



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0115815
(43) 공개일자 2013년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/02 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0038484

(22) 출원일자 2012년04월13일

심사청구일자 2012년04월13일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수,기자촌아파트 201-1601호

박창훈

경기도 용인시 수지구 죽전1동 건영캐스빌아파트 803동 1301호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

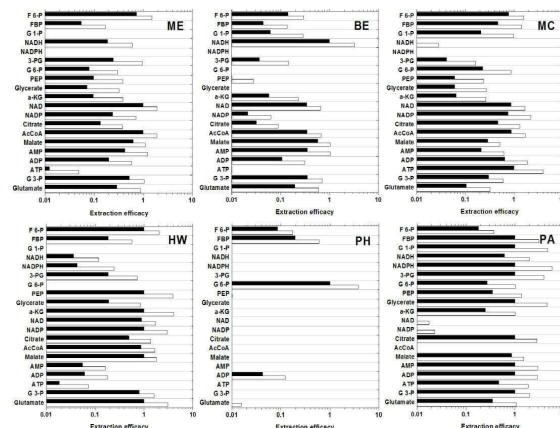
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 미생물의 세포 내 대사 프로파일을 위한 추출 및 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 미생물의 바이오매스를 냉장 메탄올(cold methanol)에 현탁한 다음 동결시키는 단계; (b) 상기 동결된 바이오매스를 해동시키는 단계; (c) 상기 단계 (a) 및 (b)를 반복하여 상기 바이오매스로부터 누출된 대사물의 현탁액을 얻는 단계; 및 (d) 상기 대사물의 현탁액에 대하여 매스 스펙트로메트리(mass spectrometry) 분석을 실시하여 상기 미생물의 세포 내 대사물을 동정하는 단계를 포함하는 미생물의 세포 내 대사 프로파일(intracellular metabolic profile)을 얻는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 따르면, 본 발명은 고생산 및 고수율의 대사 프로파일을 제공할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

여명수

서울특별시 마포구 신수동 서강대학교 513호

이수진

서울특별시 마포구 염리동 삼성래미안아파트 105동
1504호

김보림

서울특별시 금천구 시흥동 209번지 현대아파트 50
7호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10035578
부처명	지식경제부
연구사업명	산업기술개발사업
연구과제명	2,3-부탄디올 생산용 균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술 개발
주관기관	서강대학교산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2015.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0002153
부처명	교육과학기술부
연구사업명	바이오. 의료기술개발사업-시스템. 인포메틱스사업
연구과제명	생물학적 대사 네트워크의 동역학 모델링 방법론 및 파라미터 추정 방법 개발에 관한 연구
주관기관	서강대학교산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

미생물의 세포 내 대사 프로파일(intracellular metabolic profile)을 얻는 방법:

- (a) 미생물의 바이오매스를 냉장 메탄올(cold methanol)에 현탁한 다음 동결시키는 단계;
- (b) 상기 동결된 바이오매스를 해동시키는 단계;
- (c) 상기 단계 (a) 및 (b)를 반복하여 상기 바이오매스로부터 누출된 대사물의 현탁액을 얻는 단계; 및
- (d) 상기 대사물의 현탁액에 대하여 매스 스펙트로메트리(mass spectrometry) 분석을 실시하여 상기 미생물의 세포 내 대사물을 동정하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 미생물은 크렙시엘라 종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 미생물은 크렙시엘라 옥시토카인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 냉장 메탄올은 -80°C 내지 -30°C 의 메탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 냉장 메탄올은 100 (vol/vol%) 메탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 동결은 액체 질소를 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 해동은 드라이아이스 상에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 단계 (a) 및 단계 (b)의 반복은 1-10차례 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c) 및 (d) 사이에 상기 대사물의 현탁액을 여과하는 과정을 추가적으로 포함하며

상기 단계 (d)는 상기 여과 과정을 거친 대사물의 현탁액을 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)의 대사물은 3-포스포글리세린산염(3-phosphoglycerate; 3-PG), 아세틴-코엔자임 A(acetyl-coenzyme A; AcCoA), 프럭토즈 6-포스페이트(fructose 6-phosphate; F6P), 프럭토즈 1,6-비스포스페이트(fructose 1,6-bisphosphate; FBP), 글루코즈 1-포스페이트(glucose 1-phosphate; G1P), 글루코오스 6-포스페이트(glucose 6-phosphate; G6P), 포스포에놀피루브산(phosphoenolpyruvate; PEP), α -케토글루타레이트(α -ketoglutarate; α -KG), 글리세롤 3-포스페이트(glycerol 3-phosphate; G3P), NAD(Nicotinamide Adenine Dinucleotide), NADH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced form), NADP(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), NADPH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form), ADP(Adenosine Diphosphate), AMP(Adenosine Monophosphate), ATP(Adenosine Triphosphate), 글리세레이트(glycerate), 시트레이트(citrate), 글루타메이트(glutamate) 및 말레이트(malate)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 미생물 대상물 중에서 G1P(glucose 1-phosphate) 및 NADPH의 분석을 위하여 상기 미생물의 바이오매스의 과염소산(perchloric acid) 추출 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미생물의 세포 내 대사 프로파일을 위한 추출 및 분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근, 세포 시스템에 관한 연구가 점점 보편화되고 세포의 성장 기술 및 생산 과정을 최적화를 향상시킴으로 생산이 증가되었다. 세포 성장은 초기에 대사 공학에 의해 증대되었고, 응용 생물학적 제법의 발전을 통해 생산성이 증대되었다. 세포 성장을 증진시키기 위해서는, 생합성 반응, 에너지 대사 및 보충대사반응과 밀접하게 연관되어 있기 때문에 탄소대사에 대한 이해가 중요하다. 예컨대, 중추 탄소대사의 이해 및 *K. oxytoca*의 인-비보 동역학과 관련된 이해를 통해 생합성과정의 중간 대사 단계를 조작하여 2,3-부탄다이올의 생산을 증가시켰다.

