

## 해양의 *Pseudomonas* sp.로부터 분리한 alginate lyase 유전자의 promoter에 의한 대장균 내에서의 $\beta$ -agarase 유전자의 발현과 catabolite repression의 변화

진철호 · 박제현 · 한정현 · 최윤혁 · 이종희 · 이정기<sup>1</sup> · 공인수\*  
부경대학교 식품생명공학부, <sup>1</sup>인바이오넷(주)

**Expression of  $\beta$ -agarase Gene and Catabolite Repression in *Escherichia coli* by the Promoter of Alginate Lyase Gene Isolated from Marine *Pseudomonas* sp. Jin, Cheal-Ho, Je-Hyeon Park, Jeong-Hyun Han, Yoon-Hyeok Chae, Jong-Hee Lee, Jung-Kee Lee<sup>1</sup>, and In-Soo Kong\*.** Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea, <sup>1</sup>InBioNet Co. 1690-3 Taejon 306-230, Korea – Promoter is a key factor for expression of the recombinant protein. There are many promoters for overexpression of protein in various organisms. The *aly* promoter of *Pseudomonas* sp. W7 isolated from marine environment was known to be a constitutive expression promoter of the alginate lyase gene, and its promoter activity is repressed by glucose in *Escherichia coli*. To investigate the catabolite repression of the *aly* promoter and association between the promoter mutants,  $\beta$ -agarase gene, which was also cloned from *Pseudomonas* sp. W7 was connected to the *aly* promoter with the sequence the coding 46 N-terminal amino acids of the alginate lyase gene. The constructed plasmid was introduced into *E. coli* and the agarase activity was measured. Fourty six amino acids of the alginate lyase gene was serially deleted using PCR to the direction of 5' upstream region and subcloned. The agarase was overexpressed by the *aly* promoter and the production of agarase was repressed by the addition of glucose into culture media. Fourty six amino acids of alginate lyase did not affect the production of agarase at all. The deletion of a putative stem-loop structure in the *aly* promoter induced the decrease of  $\beta$ -agarase productivity.

**Key words:**  $\beta$ -agarase gene, alginate lyase gene promoter, *Pseudomonas* sp., overexpression promoter, catabolite repression

유전자 재조합기술에 의한 장점 증의 하나는 연구용 또는 의약품 및 산업용 단백질을 대량생산할 수 있다는 점이다. 외래 단백질을 대량으로 생체내에서 생산하는데 사용하는 host로는 현재 *E. coli*, *Bacillus*, 효모, 동물세포 등이 있으며 이 가운데 *E. coli*가 가장 많이 사용되고 있다. *E. coli* 내에서 외래 단백질을 생산하기 위한 vector로는 heat-shock induced expression vector, IPTG induction vector 등이 개발되어 사용되고 있는 중이다. IPTG에 의한 induction은 식품 첨가물 및 의약품 단백질을 생산하는데 부적합하다. 왜냐하면 인간 및 동물의 체내에 IPTG가 흡수시 문제점을 일으키기 때문이다. 따라서 이러한 용도로 사용할 때 정제 과정이 복잡해지게 된다[9]. Heat-shock induction의 경우 발효시 미생물 발효 reactor 전체의 온도를 변화시켜 주어야 하는 어려움과 온도 상승에 따른 경비 상승의 단점이 있다[13]. 이러한 어려움을 극복하기 위하여 배양하는 기질의 농도에 따른 autoregulation방법이 산업용으로는 바람직

하다.

Autoregulation은 배양하는 기질 성분의 농도에 따라서 생체내에서 repressor-operator interaction이나 activator interaction에 의해 인위적으로 조절 가능하기 때문에 비교적 간단한 조작으로 발현량을 조절해 줄 수 있기 때문에 이의 개발이 절실히 요구되고 있다. 탄소원 가운데에서도 glucose에 의한 조절이 대표적이라 할 수 있다. 기존 알려진 glucose에 의해 조절되는 대표적인 발현 vector들은 대부분 IPTG에 의한 inducible vector이기 때문에 이와는 다른 작용기작을 갖는 glucose 조절의 다른 강력한 promoter를 지닌 vector의 개발이 필요하다.

