과지는 더 작은 분자량 10,000 이상의 물질을 제거하는데 효율적이다. 한외여과 후 natural circulate type의 진공농축기를 이용하여 55℃에서 1시간 정도 농축하여 냉동건거기를 이용해 최종 분말을 얻었다.

## 5. D-pinitol과 D-chiro-inositol의 동정 및 정량

HPLC 및 GC-MS를 이용한 방법을 통하여 D-chiro-inositol 및 D-pinitol의 정량

## 6. 두부 순물로부터 D-pinitol 및 D-chiro-inositol 회수 공정 설비

### 가. 음이온 및 양이온교환수지를 이용한 분리방법

자연상태의 순물 중에는 D-chiro-inositol 이 거의 존재하지 않았다. 두부의 원재료인 대두 중에 거의 존재하지 않기 때문인 것으로 판단된다. 자연 상태의 순물중의 pinitol 농도는 약 0.03~0.05% 정도인데 이러한 저농도의 물질을 선택적으로 회수하는 데는 일반적으로 수지에 선택적으로 흡착시킨 후 다시 용출하여 회수하는 방법을 사용하는데, 그 목적물의 물리적 화학적 특성에 따라 적절한 성격의 수지를 사용하여야 한다. D-chiro-inositol과 D-pinitol은 5개 이상의 하이드록실기(OH)를 가진 분자량이 180Da, 194Da인 저분자 고리화합물로서 고농도분리회수가 까다로운 물질이다. 따라서 본 과제에서는 전제공정1에 따라 최상의 조건을 가진 수지를 공업적 공정에 도입하기 위하여 7가지의 수지를 선택하여 실험하였다. PK-228, WK-40, HP-20, XAD-1600, XAD-4, SP-850 등의 수지를 사용하였을 때 흡착효과가 거의 없었으며, 또한 불순물제거를 위하여 수지를 수세할 때 대부분 씻겨버리는 특성이 있었다. WA-30은 약산성수지인데도 불구하고 예상을 뒤엎고 흡착률이 가장 높았으며, 회수율 또한 매우 높았다. 그러나 회수하기 위하여 주정(식품용 발효알콜95%)을 사용하여도 용출되지 않아서 염산이나 가성 소다용액을 사용하여야 하는데 이때는 최종제품에 중화산물인 소금이 공정상 생성되어 잔존하게 되므로 제품의 건전성과 천연성을 저하시키는 요인이 된다. 실제로 WA-30을 사용하여 pinitol 함량이 20% 정도의 샘플을 얻을 수 있었으며, 이는 자연상태의 순물 중의 pinitol 농도 약 0.03~0.05%에 비하면 매우 높은 농축율이라 할 수 있지만, 10%이상의 염분이 잔존하였다.

수지컬럼의 순물의 이송속도는 1.5~2.0m<sup>3</sup>이 적절하였으며, 온도는 30~35℃가 가장 적절하였다. 용출용매로는 염산용액 보다 0.1N NaOH 용액이 적절하였으며, 용출량은 수지량의 5~6배의 부피가 적절하였다.

### < 정제공정 1 >

순물-->원심분리-->여과-->이소플라본 흡착수지-->음이온수지 (WA-30)-->용출 (0.1N NaOH)-->중화-->농축-- -->건조 -->분쇄

이와 같이 최종 제품 중에 pinitol 의 함량이 20%이상으로 높은 제품을 얻는 방법은 공정부산물인 소금이 10%정도 잔존하게 되어 동물실험에는 정제공정2에 따라 pinitol함량이 10%정도이지만 소금이 생성되지 않는 공정으로 얻은 제품을 사용하였다.

### < 정제공정 2 >

순물-->원심분리-->여과-->이소플라본 흡착수지-->규조토여과 -->농축 -->건조 -->분쇄

### 제 3 절 연구개발 결과 및 고찰

<제1세부과제>

#### 1. *myo*-inositol methyltransferase (IMT) 유전자의 분리

가. 염생식물인 *Mesembryanthemum*에서 cloning 된 IMT와 아미노산 서열 특히 기질결합

부위가 유사한 대두 EST를 NCBI에서 검색한 후 해당 EST를 확보하여 DNA 염기서열 결정을 통해 full sequence를 확인한 후 번역하여 *Mesembryanthemum*의 IMT와 매우 유사한 2개의 clone을 선발하여 full sequence를 확보하였다. 번역결과 첫 번째 clone은 open reading frame이 1054 bp이고 352 amino acid로 (Fig. 7 ) 두 번째 clone의 open reading frame은 1110 bp이고 369 amino acid로 구성되어 있다 (Fig. 8).

```

ATG CAC CTT AAA CAG GTT GAA GAA GAG CAA GAT GGT ATA CTT TTC GCC ATG AAC ATG ATG TCT 63
M H L K Q V E E E Q D G I L F A M N M M S 21
ACC ATG GTG TAT CCG TTT GTG GTT CCG ACC GCG ATT GAG TTA GGG ATC TTT GAC ATC ATA GCG 126
T M V Y P F V V R T A I E L G I F D I I A 42
AAA GCC GGT GAA GGT GCG AAG CTA TCA GCA GAG GAG ATT ATA GAG CAA CTT GGC ACA AAG AAC 189
K A G E G A K L S A G G I I E Q L G T K N 63
CCT GAA GCT CCC ACG ATG TTG GAC CCG CTT CTC AGG TTA TTG GCT AGT CAC TCC ATG CTA TCT 252
P E A P T M L D R L L R L L A S H S M L S 84
TCC TCT CTT GAT ACT GAA GAT CTC CAA CAT GGC CAA AAC TCT CCT AAG AGG CTC TAT AGT CTT 315
S S L D T E D L Q N G Q N S P K R L Y S L 105
ACC TAT GCT TCC AAG TAT TTT GTC ACT GAT GCT GAT GGT GTC TCG TTC GGA GCT ACC TTG AAC 378
T Y A S K Y F V T D A D G V S P G A T L N 126
TTA CTT CTT GAC AAG GTC TTC TTG GAA AGC TGG ACT GAA CTG AAA GGA GCC ATC TTG GAA GGG 441
L L L D K V F L E S W T E L K G A I L E G 147
GGT GTA GCA TTC AAC AGG GTT CAT TCC ATG CAC TCA TTT GAG TAC CCA GCA GTT GAT CCT AGG 504
G V A F N R V H S M H S F D Y P A V D P R 168
TTC AAT GAT GTT TTC AAC AAA GCT ATG TTC AAC CTT ACT ACT ATA GTC ATG AAG AGG GTT CTT 567
F N D V F W K A M F N L T T I V M K R V L 189
GAG TTT TAC GAA GGG TTT AAG AAC ATT AAT AGG CTT GTG GAT GAT GGT GGG GTT AAA TTT TTT 630
E F Y E G F K N I N R L V D D G G V K F F 210
GAC CTT GCC CCC ATG TCC AAT AGA AGC ATG GCT TCC CTA CAT ACC CCC GGT ATT CGA ACA TGT 693
D L V F M S N R S M A S L H T P G I R T C 231
AGG AGG AGA TAT GTT TTG AAG AAG TGT TCC CCA ACG GAA GAC CCC CAT TTT TTA TTA AAG TGG 756
R R R Y V L K K C S P T E D P H F L L K W 252
ATA CTT CCA CGA TTG GAA GTA ATG ACC CAA GCC TTA AAG TTG TTA AAG AAT TGT CAT AAA GCT 819
I L P R L E V M T Q A L K L L K W C H K V 273
ATT CCT AGT GAT GGA AAA GTG ATT GTT GTG GAC TTA ATT CTT CCC ATT TTG CCC GAG AGC ACA 882
I P S D G K V I V V D L I L P I L P E S T 294
GTT ACT GCT AAG AGT GGT TTC CAA GCT GAC CTC TTA ATG ATG ACT CAA AAC TCA GGA GGA AAA 945
V T A K S G F Q A D L L M M T Q N S G G K 315
GAG AGA ACC CAA CAT GAA TTC ATG GAA TTG GCA TTA AGT TCT GGA TTC AGT GGC ATC AAA ATC 1008
E R T Q H E F M E L A L S S G F S G I K I 336
GTT TGC AGT GTC TCT GGC TTC TGG GTT ATG GAA TTT TAT AAG TAA 1054
V C S V S G F W V M E F Y K STOP 350

```

Fig. 7 IMT와 기질 binding site가 유사한 putative soybean IMT1 cDNA의 open reading frame 염기서열 및 아미노산 서열







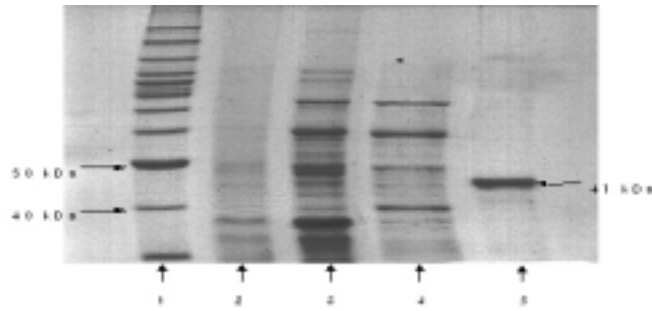


Fig. 10 SDS-PAGE를 통한 대량 발현 된 putative IMT의 분자량 확인 및 분리

- lane 1 : protein marker
- lane 2 : 빈 vector
- lane 3 : IPTG induction후 total protein
- lane 4 : wash 된 total protein
- lane 5 : 대량 발현되어 분리된 putative IMT

#### 다. Gas chromatography를 통한 기질 특이성 확인

대두 myo-inositol methyltransferase (IMT) 유전자가 도입된 BL21 cell line을 6시간 동안 IPTG induction하였다. 시행 후 10000g로 원심분리한 후 침전물을 취하여 extract buffer를 첨가한 후 3분 동안 초음파 분쇄기를 사용하여 cell를 분쇄시켰다. 이를 다시 12000g로 원심분리하여 상등액을 취했다. 상등액을 반응 buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) 및 기질인 myo-inositol과 함께 혼합하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 vial로 옮기고 control 및 각각의 sample을 nitrogen evaporator를 사용하여 물을 제거하였다. 잔여 수분을 완전히 제거하기 위하여, phosphorus pentoxide (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)가 담긴 desiccator에서 증발시켰다. 수분제거 후 trimethylsilyl-imadazole와 pyridine mixture (1:1, v/v) 400 μl를 처리시킨 후 70°C heating block에서 30분간 silylation 반응 후 20분간 상온에서 방치한다. Derivatization되어진 시료를 gas-chromatography를 이용하여 분석하였다. Split mode injector (1:50)에서 1 μl를 injection하였으며 gas-chromatography의 column으로 DB-1 capillary column (30 m length, 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness)을 사용하였다. Gas-chromatography의 초기온도는 150°C에서 2분간 유지 후에 1°C/min속도로 300°C 올린 다음 300°C에 맞추어 5분을 유지시킨다. injector 온도는 280°C에서 수행되었고 detector 온도는 300°C에서 수행되어졌다.

Gas-chromatography를 이용한 분석을 통해서 IMT의 활성을 확인하기 위하여 기질과 생성물들의 retention time을 먼저 확인하였는데 기질인 myo-inositol은 retention time이 8.635에서 peak가 생성되었고 ononitol은 retention time이 7.797에서 peak가 생성되었다 (Fig.11 ). 기질과 생성물의 retention time을 확인한 후 control을 empty vector + SAM + inositol로 (Fig.12-1) sample은 IMT + SAM + inositol (Fig.6-2)로 반응하였다. 결과적으로 빨간 원의 모습처럼 1시간 후에 an retention time이 7.557에서 ononitol이 생성됨을 확인할 수 있다 (Fig.12-2 ).

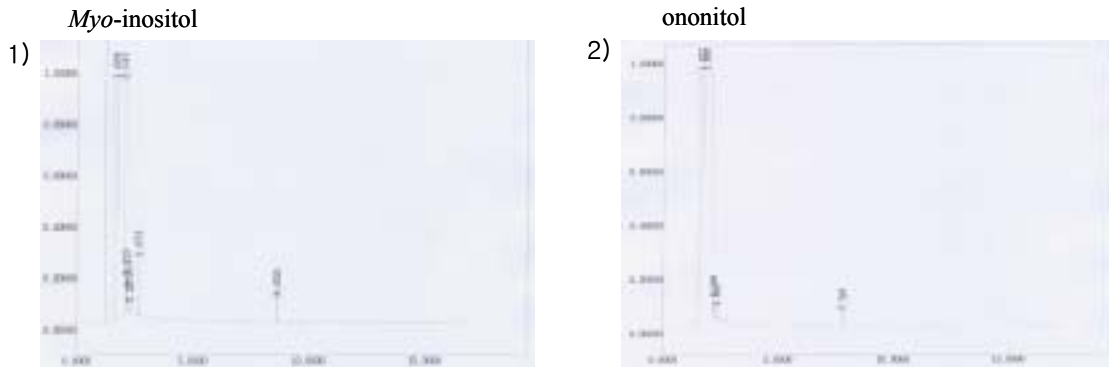


Fig. 11 *Myo*-inositol 과 ononitol의 Gas-chromatography 분석

- 1) *Myo*-inositol retention time
- 2) Ononitol retention time

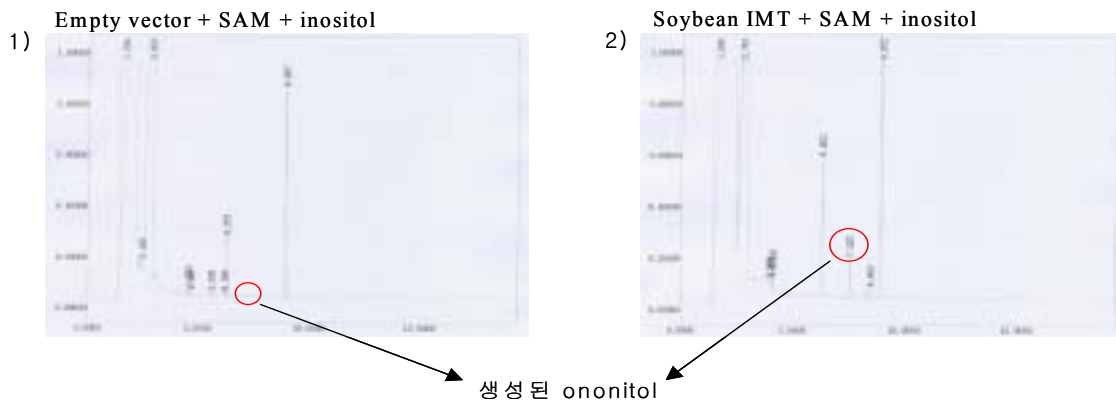


Fig. 12 Soybean IMT 효소반응을 통한 기질특이성 확인

- 1) 기질인 *myo*-inositol과 empty vector가 발현된 *E. coli*의 extract와 혼합한 후 37°C에서 1 hr 반응 후의 GC data
- 2) 기질인 *myo*-inositol과 soybean IMT 유전자가 발현된 *E. coli*의 extract와 혼합한 후 37°C에서 1 hr 반응 후의 GC data retention time 7.667 인 ononitol peak

라. RT-PCR을 이용한 soybean *myo*-inositol methyltransferase 유전자 발현 양상 분석  
*myo*-inositol methyltransferase 유전자가 salt condition에서 induction된다는 사실을 확인하기 위해 normal condition에서 1개월간 키운 soybean에 salt stress (250 mM NaCl)를 처리한 후 정해진 시간(1hr, 2hr, 4hr, 8hr, 12hr)에 각 잎과 뿌리에서 mRNA를 추출한 뒤 cDNA를 합성하였다. (total volume 25 $\mu$ l안에 total RNA (3 $\mu$ g), Oligo(dT)12-18mer primer (10 pmol), dNTP (2.5 mM), 10 $\times$  RT buffer, reverse transcriptase (NEB, 200unit) 1 $\mu$ l)와 같은 조성으로 mixture를 만들어 reaction하였다. 합성된 cDNA를 template로 하여 gene specific primer를 제작해서 PCR을 수행하였다. (total volume 50 $\mu$ l안에 합성된 cDNA (2 $\mu$ l), gene specific primer(10 pmol), ExTaq polymerase (TakaRa, 5unit), dNTP (10 mM) 10 $\times$  reaction buffer와 같은 조성으로

mixture를 만들어 reaction하였다. PCR 반응 조건은 최초 94°C에서 5min간 pre-heating한, 이후 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min으로 30 cycle 반응하였고, 마지막으로 72°C에서 10 min간 반응 시켰다.

### 제작한 primer sequence

Gene specific LB : 5' GGT ACC ATG GAG ACT GTT CTT 3'

Gene specific RB : 5' TCT AGA TCA GAT TGG AAA CGC 3'

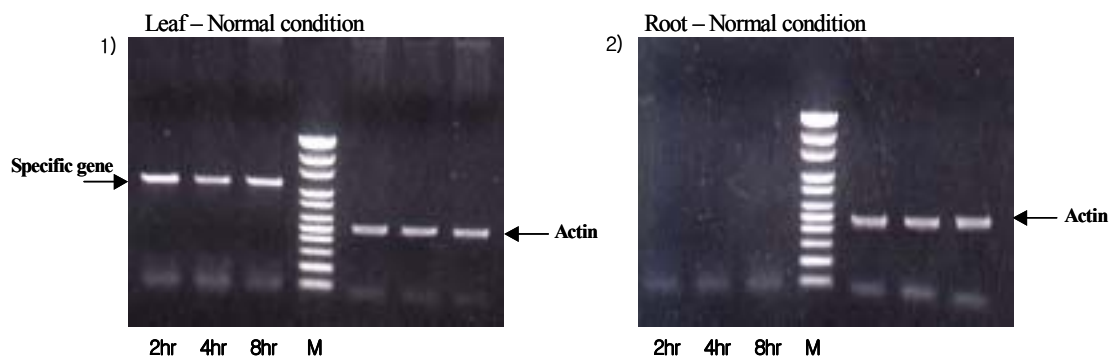


Fig. 13 RT-PCR을 이용한 IMT 유전자의 조직 특이적 발현 확인

1) M : Marker

lane 1 : Normal condition 2 hr 후의 leaf

lane 2 : Normal condition 4 hr 후의 leaf

lane 3 : Normal condition 8 hr 후의 leaf

2) M : Marker

lane 1 : Normal condition 2 hr 후의 root

lane 2 : Normal condition 4 hr 후의 root

lane 3 : Normal condition 8 hr 후의 root

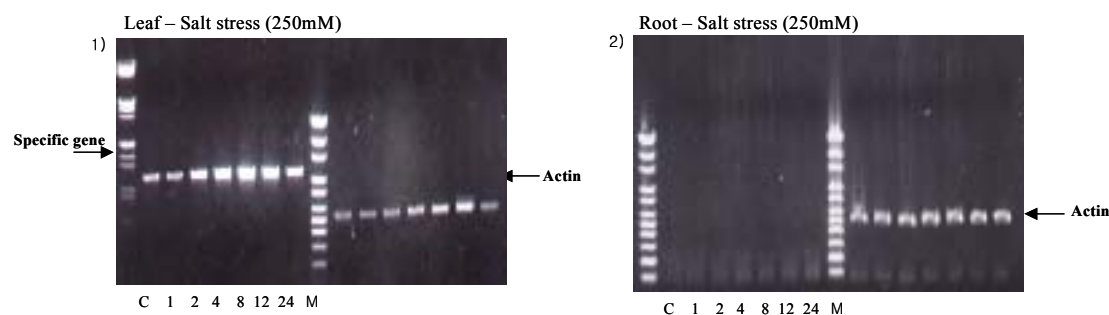


Fig. 14 RT-PCR을 이용한 IMT 유전자의 Salt stress에 대한 조직 특이적 발현 확인

1) M : Marker

lane 1 : Salt stress 0 hr 후의 leaf

lane 2 : Salt stress 1 hr 후의 leaf

lane 3 : Salt stress 2 hr 후의 leaf

lane 4 : Salt stress 4 hr 후의 leaf

lane 5 : Salt stress 8 hr 후의 leaf

lane 6 : Salt stress 12 hr 후의 leaf

lane 7 : Salt stress 24 hr 후의 leaf

2) M : Marker

lane 1 : Salt stress 0 hr 후의 root

lane 2 : Salt stress 1 hr 후의 root

lane 3 : Salt stress 2 hr 후의 root

lane 4 : Salt stress 4 hr 후의 root

lane 5 : Salt stress 8 hr 후의 root

lane 6 : Salt stress 12 hr 후의 root

lane 7 : Salt stress 24 hr 후의 root

확인결과 IMT 유전자는 뿌리보다는 잎에서 많이 발현되는 것을 확인 할 수 있었고, stress를 받은 2시간 이후부터 발현양이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 그림에는 나와 있지 않지만 drought stress를 처리한 조직을 가지고도 실험 해 본 결과 salt stress에서와 같은 pattern을 보였지만 salt stress 보다 많이 발현되지 않았다. 위의 실험결과 Fig.13, Fig.14를 보면 뿌리보다는 잎에서 발현이 되고 salt stress를 처리한 잎에선 시간이 지날수록 myo-inositol methyltransferase (IMT) 유전자의 발현 양이 증가하는 확인 할 수 있었다.

## 2. Ononitol과 pinitol 의 분리

가. OEP를 분리하기 위하여 OEP의 기질과 ononitol과 산물인 pinitol을 구별할 필요성이 있었다. OEP의 기질인 ononitol과 산물인 pinitol을 구별하기 위해 CD를 수행하였다. 이 결과 이성질체인 두 물질은 구별이 되는 것으로 확인 되었다. 순수 ononitol과 pinitol을 구입한 후 circular dichroism (CD)를 통해서 이성질체인 두 물질을 구별할 수 있었다 (Fig. 15).