[0003] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 미생물을 배양하여 미생물 내의 대사산물을 수득하기 위해 세포내 대사산물을 추출하는 최적화된 방법을 조사하고자 노력하였다. 그 결과, 냉각 메탄올을 이용하는 경우, 타 추출방법과 비교하여 세포내 대사물질을 고수율로 수득할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0005] 따라서 본 발명은 세포 내 대사 프로파일을 얻는 방법을 제공하는 데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 미생물의 세포 내 대사 프로파일(intracellular metabolic profile)을 얻는 방법을 제공한다:

[0008] 본 발명자들은 미생물을 배양하여 미생물 내의 대사산물을 수득하기 위해 세포내 대사산물을 추출하는 최적화된 방법을 조사하고자 노력하였다. 그 결과, 냉각 메탄올을 이용하는 경우, 타 추출방법과 비교하여 세포내 대사 물질을 고수율로 수득할 수 있음을 규명하였다.

[0009] 본 발명의 미생물의 세포 내 대사 프로파일을 얻는 방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0010] 단계 (a): 동결 단계

[0011] 본 발명에 따르면, 미생물의 바이오매스를 냉각 메탄올(cool methanol)에 현탁한 다음 동결시킨다.

[0012] 바람직하게는, 상기 미생물은 크렙시엘라(Klebsiella) 종이고, 상기 크렙시엘라 종은 크렙시엘라 그라눌로마티스(Klebsiella granulomatis), 크렙시엘라 옥시토카(Klebsiella oxytoca), 크렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae), 크렙시엘라 테리제나(Klebsiella terrigena) 및 크렙시엘라 플랜티콜라(Klebsiella planticola)를 포함하며, 가장 바람직하게는 크렙시엘라 옥시토카이다.

[0013] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 미생물 바이오매스는 회분 배양 방식으로 5.0 L 생물반응기를 이용하여 2.0 L의 배지로, 10시간 배양한 후에 채취된 미생물 바이오매스이다. 채취된 미생물은 채취 즉시 60% 메탄올(-40℃)과 혼합하고 냉각 원심분리를 실시하여 상층액을 제거한 세포물을 -80℃에 보관하여 다음 과정을 진행한다.

[0014] 상기 -80℃에 보관된 미생물 바이오매스를 해동하여 냉각 메탄올에 현탁한다.

[0015] 본 발명의 미생물 바이오매스에 첨가되는 메탄올의 분자식은 CH_3OH 로, 하이드록시메탄(Hydroxymethane), 메틸 알코올(Methyl alcohol), 메틸 하이드레이트(Methyl hydrate), 메틸 하이드록사이드(Methyl hydroxide), 메틸릭 알코올(Methylic alcohol), 메틸올(Methylol) 및 목정(Wood alcohol)과 동일한 의미를 갖는다.

[0016] 바람직하게는, 본 발명의 단계(a)의 메탄올은 -80℃ 내지 -30℃ 상태의 냉장된 형태이다. 보다 바람직하게는, -70℃ 내지 -40℃ 메탄올이고, 가장 바람직하게는 -60℃ 내지 -40℃ 메탄올이다.

[0017] 본 발명의 미생물 바이오매스의 세포내 대사산물을 추출하기 위해 처리되는 냉각 메탄올은 100 (vol/vol%) 메탄올이다.

[0018] 상기 냉각 메탄올이 첨가된 미생물 바이오매스를 액체 질소를 이용하여 동결한다.

[0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 현탁한 미생물 바이오매스가 첨가된 냉각 메탄올이 든 튜브를 액체질소에 담귀 동결한다.

[0020] 단계 (b): 해동 단계

[0021] 이어, 상기 동결된 바이오매스를 해동한다.

[0022] 바람직하게는, 단계 (b)의 해동은 드라이아이스 상에서 실시한다.