본 연구실에서는 해양의 *Pseudomonas* sp. W7로부터 분리한 alginate lyase 유전자(pKAL24)가 *E. coli*내에서 효율 좋게 발현하고 있으며 특히 glucose의 첨가에 의해서 catabolite repression을 강하게 받고 있는 특성을 보고한 바 있으며 외래 유전자의 발현에 우수한 promoter임을 밝힌바 있다[4,6,7]. 본 연구는 *Pseudomonas* sp. W7로부터 분리한 alginate lyase 유전자의 promoter와  $\beta$ -agarase 유전자의 open reading frame(ORF)만을 연결시켰을 때 효과적으로 *E. coli*내에서 대량발현시킬 수 있는가를 검토하고 promoter

\*Corresponding author  
Tel. 82-51-620-6185, Fax. 82-51-620-6180  
E-mail: iskong@dolphin.pknu.ac.kr

region의 변화가 발현에 어떠한 영향을 미치는가를 조사한 연구결과이다.

**재료 및 방법**

**사용균주, plasmid 및 배지조성**

본 실험에서 사용한 *E. coli* 균주는 XL1-blue[*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacF[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> lacZ  $\Delta$ M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]*]를 사용하였으며 클로닝 vector로는 pUC19를 사용하였다. 730 bp의 alginate lyase 유전자의 promoter region은 pKAL24[7]로부터 PCR을 통해 분리하였으며 1.9 kb의  $\beta$ -agarase 유전자의 ORF를 pJA1[8]으로부터 PCR을 통해 분리하여 사용하였다. *E. coli* 배양시의 배지는 Luria Bertani(LB) 배지를 사용하였으며 항생제로는 ampicillin 100  $\mu$ g/ml을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 Difco (USA), Sigma(USA) 또는 Junsei(Japan)로부터 구입하여 사용하였으며, restriction enzyme은 Promega(USA)로부터 구입하여 사용하였다.

**형질전환과 plasmid DNA 분리**

*E. coli* competent cell은 Mandel과 Higa 등이 확립한 CaCl<sub>2</sub> 방법에 따라 실시하였다[10]. *E. coli*로부터 plasmid의 분리 정제는 Sambrook[12]와 Ish-Horowicz[3]의 방법의 변형이나 polyethylene glycol을 사용한 방법을 이용하였다.

**Agarose gel 전기영동 및 DNA elution**

전기영동 완충용액으로는 TAE 완충용액(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.8-2.0%의 agarose 수평 gel을 사용하여 시료의 1/4배량의 4 $\times$  gel loading buffer를 가한 DNA용액을 100 V에서 전기영동 하였다. Agarose gel로부터 DNA 단편의 회수는 Gel extraction kit (Quiagen, Germany)를 사용하였다.

**대량발현 vector의 제조**

대량발현 plasmid pJAG1을 만들기 위해,  $\beta$ -agarase gene의 ORF[8]와 46개의 alginate lyase N-terminal amino acid residues를 포함하는 promoter region[7]을 PCR을 이용하여 연결시켰다. 먼저 pJA1으로부터 primer V와 VI(primer V, 5'-GGCCGGATCCCATGAAAGCTATGCCCTG-3'; primer VI, 5'-GGCCGAATTCATTGGTGTGTTGATGTCAC-3')를 사용하여  $\beta$ -agarase gene의 ORF를 증폭시켰다. 제작된 primer들은 각각 *Eco*RI과 *Bam*HI site를 포함하고 있으므로, 이 증폭된 1.9 kb의 PCR product를 동일한 제한효소로 digestion한 pUC19과 ligation하였다. 그 후 pKAL24로부터 primer III과 IV[primer III, 5'-GGCCGGATCCGGGTCGACCGGGTTAACCG-3'; primer IV(reverse primer), 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAACACG-3']를 사용하여 46개의 alginate lyase N-terminal amino acid residues를 포함하는 promoter region을 증폭시켰다. 이 증폭된 750 bp의 PCR product의 양쪽에 있는 *Bam*HI과 *Hind*III site를 제한효소로 처리한 후  $\beta$ -agarase gene의 ORF가 ligation된 재조합 plasmid를 동일한 제한효소로 처리하고 ligation하여 대량발현 plasmid DNA인 pJAG1을 만들었다.

