Analysis of intracellular amino acids in the fermentation of *Pichia pastoris* X-33 and KM71H

Kyung-Ah Han[1,3,4] , Sun Yong Kim[2,3,4], and Jong Il Rhee[2,3,4]
Department of Material and Biochemical Engineering[1], Faculty of Applied Chemical Engineering[2], BioProcess Technology lab.[3], Research Center for BioPhotonics[4], Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea
Tel : +82-062-530-0847, Fax : +82-062-530-0846

Abstract

Analysis of extra- and intra- cellular metabolites is very important to study cell metabolish. Intracellular amino acids in yeast are of great interest as precursors of desired products in biomass production of the feed industries and the production of glutamate. In this study, the fermentations of *P. pastoris* X-33 and KM71H were carried out in shake flasks. After centrifugation, the harvested cells were mechanically disrupted by using glass bead. The supernatants were used to analyze intracellular amino acid by HPLC system. For HPLC analysis, Resolve C18 column was used with Fluorescence detector. The OPA(o -phthalaldehyde) derivation reaction was employed for analysing amino acids at 30 ℃, 1 ml/min and gradient mode. The concentration of intracellular protein was measured by spectrophotometer.

서론

메탄 자화 효모인 *Pichia pastoris*는 유전자 재조합 단백질을 생산하는데 있어서 많은 장점을 지니고 있는 유용한 숙주세포로 알려져 있다. 최근 들어 효모를 이용한 연구들이 다양한 분야에서 활용되고 있는데 특히 재조합 단백질 분야의 연구가 활발하게 진행되고 있다. 의약품으로 활용되는 재조합 단백질을 미생물을 이용하여 생산하는 경우, 균주를 이용한 대량생산 시스템뿐만 아니라 미생물의 대사를 통하여 대사 flux를 최소화하고 주요 경로로 유도하고자 하는 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 특별히 아미노그룹과 카복실산을 포함하는 유기

화합물인 아미노산의 연구 역시 중요하게 여겨지고 있다. 아미노산을 HPLC를 이용하여 분석하는 경우, 이온교환 크로마토그래피와 역상 크로마토그래피를 이용하여 유도체화를 통하여 분석하는 경우가 많다. 유도체화 시약의 경우 ninhydrin이나 FMOC (9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride)와 OPA (ortho-phthalaldehyde) 시약이 가장 많이 사용된다. OPA 유도체화는 ninhydrin이나 FMOC에 비하여 낮은 온도에서도 반응이 가능하고 검출의 감도가 좋은 장점을 가진다. 본 연구에서는 *Pichia pastoris* X-33과 KM71H를 배양하여 OPA 반응을 이용하여 세포 내 아미노산을 분석하였다.

재료 및 방법

Ⅰ. *Pichia pastoris* 배양

Pichia pastoris X-33과 KM71H를 각각 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose가 첨가된 YPD 배지에서 배양하였다. 각 균주는 200 rpm, 30 ℃에서 48시간동안 배양하였다. 배양한 균주는 많은 양의 세포를 얻기 위해 대수증식기에 시료를 채취하였다.

Ⅱ. 시료채취, 농축 및 전처리

대수증식기에 채취한 3 ml의 시료는 4000 g, 4 ℃에서 5분간 원심분리하여 농축하고 상등액과 펠릿을 구분하여 펠릿에 멸균된 증류수를 500 ㎕ 넣고 12000 g, 4 ℃에서 10분간 원심분리하여 2-3회 세척한 후 보관하여 각각의 필요한 데이터를 위한 분석에 사용하였다.

Ⅲ. 글라스비드를 이용한 세포 파쇄

보관해둔 시료에 600 ㎕ 멸균 증류수를 넣고 글라스비드 (직경 0.5 mm)를 넣은 후 5분간 잘 섞고 12000 g, 4 ℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 세포 내 단백질 분석에 사용하였다.

Ⅳ. 세포 내 단백질 분석

glass 비드로 세포를 파쇄하여 얻은 상등액으로 Bradford 방법을 이용하여 분광광도계로 595 nm에서 세포 내 단백질을 분석하였다.

V. 세포 내 아미노산 분석

준비한 용매 A(sodium acetate, sodium phosphte. tetrahydrofuran and water)와 B(methanol and water)를 기울기용리로 30 ℃에서 1 ml/min, Ex 330/ Em 420 nm에서 80분간 분석하였다. OPA 반응은 보렉스 완충액 (pH 7.0, 0.4 M)에 용해시켜 만든 후 4 ℃에서 24시간 안정화시켜 시료와 시약을 1 : 3의 비율로 섞어 1분 30초간 반응시킨 후 시료를 주입하였다.

결과 및 고찰

① *Pichia pastoris* 배양

Pichia pastoris X-33과 KM71H를 각각 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose가 첨가된 YPD 배지를 사용하여 배양하였다. 각 균주들은 200 rpm, 30 ℃에서 배양하였고 대수증식기 시료를 채취하여 분석에 사용하였다.

② 시료채취, 농축 및 전처리

채취한 3 ml의 시료는 4000 g, 4 ℃에서 5분간 원심분리하여 농축하고 상등액과 펠릿을 구분하여 펠릿에 멸균된 증류수를 넣고 원심분리하여 2-3회 세척하여 보관하여 각각의 필요한 데이터를 위한 분석에 사용하였다.

③ Glass 비드를 이용한 물리적 파쇄

보관해둔 시료에 멸균 증류수를 넣고 글라스비드를 넣은 후 잘 섞어 원심분리해서 상등액만 분석에 사용하였다.

④ 세포 내 단백질 분석

glass 비드를 사용하여 세포를 파쇄시켜 얻은 상등액을 Bradford 방법을 이용하여 분광광도계로 595 nm에서 세포 내 단백질을 분석하였다.

⑤ 세포 내 아미노산 분석

OPA 시약을 만들어 4 ℃에서 24시간 안정화시켜 사용하였고, 용매 A(sodium acetate, sodium phosphte. tetrahydrofuran and water)와 B(methanol and water)를 기울기용리로 30 ℃에서 1 ml/min, Ex 330/ Em 420 nm에서 80분간 분석하였다.

요약

10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose가 첨가된 YPD 배지를 이용하여 200 rpm, 30 ℃에서 24시간 배양한 *Pichia pastoris* X-33과 KM71H를 각각 대수증식기에 시료를 채취하여 4000 g, 4 ℃에서 5분간 원심분리하여 펠릿만을 얻어 멸균된 증류수를 500 ㎕ 넣고 4000 g, 4 ℃에서 5분간 원심분리하여 2-3회 세포 내 단백질과 아미노산 분석에 이용하였다. HPLC는 OPA 시약을 만들어 4 ℃에서 24시간 안정화시켜 사용하였고, 용액 A와 B를 미리 준비하여 기울기용리로 30 ℃에서 1 ml/min, Ex 330/ Em 420 nm에서 80분간 분석하였다.

감사

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-03-03) 지원으로 수행되었음.

References

1. M. A. Hans, E. Heinzle and C. Wittmann (2001), "Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*" , *Appl. Microbiol. biotechnol.*, 56 : 776-779.
2. E. L. Schwarz, W. L. Roberts and M. Pasquali (2005), "Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection" *Clin Chem.*, 354 : 83-90.