[0023] 단계 (c): 대사물의 현탁액을 얻는 단계

- [0024] 상기 단계 (a) 및 (b)를 반복하여 상기 바이오매스로부터 추출된 대사물의 현탁액을 얻는다.
- [0025] 단계 (a)의 동결 및 단계 (b)의 해동을 반복하여 남아있는 세포 내 대사물질이 세포 외로 새어나오도록 한다.
- [0026] 바람직하게는 상기 단계 (a) 및 (b)의 반복은 1-10 차례 실시하고, 보다 바람직하게는, 1-6 차례 실시하며, 가장 바람직하게는 2-5차례 실시한다.
- [0027] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 과정을 통해 수득한 세포내 대사물질의 용해물을 -80℃에 보관한다.
- [0028]
- [0029] 단계 (d): 대사물을 동정하는 단계
- [0030] 마지막으로, 상기 대사물의 현탁액에 대하여 매스 스펙트로메트리(mass spectrometry) 분석을 실시하여 상기 미생물의 세포 내 대사물을 동정한다.
- [0031] 바람직하게는, 본 발명의 단계 (c) 및 단계 (d) 사이에 상기 대사물의 현탁액을 여과하는 과정을 추가적으로 포함하며 상기 단계 (d)는 상기 여과 과정을 거친 대사물의 현탁액을 이용한다.
- [0032] 본 발명의 미생물 바이오매스로부터 추출한 세포내 대사물은 바람직하게는, 3-포스포글리세린산염(3-phosphoglycerate; 3-PG), 아세틴-코엔자임 A(acetyl-coenzyme A; AcCoA), 프럭토스 6-포스페이트(fructose 6-phosphate; F6P), 프럭토스 1,6-비스포스페이트(fructose 1,6-bisphosphate; FBP), 글루코즈 1-포스페이트(glucose 1-phosphate; G1P), 글루코오스 6-포스페이트(glucose 6-phosphate; G6P), 포스포에놀피루브산(phosphoenolpyruvate; PEP), α-케토글루타레이트(α-ketoglutarate; α-KG), 글리세롤 3-포스페이트(glycerol 3-phosphate; G3P), NAD(Nicotinamide Adenine Dinucleotide), NADH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced form), NADP(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), NADPH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form), ADP(Adenosine Diphosphate), AMP(Adenosine Monophosphate), ATP(Adenosine Triphosphate), 글리세레이트(glycerate), 시트레이트(citrate), 글루타메이트(glutamate) 및 말레이트(malate)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사물이다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법을 이용하여 동정한 대사물은 고온 에탄올 추출방법, 메탄올-클로로포름 추출방법, 열수 추출방법, 수산화칼륨 추출방법 및 과염소산 추출방법과 비교하여 높은 수율을 보여준다.
- [0034] 본 발명의 미생물의 세포 내 대사 프로파일을 얻는 방법은 세포 내 대사물질의 추출 효율을 높이기 위해 다른 용매를 이용한 추출방법을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0035] 바람직하게는, 상기 방법은 미생물 대상물 중에서 G1P(glucose 1-phosphate) 및 NADPH의 분석을 위하여 상기 미생물의 바이오매스의 과염소산(perchloric acid) 추출 단계를 추가적으로 포함한다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0037] (a) 본 발명은 미생물의 세포 내 대사 프로파일(intracellular metabolic profile)을 얻는 방법을 제공한다.
- [0038] (b) 본 발명은 고생산 및 고수율의 대사 프로파일을 제공할 수 있다.
- [0039] (c) 본 발명은 원하는 세포내 대사물질에 대한 최적의 추출방법을 모색하여 최고 수율의 방법을 구축할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 회분식 배양의 성장 프로파일을 보여준다. ●는 건조중량을 나타내며, 위를 향하는 화살표는 샘플링을 의미한다. 세포외 대사물질인 글루코오스(□), 숙신산(△), 젖산(▼), 포름산(◁), 아세트산(►), meso-2,3-부탄다이올(▲), R,R-2,3-부탄다이올(▽) 및 에탄올(◄)의 농도 프로파일을 나타낸다.

도 2는 (a) ME, (b) BE, (c) MC, (d) HW, (e) PH 및 (f) PA 추출방법에 대한 UPLC/Q-TOF-MS ES-총 이온 크로마

도그림을 보여준다.

도 3은 크렙시엘라 옥시토카의 세포내 대사물질의 농도를 나타낸다. 배양 후 10시간에 샘플을 수득하여 각 추출방법[냉장 메탄올(검정색), 고온 에탄올(회색), 메탄올-클로로포름(백색), 열수(사선), 수산화칼륨(가로줄) 및 과염소산(교차줄)]별로 나타낸다.

도 4는 20 대사물질에 대한 추출 효율의 최대값 및 중간값을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] 실시예

[0043] 실험재료 및 방법

[0044] 실험재료

[0045] 사용 균주는 *Klebsiella oxytoca*(하기 '*K. oxytoca*'라고 함, ATCC 43863)로 ATCC(American Type Culture Collection)에서 주문하여 사용하였다. 분석에 사용된 세포 외 대사물질[글루코오즈, 젖산, 피루브산, 숙신산, (R,R)-2,3부탄다이올, (meso)-2,3부탄다이올 및 에탄올] 과 세포 내 대사물질 [3-포스포글리세린산염(3-phosphoglycerate; 3-PG), 아세틴-코엔자임 A(acetyl-coenzyme A; AcCoA), 프럭토즈 6-포스페이트(fructose 6-phosphate; F6P), 프럭토즈 1,6-비스포스페이트(fructose 1,6-bisphosphate; FBP), 글루코즈 1-포스페이트(glucose 1-phosphate; G1P), 글루코오즈 6-포스페이트(glucose 6-phosphate; G6P), 포스포에놀피루브산(phosphoenolpyruvate; PEP), α-케토글루타레이트(α-ketoglutarate; α-KG), 글리세롤 3-포스페이트(glycerol 3-phosphate; G3P), NAD(Nicotinamide Adenine Dinucleotide), NADH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced form), NADP(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), NADPH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form), ADP(Adenosine Diphosphate), AMP(Adenosine Monophosphate), ATP(Adenosine Triphosphate), 글리세레이트(glycerate), 시트레이트(citrate), 글루타메이트(glutamate) 및 말레이트(malate)] 의 표준 물질은 Sigma(미국) 또는 Fluka(미국)에서 구입하였다. 고순도 용제 및 시약을 사용하여 LC/MS(Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) 분석을 실시하였다