이때 증폭 횟수는 25회로 denaturation은 95°C에서, primer annealing은 60°C에서, extension은 72°C에서 각각 30초간 반복 수행하였다. 그리고 마지막 extension시간을 72°C에서 10분간 연장하여 반응하였다.

**Primer의 제작과 recombinant plasmid의 제조**

Primer의 제작을 위해 이미 보고된 alginate lyase 유전자의 sequence를 바탕으로 하였다[4].

*Alv* promoter의 46개의 alginate lyase N-terminal amino acid residues를 순차적으로 제거할 수 있도록 *Bam*HI site를 포함하는 5개의 primer 1, 2, 3, 4, 5(primer1, 5'-GGCCGGATCCTTATTTTGCACCA-3'; primer2, 5'-GGCCGGATCCTG

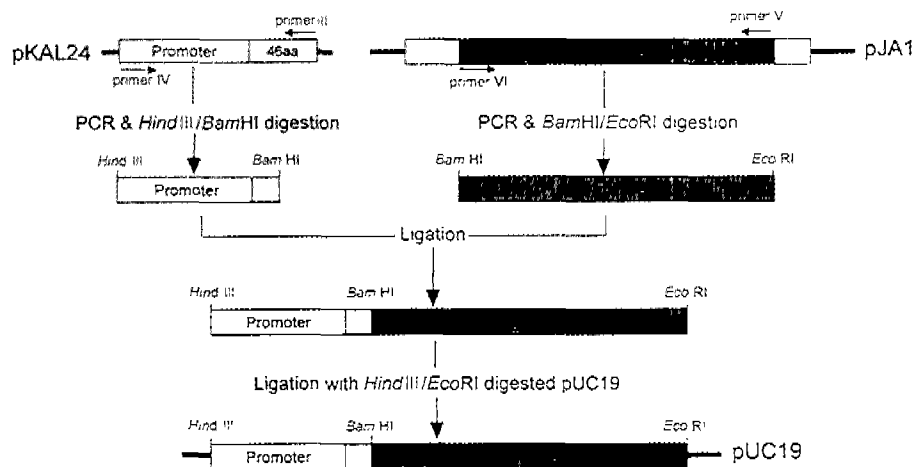


Fig. 1. Construction of agarase expression plasmid, pJAG1.

AGGCTCTAGGTAA-3'; primer3, 5'-GGCCGGATCCA TTAGGGCGTCTGCT-3'; primer4, 5'-GGCCGGATCCG CGGTGGGTGTGTCC-3'; primer5, 5'-GGCCGGATCCA CTTTAACCAACAGA-3')를 제작하여 reverse primer와 PCR을 수행하고 *Bam*HI과 *Hind*III sites를 제한효소로 digestion한 후 ligation시켰다.

Alginate lyase유전자의 promoter region에는 2개의 가능한 consensus promoter sequence(promoter PI and promoter PII)가 존재하고 있는데 추정되는 2개의 promoter sequence까지 sub-cloning하기 위하여 제작된 2개의 primer I과 II(primer I, 5'-GGCCAAGCTTGAGCGAAGATCGGCTGTATTC-3'; primer II, 5'-GGCCAAGCTTCTATTACCCTATTTATAGC-3')를 universal primer와 함께 사용하여 PCR에 의해 증폭시키고 분리 정제하여 제작된 primer들에 포함된 *Hind*III site와 pKAL24에 포함된 *Eco*RI site를 이용하여 ligation시켜 subcloning을 행하였다.