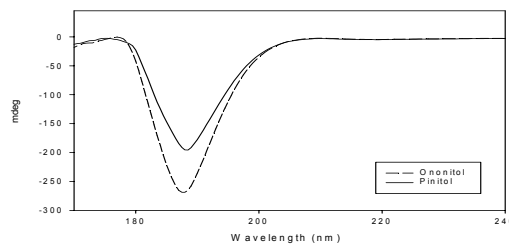


Fig. 15 Ononitol과 pinitol의 CD spectrum

## 3. Ononitol epimerase 유전자의 분리

가. Ononitol epimerase(OEP) 유전자가 염, 가뭄 스트레스에 의해 induction된다는 사실에 근거하여 soybean EST homepage (<http://129.186.26.94>)에서 염 처리한 library와 가뭄 처리한 library에서 많이 발현하는 EST를 검색하였다. 그 중 NAD<sup>+</sup>-dependent epimerase를 하나 검색하였고 NCBI에서 제공하는 Two Blast N을 통하여 full length EST clone과 sequence를 확보하였다. 또한 full length EST clone를 Iowa State University의 Dr. Shoemaker로부터 제공받아 염기서열을 분석한 결과 in silico 상에서 찾은 full length sequence와 일치하는 것을 확인하였으며 Sequencing결과 open reading frame이 1053 bp이고, 351 amino acids로 구성되어 있음을 확인하였다 (Fig. 16).

```

1 ATG CGC GAC AAG ACT GTG CTG GTA ACC GGC GSA GCC GGT TAC ATC GGC ACC CAC ACC GTT
  M R D K T V L V T G G A G Y I G T H T V
61 CTT CAG CTC TTG CTC GGA GGT TGC AGA ACC GTC GTC GTC GAC AAT CTC GAC AAT TCC TCC
  L Q L L L G G C R T V V V D N L D N S S
121 GAG GTT TCT ATC CAC CGA GTC AGG GAG CTT GCC GGC GAA TTT GGG AAC AAC CTC TCC TTT
  E V S I H R V R E L A G E F G N N L S F

```

```

181 CAC AAG GTG GAC CTA CGG GAC AGG GAT GCA CTA GAG CAA ATT TTT GTT TCC ACA CAA TTT
    H K V D L R D R D A L E Q I F V S T Q F
241 GAT GCT GTC ATA CAC TTT GCT GGA CTG AAA GCA GTA GGA GAA AGT GTG CAA AAA CCT TTA
    D A V I H F A G L K A V G E S V Q K P L
301 CTA TAC TAT AAC AAC AAC TTG ACT GGG ACA ATC ACT CTA TTG GAA GTC ATG GCT GCC CAT
    L Y Y N N N L T G T I T L L E V M A A H
361 GGA TGC AAG AAG CTC GTG TTC TCT TCT TCA GCA ACT GTA TAT GGT TGG CCA AAG GAA GTT
    G C K K L V F S S S A T V Y G W P K E V
421 CCA TGC ACA GAA GAG TTC CCT CTG TCA GCA ATG AAC CCA TAT GGA CGA ACT AAG CTT ATC
    P C T E E F P L S A M N P Y G R T K L I
481 ATT GAA GAA ATT TGT CGT GAT GTC CAC CGT GCA GAG CCA GAT TGG AAA ATA ATA TTG TTA
    I E E I C R D V H R A E P D W K I I L L
541 AGA TAC TTC AAC CCA GTC GGT GCA CAC CCT AGC GGT TGT ATT GGG GAG GAT CCC CGC GGA
    R Y F N P V G A H P S G C I G E D P R G
601 ATT CCA AAC AAT CTC ATG CCA TTT GTT CAG CAA GTA GCA GTT GGC CGA CCG CCT GCA CTG
    I P N N L M P F V Q Q V A V G R R P A L
661 ACA GTT TTT GGA AAT GAT TAT AAT ACA ACT GAT GGC ACT GGG GTT CCG GAT TAC ATT CAT
    T V F G N D Y N T T D G T G V R D Y I H
721 GTT GTT GAT TTA GCA GAT GGG CAC ATT GCT GCG TTG CTT AAA CTA GAT GAT CCT AAT ATA
    V V D L A D G H I A A L L K L D D P N I
781 GGT TGT GAG GTT TAT AAC CTG GGA ACA GGA AAG GGA ACA TCA GTT TTG GAG ATG GTT CGA
    G C E V Y N L G T G K G T S V L E M V R
841 GCT TTT GAG ATG GCA TCT GGA AAG AAA ATT CCA CTT GTG ATG GCT GGC CGT AGA CCT GGT
    A F E M A S G K K I P L V M A G R R P G
901 GAT GCT GAA ATT GTT TAT GCA TCA ACA AAG AAA GCG GAA AGA GAG CTT AAA TGG AAG GCA
    D A E I V Y A S T K K A E R E L K W K A
961 AAA TAT GGC ATT GAT GAG ATG TGC CGC GAT CAA TGG AAT TGG GCT AGC AAA AAC CCT TAT
    K Y G I D E M C R D Q W N W A S K N P Y
1021 GGC TAT GGA GAT CAG GAG GAT TCC ACC GTT TAA
    G Y G D Q E D S T V stop

```

Fig. 16 Putative OEP를 coding하는 clone의 nucleotide sequence와 amino acid sequence

우리가 분리한 putative OEP의 아미노산 서열과 이와 유사한 NAD-dependnet epimerase들의 아미노산 서열 비교 (Fig. 17).

```

soybean      1 ---MRDKTVLVTGGAGYIGHTVLQLLLGGCRIVVVVDNLDNSSEVSIHRVRELAGEFGNN
cyamopsis   1 ---MSSQTVLVTGGAGYIGSHTVLQLLLGGFKAVVVVDNLDNSSETAIHRVKELAGKFGNN
arabidopsis 1 ----MARNVLVSGGAGYIGSHTVLQLLLGGYSVVVVVDNLDNSSAVSLQRVKKLAAEHGER
oryza       1 MVSALLRTILVTGGAGYIGSHTVLQLLQLGFRVVVLDNLDNASELAAILRVRELAGHNANN
zea         1 MVSAVLRTHLVTGGAGYIGSHTVLQLLQQGFRVVVVVDNLDNASEAALARVAELAGHDGAN

soybean      58 LSFHKVLDLRDRDALEQIEFVSTQFDAVIHFAGLKAVGESVQKPLLYYNNNLIGTITLLEVM
cyamopsis   58 LSFHKLDLRDRDALEKIFSSTRFDSEVIHFAGLKAVGESVQKPLLYYDNNLIGTIVLFEVM
arabidopsis 57 LSFHQVLDLRDRSALEKIFSETRFDVAVIHFAGLKAVGESVQKPLLYYNNNLVGTITLLEVM
oryza       61 LDFRKVLDLRDKQALDQIFSSQRFDAVIHFAGLKAVGESVQKPLLYYDNNLIGTITLQVM
zea         61 LVFHKVLDLRDRHALVDIFSSHRFDAVIHFAGLKAVGESVHKPLLYYDNNLVGTITLLEVM

soybean      118 AAHGCKKLVFSSSATVYGWPKVEVPCTEEFPLSAMNPYGRTKLIIEEICRDVHRAEPDVKI
cyamopsis   118 AAHGCKKLVFSSSATVYGEKPKVEVPCTEEFPLSAMNPYGRTKLIIEEICRDIYRAEQEVKI
arabidopsis 117 AQHGCKNLVFSSSATVYGSKPKVEVPCTEEFPLSALNPYGRTKLFIIEICRDVYGSDEPKI
oryza       121 AAHGCKKLVFSSSATVYGWPKVEVPCTEESPLCAMNPYGRTKLVIEDMCRDLHASDPNWKI
zea         121 AANGCKKLVFSSSATVYGWPKVEVPCTEEFPLCATNPYGRTKLVIEDI CRDVHRSDEPKI

soybean      178 ILLRYFNPVGAHPSGQIGEDPRGIPNNLMPPVQVAVGRRPALTVFGNDYNTTSDGTGVRD
cyamopsis   178 ILLRYFNPVGAHPSGYIGEDPRGIPNNLMPPVQVAVGRRPALTVFGNDYNTTSDGTGVRD
arabidopsis 177 ILLRYFNPVGAHPSGDIGEDPRGIPNNLMPPVQVAVGRRPRLTVFGNDYNTKDGTVGRD
oryza       181 ILLRYFNPVGAHPSGYIGEDPCGIPNNLMPPVQVAVGRRPALTVYGTDYNTKDGTVGRD
zea         181 ILLRYFNPVGAHPSGYIGEDPCGIPNNLMPPVQVAVGRRLPHLTVYGTDYNTKDGTVGRD

soybean      238 YIHVVLDLADGHIAALRLKLDLP--KIGCEVYNLGTGKGTSVLEMVRAFEMASGKKIPLVMA
cyamopsis   238 YIHVVLDLADGHIAALRLKLDLP--KIGCEVYNLGTGKGTSVLEMVKAFAEQASGKKIPLVMA
arabidopsis 237 YIHVVLDLADGHIAALRLKLEDC--KIGCEVYNLGTGNGT SVLEMVDAFEKASGKKIPLVIA
oryza       241 YIHVVLDLADGHIAALRLKLYEDSDKIGCEVYNLGTGKGT SVLEMVAFAFEKASGKKIPLVFA
zea         241 YIHVVLDLADGHIAALRLKHEDSDKIGCEVYNLGTGKGT SVLEMVAFAFEKASGKKIPLVFA

soybean      296 GRRPGDAEIVYASTAKAERELKWKAKYGIEMCRDQWNWASKNPYGYGDQEDSTVZ
cyamopsis   296 GRRPGDAEIVVYASTAKAERELNWKAKYGIEMCRDQWNWASKNPYGYGGSEDSN-
arabidopsis 295 GRRPGDAEIVYASTAKAERELNWKAKYGIEMCRDLWNWASNNPYGYDSEDNSH--
oryza       301 GRRPGDAEIVYAATAKAERELKWKAKYGIEMCRDLWNWASKNPYGYGSPDSN--
zea         301 GRRPGDAEIVYAATAKAERELKWKAKYGIEMCRDLWNWASKNPYGYAGSRDNSK-

```

Fig. 17 NAD-dependent epimerase 의 아미노산 서열 비교.

나. *E.coli* 에서 대량 발현 및 SDS-PAGE로 분자량 확인

확보된 EST를 PCR을 통해 증폭한 후 T-vector에 삽입하였고, *E. coli*에 transformation을 실시한 후 blue/white selection을 통해 재조합 clone을 선별하였다. 선별된 clone에서 plasmid를 추출 한 후 삽입된 insert를 elution하여 *E. coli* expression vector (pET15b)에 삽입하였고, *E. coli* (BL21)에 transformation 하였다. 이후 형질전환 된 BL21 cell line을 IPTG induction 방법으로 protein을 대량 발현시켰으며 시간별 확인을 통해 가장 많이 발현되는 시간대가 IPTG induction 후 4시간째임을 확인하였다. 대량 발현된 단백질은 수용성 단백질로 판단하여 His·Tag binding resin을 사용하여 imidazole의 농도변화에 따라 분리되는 성질을 이용해서 단백질을 분리하였다. 이렇게 분리된 단백질을 SDS-PAGE를 통해서 확인하였다 (Fig. 18).

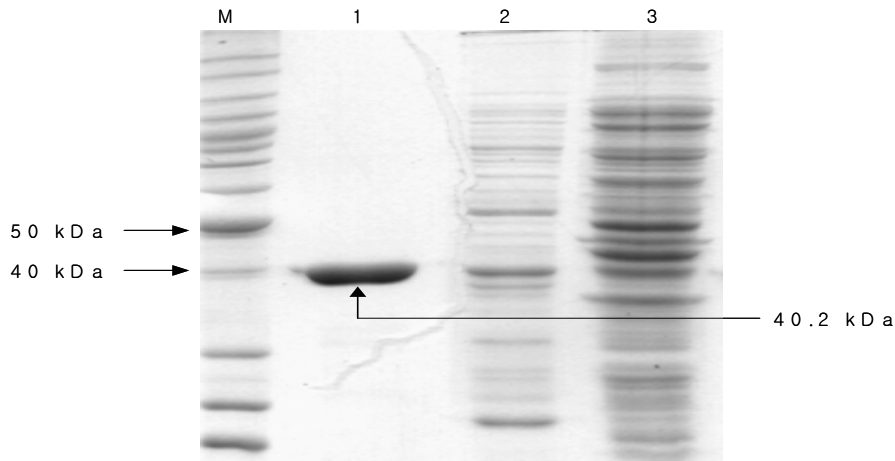


Fig. 18 SDS-PAGE를 통한 대량 발현 된 putative OEP의 분자량 확인

M : protein marker,

lane 1 : putative OEP (IPTG induction 후 4 hr)

lane 2 : 80 mM imidazole wash buffer (after IPTG induction)

lane 3 : Total protein (after IPTG induction)

다. 대두의 ononitol epimerase (OEP) 유전자가 도입된 BL21 cell line을 4시간동안 IPTG induction하였다. 시행 후 10000g로 원심분리한 후 침전물을 취하여 extract buffer를 첨가한 후 3분 동안 초음파 분쇄기를 사용하여 cell를 분쇄시켰다. 이를 다시 12000g로 원심분리 하여 상등액을 취했다. 상등액을 반응 buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) 및 기질인 ononitol과 함께 혼합하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 vial로 옮기고 control 및 각각의 sample을 nitrogen evaporator를 사용하여 물을 제거하였다. 잔여 수분을 완전히 제거하기 위하여, phosphorus pentoxide (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)가 담긴 desiccator에서 증발시켰다. 수분 제거 후 trimethylsilylimadazole와 pyridine mixture (1:1, v/v) 400  $\mu$ l를 처리시킨 후 70°C heating block에서 30분간 silylation 반응 후 20분간 상온에서 방치한다. Derivatization되어진 시료를 Gas-chromatography를 이용하여 분석하였다. Split mode injector (1:50)에서 1  $\mu$ l를 injection하였으며 Gas-chromatography의 column으로 DB-1 capillary column (30m length, 0.25mm ID, 0.25  $\mu$ m film thickness)을 사용하였다. Gas-chromatography의 초기온도는 150°C에서 2분간 유지한 다음, 다시 1°C/min의 속도로 300°C까지 맞추고 300°C에서 3분을 유지시킨다. injector 온도는 280°C에서 수행되었고 detector 온도는 300°C에서 수행되어졌다. Gas-chromatography를 이용한 분석을 통해서 OEP의 활성을 확인할 수가 있었는데 기질인 ononitol은 retention time이 7.797에서 peak가 생성되었고 OEP의 반응산물인 pinitol은 6.508에서 peak가 생성되었다 (Fig. 19). 또한 OEP가 첨가된 sample인 경우 빨간 원의 모습처럼 1시간의 반응기간 동안 retention time이 6.433에서 pinitol이 생성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 20).

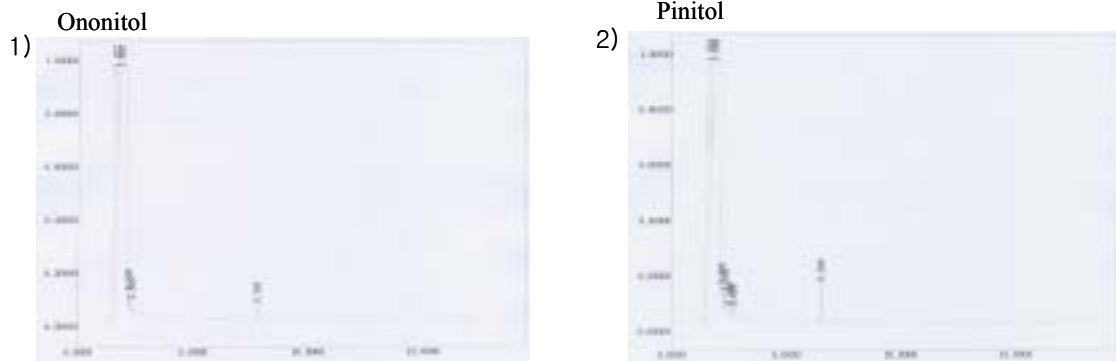


Fig. 19 Ononitol과 pinitol의 Gas-chromatography 분석

- 1) Ononitol retention time
- 2) Pinitol retention time

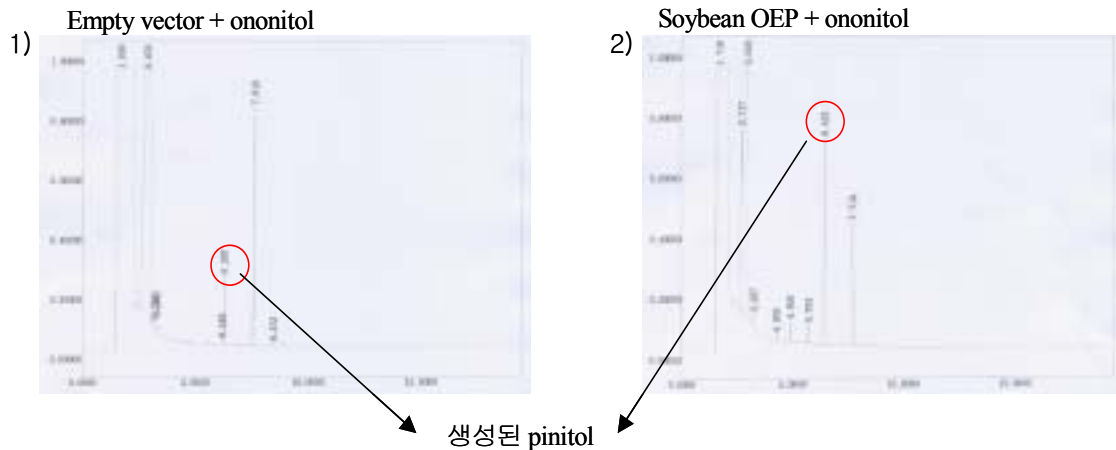


Fig. 20 효소반응을 통한 기질특이성 확인

- 1) 기질인 ononitol과 empty vector가 발현된 *E. coli*의 extract와 혼합한 후 37°C에서 1 hr 반응 후의 GC data retention time 6.267 인 pinitol peak
- 2) 기질인 ononitol과 ononitol epimerase 유전자가 발현된 *E. coli*의 extract와 혼합한 후 37°C에서 1 hr 반응 후의 GC data retention time 6.433 인 pinitol peak

라. RT-PCR을 이용한 soybean의 ononitol epimerase 유전자 발현 분석

IMT 유전자와 마찬가지로 ononitol epimerase 유전자도 salt stress에서 induction된다는 사실을 확인하기 위해 normal condition에서 1개월간 키운 soybean에 salt stress (250 mM NaCl)를 처리하였다. 이후 식물체에서 조직별로 mRNA를 추출한 뒤 cDNA를 합성하였다. (total volume 50 $\mu$ l 안에 합성된 cDNA (2 $\mu$ l), gene specific primer(10 pmol), ExTaq polymerase (TakaRa, 5unit), dNTP (10 mM) 10 $\times$  reaction buffer와 같



은 조성으로 mixture를 만들어 reaction하였다. PCR 반응 조건은 최초 94℃에서 5min 간 pre-heating한, 이후 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min으로 30 cycle 반응하였고, 마지막으로 72℃에서 10 min간 반응 시켰다. 확인결과 Ononitol epimerase 유전자는 IMT 유전자는 normal condition일때 뿌리와 잎에선 발현이 되지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 21).

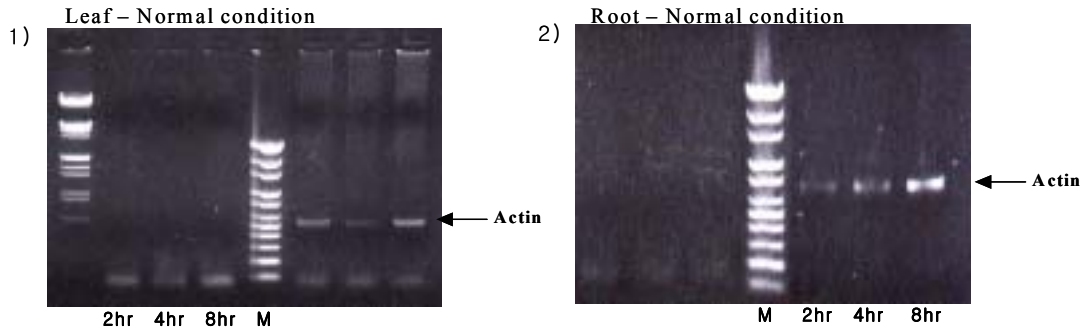


Fig. 21 RT-PCR을 이용한 OEP 유전자의 조직 특이적 발현 확인

1) M : Marker

lane 1 : Normal condition 2 hr 후의 leaf  
 lane 2 : Normal condition 4 hr 후의 leaf  
 lane 3 : Normal condition 8 hr 후의 leaf

2) M : Marker

lane 1 : Normal condition 2 hr 후의 root  
 lane 2 : Normal condition 4 hr 후의 root  
 lane 3 : Normal condition 8 hr 후의 root

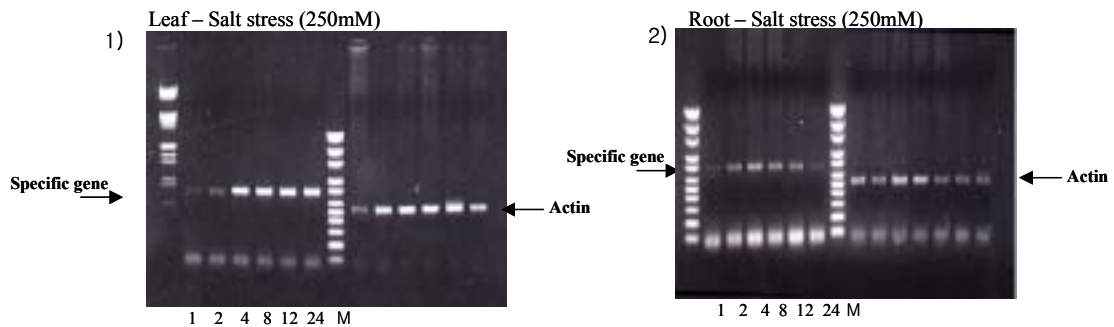


Fig. 22 RT-PCR을 이용한 OEP 유전자의 salt stress에 대한 발현 양상

1) M : Marker

lane 1 : Salt stress 1 hr 후의 leaf  
 lane 2 : Salt stress 2 hr 후의 leaf  
 lane 3 : Salt stress 4 hr 후의 leaf  
 lane 4 : Salt stress 8 hr 후의 leaf  
 lane 5 : Salt stress 12 hr 후의 leaf  
 lane 6 : Salt stress 24 hr 후의 leaf

2) M : Marker

lane 1 : Salt stress 1 hr 후의 root  
 lane 2 : Salt stress 2 hr 후의 root  
 lane 3 : Salt stress 4 hr 후의 root  
 lane 4 : Salt stress 8 hr 후의 root  
 lane 5 : Salt stress 12 hr 후의 root  
 lane 6 : Salt stress 24 hr 후의 root

Salt stress를 처리한 조직에서의 발현 양상을 어떤지를 확인하기 위해 RT-PCR을 통해 실험을 해보았다 실험 결과 OEP는 normal condition 에서는 전혀 발현되지 않던 것이 salt stress 의 자극을 받았을 때 잎과 뿌리에서 모두 발현하는 것을 확인하였고 발현양도 4 hr를 기점으로 해서 증가함을 알 수가 있다 (Fig. 22).

#### 4. *Myo*-inositol methyltransferase 유전자 효모로의 도입

가. 콩에서 cloning된 *myo*-inositol methyltransferase 유전자를 yeast vector에 삽입하기 위하여 gene specific 한 primer를 제작하고 PCR을 수행하였다.

PCR mixture는 (total volume 50  $\mu$ l 안에 보유중인 *Myo*-inositol methyltransferase 유전자 (2 $\mu$ l), gene specific primer(10 pmol), ExTaq polymerase (TakaRa, 5unit), dNTP (10 mM) 10 $\times$  reaction buffer) 같고 PCR 반응 조건은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5min간 pre-heating한, 이후 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min으로 35 cycle 반응하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10 min간 반응 시켰다. 이렇게 증폭된 유전자를 T-vector에 삽입하였고, *E. coli*에 transformation을 실시한 후 blue/white selection을 통해 재조합 clone을 선별하였다. 선별된 clone에서 plasmid를 추출 한 후 삽입된 insert를 elution하여 leu marker를 가진 yeast vector (pBR425)에 삽입하였고 yeast에 transformation 하였다. 이후 형질 전환 된 yeast cell line을 leu- SD plate에 계대하여 single colony를 선별 후에 leu- SD media 100 ml에서 4일간 배양하였다.

나. 형질 전환 된 yeast 를 7000g로 원심분리 하여 pellet을 얻어 Tris-HCl pH=7.9 buffer에 혼탁하였다. 혼탁액에 tunicase 효소를 1.5 mM 되게 처리하여 38 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시켰다. 현미경을 통해서 yeast cell이 충분히 lysis 된 것을 확인한 후 TCA (Trichloroacetic acid) 사용하여 protein을 침전 시켰다. 상등액을 vial로 옮기고 control (empty vector가 삽입된 yeast) 및 sample (methyltransferase가 삽입된 yeast) 을 nitrogen evaporator를 사용하여 수분을 제거하였다. 잔여 수분을 완전히 제거하기 위하여 phosphorus pentoxide ( $P_2O_5$ )가 담긴 desiccator에서 증발시켰다. 수분 제거 후 trimethylsilylimadazole과 pyridine mixture (1:1, v/v) 400  $\mu$ l를 처리시킨 후 70 $^{\circ}$ C heating block에서 30분간 silylation 반응 후 20분간 상온에서 방치한다. Derivatization되어진 시료를 gas-chromatography를 이용하여 분석하였다. Split mode injector (1:50)에서 1  $\mu$ l를 injection하였으며 gas-chromatography의 column으로 DB-1 capillary column (30 m length, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film thickness)을 사용하였다. Gas-chromatography의 초기온도는 150 $^{\circ}$ C에서 2분 간 유지한 다음, 다시 1 $^{\circ}$ C/min의 속도로 300 $^{\circ}$ C까지 맞추고 300 $^{\circ}$ C에서 3분을 유지시킨다. injector 온도는 280 $^{\circ}$ C에서 수행되었고 detector 온도는 300 $^{\circ}$ C에서 수행되어졌다.

Gas-chromatography를 이용한 분석을 우선 ononitol과 pinitol의 peak time (Fig. 23)을 확인한 후 형질 전환 된 yeast에서 ononitol peak가 생성되는지를 확인 하였다. 형질 전환 된 yeast에서 ononitol을 확인하였는데 이는 빨간 원의 모습처럼 retention time이 10.378에서 ononitol peak가 생성됨을 확인하였다 (Fig. 24).