[0046] 배양 조건

[0047] 전 배양은 12시간, 교반속도 200 rpm, 배양 온도는 37℃로 200 ml LB 배지를 이용하여 500 ml 플라스크에서 수행하였다. 본 배양인 회분 배양은 5.0 L 생물반응기를 이용하여 2.0 L의 작업량으로 다음과 같은 조성의 최소 배지를 이용하여 진행하였다:

[0048] 2.90 g/L K_2HPO_4 , 11.30 g/L KH_2PO_4 , 6.60 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.25 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0014 g/L $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 ml/L HCl, 20 g/L 글루코오즈. 주입 공기는 1.5 L/분이고 2 M NaOH를 이용하여 pH 6.5로 조절하였다. 또한 주기적으로 거품억제제(anti-foam)을 주입하여 거품에 의한 공정의 방해 요인을 제거하였다.

[0049] 샘플링 및 쿼칭

[0050] 본 배양이 시작된 후 10시간 후에 배양 균주 채취를 하였다. 10 ml 병(vial)을 이용 채취된 균주는 같은 부피의 60% 메탄올(-40℃)에 바로 투입하였다. 결과의 유의성을 위해, 각 세포 내 대사물질 추출방법 당 4 차례 샘플을 준비하였다. 메탄올에 담겨진 샘플은 냉동 원심분리기를 이용하여 10분 동안 $30,000 \times g$, -9℃ 조건으로 원심분리를 실시하였다. 상층액을 제거하고 원심분리된 세포물질을 액체질소에서 처리한 후 -80℃에서 세포내 대사물질 추출방법 시행 전까지 보관하였다.

- [0051] 추출방법
- [0052] (1) 냉장 메탄올 추출법(Cool Methanol Extraction; ME)
- [0053] 퀀칭(Quenching) 단계에서 보관된 세포물질에 1 ml의 100% 메탄올(-50℃)을 첨가하여 부유시킨 후 액체질소를 첨가하여 냉각하였다. 이 용액을 드라이아이스를 이용하여 해동하였다. 이 같이 냉각-해동 과정을 3회 반복하여 실시, 세포 내 대사물질들이 세포 외부로 새어 나오게 하였다. 속도 16,000×g, 온도 -9℃, 시간 5분의 조건으로 원심분리를 실시하였다. 상층액(세포 내 대사물질이 녹아있는)은 드라이아이스를 이용하여 보관하고 500 μ l 100% 메탄올(-50℃)을 첨가하여 원심분리물을 부유시켜 상기 서술된 냉각-해동 과정을 반복하여 남아있을지 모를 세포내 대사물질을 추출하였다. 이 같은 과정을 통해 수득한 세포내대사물질이 녹아있는 액체는 -80℃에서 UPLC/Q-TOF-MS 분석을 위한 샘플 처리 전까지 보관하였다.
- [0054] (2) 고온 에탄올 추출법(Boiling Ethanol Extraction; BE)
- [0055] 퀀칭 단계에서 준비된 세포물질에 1 ml 100% 에탄올(90℃)을 주입한 후 열혼합기(Thermomixer, Eppendorf, 독일)를 이용하여 10분 동안 90℃에서 반응하였다. 그 후 5분동안 얼음에서 냉각하였다. 16,000×g, 0℃의 조건에서 5분동안 원심분리를 실시하여 부유물은 제거하였다. 이 같은 과정을 통해 수득한 세포내 대사물질이 용해된 액체를 -80℃에서 UPLC/Q-TOF-MS 분석을 위한 샘플 처리 전까지 보관하였다.
- [0056] (3) 메탄올/클로로포름 추출(Methanol/Chloroform Extraction; MC)
- [0057] 퀀칭 단계에서 준비된 세포물질을 1 ml 메탄올/클로로포름 용액(2:1 v/v)을 첨가하여 부유시키고 냉장 메탄올을 이용한 세포내 대사물질 추출방법에서 사용한 냉각-해동 과정을 진행하였다. 그리고 얼음에서 냉각시킨 0.25 ml 0.5 mM 트리신(tricine)을 주입하였다. 샘플을 교반하여 혼합한 후 상분리가 일어나는 과정을 거쳤다. 상층인 메탄올층을 수집하여 얼음 상에 냉각시키고 하층에 0.25 ml 얼음-냉각 0.5 mM 트리신을 주입하여 다시 상분리를 실시하였다. 상층인 메탄올층은 얼음 상에서 냉각시키고 미리 수득한 메탄올층과 혼합하였다. 메탄올층을 16,000×g, 0℃의 조건에서 10분 동안 원심분리를 실시하여 상층액을 수득하고 -80℃에서 UPLC/Q-TOF-MS 분석을 위한 샘플 처리 전까지 보관하였다.
- [0058] (4) 열수 추출(Hot Water Extraction; HW)
- [0059] 퀀칭 단계에서 준비된 세포물질에 정제수(de-ionized water) 1 ml를 첨가한 후 열혼합기를 이용하여 95℃에서 5분동안 반응하였다. 이후 얼음 상에서 냉각하고 9,500×g, -9℃의 조건에서 5분동안 원심분리를 실시하여 상층액을 -80℃에서 UPLC/Q-TOF-MS 분석을 위한 샘플 처리 전까지 보관하였다.
- [0060] (5) 수산화칼륨 추출(Potassium Hydroxide Extraction; PH)
- [0061] 퀀칭 단계에서 준비된 세포물질에 1 ml 0.25 M KOH(80℃)을 첨가하여 부유시키고 열혼합기를 이용하여 80℃에서 10분동안 반응하였다. 그리고 5분동안 얼음 상에서 냉각하였다. 20,000×g, 0℃의 조건에서 10분 동안 원심분리를 실시하고 상층액을 수득하여 1 ml 0.25 M 과염소산을 첨가하여 중화반응을 진행하였다. 중화반응 후 원심분리를 실시하여 상층액을 -80℃에서 UPLC/Q-TOF-MS 분석을 위한 샘플 처리 전까지 보관하였다.
- [0062] (6) 과염소산 추출(Perchloric Acid Extraction; PA)
- [0063] 퀀칭 단계에서 준비된 세포물질을 1 ml 냉각된 0.25M 과염소산(perchloric acid)를 첨가하여 냉장 메탄올을 이용한 세포내 대사물질 추출방법에서 사용한 냉각-해동 과정을 진행하였다. 16,000×g, 0℃의 조건으로 원심분리를 5분 동안 실시한 후 상층액을 수득하고 KOH를 주입하여 중화반응을 진행하였다. 또다시 원심분리하여 상층액을 -80℃에서 UPLC/Q-TOF-MS 분석을 위한 샘플 처리 전까지 보관하였다.

- [0064] 여과
- [0065] 6가지의 세포내 대사물질 추출방법을 이용하여 수득한 세포내 대사물질이 용해되어 있는 액상을 아미콘 울트라 프리-MC 초여과 팁(Amicon Ultrafree-MC ultrafilter tips, Millipore Co., 미국)을 이용하여 $9,100 \times g$, 4°C 의 조건에서 원심분리를 2시간 동안 진행하여 여과 추출 하였다.
- [0066] 세포의 대사물질 농도의 측정
- [0067] 세포의 대사물질인 글루코오즈, 젖산, 포름산염 및 아세테이트의 농도는 HPLC(high-performance liquid chromatography, UV 730D 검출기, RI 750F 모니터; 영진, 대한민국)를 이용하여 측정하였다. 사용한 컬럼은 아미넥스(Aminex) HPX-87H, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$ (Bio-Rad, 미국)을 사용하였고 이동상은 55°C 에서 흐름 속도 0.6 mL /분의 조건으로 $0.005 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ 를 사용하였다.
- [0068] UPLC/Q-TOF-MS 측정
- [0069] 세포내 대사물질의 농도를 측정하기 위해, 워터스 액유티 UPLC 시스템(Waters Acquity UPLC™ system, Waters, 영국)을 사용하였다. 사용한 컬럼은 액유티 HSS T3 컬럼(Aquity HSS T3 column, $1.8 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm} \times 150\text{mm}$; Waters, 영국)이다. 오븐의 온도는 35°C 이고, 자동-샘플러의 온도는 4°C 의 조건으로 진행하였다. 이동상으로는 (A) 5 mM 트리부틸암모늄 아세테이트(tributylammonium acetate in water) 및 (B) 메탄올을 사용하였다. 사용한 질량분석기mass spectrometry는 워터스 제노 Q-TOP/MS(Waters Xevo™ Q-TOF/MS; Waters Corp., 영국)이었으며, 이온화는 음성 전기분무(negative electrospray; ESI) 방식을 이용하였다. 질량 범위는 m/z 50 내지 1000 Da 으로 0.3 초 스캔시간으로 설정하였다. ESI 소스 상태는 다음과 같다: 캐필러리 전압, 3.0 kV ; 샘플링 콘, 30 V ; 추출 콘, 3.0 V ; 소스 온도, 100°C ; 탈용매화 온도, 350°C . 탈용매화 및 콘 가스(cone gas)로는 질소를 사용하였으며 흐름 속도는 500 L/h 이었다. 충돌 에너지(collision energy)는 3 eV 이었다. 결과의 정확도를 높이기 위해 LockSpray™ 를 사용하였다.
- [0070] 세포내 대사물질의 부피
- [0071] 세포내 대사물질의 농도를 구하기 위해 세포내 대사물질의 부피를 결정 하였다. 세포내 대사물질의 농도는 세포내 물질의 부피로 나누어서 mM 단위로 치환될 수 있다. 본 연구에서는 *K. oxytoca*의 세포내 대사물질 부피로 보고되어있는 1.67 mL/mg 건조중량 수치를 이용하여 정량 분석에 사용하였다.
- [0072] 결과
- [0073] 회분식배양의 성장 프로파일
- [0074] *K. oxytoca*의 회분식배양 특성분석을 위해 2시간 단위로 샘플을 채취하고 세포 양 및 세포의 대사물질 농도를 분석하였다(도 1). 도 1에서 세포건조중량 분석을 통해 *K. oxytoca*가 접종 후 8시간까지 지수생장을 하였고 그 이후에는 정지상에 도달한 것을 알 수 있었다. 성장과 관련된 생산물인 숙신산, 젖산, 포름산 및 아세테이트의 농도는 세포 건조 질량과 유사한 경향을 보이는 것을 확인하였다. 또한 지수생장이 끝나는 시점에서 배지 내의 모든 글루코오즈를 완전히 소모한 것을 확인 하였다.
- [0075] UPLC/Q-TOF-MS 측정
- [0076] UPLC 시스템은 *K. oxytoca*의 세포내 대사물질의 효과적이고 편리한 분석을 위해 사용되었다. 특히 UPLC 총이온 크로마토그램(Total Ion Chromatograms; TICs)을 비교함으로써 6가지 세포내 대사물질 추출 방법의 추출물질과 추출물의 상대적인 차이를 확인 할 수 있었다(도 2). 분석된 20가지의 *K. oxytoca* 세포내 대사물질은 각 표준물질의 절편 이온(fragment ions), 체류 이온(retention ions) 및 마커 이온(marker ions)의 accurate