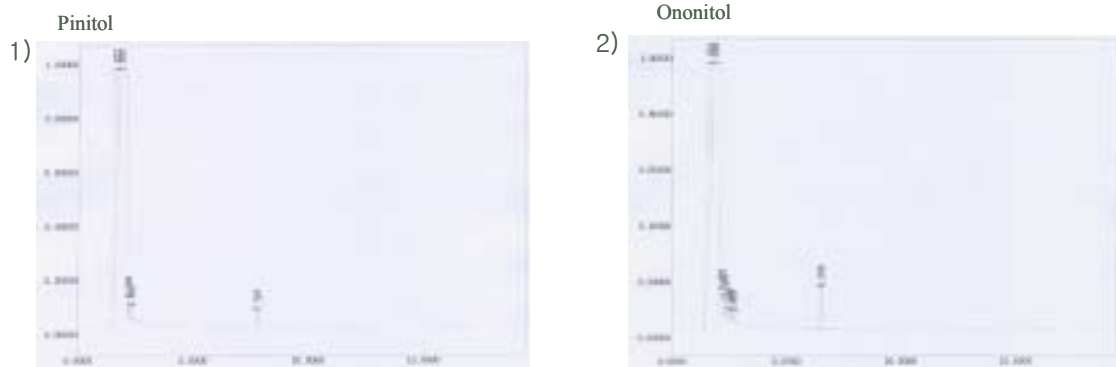
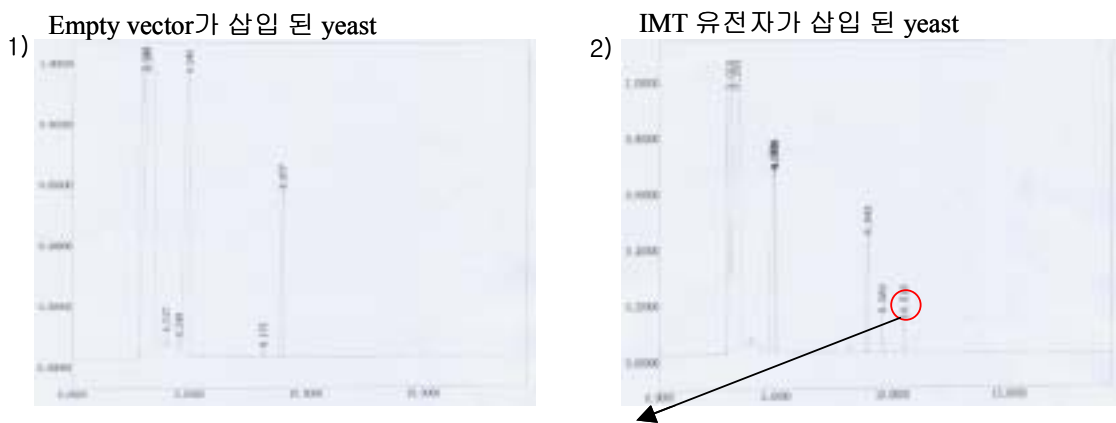


Fig. 23 Ononitol과 pinitol의 Gas-chromatography 분석

- 1) 1 mM pinitol (retention time 9.017)
- 2) 1 mM ononitol (retention time 10.378)
- 3) 1 mM Phenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (retention time 13.147, 13.010)



형질전환 된 yeast에서 생산 된 ononitol

Fig. 24 형질전환 된 yeast의 Gas-chromatography 분석

- 1) Empty vector가 발현된 yeast의 GC-FID data
- 2) IMT 유전자가 삽입된 vector가 발현된 yeast의 GC-FID data retention time 10.578 에서 ononitol peak 확인

##### 5. *Myo*-inositol methyltransferase 유전자와 ononitol epimerase 유전자 효모로의 도입

가. *Myo*-inositol methyltransferase 유전자와 ononitol epimerase 유전자를 yeast vector에 삽입하기 위하여 gene specific 한 primer를 제작하고 PCR을 수행하였다. PCR mixture는 (total volume 50  $\mu$ l 안에 보유중인 각각의 유전자 (2  $\mu$ l), gene specific primer(10 pmol), ExTaq polymerase (TakaRa, 5 unit), dNTP (10 mM) 10 $\times$  reaction buffer) 같고 PCR 반응 조건은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5 min간 pre-heating한, 이후 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min으로 35 cycle 반응하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10 min

간 반응 시켰다. 이렇게 증폭된 유전자를 T-vector에 삽입하였고, *E. coli*에 transformation을 실시한 후 blue/white selection을 통해 각각의 재조합 clone을 선별하였다. 선별된 clone에서 plasmid를 추출한 후 삽입된 insert를 elution하여 *myo*-inositol methyltransferase 유전자는 leu marker를 가진 yeast vector (pBR425)에 삽입하고 ononitol epimerase 유전자는 ura marker를 가진 yeast vector (pYES2)에 삽입하였다. 두개의 vector를 동시에 같은 yeast에 transformation 하여 leu-, ura- SD plate에 도말함으로써 형질전환 된 yeast를 colony를 선별하였고 이후 형질전환 된 yeast cell line을 leu-, ura- SD plate에 2차, 3차 계대하여 single colony를 선별 후에 leu-, ura- SD media에 4일간 배양하였다.

나. 두개의 vector가 삽입되어 형질 전환 된 yeast 50 ml를 4일간 배양 후에 7000g로 원심분리 하여 pellet을 얻어 Tris-HCl pH=7.9 buffer에 혼탁하였다. 혼탁액에 tunicase 효소를 1.5 mM 되게 처리하여 38°C에서 12시간 반응시켜 yeast cell를 충분히 lysis 시켰다. 현미경을 통해서 yeast cell이 충분히 lysis 된 것을 확인한 후 TCA (Trichloroacetic acid) 100 mM 되게 첨가하여 protein을 침전 시켰다. 다시 원심분리하여 protein을 제거한 후 상등액을 vial로 옮기고 control (empty vector가 삽입된 yeast) 및 sample (methyltransferase, epimerase가 삽입된 yeast) 을 nitrogen evaporator를 사용하여 수분을 제거하였다. 잔여 수분을 완전히 제거하기 위하여 phosphorus pentoxide (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 가 담긴 desiccator에서 10 hr이상 증발시켰다. 수분 제거가 완전해지면 trimethylsilylimadazole과 pyridine mixture (1:1, v/v) 400  $\mu$ l를 처리시킨 후 70°C heating block에서 30분간 silylation 반응 후 20분간 상온에서 방치한다. Derivatization 되어진 시료를 gas-chromatography를 이용하여 분석하였다. Split mode injector (1:50)에서 1  $\mu$ l를 injection하였으며 gas-chromatography의 column으로 DB-1 capillary column (30 m length, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film thickness)을 사용하였다. Gas-chromatography의 초기온도는 150°C에서 2분간 유지한 다음, 다시 1°C/min의 속도로 300°C까지 맞추고 300°C에서 3분을 유지시킨다. injector 온도는 280°C에서 수행되었고 detector 온도는 300°C에서 수행되어졌다. Gas-chromatography를 이용한 분석에서 우선 ononitol과 pinitol의 peak time (Fig. 25)을 확인한 후 형질전환 된 yeast에서 ononitol peak와 pinitol peak가 생성되는지를 확인 하였다. 형질전환 된 yeast에서 ononitol과 pinitol이 생성됨을 확인하였다. 빨간 원의 모습처럼 retention time이 10.378에서 ononitol peak가 생성됨을 확인하였으며 retention time이 8.910에서 pinitol peak를 확인하였다 (Fig. 26).

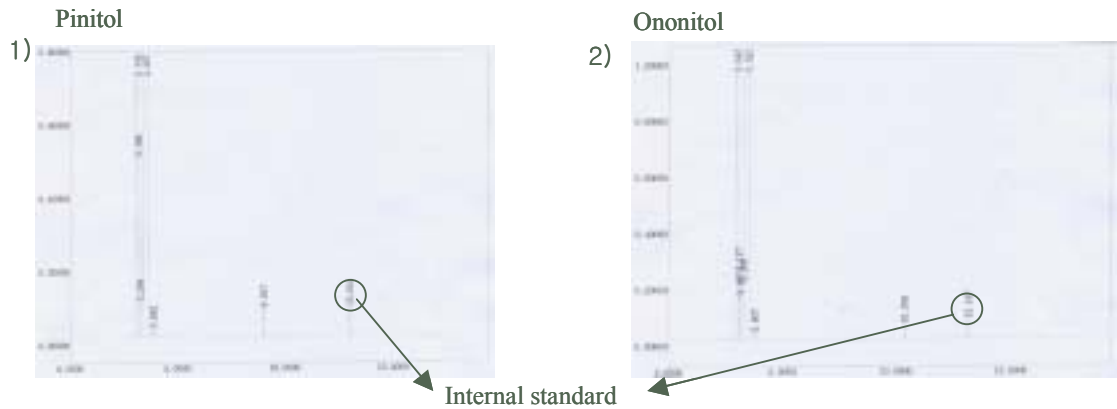


Fig. 25 Ononitol 과 Pinitol의 Gas-chromatography 분석

- 1) 1 mM pinitol (retention time 9.017)
- 2) 1 mM ononitol (retention time 10.378)
- 3) 1 mM Pheny  $\alpha$ -D-glucopyranoside (retention time 13.147, 13.010)

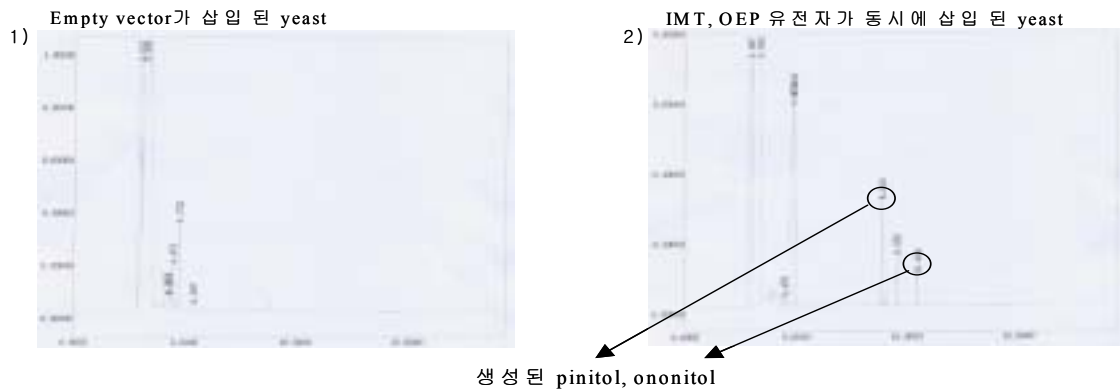


Fig. 26 형질전환 된 yeast의 Gas-chromatography 분석

- 1) Empty vector가 발현된 yeast의 GC-FID peak
- 2) IMT, OEP 유전자가 삽입된 vector가 발현된 yeast의 GC-FID peak  
retention time 10.492에서 ononitol peak 확인  
retention time 8.910에서 pinitol peak 확인

다. 형질전환 된 yeast에서 ononitol과 pinitol이 얼마나 생성이 되는지를 정량하기 위해 Internal standard인 Pheny  $\alpha$ -D-glucopyranoside 1 mM을 측정(Fig. 20)을 통하여 예 러율은 0.86 %로 정하였다. ononitol과 pinitol 기준을 정하기 위하여 1 mM 1  $\mu$ l을 측 정하였다. GC측정값이 ononitol은 125(mV\*sec), pinitol은 177(mV\*sec)의 면적비가 산 출 되었고 ononitol, pinitol의 양은 194 ng/ $\mu$ l이 되었다. empty vector가 형질 전환된 yeast에선 ononitol과 pinitol은 생성되지 않았으며 IMT 유전자가 형질 전환된 yeast에 선 ononitol은 25  $\mu$ g/ml 생성되었고, IMT와 OEP가 형질 전환된 yeast에선 ononitol은 13  $\mu$ g/ml, pinitol은 53  $\mu$ g/ml이 생성 되었다(Fig. 27).

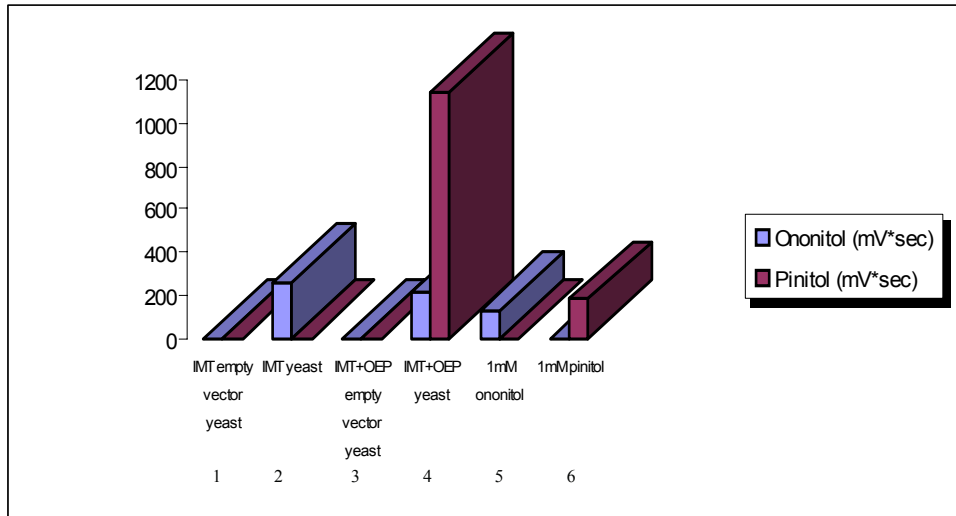


Fig. 27 형질 전환된 yeast에서 생성된 ononitol, pinitol GC-FID data

1. IMT empty vector가 형질전환된 yeast를 100ml 배양하여 lysis 시킨 후 전처리 하여 1 $\mu$ l inject 시킨 면적
2. IMT 유전자가 형질전환된 yeast를 100ml 배양하여 lysis 시킨 후 전처리 하여 1 $\mu$ l inject 시킨 면적
3. IMT, OEP empty vector가 형질전환된 yeast를 100ml 배양하여 lysis 시킨 후 전처리 하여 1  $\mu$ l inject 시킨 면적
4. IMT, OEP 유전자가 형질전환된 yeast를 100ml 배양하여 lysis 시킨 후 전처리 하여 1 $\mu$ l inject 시킨 면적
5. 1 mM ononitol을 전처리 하여 1  $\mu$ l inject 시킨 면적
6. 1 mM pinitol을 전처리 하여 1  $\mu$ l inject 시킨 면적

<제2세부과제>

1. 두부와 콩으로부터 pinitol과 D-chiro-inositol의 최대화 추출분리방법 확립결과

가. CaCl<sub>2</sub> 응고제 사용 시 수침시간과 마쇄시간 별 유효성분 분석

CaCl<sub>2</sub>를 응고제로 사용 시 아래의 Table 1-3과 Fig. 28~30에서 보듯이 수침시간 1시간에서 5시간까지 유효성분 즉 pinitol, D-chiro-inositol, myo-inositol의 함량이 증가하다가 5시간 이후부터 20시간까지 수침 시간이 길어질수록 유효성분 점점 감소함을 볼 수 있었다. 전체적으로 볼 때 세 가지 유효성분 중 pinitol이 가장 많이 순물에 함유되어 있었고, myo-inositol과 D-chiro-inositol은 소량 함유되어 있는 것이 관찰되었다. 마쇄시간에 따른 유효성분 함량은 마쇄시간 4분에서 가장 많은 유효성분을 함유하고 있음을 볼 수 있다. 즉 2분일 때 보다 4분에서 pinitol, D-chiro-inositol, myo-inositol의 함량이 많이 증가하였으며, 마쇄시간 6분에서는 마쇄시간 4분에 비하여 커다란 차이를 보이지는 않지만 pinitol의 함량은 약간 감소하였다. 이 결과는 CaCl<sub>2</sub>를 응고제로 사용하여 콩으로부터 순물을 얻을 때 최대로 유효성분을 얻을 수 있는 조건은 수침시간 5시간, 마쇄시간 4분이 최적의 조건임을 알 수 있었다.

Table 1. CaCl<sub>2</sub> 사용시 마쇄시간 2분에서의 유효성분 함량

Soaking time (hr)	Component( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
	Pinitol	D- <i>Chiro</i> -inositol	<i>Myo</i> -inositol
1	356	19.5	25.6
3	463	25.6	32.3
5	589	23.8	38.4
10	403	17.3	24.8
15	397	16.7	27.7
20	358	18.1	24.9

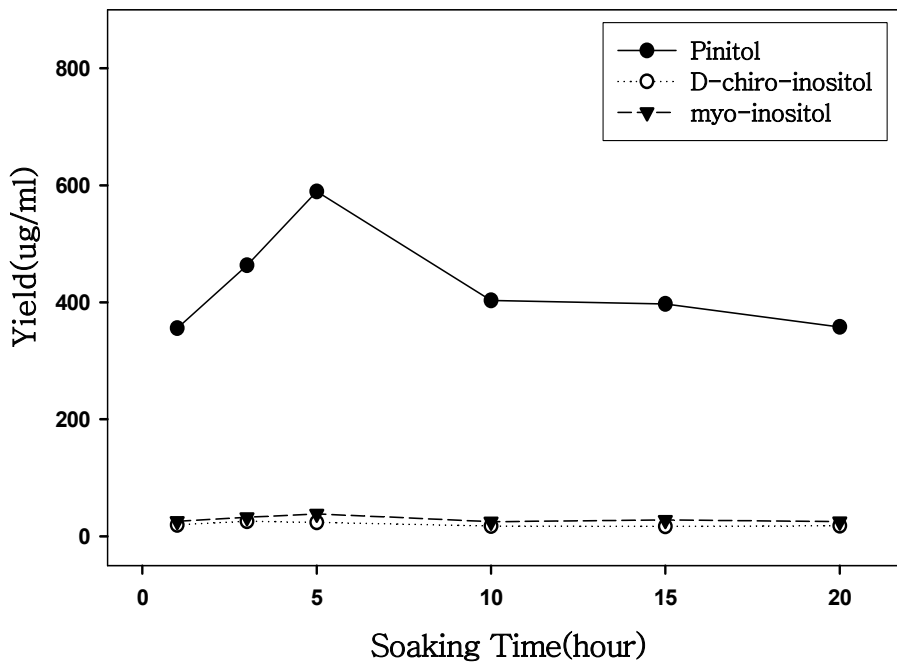


Fig. 28 CaCl<sub>2</sub> 사용 시 마쇄시간 2분에서의 유효성분 함량 비교

Table 2. CaCl<sub>2</sub> 사용시 마쇄시간 4분에서의 유효성분 함량

Soaking time (hr)	Component( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
	Pinitol	D-Chiro-inositol	Myo-inositol
1	461	20.5	33.6
3	516	23.0	38.0
5	847	31.2	48.7
10	614	26.1	36.8
15	541	22.4	39.2
20	208	0.59	18.7

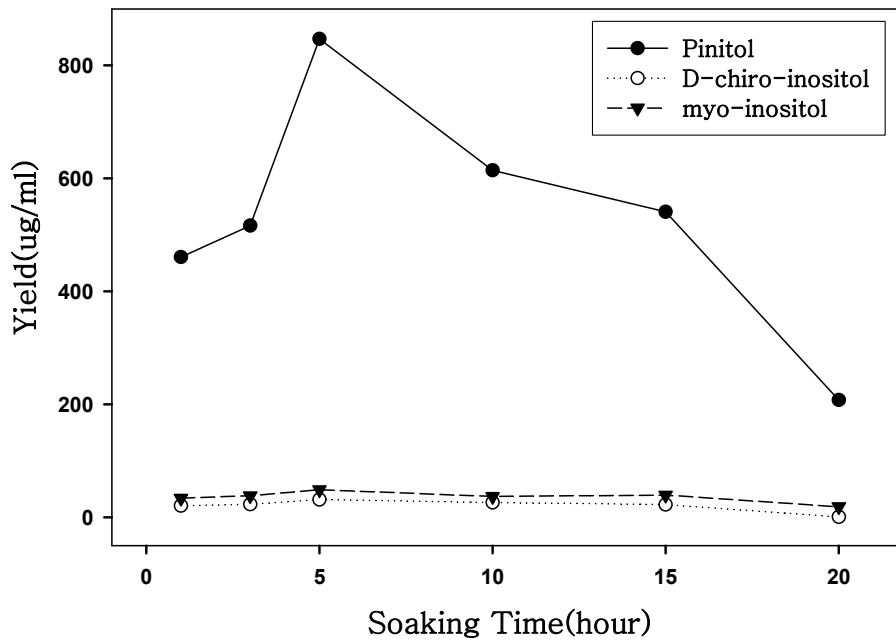


Fig. 29 CaCl<sub>2</sub> 사용시 마쇄시간 4분에서의 유효성분 함량



Table 3. CaCl<sub>2</sub> 사용시 마쇄시간 6분에서의 유효성분 함량

Soaking time (hr)	Component( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Pinitol	D- <i>Chiro</i> -inositol	<i>Myo</i> -inositol
1	341	15.4	24.7
3	395	18.3	29.6
5	742	32.3	47.8
10	608	63.7	58.6
15	537	42.8	52.0
20	318	11.7	19.4

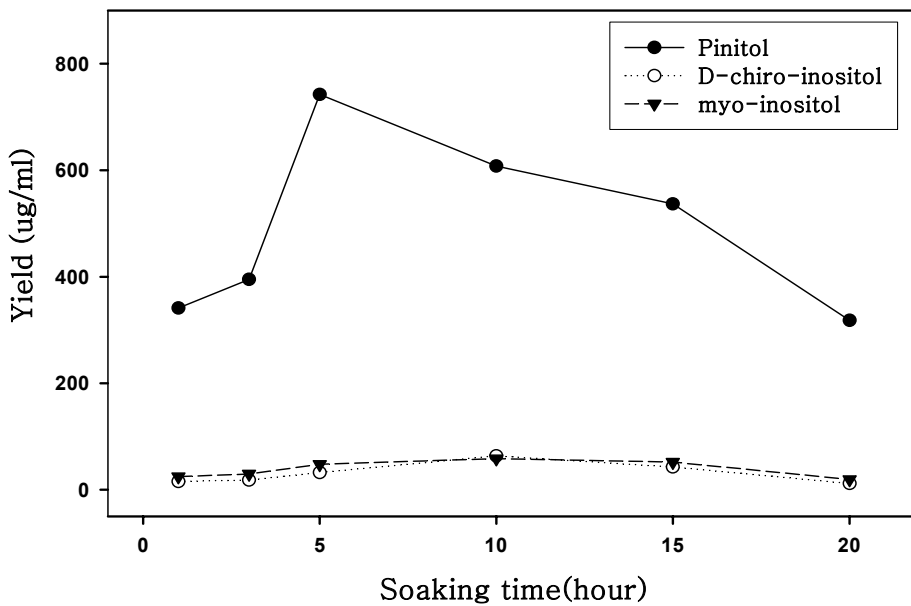


Fig. 30 CaCl<sub>2</sub> 사용시 마쇄시간 6분에서의 유효성분 함량

나. MgCl<sub>2</sub> 응고제 사용시 수침시간별 마쇄시간 별 유효성분 분석

응고제(간수)에 따른 유효성분의 차이를 살펴보기 위하여 응고제로서 CaCl<sub>2</sub> 대신에 MgCl<sub>2</sub>를 사용하여 수침시간 5시간부터 20 시간까지 범위에서 유효성분의 변화를 살펴 보았다. Table 4~6에서 볼 수 있는 것과 같이 MgCl<sub>2</sub>를 응고제로서 사용했을 때, D-*chiro*-inositol 과 *myo*-inositol의 양은 전체적으로 약간 증가였으나 pinitol의 양은 비교적 많이 감소하였다. 따라서 CaCl<sub>2</sub>를 응고제로 하여 다음 실험을 진행하였다.

Table 4. MgCl<sub>2</sub> 사용시 마쇄시간 2분에서의 유효성분 함량

Soaking time (hr)	component( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
	Pinitol	D- <i>Chiro</i> -inositol	<i>Myo</i> -inositol
5	428	22.5	40.0
10	341	21.3	33.2
15	315	18.2	29.3
20	270	20.1	30.1

Table 5. MgCl<sub>2</sub> 사용시 마쇄시간 4분에서의 유효성분 함량

Soaking time (hr)	Component( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
	Pinitol	D- <i>Chiro</i> -inositol	<i>Myo</i> -inositol
5	776	42.1	75.6
10	605	28.2	45.5
15	388	23.6	41.1
20	359	26.0	35.3

Table 6. MgCl<sub>2</sub> 사용시 마쇄시간 6분에서의 유효성분 함량

Soaking time (hr)	Component( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
	Pinitol	D- <i>Chiro</i> -inositol	<i>Myo</i> -inositol
5	592.3909	34.1400	59.8231
10	480.1947	28.3247	45.4217
15	425.5536	29.0579	46.5496
20	415.8966	28.9990	46.8530

#### 다. 한국산 콩 12품종의 유효성분 비교분석

CaCl<sub>2</sub> 응고제 사용 시 수침시간과 마쇄시간 별 유효성분 분석에서의 결과에 따라 수침 시간 5시간, 마쇄시간 4분, 응고제(간수)로 CaCl<sub>2</sub>를 사용하는 조건 하에서 수원작물시 험장으로부터 공급받은 한국산 콩 12품종(진품콩, 소담콩, 보광콩, 진품2호, 만리콩, 무한콩, 황금콩, 대원콩, 신탄달콩, 장수콩, 단백콩, 태광콩)으로부터 순물을 만들어 각 품 종간의 유효성분의 변화를 조사하였다.

아래의 Table 7과 Fig. 31~32에서 볼 수 있는 것처럼 한국산 12품종별 유효성분의 조사에서도 US No. 1. 품종과 마찬가지로 pinitol이 D-*chiro*-inositol이나 *myo*-inositol에 비하여 두부 순물에서 훨씬 높은 농도로 존재하였으며, 12품종에서도 특히 실파달콩, 태광콩, 진품2호의 순서로 다른 품종들에 비하여 높은 pinitol 함량을 가지고 있었다. 특히 실파달콩에서는 US No. 1보다 20% 높은 pinitol을 함유하는 순물이 만들어지므로 본과제의 목적에 적합한 국산 품종으로 판단된다. 또한 이러한 결과를 통해 콩에서는 D-*chiro*-inositol보다는 pinitol의 분리가 훨씬 효율적인 것으로 판단되며, D-*chiro*-inositol의 분리는 콩 보다는 메밀의 주요 수용성당류중 하나인 fagopyritol B1(메밀의 총 수용성 당류 중 42% 차지)를 가수분해하여 얻는 것이 훨씬 효율적인 것으로 판단된다.

Table 7. 한국산 콩 12품종별 순물에서 pinitol, D-*chiro*-inositol, *myo*-inositol의 함량

Soybean species	Component( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
	Pinitol	D- <i>Chiro</i> -inositol	<i>Myo</i> -inositol
진품콩	355	17.1	53.4
소담콩	463	20.2	66.6
보광콩	411	18.6	67.4
진품2호	684	38.1	125.4
만리콩	454	19.1	76.5
무한콩	267	17.0	63.3
황금콩	300	18.3	34.4
대원콩	430	21.7	32.0
실파달콩	1048	72.8	72.2
장수콩	397	46.2	38.0
단백콩	397	19.1	31.5
태광콩	758	26.7	52.9

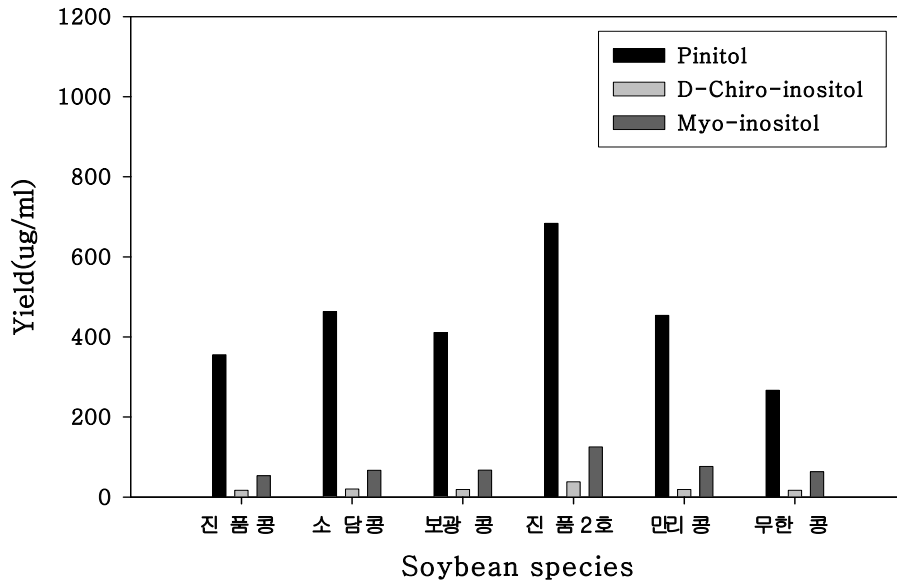


Fig. 31 한국산 콩 품종별 순물 중 pinitol, D-chiro-inositol, myo-inositol 함량 비교

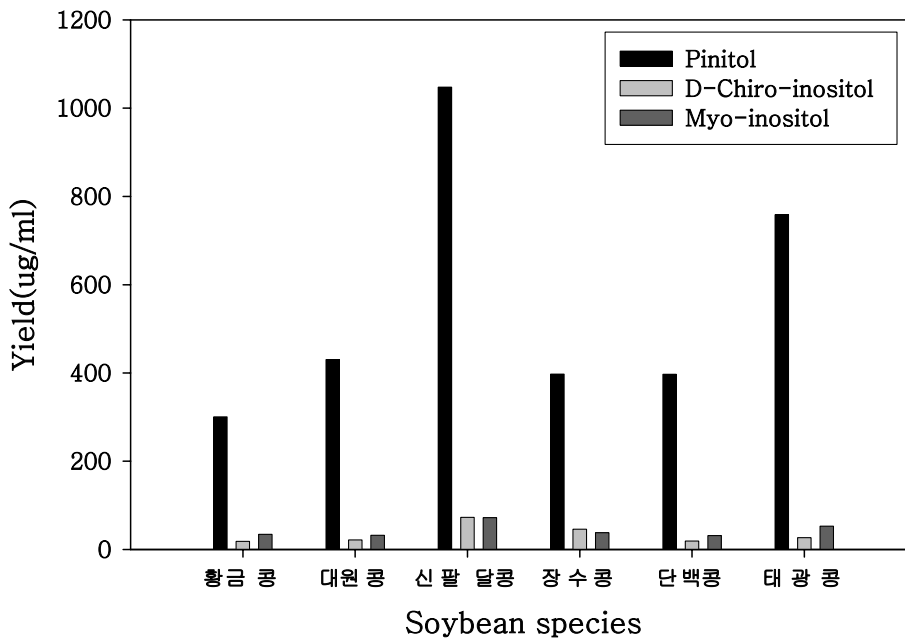


Fig. 32 한국산 콩 품종별 순물 중 pinitol, D-chiro-inositol, myo-inositol 함량 비교

## 2. 메밀로부터 fagopyritol B1 표준물질 추출 정제 및 최대화 결과

연구수행 및 방법에서 기술한 바와 같이 fagopyritol B1의 표준물질을 정제하는 방법이 확립이 되어 유효성분 최대화 방법이 확립되었고, 이는 다른 품종에서의 유효성분을 추출하는 방법으로 그대로 확립될 수 있다. 분리된 fagopyritol B1 10 $\mu$ g과 internal standard로 phenyl- $\alpha$ -D-glucoside(20 $\mu$ g)을 사용하여, 각 품종별 fagopyritol B1의 함유량을 다음과 같이 계산하였다 (Fig. 33~35). 세 가지 품종 중 양절메밀 2호가 가장 높은 fagopyritol B1의 함유량을 나타내고 있으며, 마쇄시간 2분에서 fagopyritol B1이 최대로 추출되는 조건임을 나타내었다. 양절메밀 2호의 fagopyritol B1 성분의 최대 함유량은 마쇄된 메밀가루 10g당 83.8 $\mu$ g으로 양절메밀의 37.7 $\mu$ g에 비해 약 220%의 수율을 나타내었으며, 대산 메밀의 47.3 $\mu$ g에 비해 170%정도 높은 수율을 나타내었다 (Fig. 36). 그러므로 양절메밀 2호를 마쇄시간 2분의 조건으로 추출했을 때 가장 높은 fagopyritol B1을 얻을 수 있음을 확인하였다.

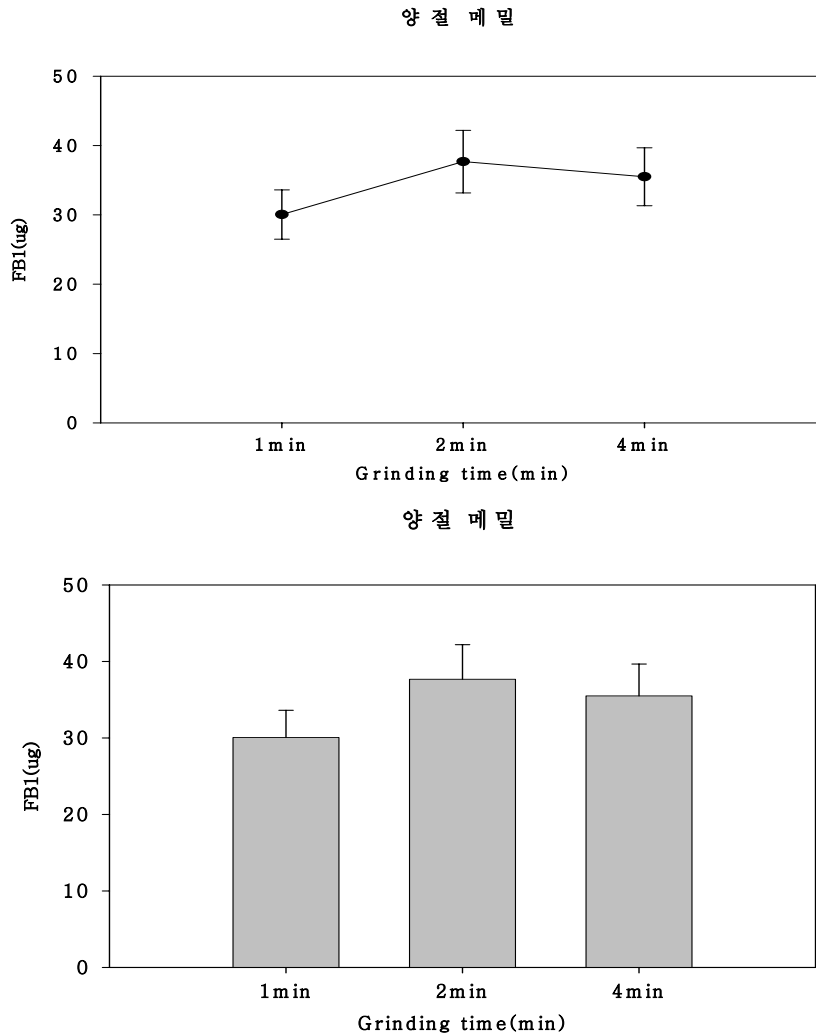


Fig. 33 한국산 양절메밀에서 마쇄시간에 따른 fagopyritol B1 수율 비교

양 절 메 밀 2 호

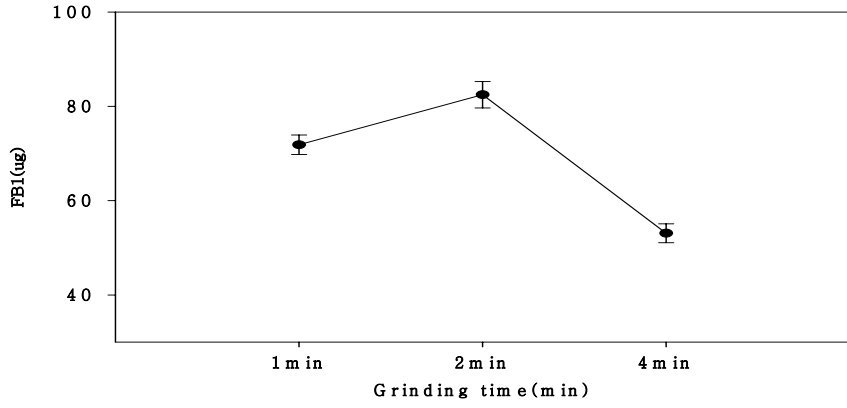


Fig. 34 한국산 양절메밀2호에서 마쇄시간에 따른 fagopyritol B1 수율 비교

대 산 메 밀

Grinding time (min)	FBI (ug)
1 min	46
2 min	47
4 min	27

대 산 메 밀

Grinding time (min)	FBI (ug)
1 min	46
2 min	47
4 min	27

Fig. 35 한국산 대산메밀에서 마쇄시간에 따른 fagopyritol B1 수율 비교

- 53 -

품종별 성분 비교

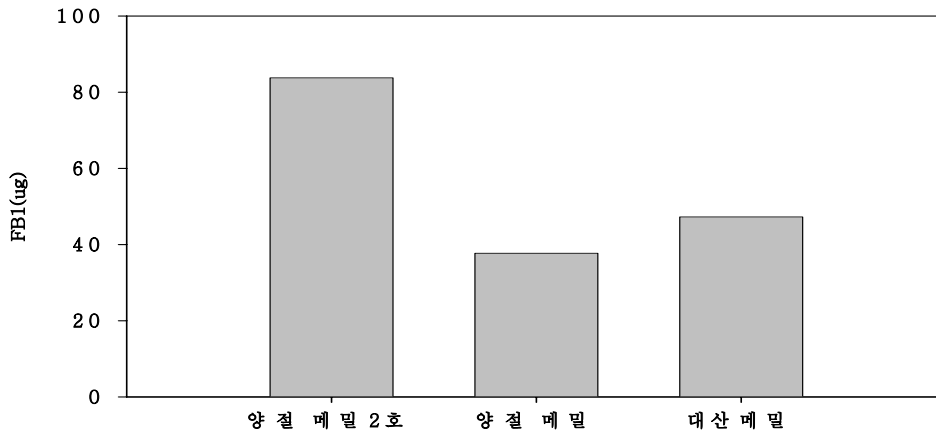


Fig. 36 한국산 메밀품종별 fagopyritol B1 최대수율 비교

3. 메밀에서 추출된 galactosyl 유도체로부터 D-chiro-inositol 획득

가. Free  $\alpha$ -galactosidase assay

연구 방법에서 기술한 바와 같이  $\alpha$ -galactosidase(Sigma, USA)의 활성은 *p*-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-galactoside assay에 의해 실험되었다.  $\alpha$ -galactosidase의 최적 pH와 온도를 찾기 위하여 세 가지 다른 pH(pH=5.5, 6.5, 7.4)에서 실험하여 최적 pH를 찾고 여기서 확립된 최적 pH에서 최적 온도를 찾기 위하여 세 가지 다른 온도(15°C, 25°C, 40°C)에서 실험하였다. UV/VIS spectrophotometer(HP8453, USA)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 1분단위로 온도별, pH별로 구분하여 측정하였다. Fig. 37~45에서 나타낸바와 같이 free  $\alpha$ -galactosidase는 pH=6.5과 40°C에서 가장 높은 활성과 상대속도를 나타내었다.

1) 25°C에서 pH 최적화

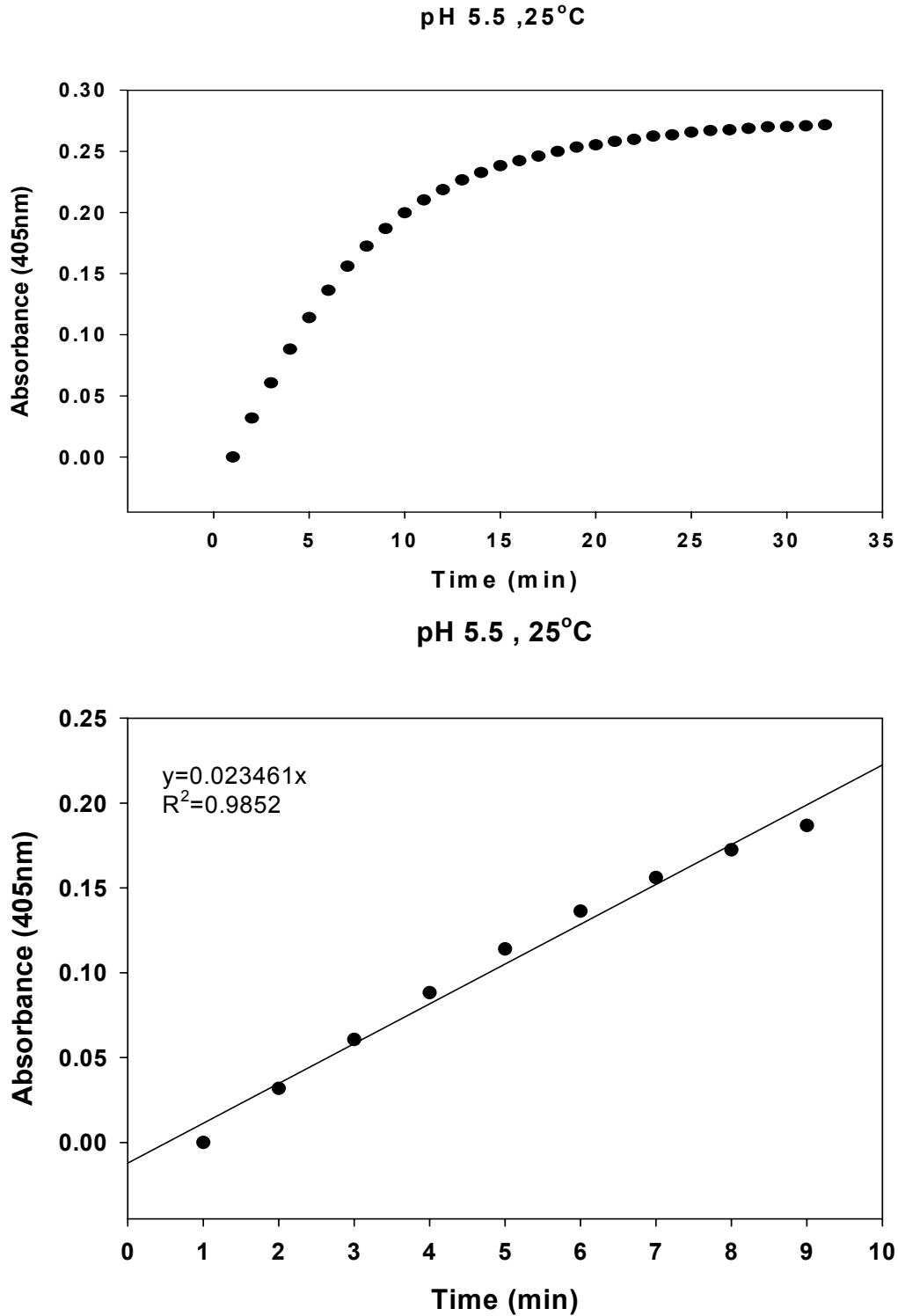


Fig. 37 pH=5.5, 25°C에서 free  $\alpha$ -galactosidase의 activity



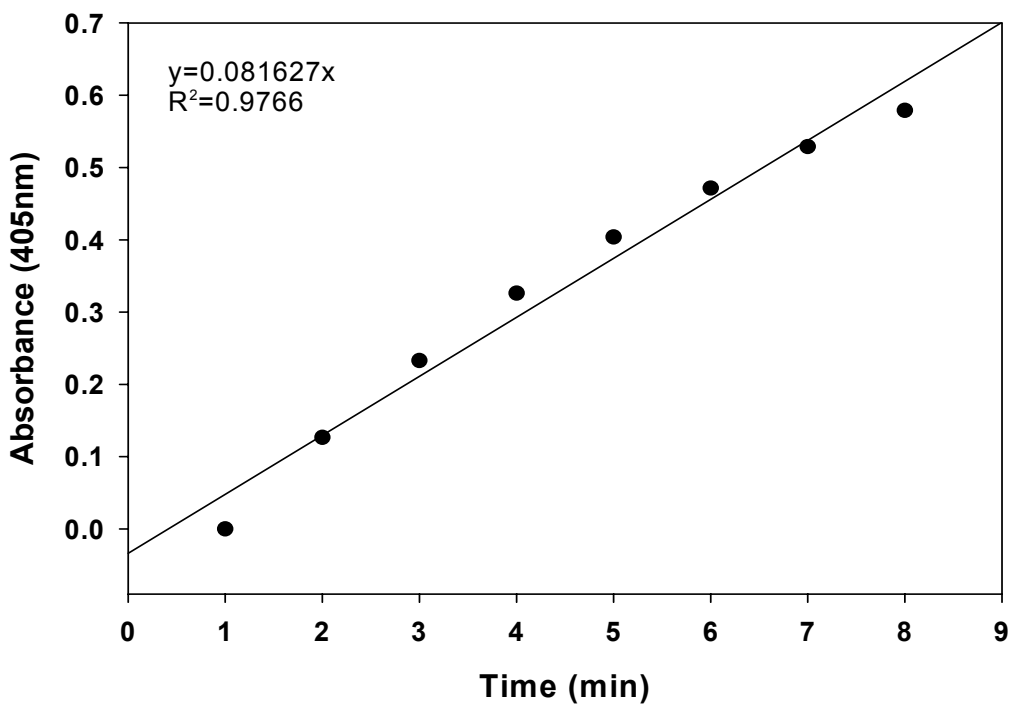
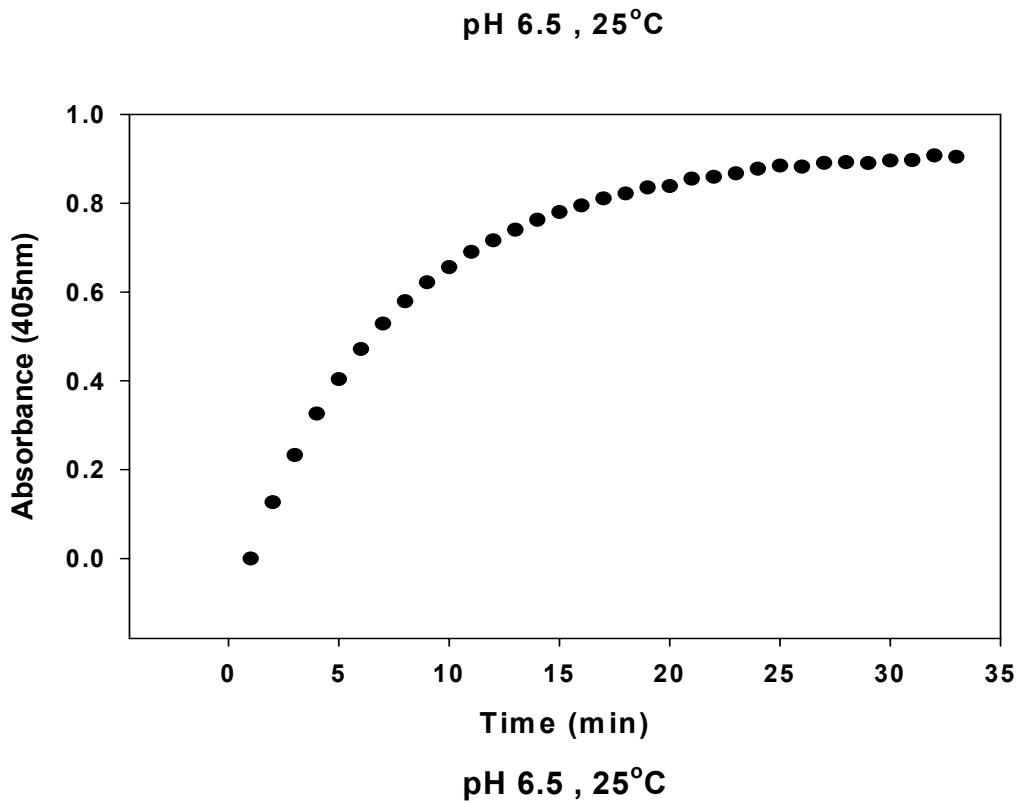
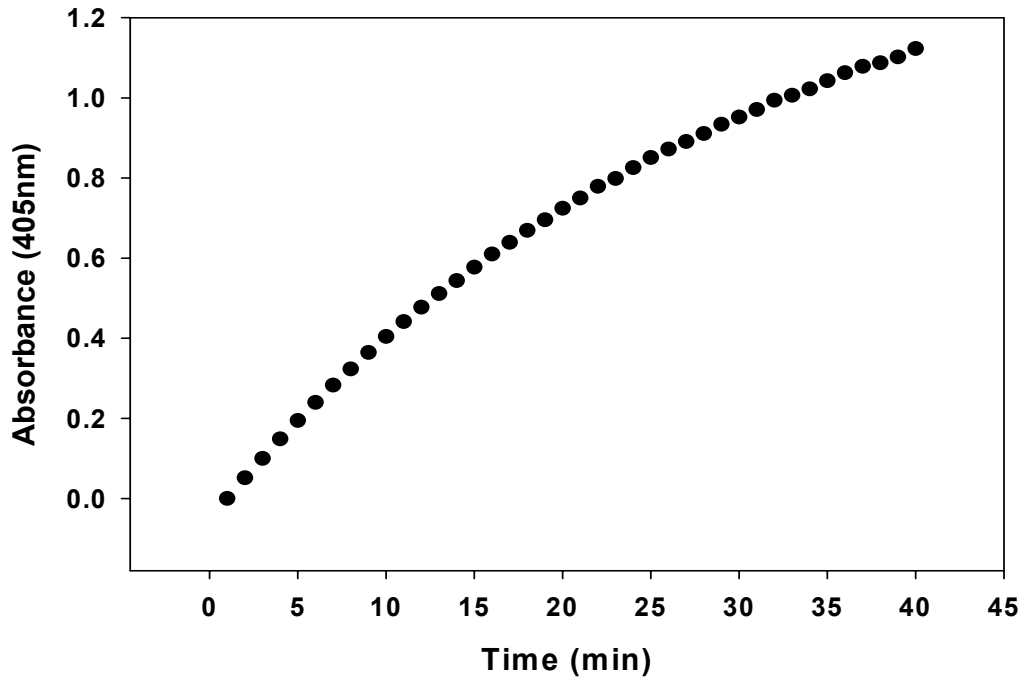