mass로 확인 되었고 각 물질의 분석특성은 표 2에 나타내었다(표 1 및 표 2).

표 1

대사물질	체류 시간 (min)	분자식	정확한 질량 (M-H) ⁻	수득한 질량 (M-H) ⁻	질량 차 (mDa)
글리세레이 트	7.60	C3H6O4	105.019	105.021	2
말레이트	16.73	C4H6O5	133.014	133.015	1.3
α-KG	17.47	C5H6O5	145.014	145.014	0.5
글루타메이 트	4.95	C5H9NO4	146.045	146.047	1.3
PEP	18.70	C3H5O6P	166.975	166.976	1.3
G3P	10.24	C3H9O6P	171.006	171.008	1.6
3-PG	18.09	C3H7O7P	184.985	184.987	1.6
시트르산	18.34	C6H8O7	191.019	191.02	0.9
F6P	10.00	C6H13O9P	259.022	259.023	1.4
G1P	10.25	C6H13O9P	259.022	259.024	1.6
G6P	9.28	C6H13O9P	259.022	259.023	1.4
FBP	18.08	C6H14O12P2	338.988	338.99	2.1
AMP	15.08	C10H14N5O7P	346.055	346.06	4.9
ADP	19.00	C10H15N5O10P2	426.022	426.027	4.9
ATP	21.44	C10H16N5O13P3	505.988	505.992	4.2
NAD	12.78	C21H27N7O14P2	662.101	662.098	-3.5
NADH	19.21	C21H29N7O14P2	664.117	664.116	-1
NADP	18.34	C21H28N7O17P3	742.068	742.066	-1.9
NADPH	21.50	C21H30N7O17P3	744.083	744.083	-0.4
AcCoA	23.06	C23H38N7O17P3S	808.118	808.122	4.2

[0077]

표 2

대사물질	보정곡선 상세정보 ^a			LOD (μmoles/L)	LOQ (μmoles/L)
	경사 (b)	절편 (a)	R ²		
글리세레이트	255.49	8.8918	0.9997	0.419	16.710
말레이트	501.57	31.42	0.9998	0.786	15.621
α-KG	312.86	54.156	0.9993	0.152	26.723
글루타메이트	165.76	26.515	0.9991	0.364	14.011
PEP	146.66	5.3197	0.9997	0.828	11.796
G3P	203.54	24.393	0.9995	0.760	5.309
3-PG	198.55	92.723	0.9978	0.867	17.957
시트레이트	231.71	62.79	0.9994	1.049	16.281
F6P	71.332	42.193	0.998	0.651	12.172
G1P	61.431	20.661	0.9989	0.710	25.017
G6P	45.818	40.677	0.9981	0.956	22.221
FBP	41.128	21.67	0.9997	0.712	11.758
AMP	61.8	23.975	0.9986	0.419	5.365
ADP	33.605	36.003	0.9958	0.694	15.666
ATP	37.298	51.73	0.9983	0.627	15.184
NAD	8.3762	3.3344	0.9995	0.299	4.267
NADH	11.414	-28.385	0.9967	0.280	15.325
NADP	9.5093	2.7016	0.9995	0.303	5.341
NADPH	8.9184	11.916	0.9976	0.379	6.920
AcCoA	36.638	69.331	0.9972	0.633	20.424

[0078]

[0079] 세포내 대사물질의 농도

[0080] 6가지 세포내 대사물질 추출방법의 비교를 위하여 모든 추출은 동일한 샘플을 이용해 시행하였다. 또한 각 추출방법은 신뢰도와 효율성을 위하여 3번 반복하여 수행하였다(도 3). 도 3은