Fig. 38 pH=6.5, 25°C에서 free  $\alpha$ -galactosidase의 activity

pH 7.4 , 25°C



pH 7.4 , 25°C

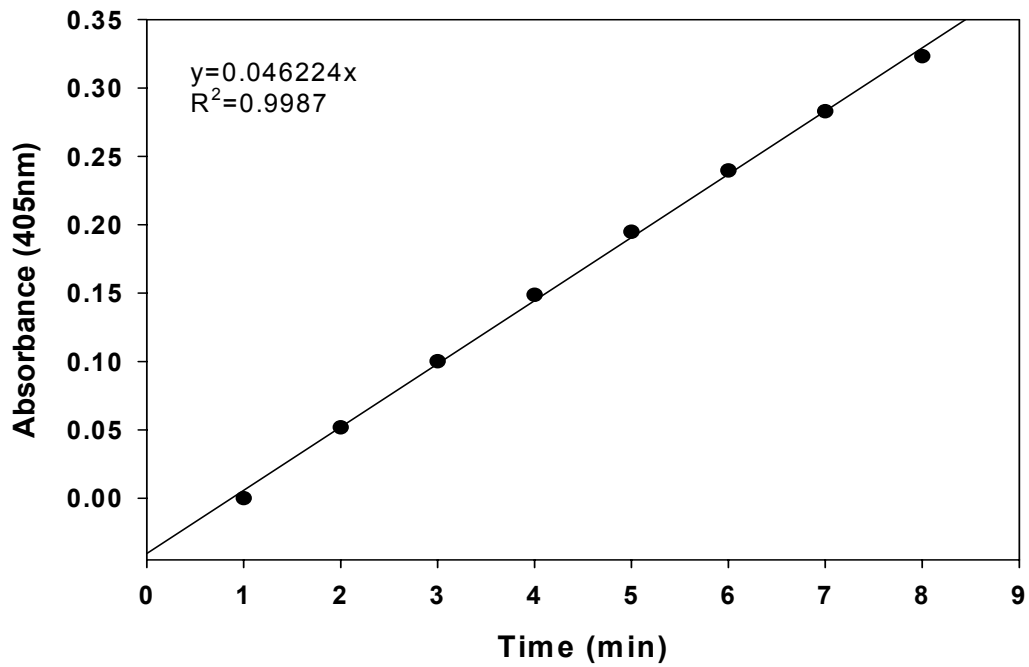


Fig. 39 pH=7.4, 25°C에서 free  $\alpha$ -galactosidase의 activity

2) pH=6.5에서 온도 최적화

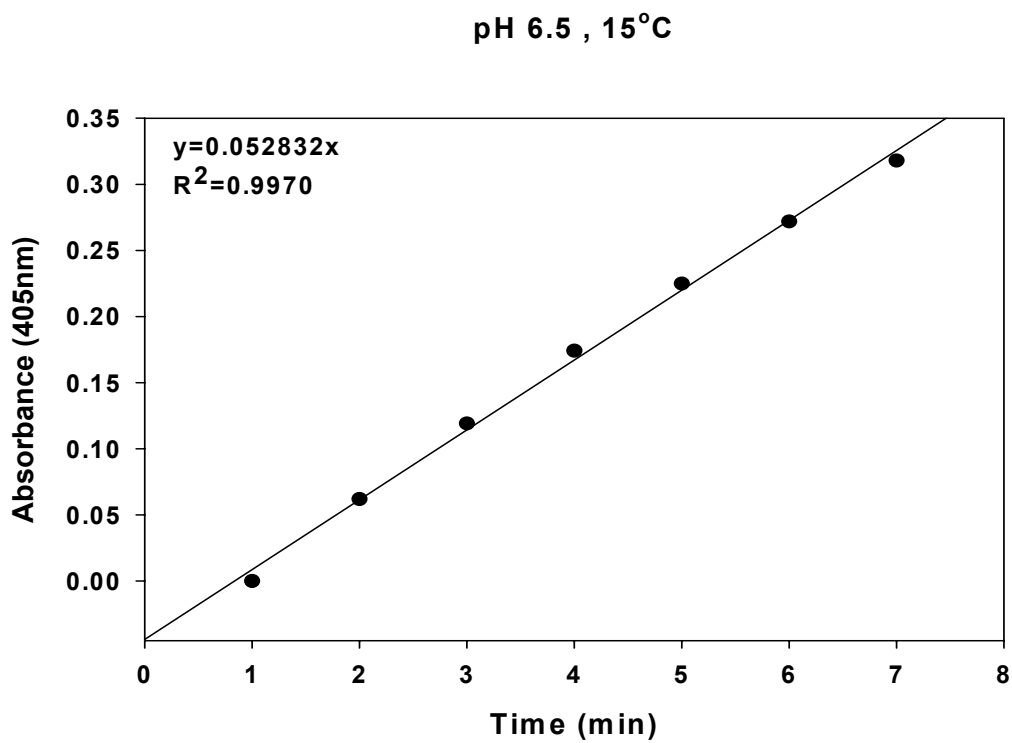
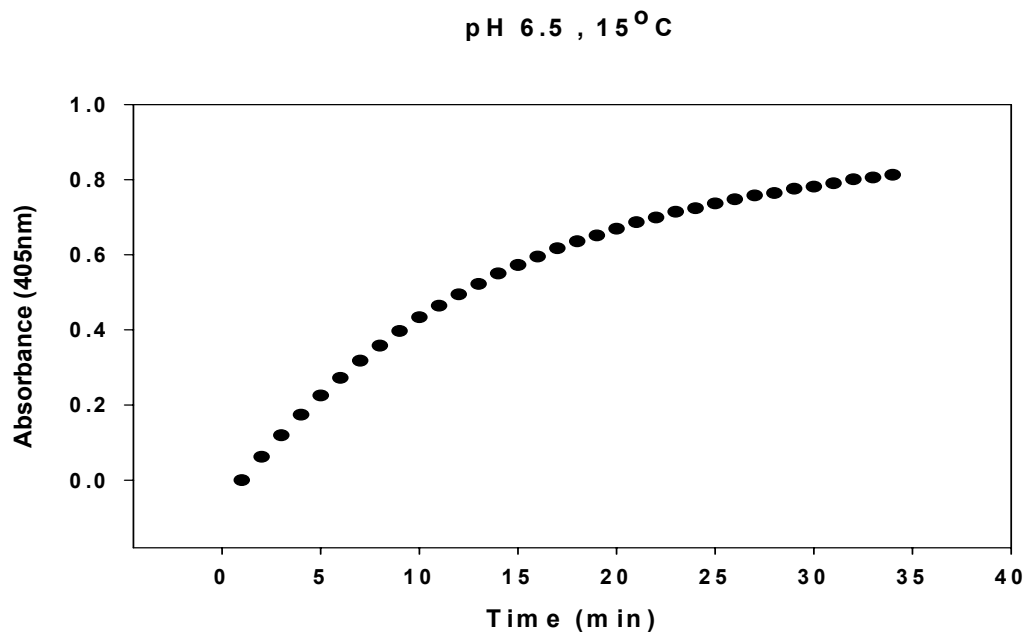


Fig. 40 pH=6.5, 15°C에서 free  $\alpha$ -galactosidase의 activity

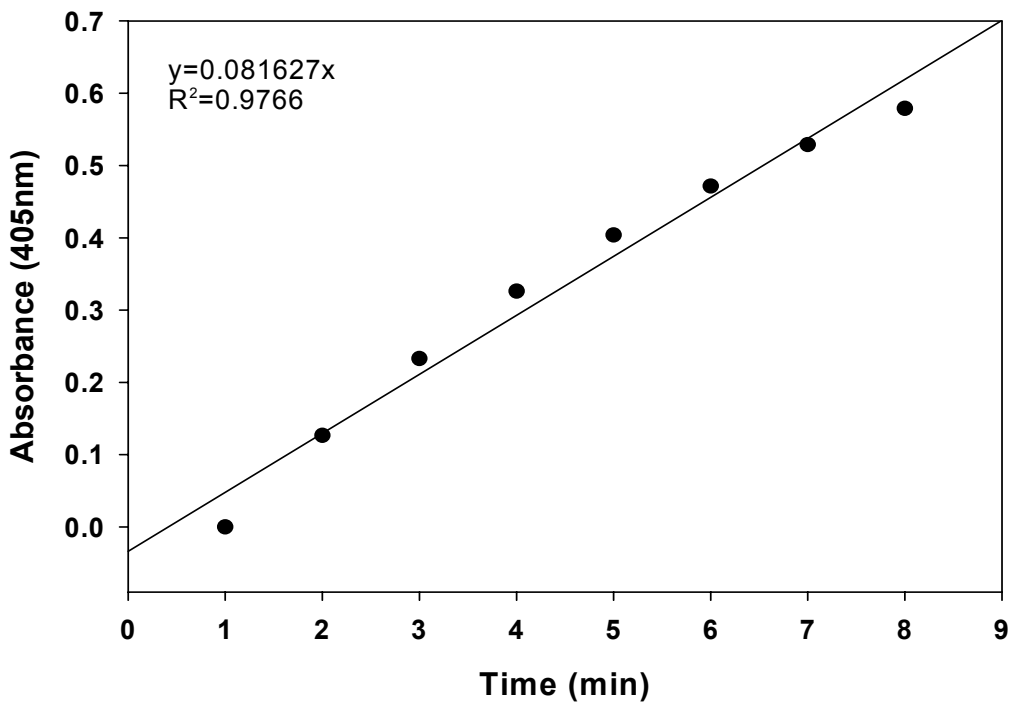
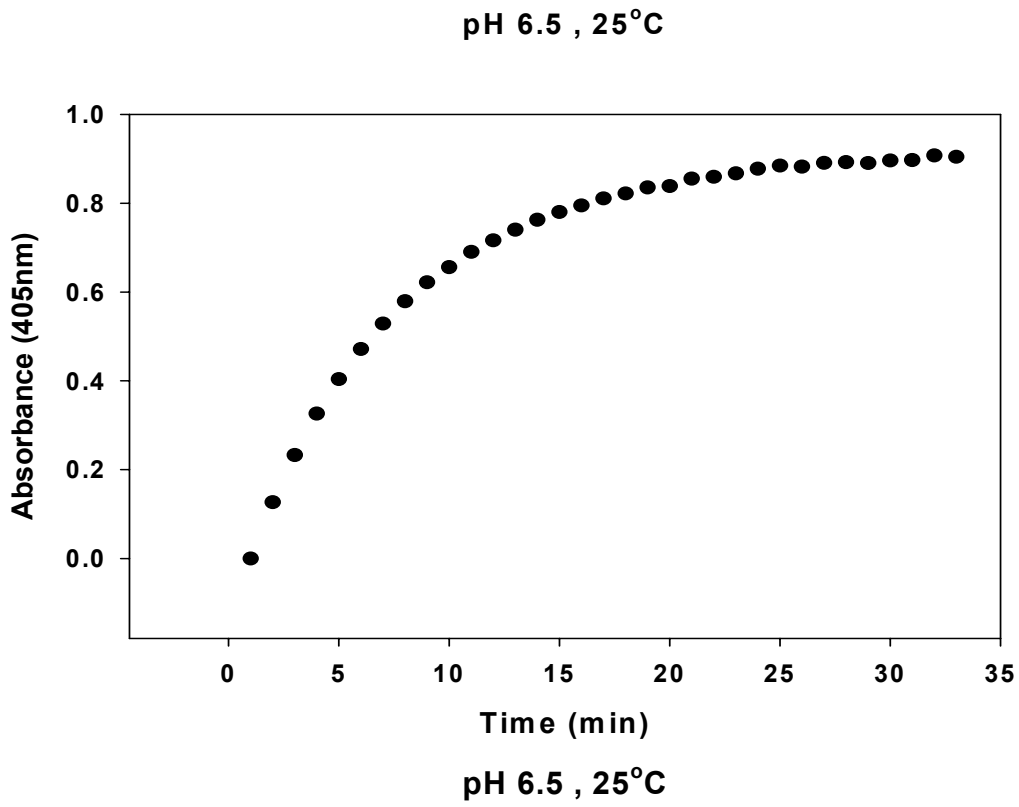
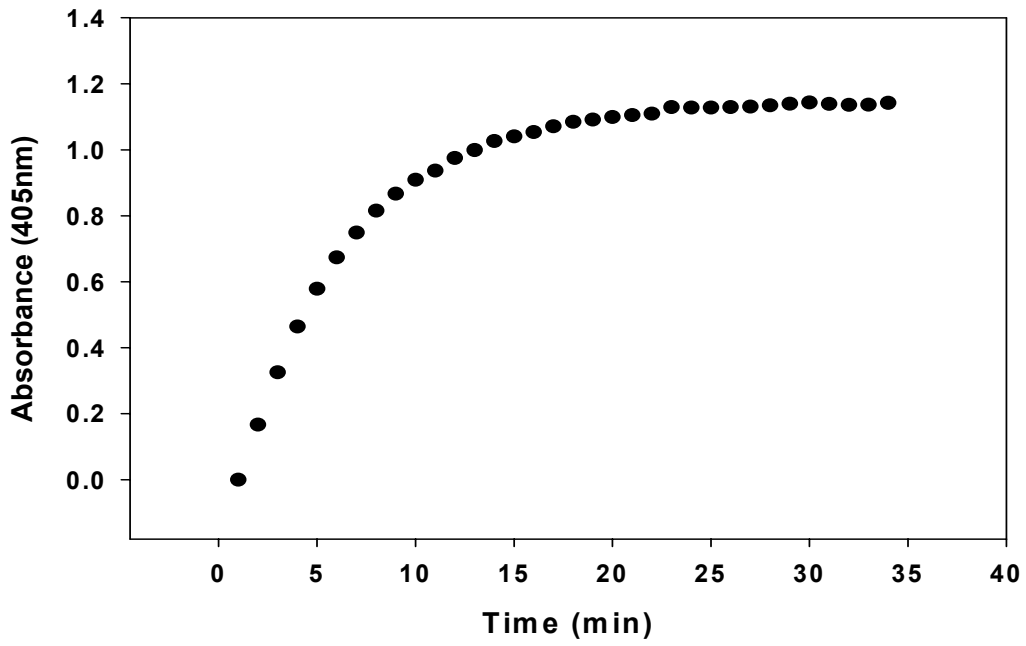


Fig. 41 pH=6.5, 25°C에서 free  $\alpha$ -galactosidase의 activity

pH 6.5 , 40°C



pH 6.5 , 40°C

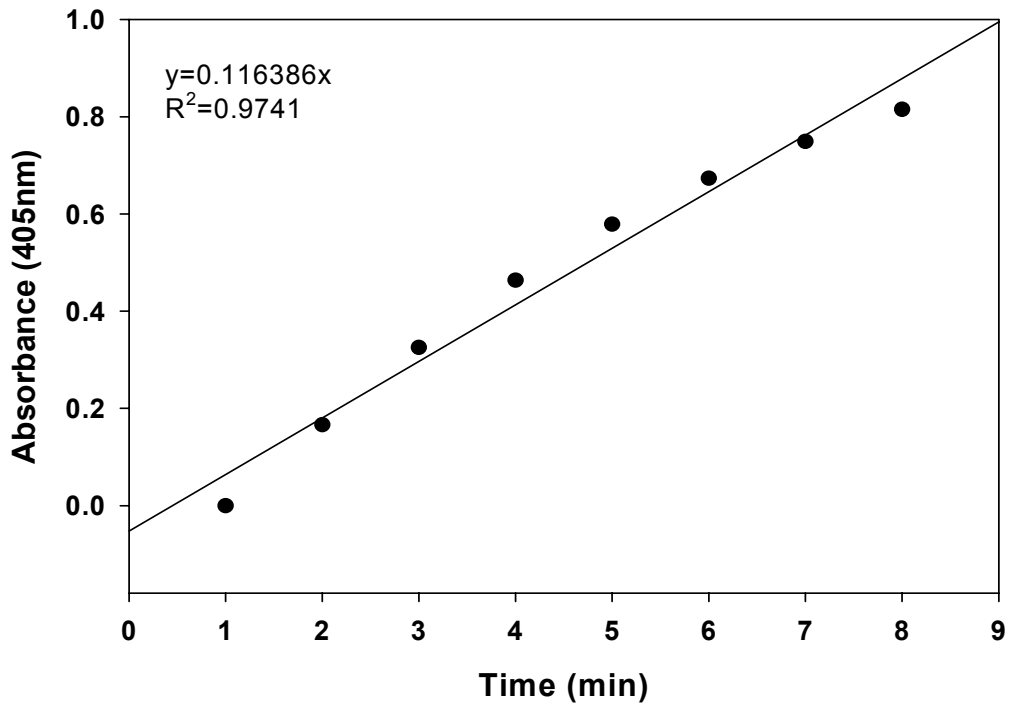


Fig. 42 pH=6.5, 40°C에서 free  $\alpha$ -galactosidase의 activity

3) 조건별 free  $\alpha$ -galactosidase 상대속도 비교

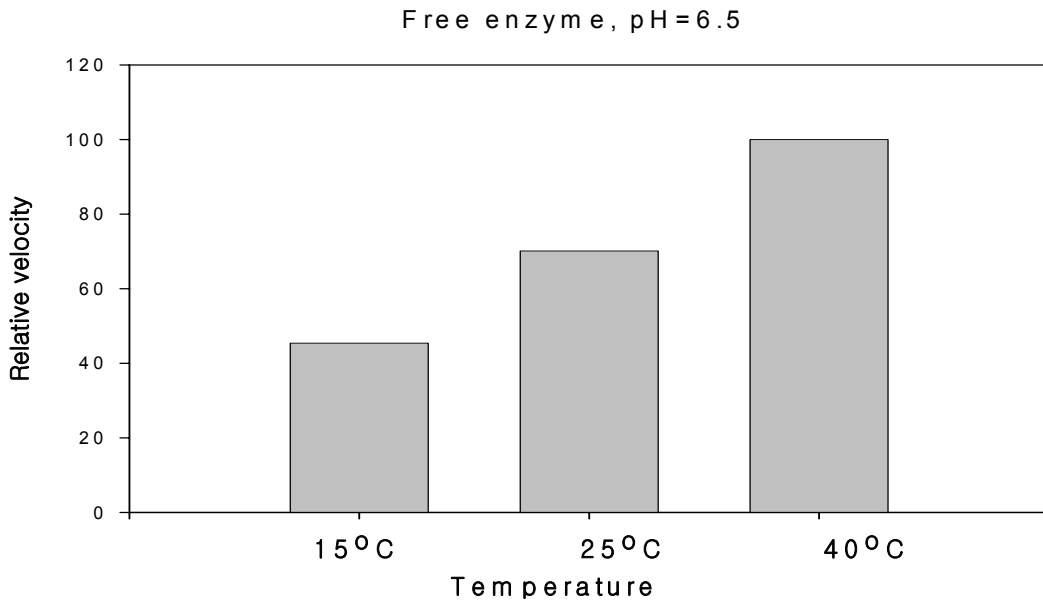


Fig. 43 pH=6.5, 온도별 free  $\alpha$ -galactosidase의 상대속도 비교

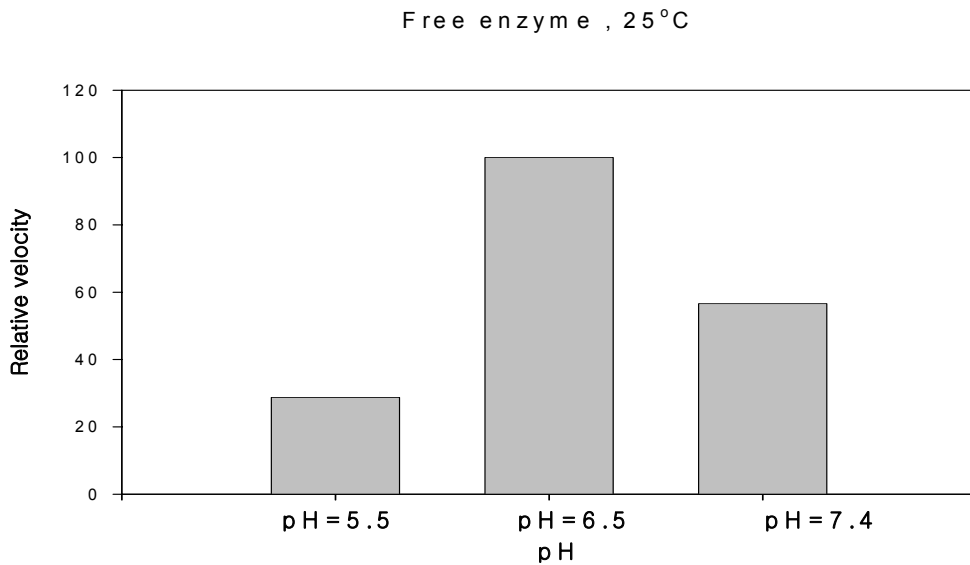


Fig. 44 25°C, pH별 free  $\alpha$ -galactosidase의 상대속도 비교

나.  $\alpha$ -galactosidase immobilization 및 immobilization 최적화

1) 담체 전처리 최적화 결과

Fig. 45의 결과에서 보듯이,  $H_2SO_4$ 와  $H_2O_2$ 를 5:1로 혼합한 용액과,  $H_2O_2$  30%, 35%를 사용하여 전처리를 한 경우 silanization과 glutaraldehyde modification yield가 모두 좋은 결과를 보여 주었다. 특히 Fig. 46의 결과와 같이,  $H_2O_2$ 의 경우 전 농도 분

포에 걸쳐서 고르게 좋은 결과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%~35%에 걸쳐서, glutaraldehyde modification yield는 많은 차이를 보이지 않았으나 silanization yield에 있어서 차이를 보였기 때문에 silanization yield가 가장 높았던 35% 과산화수소수로 전처리 하는 방법을 최적 조건으로 결정하였다.

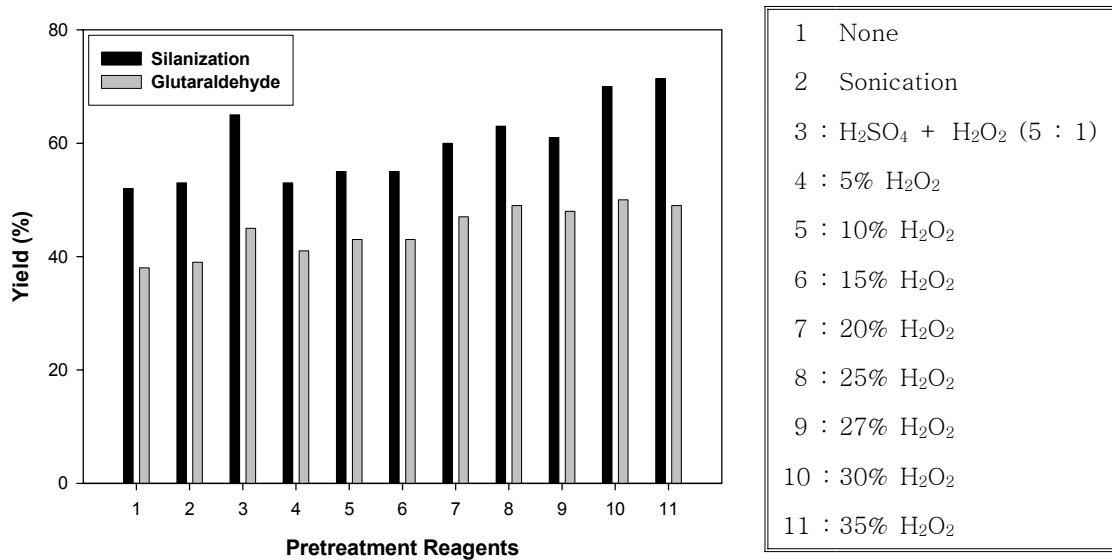


Fig. 45 Silanization, glutaraldehyde modification yield with various pretreatment reagents

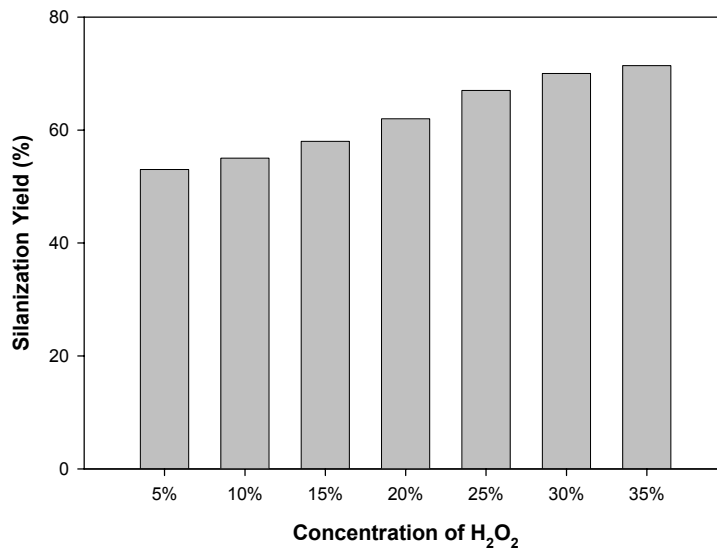


Fig. 46 Silanization yield with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration

## 2) Silanization 최적화 결과

Fig. 47에 나타난 결과와 같이, 3-APTES가 다소 높은 효소 활성을 보이는 것을 확

인하였다. 농도별 실험 결과에서는 10% 용액을 사용하였을 경우 효소의 활성이 가장 좋았다.

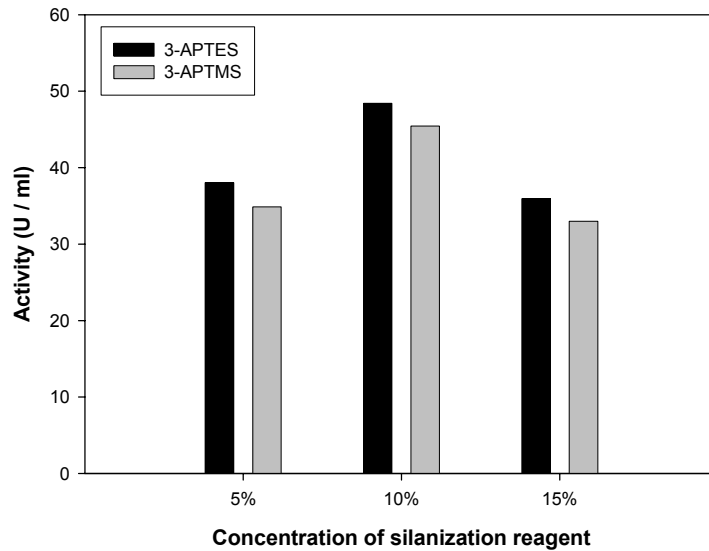


Fig. 47 Preparation of 3-APTES and 3-APTMS with immobilized enzyme activity

### 3) $\alpha$ -galactosidase immobilization 최적화 결과

담체 0.1g 과 반응용액0.6ml(enzyme soln. 0.3ml +pH6.5 potassium phosphate buffer 0.3ml)당 loading된 효소는 1.53mg이며, 반응 후 액상에 남은 단백질량은 0.1mg/ml이다. 그러므로 0.06mg(0.1mg/ml×0.6ml)의 단백질이 담체에 결합하지 못하였으며 %농도로 환산했을 때의 잔류 단백질량은 4%로서 총 96%의  $\alpha$ -galactosidase가 담체에 결합하였다.

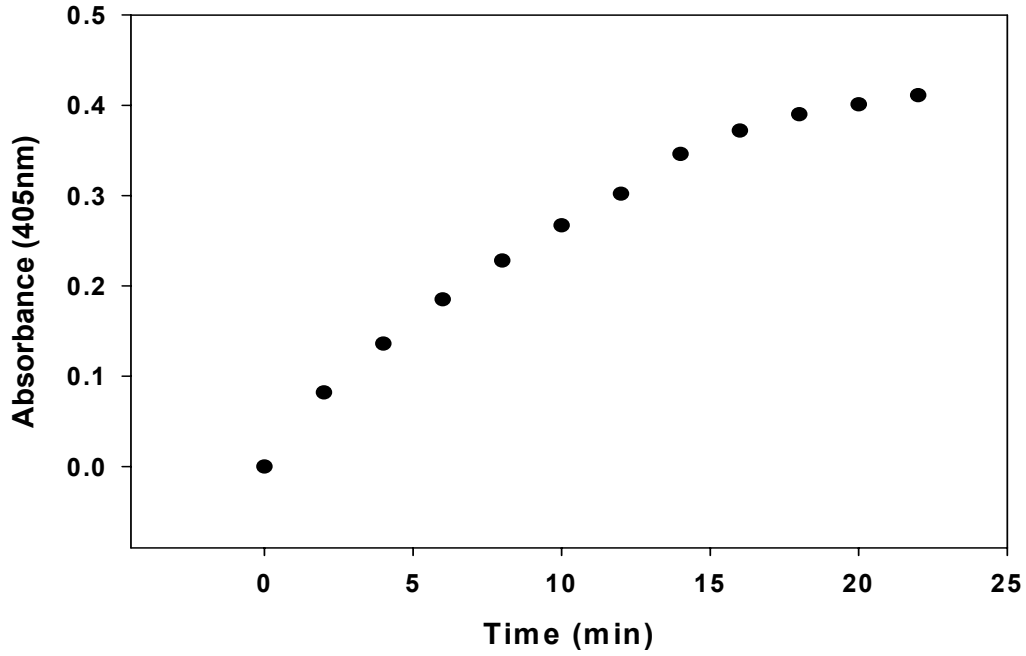
### 다. Immobilized $\alpha$ -galactosidase assay

담체 10mg에 결합한  $\alpha$ -galactosidase에 100ul의 pH6.5 potassium phosphate buffer를 넣고, 총 1.2ml의 동일 buffer로 맞추어 준 후 1mM, 300ul의 *p*-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-galactoside의 기질을 넣어 반응시켰다. Immobilized  $\alpha$ -galactosidase는 세 가지 pH (pH= 5.5, 6.5, 7.4)와 두 온도(25℃, 40℃에서)반응을 측정하였다. UV/VIS spectrophotometer(Ultrspec 2100Pro, USA)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 2분단위로 온도별, pH별로 구분하여 측정하였다. Fig. 48~55 에서 나타낸바와 같이 free  $\alpha$ -galactosidase는 pH=7.4과 40℃에서 가장 높은 활성과 상대속도를 나타내었다.



1) 25°C에서 pH 최적화

pH 5.5 , 25°C



pH 5.5 , 25°C

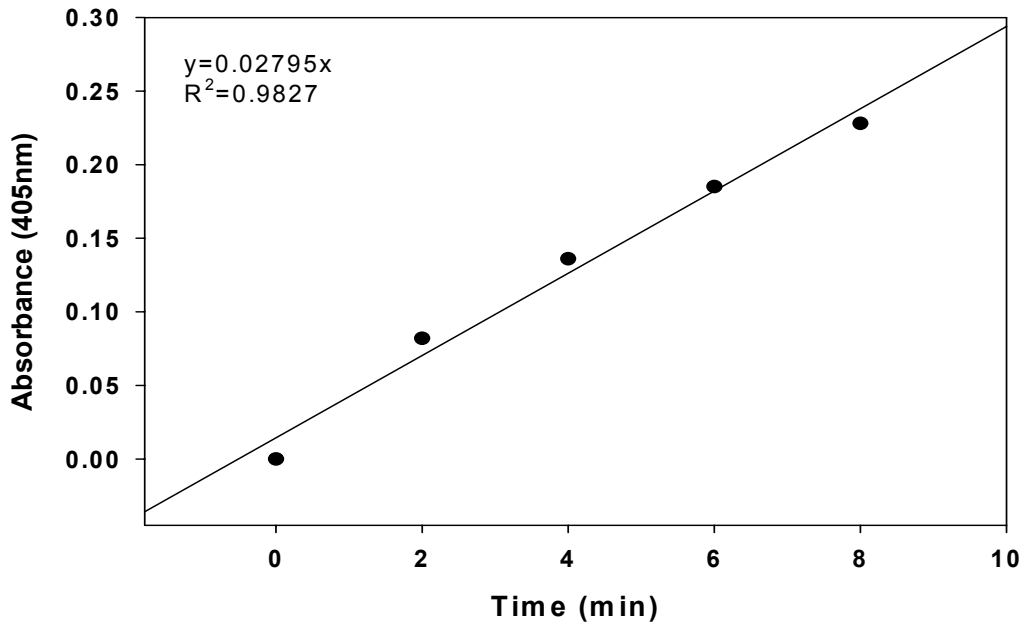
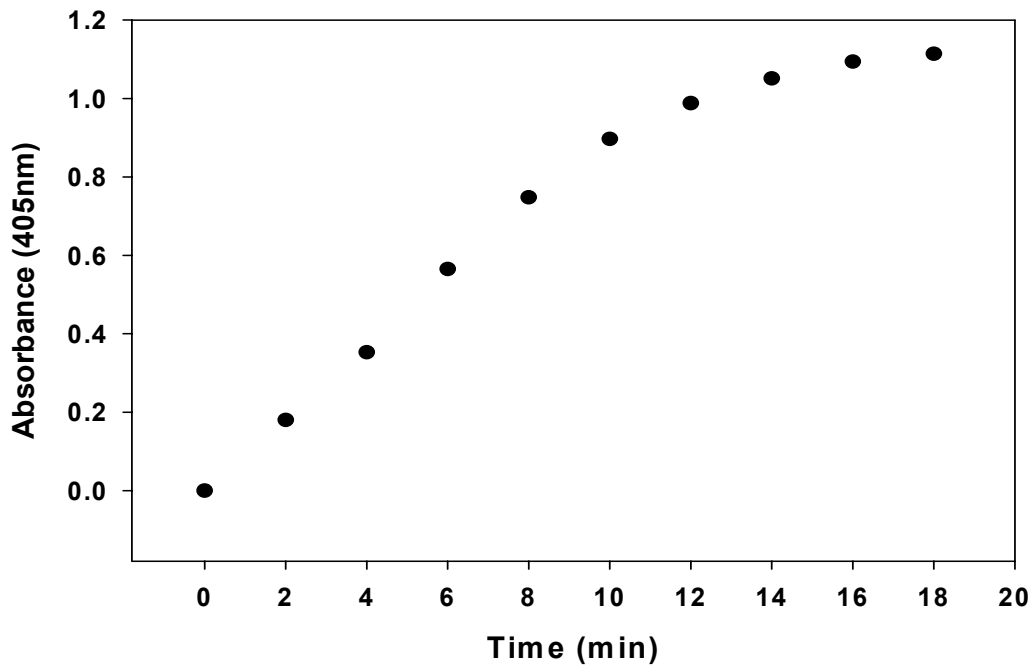


Fig. 48 pH=5.5, 25°C에서 immobilized  $\alpha$ -galactosidase의 activity

pH 6.5 , 25°C



pH 6.5 , 25°C

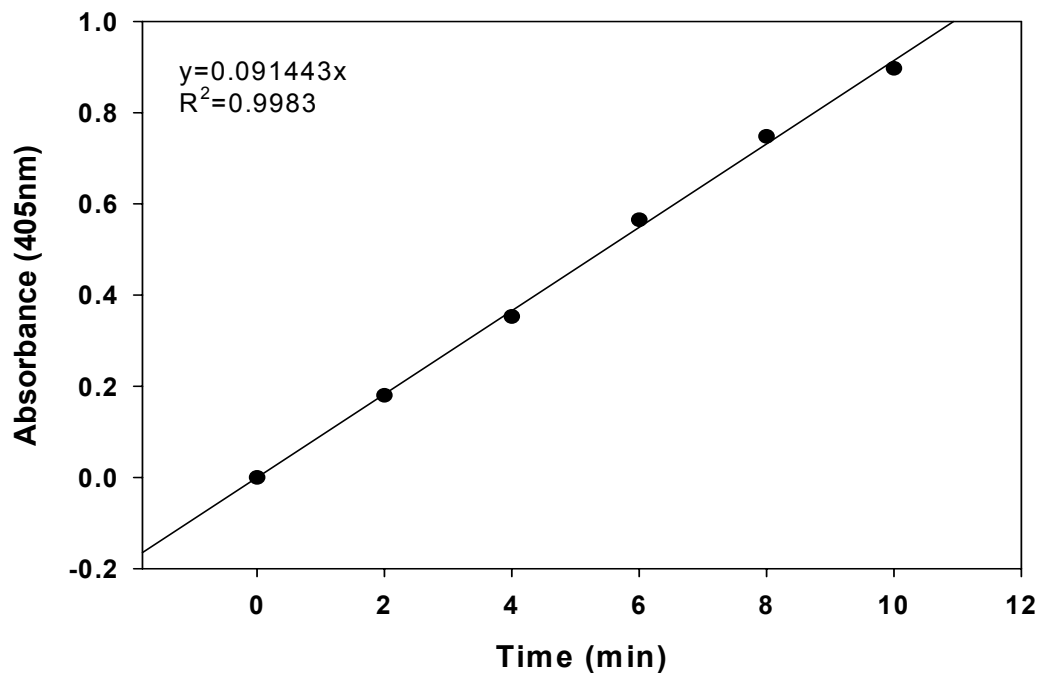
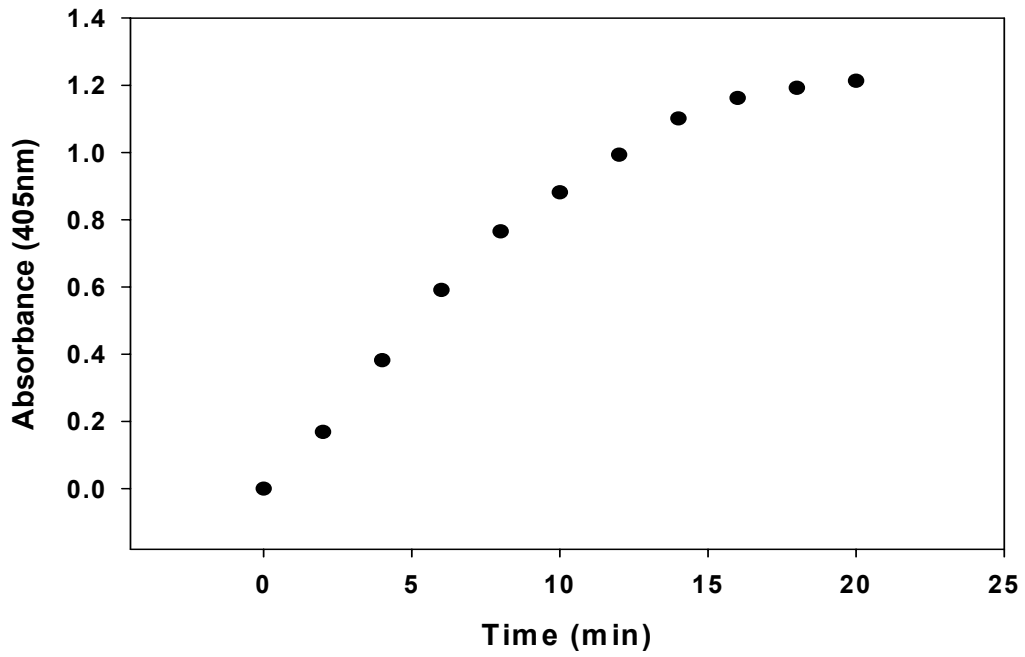


Fig. 49 pH=6.5, 25°C에서 immobilized  $\alpha$ -galactosidase의 activity

pH 7.4 , 25°C



pH 7.4 , 25°C

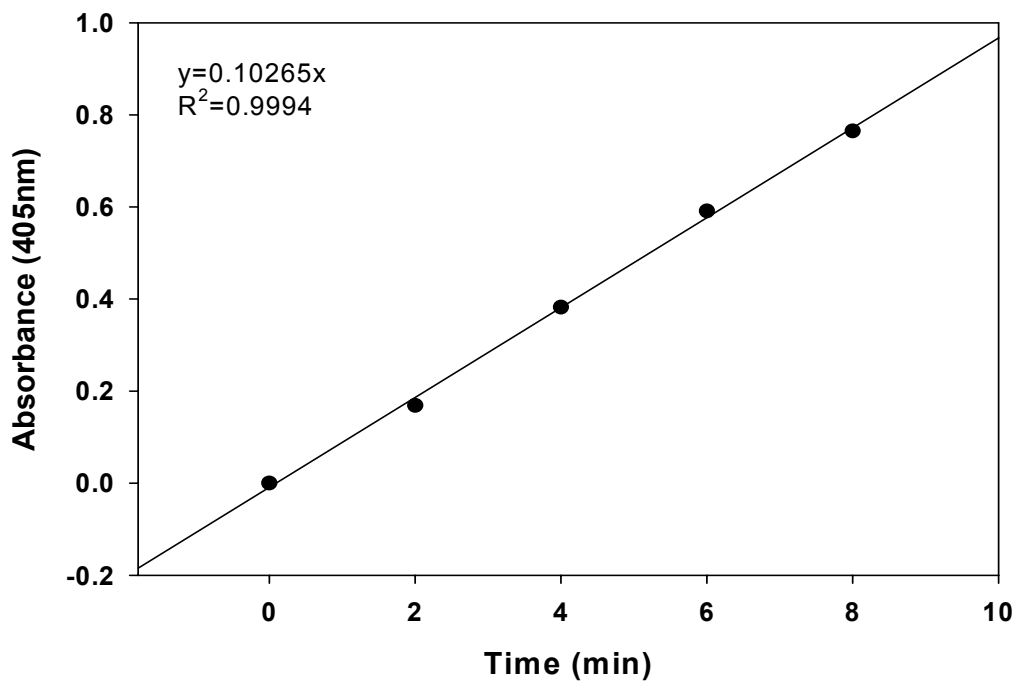


Fig. 50 pH=7.4, 25°C에서 immobilized  $\alpha$ -galactosidase의 activity

2) pH=7.4에서 온도 최적화

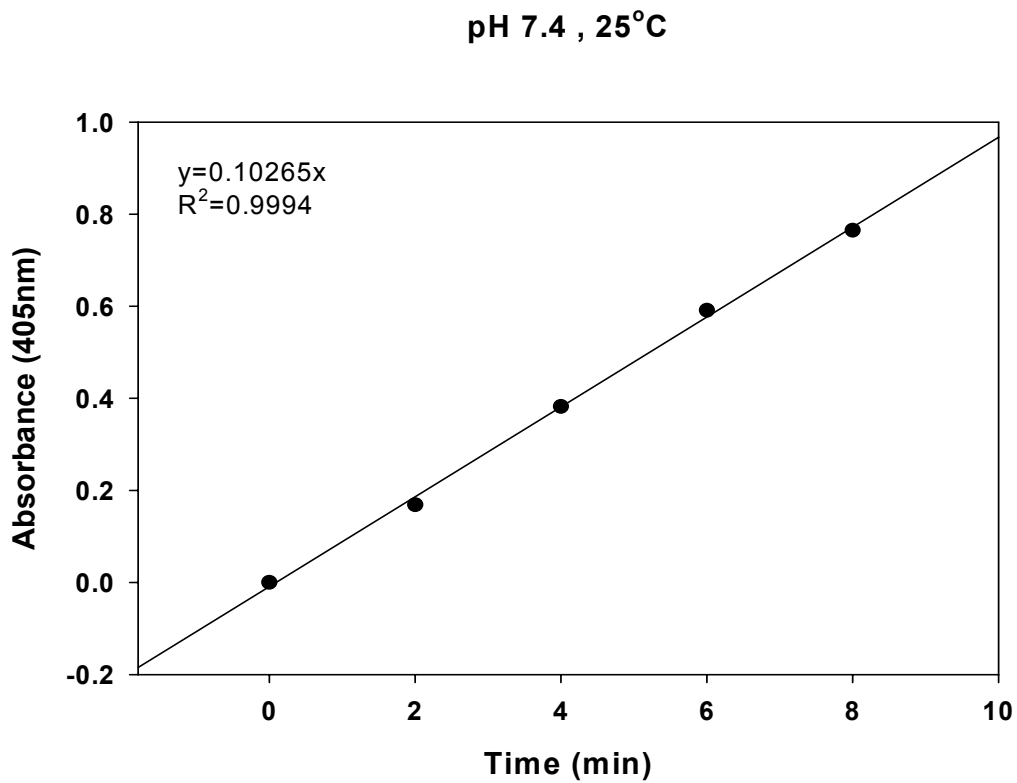
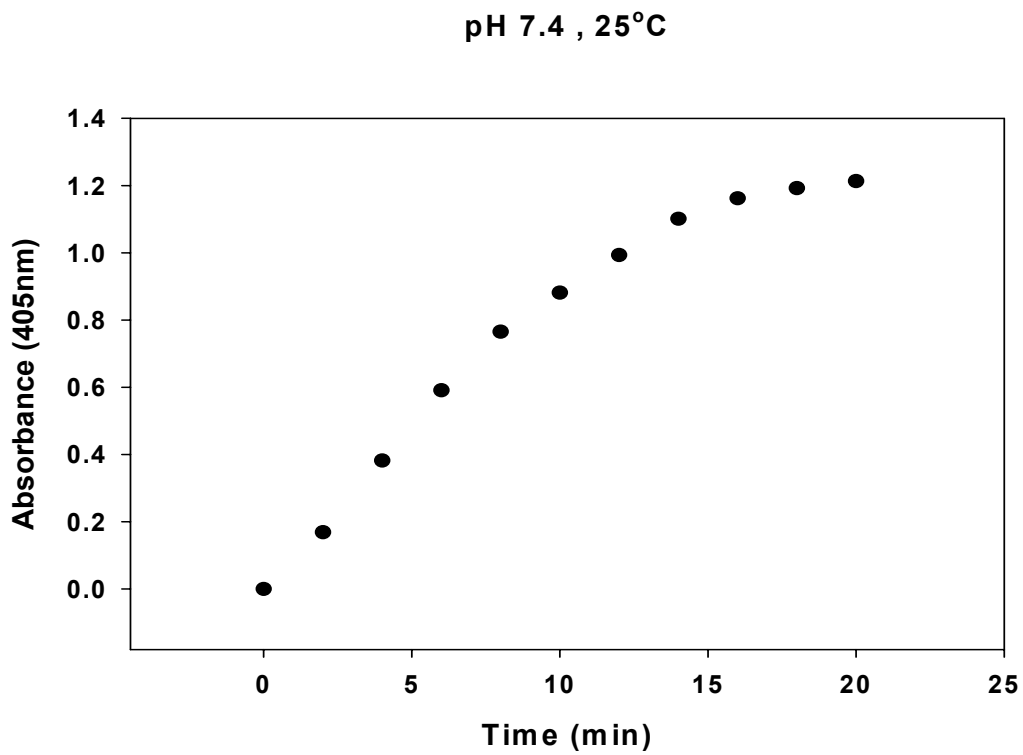
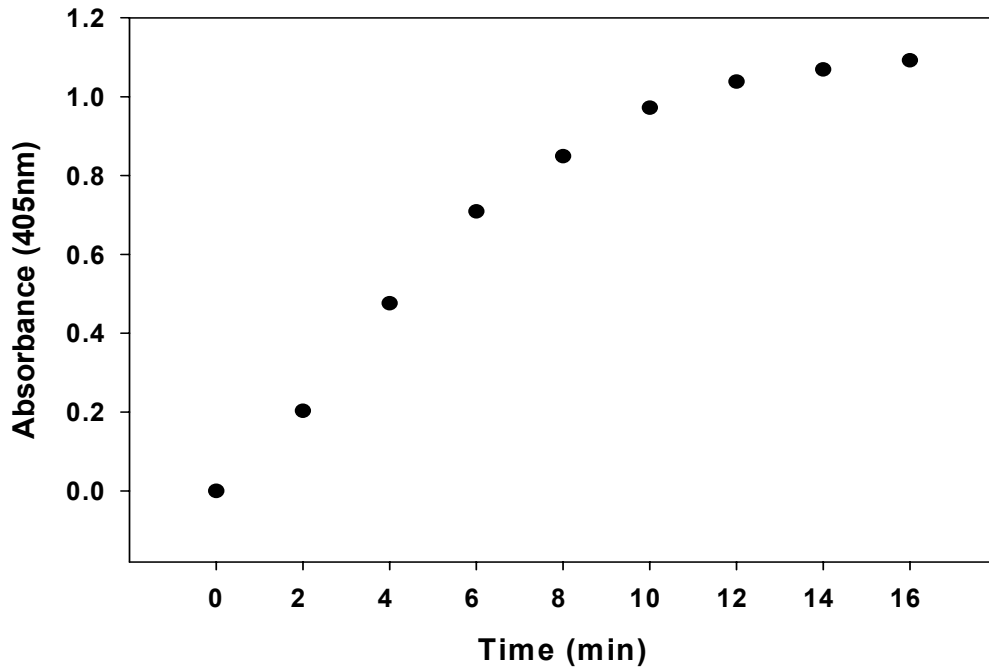