[0081] 추출방법의 영향

[0082] 추출물의 완벽성을 갖추고 세포내 효소 및 화학물질에 의한 전반적인 변화 및 열에 의한 변성이 일어나지 않게 하는 것이 효율적인 세포내 대사물질의 추출방법이다. 이러한 효율적인 방법에 대한 연구를 위해 본 연구에서는 6가지의 세포내 대사물질 추출방법을 시행하여 분석하여 *K. oxytoca*에 가장 적합한 추출방법을 확인하고자 하였다. 각 추출방법의 효율도를 평가하기 위하여 다음과 같은 두 가지의 효율도 계산법을 사용하였다(공식 1 및 공식 2).

$$\text{효율도 (vs 최대값)}_{m,e} = \frac{[m]_e}{\text{최대값}[m]}$$

[0083] (공식 1)

$$\text{효율도 (vs. 중간값)}_{m,e} = \frac{[m]_e}{\text{중간값}[m]}$$

(공식 2)

[0084]

[0085]

그리고 이에 대한 결과를 도 4에 나타내었다. 과염소산을 이용한 추출방법의 경우 모든 세포내 대사물질에서 1에 가까운 효율도(vs 최대값)를 얻을 수 있었다. 냉장 메탄올, 메탄올/클로로포름 또는 열수를 이용한 추출방법의 경우 유사한 효율도를 보이는 것을 확인 하였다. 또한 이 세 추출방법은 거의 완벽에 가까운 추출결과를 나타내었다. 그러나 냉장 메탄올을 이용한 추출방법의 경우 추출의 안정도로 이해 될 수 있는 효율도(vs. 중간값)가 1에 가까운 것으로 나타나 다른 추출방법에 비해 추출의 안정도가 뛰어난 것을 확인 하였다(도 4).

[0086]

고찰

[0087]

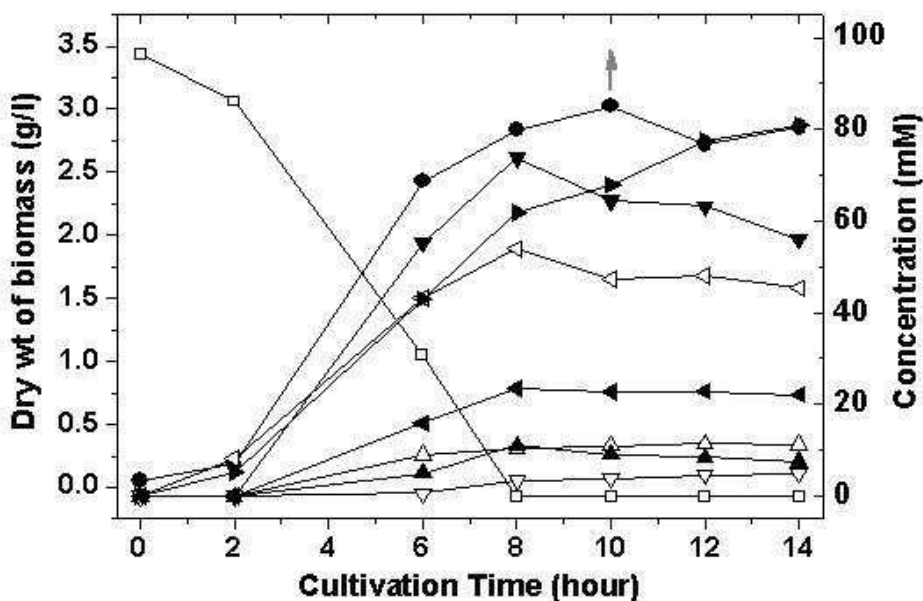
6 가지 세포내 대사물질 추출방법에서 가장 많은 수의 대사물질을 추출한 방법은 냉장 메탄올, 메탄올/클로로포름 또는 열수를 이용한 방법으로 조사한 20가지 물질 중 18개의 대사물질을 추출할 수 있었다. 그 다음은 17개의 대사물질을 추출해낸 고온 에탄올 및 과염소산을 이용한 추출방법이었다. 추출된 대사물질의 농도를 조사 결과 냉장 메탄올을 이용한 추출 방법이 다른 추출 방법보다 분석 안정성이 높았다. 그러나 세포내 대사물질인 G1P 및 NADPH의 경우 냉장 메탄올을 이용한 방법에서는 추출되지 않았다. 과염소산을 사용한 추출방법은 UPLC/Q-TOF/MS를 이용한 분석의 경우 다른 방법보다 G1P 및 NADPH의 농도가 높게 나왔다. 따라서 세포내 대사물질의 전반적인 추출을 할 경우 과염소산의 동시 사용을 고려해야 한다.