Fig. 51 pH=7.4, 25°C에서 immobilized  $\alpha$ -galactosidase의 activity

pH 7.4 , 40°C



pH 7.4, 40°C

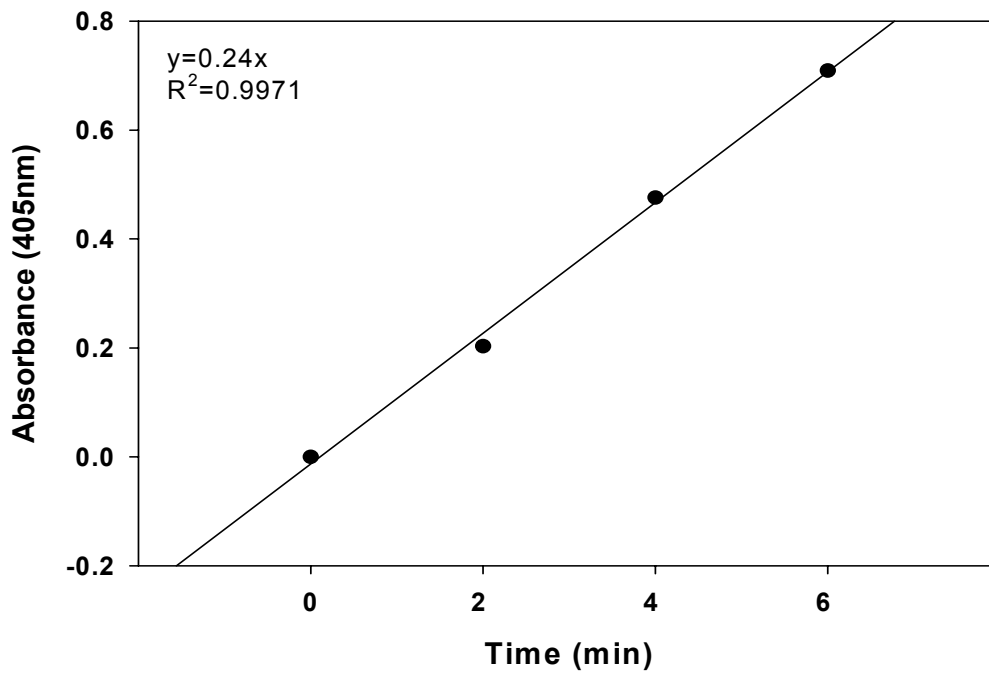


Fig. 52 pH=7.4, 40°C에서 immobilized  $\alpha$ -galactosidase의 activity

3) 조건별 free  $\alpha$ -galactosidase 상대속도 비교

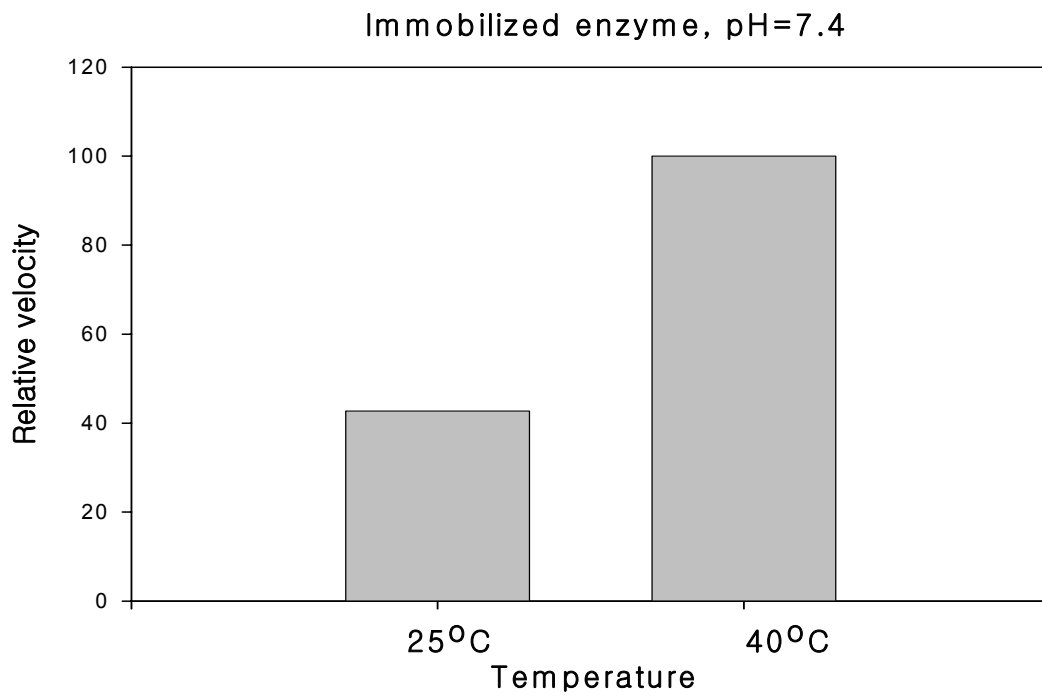


Fig. 53. pH=7.4, 온도별 immobilized  $\alpha$ -galactosidase의 상대속도 비교

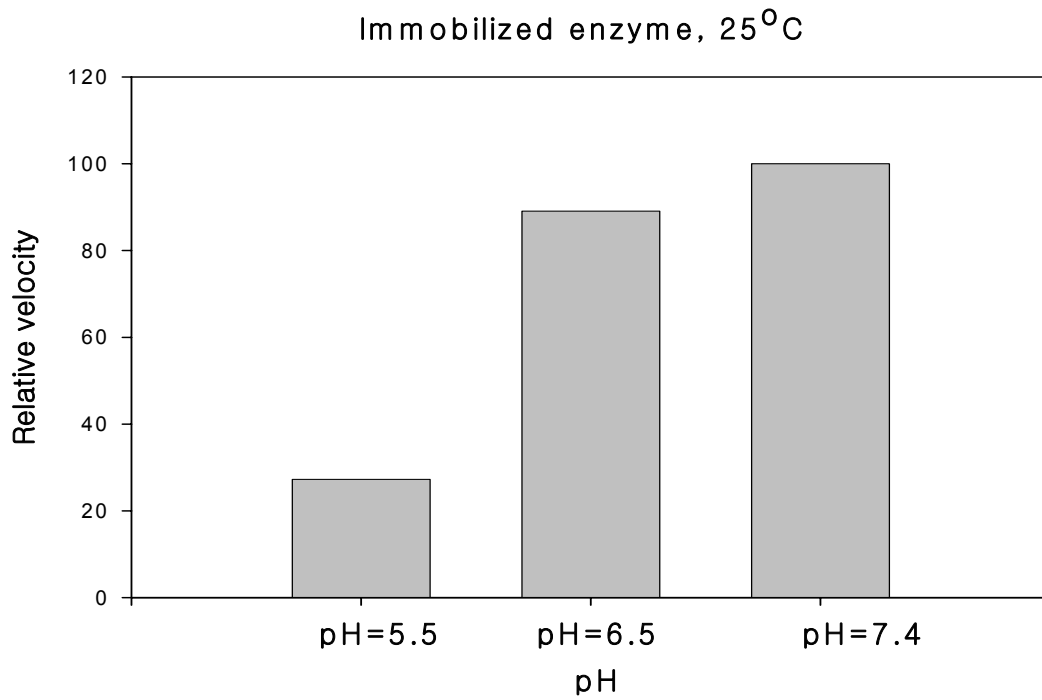


Fig. 54 25°C, pH별 free  $\alpha$ -galactosidase의 상대속도 비교

라. Free  $\alpha$ -galactosidase 와 immobilized  $\alpha$ -galactosidase 의 stability 비교

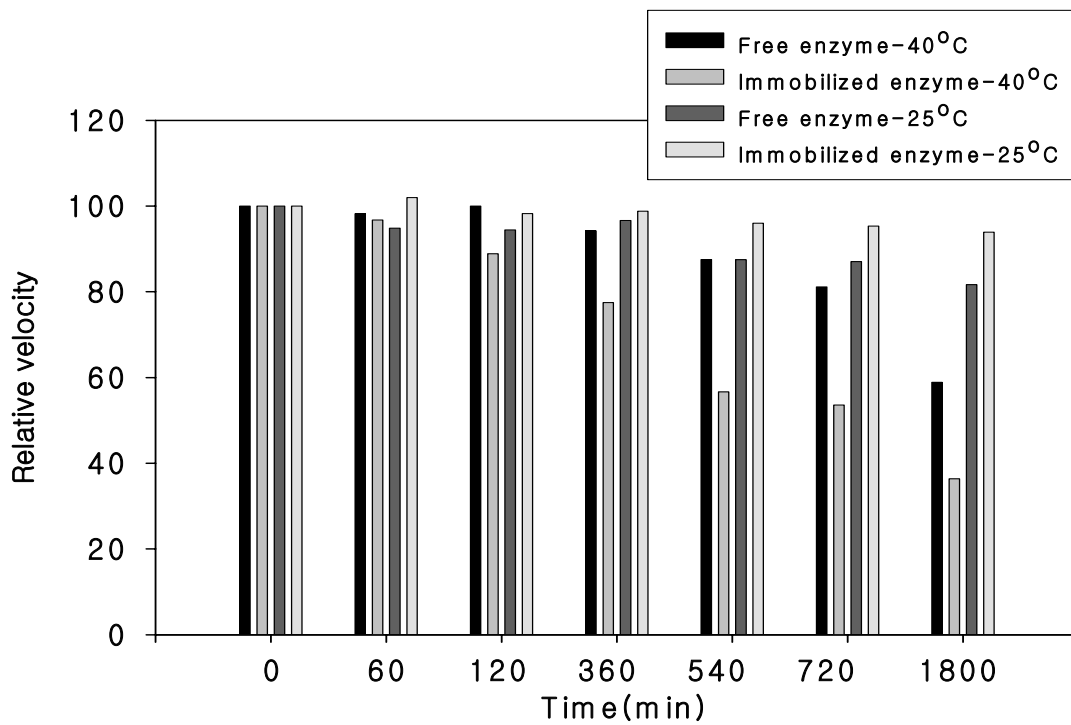
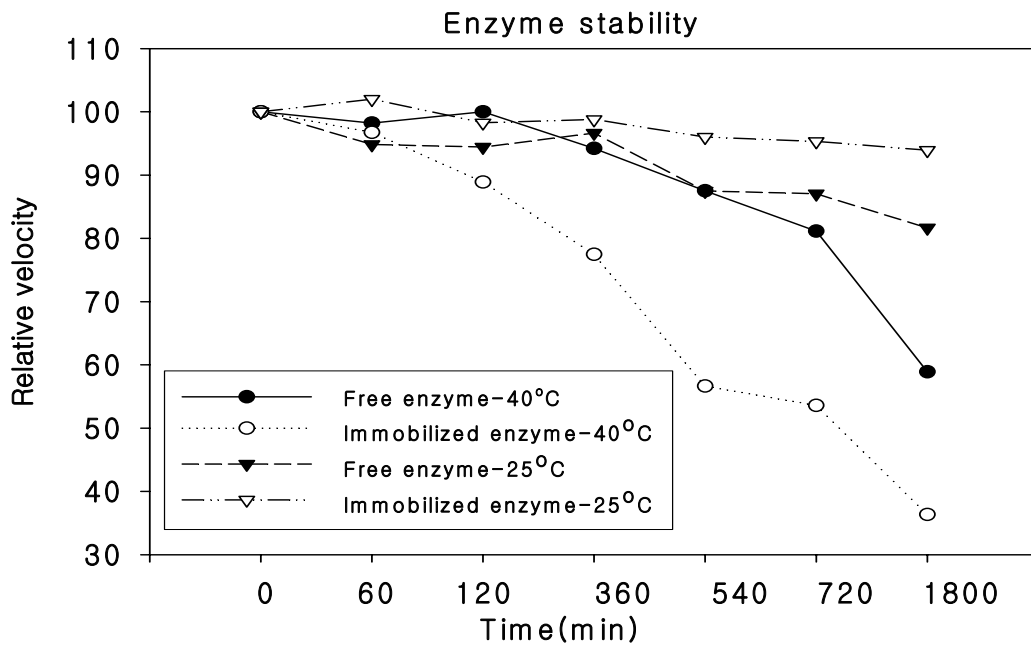


Fig. 55 Free  $\alpha$ -galactosidase 와 immobilized  $\alpha$ -galactosidase 의 온도별 stability 비교

40℃에서 보관한 free enzyme의 경우 보관 후 12시간까지는 대조군에 비해 80%이상의 상대속도를 나타내며 30시간 이후에는 거의 58%까지 상대속도가 떨어지는 경향을 보이는 반면 immobilized enzyme의 경우에는 보관 후 1시간 이후부터 지속적으로 상대속도가 낮아져 30시간에 이르러서는 36%까지 상대속도가 감소함을 나타내었다. 25℃에서 보관된 free enzyme의 상대속도의 경우 높은 안정성을 나타내었는데 보관 후 6시간까지는 대조군과 거의 동일한 수준의 상대속도를 유지하였으며, 30시간에 이르러서도 80%에 가까운 상대속도를 유지하고 있었다. 25℃에서 보관된 immobilized enzyme의 경우에는 실험군 중 가장 우수한 stability를 나타내었는데, 보관 후 12시간 까지도 대조군과 거의 비슷한 상대속도를 유지하였고 보관 후 30시간 측정 시에도 90% 이상의 높은 상대속도를 유지하고 있었다. 각각의 온도별과 pH별 그리고, free 와 immobilized 된 상태에서의  $\alpha$ -galactosidase의 기질을 분해하는 척도를 비교 분석한 결과, 기질을 분해하는  $\alpha$ -galactosidase의 능력과 안정성은 free enzyme의 경우에는 pH=6.5, 25℃에서 가장 높은 경향을 나타내었으며, immobilized enzyme의 경우에는 pH=7.4, 25℃에서 가장 높은 경향을 나타내었다. 40℃에서는 free 와 immobilized 된 상태에서의  $\alpha$ -galactosidase의 기질을 분해하는 상대속도는 빠르게 나타나지만, 특히 immobilized enzyme의 경우 안정성에 심각한 문제를 초래하여 기질을 분해하는 능력이 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서 immobilized enzyme을 실제로 상용하기 위해서는 25℃의 낮은 온도에서 사용을 하면 free enzyme 보다 높은 활성을 유지하면서도 재사용이 가능하여 생산성을 올릴 수 있는 가능성이 높다고 할 수 있다.

#### 마. 메밀로부터 추출된 fagopyritol B1 수율 분석

메밀에서 fagopyritol B1 이 다량 함유된 부분은 bran으로 알려져 있다. 메밀은 hull이 최외층을 두껍게 감싸고 있으며 hull과 메밀의 안쪽부분의 얇게 경계를 이루는 부위가 bran부위다. 2차 연도에서는 bran을 따로 분리하지 못하였으며 hull을 제외한 메밀 전 부위로부터 fagopyritol B1을 추출하였고 가장 높은 함유량을 나타난 양절메밀 2호가 메밀가루 10g당 83.8 $\mu$ g으로 상당히 낮은 수율을 나타내었다. 메밀로부터 bran 부위만을 따로 분리하여 bran 부위를 sample로 취해 gas-chromatography로 분석한 결과 메밀가루 10g 당 19.54mg으로 전체 부위에서 취했을 때보다 233배 더 높은 수율을 나타내었다.

#### 바. 산에 의한 fagopyritol B1의 분해

2N TFA 2N trifluoro acetic acid(TFA)를 100ul 처리하여 30분 동안 70℃의 water bath에서 incubation 시켜서 가수분해를 시킨 결과 건조 메밀가루 10g에 들어있는 fagopyritol B1 19.54mg의 가수분해로 D-*chiro*-inositol 2.62mg을 획득하였다. 이는 1차 연도에서 두부 콩 10g 으로부터 생산되어진 두부 순물에서의 환산된 D-*chiro*-inositol 함유량인 0.7mg보다 거의 4배 가까이 많은 D-*chiro*-inositol을 메밀로부터 얻을 수 있음을 보여주고 있다.

#### 사. Free enzyme과 immobilized enzyme에 의한 fagopyritol B1의 분해



동량의 free enzyme과 immobilized enzyme에 의한 fagopyritol B1의 분해의 차이는 거의 나타나지 않았으며 건조 메밀가루 10g에 들어있는 fagopyritol B1 19.54mg의 가수 분해로 D-chiro-inositol 2.69mg을 획득하였다. 이는 산에 의한 처리에 비해 0.07mg/10g(건조메밀중량)이 많은 수치이다. 선행 연구자들에 의하여 산에 의한 fagopyritol B1의 분해는 enzyme에 의한 fagopyritol B1의 분해에 비해 D-chiro-inositol 이외에 여러 가지 phenolic compounds 등의 부산물을 생산함이 밝혀져 있으며, 실제 본 실험에서의 gas-chromatography분석 결과 D-chiro-inositol 보다 빠른 retention time에서 여러 가지 불분명한 작은 peak가 감지됨을 관찰하였다. 결국, 수율 측면에서 enzyme에 의한 fagopyritol B1의 분해가 산에 의한 fagopyritol B1의 분해에 비해 커다란 우위에 있지는 않으나 여러 가지 부산물을 발생시키지 않으면서 특이적으로 fagopyritol B1을 분해하여 D-chiro-inositol을 획득할 수 있는 장점이 있으며, 위의 immobilized enzyme 실험결과에서 볼 수 있듯이 immobilized enzyme의 경우 장시간 enzyme의 stability를 지니고 재사용이 가능하여 고가의 enzyme에 대한 비용을 절감할 수 있는 장점이 있다고 할 수 있다.

<제3세부과제>

1. 두부순물로부터 D-pinitol 및 D-chiro-inositol의 회수공정 설비

가. 흡착수지와 이온교환수지를 이용하여 두부 순물에서 pinitol을 분리하고자 일차적으로 산업적으로 적합한 레진을 선별하고 여기에서 선별된 레진을 이용하여 크로마토그래피 상에서의 조건을 확립하여 pinitol을 분리할 수 있는 조건을 최적화 하였다.

1) 레진 선택

산업적으로 적합한 레진을 선별하기 위해 흡착수지로 HP 20, SP 825와 XAD-7을 사용하였다. 레진을 통과한 여액에서 HPLC를 이용한 pinitol 함량, 순물 농도, 순물 총량을 실험한 결과 Table 8과 같이 HP 20과 SP 825가 비슷한 함량을 나타내었으나 SP 825가 HP 20보다 레진 수명이 길어 산업적으로 SP 825 레진을 선택하였다.

Table 8 흡착수지의 효율성 비교

	흡착수지		
	HP 20	SP 825	XAD-7
D-chiro-inositol 함량 (%)	33.3	33.4	31.7
순물 농도 (mg/ml)	2.701	2.695	2.125
순물 총량 (kg)	40.51	40.42	31.87

2) 생물학적산소요구량 (BOD) 및 화학적산소요구량 (COD)을 측정

산업적으로 적용시키기 위해서 실제로 어느 정도 정제되었는지를 고려해야 되므로 pinitol 분리 과정 각 단계의 여액을 수집하여 BOD와 COD를 측정하였다 (Table 9). 측정 결과 규조토 여과 후의 순물 여액의 BOD가 800 ppm 이하로서 절대적으로 양호한 환경 친화적 배출수로 변환되어 막대한 폐수처리 비용 절약 및 환경오염 예방의 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

Table 9 생물학적산소요구량 (BOD) 및 화학적산소요구량 (COD) 측정

측정 수질	BOD (ppm)	COD (ppm)
순물원수	32,120	13,706
원심분리후의 순물원수	30,250	16,973
SP-825 통과 후의 순물 여액	24,758	13,912
규조토 여과 후의 순물 여액	768	942

나. 공정의 개발

- 1) 순물 중의 D-pinitol 및 D-*chiro*-inositol의 경제성있는 안정적인 회수공정을 개발하고자 음이온/양이온수지를 이용한 공정은 고비용과 함께 불순물제거로 인해 제외되었고 제올라이트 및 활성탄 등의 흡착제 등을 이용하는 방법과 불순물을 제거한 후 농축하는 방법을 고안하여 연구를 진행하였다.

Table 10 흡착제의 흡착능력 비교

구 분	제올라이트(100g)	활성탄(100g)
1회 흡착량	1000 ml	1200 ml
2회 흡착량	500 ml	500 ml
3회 흡착량	300 ml	200 ml

- 2) 위 Table 10에서 볼 수 있는 것과 같이 제올라이트나 활성탄을 흡착제를 사용하는 경우 초기에는 흡제량의 10-12배의 순물을 처리할 수 있지만 회수가 증가할수록 흡착능력은 기하급수적으로 감소하였고, 또한 용출효과를 높이기위해서 50℃ 이상으로 가열해야하는 공정상의 번거로움과 에너지 비용이 발생하게 됨을 발견하였다. 이와 같은 공정은 실험실 규모에서는 가능하나 대량의 순물을 처리하는 공장의 공정에는 높은 비용의 부담이 된다.
- 3) 따라서 흡착제를 사용하는 방법 대신에 순물 중의 거대분자들을 규조토 통과를 이용해 제거한 후 농축하여 냉동건조한 후 분쇄하여 분말화한 샘플 얻었다. 초기 순물의 양은 1.5 ton 이었으며 원심분리와 흡착레진과 규조토를 차례로 통과하였다. 규조토는 저렴한 가격이어서 재사용의 필요하지 않는 장점이 있다. 진공농축에서 약 10 배를 농축하였으며 냉동건조를 거쳐서 약을 30 kg의 분말을 얻었고 현재 120 kg을 보관하고 있다. 상기 공정은 예비실험을 제외하고 3회 이상을 반복하여 개발된 공정의 유효성을 확인하였다. 분말의 성분조성을 검사하여 아래와 같은 결과를 얻었다. 이 과에 따라 본 과제의 목적인 D-*chiro*-inositol, D-pinitol의 분리회수공정을 구체적으로 구성할 수 있을 것으로 판단된다.

## 2. HPLC 분석결과

가. 분석조건: Column : YMC-Pack Polyamine, 250\*4.6mmI.D.

Eluent : acetonitrile/DW (75:25)

Flow rate : 1.0 ml/min

Detection : RI, 32\*10<sup>-6</sup> RIU/FU

나. HPLC 분석 크로마토그램

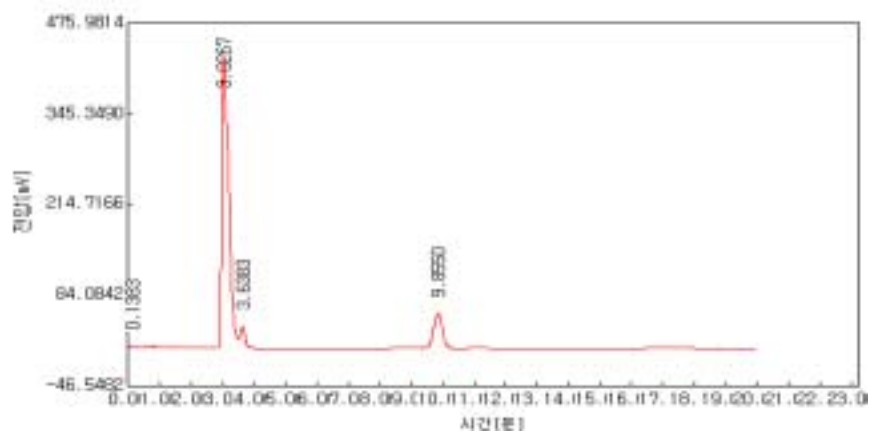


Fig. 56 피니톨 7mg

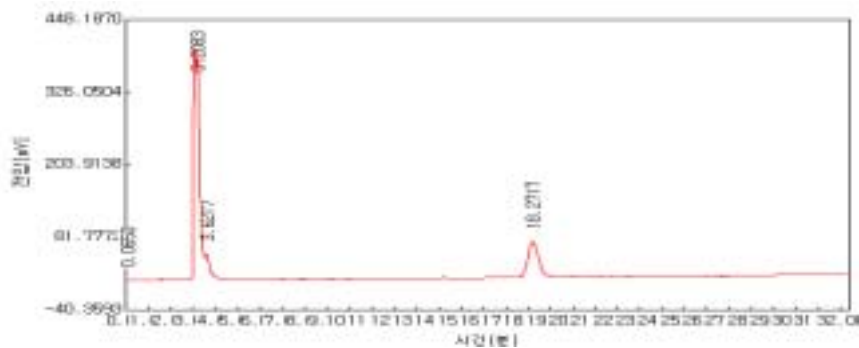


Fig. 57 설탕 5 mg

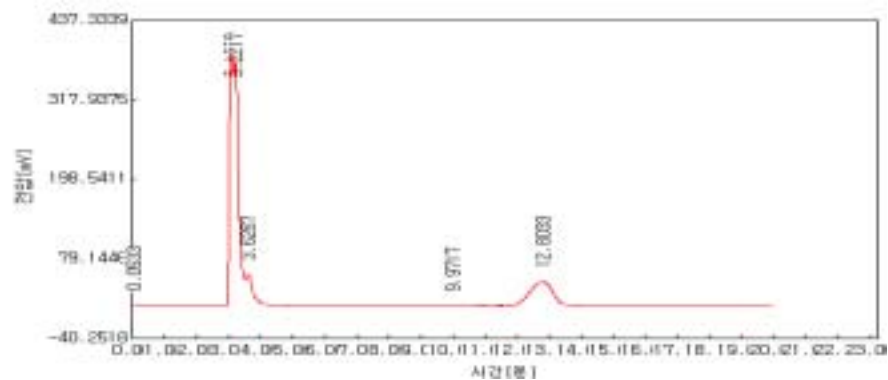


Fig. 58 포도당 7 mg

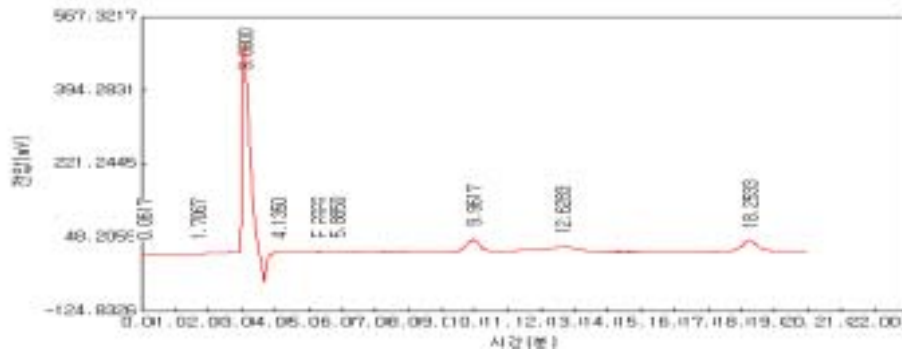


Fig. 59 최종 냉축분말 50 mg

HPLC 결과해석: 상기 Fig. 56~58에서 볼 수 있는 것처럼 표준 D-pinitol은 9.9분에서, 설탕은 18.3분, 도당은 12.8분에서 각기 다른 용출시간에 따른 피크를 보여주고 있다. 최종 냉동건조분말 50 mg을 같은 조건에서 분석한 결과는 Fig. 59에서 볼 수 있는데, 유사한 양의 D-pinitol과 설탕이 있는 것을 관찰할 수 있었으며 약간의 포도당이 있음을 확인 할 수 있었다. 하지만 어느 정도 있으리라 예상되었던 D-chiro-inositol은 관찰되지 않았다. 표준곡선의 작성을 통해 최종 냉동분말에 있는 D-pinitol의 양은 약 9 % 정도임을 확인 할 수 있었다.

### 3. 독성시험

전임상시험 연구센터에 의뢰하여 식품의약품안전청고시 제1999-61호(1999년12월22일)의 약품등의 독성시험 기준에 따라 랫드를 사용 하였으며, 예비시험에서 5,000 mg/kg의 투여군에서 아무런 이상이 발견되지 않아 당회 경구투여의 한계용량으로 많이 사용되는 2,000 mg/kg을 고용량으로 시험하였는데 아무런 이상이 발견되지 않았다. 이 양은 순수 pinitol 으로서는 약 200 mg/kg이 되는 양이다.

### 4. Pinitol 의 혈당강하효과

대두에서 추출한 피니톨 (3-O-methyl-chiro-inositol)은 혈당강하 성분으로 알려져 있다. 또한 정상 rat에서 glucose tolerance를 가지는 것으로 밝혀졌다. 피니톨과 유사한 물질로는 카이로 이노시톨 (Chiro-inositol)과 마이오이노시톨(Myo-inositol)이 있다. 사람이 피니톨을 복용하면 장에서 흡수되어 체내에서 카이로이노시톨 (Chiro-inositol)이라는 물질로 바뀌는데 피니톨과 카이로 이노시톨이 모두 혈당을 조절하는 기능을 가지고 있다고 알려져 있다. 본 실험에서는 리젠바이오텍에서 받은 대두추출물을 가지고 실험하였다. 이 대두추출물에는 피니톨 10 %가 함유되어 있다.

#### 1). Sample Preparation

wistar rat 수컷을 사용하였으며 샘타코에서 수입하였으며, 총 21마리 당노유도 시켰다. 피니톨은 리젠 바이오텍에서 받았으며 대두추출물 중 10%의 피니톨 함량을 가지고

있다. 경구투여용 sample은 대두추출물 일정량을 물에 분산시켜 준비 하였다.

2). 당뇨유도

21마리의 wistar rat 수컷을 사용하였으며 당뇨 유도하기위해서 Streptozotocin 45 mg/kg을0.1 M citrate buffer(pH=4.0) 100  $\mu$ l에 녹여 3일 동안 투여하였다. 절식 후 혈당이 300-400 mg/dl가 되면 당뇨가 유도되었다고 판단할 수 있으며, 각 그룹별로 평균 혈당이 비슷하게 5 마리씩 분리하여 실험 하였다.

3). Pinitol 투여

Pinitol 경구 투여를 하기 위해서 4시간 절식 시켰다. 당뇨 유도된 rat에 5 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg 농도의 pinitol을 500  $\mu$ l씩 경구 투여하였다. 혈당 강하 효과를 관찰 하기위해 경구 투여 후 한 시간마다 혈당을 관찰하였다. 실험이 끝날 때까지 쥐는 절식상태 를 유지하였다. 피니톨을 경구투여 하지 않은 그룹을 대조군으로 사용하였으며, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg 농도를 다르게 하여 경구투여 한 결과 대조군과 비교 하여 혈당 변화가 거의 없었다. 또한 실험그룹에 따른 혈당변화량의 유의성은 찾아 볼 수 없었다. (Fig. 60)

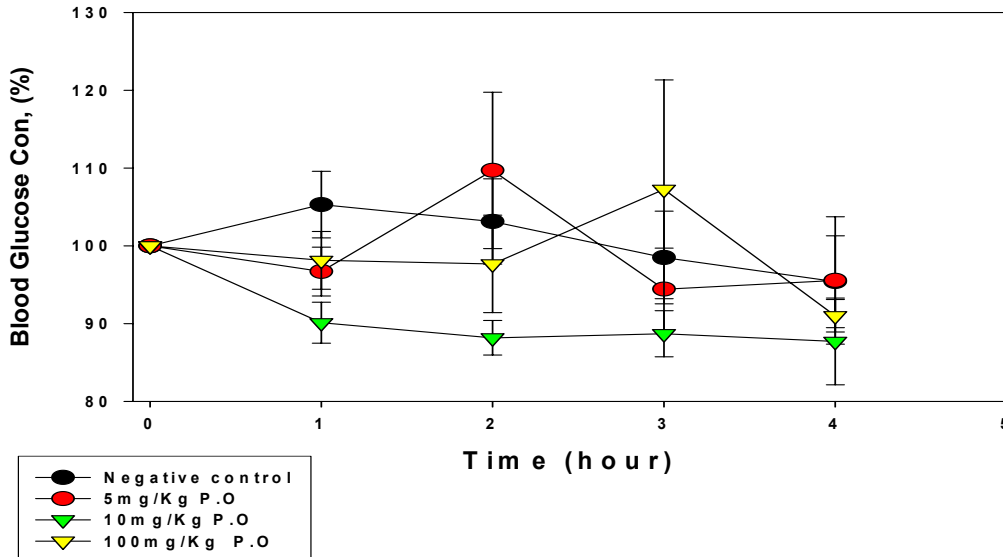


Fig. 60 Pinitol 경구투여 후 혈당 변화

1. 5 mg/kg 용량 투여시 sample

평균 230 g wistar rat 사용, 경구 투여량 500  $\mu$ l 이므로 piniol이 함유된 powder 69 mg을 3ml D.W에 녹여서 vortexing 하여 준비 하였다.

2. 10 mg/kg 용량 투여시 sample

wistar rat의 무게, 경구 투여량도 group2와 동일함. Pinitol이 함유된 power 138 mg을 3 ml D.W에 녹여서 vortexing 하여 준비 하였다.

3. 100 mg/kg용량 투여시 sample

wistar rat의 무게, 경구 투여량도 group2와 동일함. Pinitol이 함유된 power 1.84 g을 4 ml D.W에 녹여서 vortexing 하여 준비 하였다.

Fig. 61 에서는 경구투여량을 200  $\mu$ l로 줄였으며 100 mg/kg 경구투여 하였다. 이번에도 대조군과 비교하여 혈당 변화가 없었다.

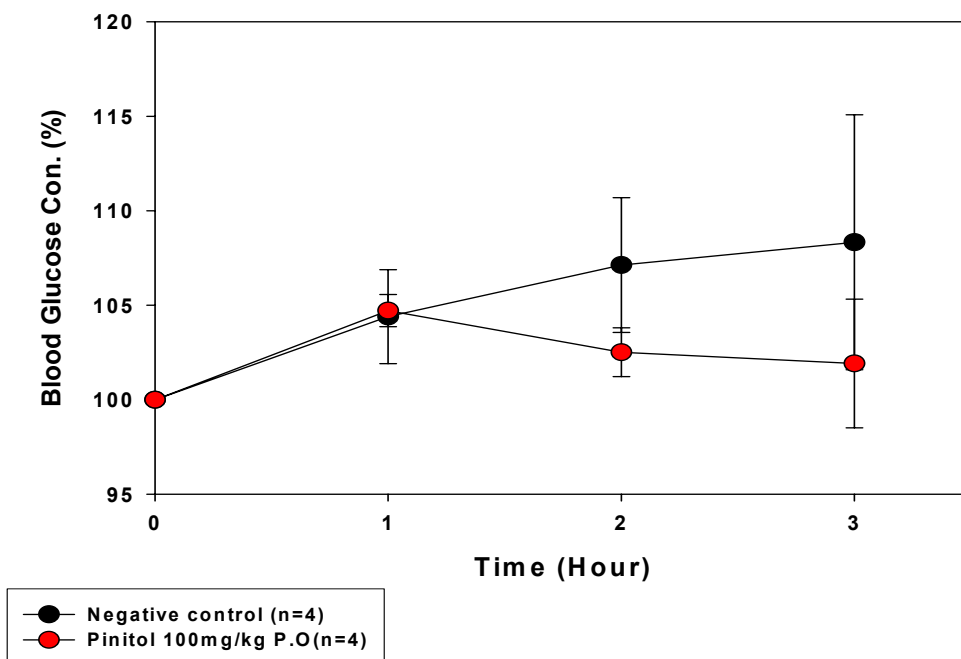


Fig. 61 Pinitol 경구투여 후 (100 mg/kg) 혈당 변화.

Sample은 평균 200 g wistar rat을 사용, 경구 투여량 200  $\mu$ l 이므로 pinitol이 함유된 powder 2 g을 2 ml D.W에 녹여서 vortexing 하여 준비하였다.

이 결과는 이미 보고된 10-20 mg/kg에서 가장 높은 유효성이 있으며, 혈당감소효과가 약 40 %인 것과 비교하면 본 과제 시험결과는 유효성이 많지 않은 것으로 나타나 이미 보고된 유효성과 큰 차이가 있는데 그 원인은 아직 밝히지 못하였다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구개발 목표

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• myo-inositol methyltransferase 유전자 분리 및 발현</li> <li>• ononitol epimerase의 분리</li> <li>• 콩으로부터 D-pinitol과 D-chiro-inositol의 분리, 정제</li> <li>• 이온교환수지를 이용한 순물에서 D-chiro-inositol 분리방법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 콩의 EST확보 및 이의 <i>E.coli</i>에서 발현</li> <li>• 기질 특이성측정</li> <li>• 염 stress하에서 콩나물로부터 효소 분리</li> <li>• 유효성분 추출방법 확립</li> <li>• 콩의 품종별 유효성분 조사</li> <li>• 이온교환수지 선택, flow rate, 온도, column 조건 설정을 통해 이온교환조건의 최적화</li> </ul>
2차 년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• peptide sequencing을 통해 OEP 유전자의 분리</li> <li>• 메밀로부터 D-chiro-inositol의 분리, 정제</li> <li>• 순물로부터 D-chiro-inositol의 회수방법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 분리된 OEP 유전자의 peptide sequence를 이용하여 OEP유전자 분리 및 <i>E.coli</i>에서 발현</li> <li>• 유효성분 추출방법의 확립</li> <li>• 메밀의 품종별 유효성분 조사</li> <li>• 활성탄, 제올라이트를 이용하여 분리하는 방법을 개발하여 이온교환수지를 이용하는 방법과 비교</li> </ul>
3차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• myo-inositol methyltransferase 유전자의 효모로의 도입</li> <li>• 콩과 메밀의 galactosyl 유도체로부터 D-chiro-inositol 획득방법 확립</li> <li>• 순물로부터 분리된 D-chiro-inositol의 정량 및 동물실험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IMT 유전자의 분리 후 yeast expression vector에 삽입 후 효모 형질전환</li> <li>• 효소적, 화학적 처리로 D-chiro-inositol 분리방법 조사</li> <li>• HPLC 및 GC-MS를 이용하여 D-chiro-inositol 및 D-pinitol의 정량</li> </ul>

## 2. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도 (점수)
1차년도( 2001 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ IMT 유전자의 cloning 및 이의 <i>E.coli</i>에서 발현</li> <li>○ ononitol epimerase의 분리</li> <li>○ 콩 품종별 유효성분 비교</li> <li>○ 유효성분 최대화 방법 확립</li> <li>○ 두부 순물로부터 D-chiro-inositol 분리 (이온교환수지 이용)</li> </ul>	30 10 20 10 30
2차년도( 2002 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ononitol epimerase의 유전자 cloning</li> <li>○ 메밀 품종별 유효성분 비교</li> <li>○ 유효성분 최대화 방법 확립</li> <li>○ 두부 순물로부터 D-chiro-inositol 분리 (활성탄, 제올라이트 이용)</li> </ul>	30 20 20 30
3차년도( 2003 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ IMT 유전자의 효모로의 도입</li> <li>○ D-chiro-inositol 분리방법 확립</li> <li>○ D-chiro-inositol 정량화 및 동물실험</li> </ul>	30 40 30
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ IMT 유전자와 ononitol epimerase 유전자의 cloning 및 이의 분석</li> <li>○ 콩, 메밀로부터 D-pinitol과 D-chiro-inositol 추출방법 연구</li> <li>○ 두부 순물로부터 D-pinitol과 D-chiro-inositol 회수공정 설비</li> </ul>	100 100 100



### 3. 연구개발 목표 달성도 및 관련분야 기술에의 기여도

#### <제 1 세부과제>

콩에서 *myo*-inositol에서 pinitol로 전환되는 데 관여하는 두 효소(*myo*-inositol methyltransferase와 onnitol epimerase)를 coding하는 유전자를 cloning 하였고 이 두 유전자를 효모에 도입하여 형질 전환된 효모에서 pinitol의 함량이 증가하는 것을 관찰하였다. 100% 목표 달성하였음

#### <제 2 세부과제>

두부 순물과 콩에서 pinitol과 *D-chiro*-inositol의 분리 방법을 최적화 하였고 이를 이용하여 12가지 품종 중에서 실팔달 콩에서 유효성분이 가장 많은 것으로 판명되었다. 메밀의 경우 양절메밀 2호에서 가장 높은 수준의 fagopyritol B1(*D-chiro*-inositol의 galactosyl 유도체)을 가지고 있음을 알 수 있었다. 메밀로부터 얻은 fagopyritol B1로부터 *D-chiro*-inositol을 얻기 위해 산가수분해법, 효소고정화법 등을 이용해 비교한 결과 두 방법에서 거의 동등한 효율성을 확인할 수 있었다. 100% 목표 달성하였음.

#### <제 3 세부과제>

두부순물에서 pinitol과 *D-chiro*-inositol을 회수하는 공정설치에 있어 흡착제를 사용하는 방법이 경제성이 없어 거대분자들을 규조토 통과를 이용해 제거한 후 농축하여 냉동건조한 후 분쇄하여 분말화된 샘플을 얻었다. 이를 HPLC를 통하여 분석한 결과 약 10 %의 pinitol이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌고 *D-chiro*-inositol은 전혀 검출되지 않았다. 독성실험 결과 아무런 이상을 관찰할 수 없었다. 당뇨를 유발한 쥐를 가지고 pinitol 투여 후 혈당을 측정된 결과 혈당감소가 그리 크지 않았다. 90% 목표 달성하였음

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 콩에서 cloning한 두 유전자(*myo*-inositol methyltransferase 와 ononitol epimerase)는 국제 특허를 준비 중에 있음. 향후 pinitol 대량생산에 유용하게 이용될 수 있다고 사료됨.
2. 두 유전자를 접합시켜 작물에 도입한다면 내냉성, 내염성 형질전환 작물체를 제작할 수 있을 것으로 사료됨.
3. 이 접합 유전자를 *myo*-inositol이 다량으로 함유된 참다래에 도입하여 pinitol이 다량으로 함유된 참다래를 분자육종할 수 있다고 사료됨
4. 두부순물에서 pinitol 성분을 분리하는 방법에 있어 좀 더 경제적이고 좀 더 농축된 형태의 분말을 생산해 낼 수 있는 연구가 더 필요하다고 사료됨.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

연구개발 과정 중에 메밀의 농축액이 type II 당뇨병인 경우 당뇨 조절에 탁월한 효과가 있다는 사실이 미국 농업식품화학회지에 보고 되었다. 이는 메밀 농축액에 다량으로 포함된 D-*chiro*-inositol 때문이다. 메밀의 경우 대두와 달리 *myo*-inositol에서 *chiro*-inositol으로 전환되는 중간물질인 ononitol과 pinitol이 전혀 검출되지 않는 점으로 인해 *myo*-inositol에서 *chiro*-inositol으로 직접 전환될 가능성이 매우 높다. 향후 메밀에서 *myo*-inositol에서 *chiro*-inositol으로 전환시키는 효소의 유전자를 cloning한다면 매우 유용하게 쓰일 것으로 사료되는 바이다.

## 제 7 장 참고문헌

- 심태흠, 이혁화, 이상영, 최순용. 1998. 한국산 메밀의 성분. 한국식품과학회지 30: 1259-1266.
- 김주현, 김동휘, 김유정. 1994. 콩나물과 두부의 가공을 위한 콩 품종의 비교. 한국농화학회지 37: 19-24.
- 진호상. 1994. 순물(두부폐액)을 이용한 Probiotics의 생산. 환경생물학회지 12: 59-64.
- 강성욱, 조정덕, 임왕진, 조흥연, 양한철. 1993. 두부공업폐수를 이용한 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* P17의 균체생산. 한국산업미생물학회지 21: 622-627.
- 이정선, 박성진, 성기승, 한찬규, 이명현, 정철원, 권태봉. 2000. 발아메밀이 본태성 고혈압쥐의 혈압, 혈당 및 혈중 지질수준에 미치는 영향. 한국식품과학회지 32: 206-211.
- 최면, 김종대, 박경숙, 오상용, 이상영. 1991. 메밀급여가 배서의 혈당 및 혈압에 미치는 영향. 한국식품영양학회지 20: 300-305.
- Acena, J. L., Arjona, O., and Plumet, J. 1996. Total synthesis of (+)-pinitol. *Tetrahedron: A*. 7: 3535-3544.
- Asplin I., Galasko, G., and Larner, J. 1993. Chiro-inositol deficiency and insulin resistance: a comparison of the chiro-inositol- and the myo-inositol-containing insulin mediators isolated from urine, hemodialysate, and muscle of control and type II diabetic subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 5294-5298.
- Guo, C., and Oosterhuis, D. M. 1997. Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. *Env. Exp. Bot.* 37: 147-152.
- Hong, Y, and Pak, Y. 1999. Identification of dhiro-inositol-containing phospholipids and changes in their metabolism upon salt stress in soybean seedlings. *Phytochemistry* 51: 861-866.
- Horbowicz, M., Brenac, P., and Obendorf, R. L. 1998. Fagopyritol B1, *O*- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* 205: 1-11.
- Korienko, A., and d'Alarcao, M. 1997. Enantionspecific synthesis of a differentially protected L-chiro-inositol from D-xylose. *Tetrahedron: A*. 38: 6497-6500.
- Kuo, T. M., Lowell, C. A., and Nelsen, T. C. 1997. Occurrence of pinitol in

- developing soybean seed tissues. *Phytochemistry*. 45: 29-35.
- Loewus, F. A., and Murthy, P. P. N. 2000. Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Sci*. 150: 1-19.
- Nelson, D. E., Koukoumanos, M., and Bohnert, H. J. 1999. Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant Physiol*. 119: 165-172.
- Nestler, J. E., Jakubowicz, D. A., Realmer, P., Gunn, R. D., and Allan, G. 1999. Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med*. 340: 1314-1320.
- Obendorf, R. L., Horbowicz, M., Dickerman, A. M., Brenac, P., and Smith, M. E. 1998. Soluble oligosaccharides and galactosyl cyclitols in maturing soybean seeds *in planta* and *in vitro*. *Crop Sci*. 38: 78-84.
- Pak, Y., Paule, C. R., Bao, Y. D., Huang, L. C., and Larner, J. 1993. Insulin stimulates the biosynthesis of chiro-inositol-containing phospholipids in a rat fibroblast line expressing the human receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90: 7759-7763.
- Pak, Y., Hong, Y., Kim, S., Piccariello, T., Farese, R. V., and Larner, J. 1998. *In vivo* chiro-inositol metabolism in the rat: a defect in chiro-inositol synthesis from myo-inositol and an increased incorporation of chiro-[<sup>3</sup>H]inositol into phospholipid in the Goto-Kakizaki (G.K) rat. *Mol. Cells* 30: 301-309.
- Rammesmayer, G., Pichorner, H., Adams, P., Jensen, R. G., and Bohnert, H. J. 1995. Characterization of IMT1, myo-inositol O-methyltransferase, from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Arch. Biochem. Biophys*. 322: 183-188.
- US Patent 5091596. 1992. Method for producing chiro-inositol.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.