[0088]

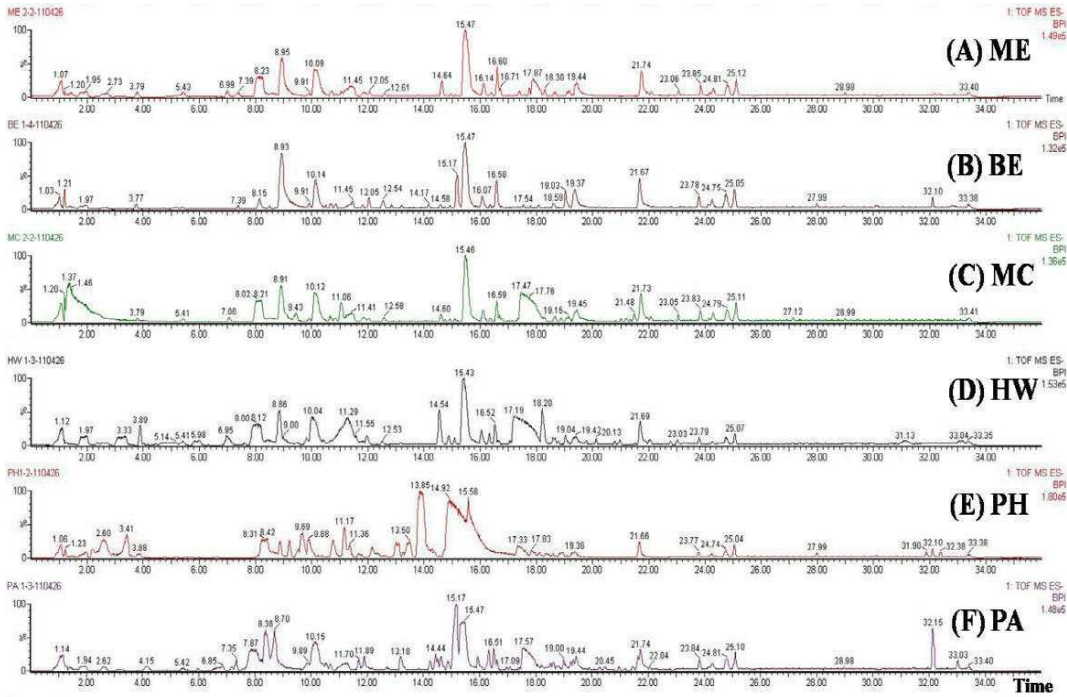
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

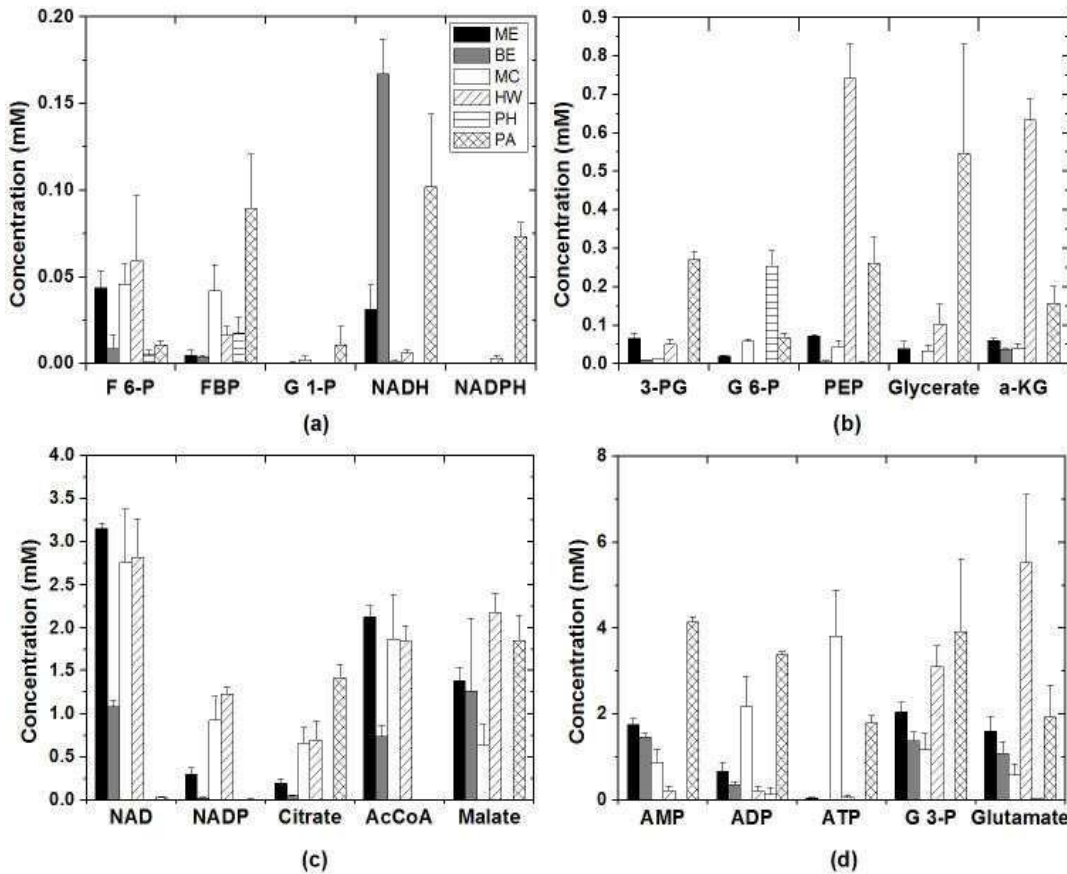
도면1



도면2



도면3



도면4