Promoter sequence와 Shine-Dalgarno sequence 사이에 inverted repeat sequence가 존재하고 있는데 이를 제거하기 위하여 megaprimer method[11]를 사용하였다. 제작된 primer C-I와 C-II(primerC-I, 5'-CATAACCCAATAT TTATAC-3'; primerC-II, 5'-GTATAAATATTGGGTTATGGTGTGGGC TATTATTG-3')를 reverse primer, universal primer와 함께 사용하여 PCR으로써 증폭시킨후 *Bam*HI과 *Hind*III site를 제한효소로 digestion한 후 ligation시켰다.

***E. coli*로부터 발현된 gene products의 확인**

$\beta$ -agarase의 발현을 확인하기 위해 agarase의 activity를 평판 배지에 키운 colony를 Gran's iodine solution(0.05 M

iodine in 0.12 M potassium iodine)[1]을 뿌려 균체 주위에 나타나는 투명환으로 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**대량발현 plasmid pJAG1의 제조와 agarase의 발현**

Alginate lyase의 promoter에 의한 agarase유전자의 대량 발현 plasmid pJAG1과 promoter 부근이 변형된 PJAG유도체를 만들기 위해,  $\beta$ -agarase gene의 ORF[8]와 46개의 alginate lyase N-terminal amino acid residues[7]를 포함하는 promoter region을 PCR을 이용하여 증폭시키고 제한효소로 처리한 후 연결시켰다(Fig. 1-2). *Aly* promoter에 의한  $\beta$ -agarase의 발현을 확인하고 비교하기 위해 pUC19, pJA1, pJAG1을 포함하고 있는 *E. coli*를 평판배지에 키운 colony에 Gran's iodine solution을 뿌려 균체 주위에 나타나는 투명환의 크기를 비교하였다. Fig. 3에서 나타난 것과 같이 pJAG1을 포함하고 있는 *E. coli* colony에서 나타나는 환의 크기가 원래 cloning된 pJA1 plasmid를 지닌 colony보다 크게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 agarase의 본래의 promoter에 의해 발현되는 것보다 alginate lyase유전자의 promoter에 의해 발현되는 것이 훨씬 강력하다는 것을 보여주는 결과이다. 이전의 보고에서 seabream의 growth hormone 유전자를 본 실험에서 사용한 alginate의 promoter와 연결 시켰을 때 growth hormone이 대량발현 되었던 것처럼[6] *E. coli*에서 alginate lyase 유전자의 promoter가 agarase유전자의 발현에도 strong promoter로 작용하고 있음을 다시한번 확인할 수 있었다. 또 이 promoter에 의하여 alginate lyase, gilthead seabream의 growth hormone 발현에서 보여주었던 glucose의 첨가에 의한 catabolite repression이 일어나는지를 확인하기 위해 평판배지에 1%의 glucose을 첨가한 후 동일한 실험을 행하였을 때 colony 주위의 agar 분해 환을 거의 확인할 수 없었다. 이는 alginate lyase promoter에 의한 agarase

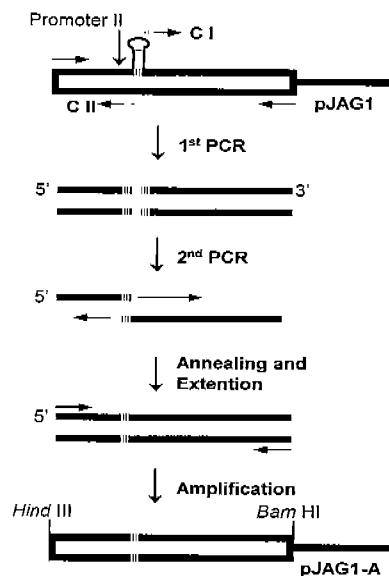


Fig. 2. The megaprimer method for the deletion of inverted repeat sequence in the promoter region.

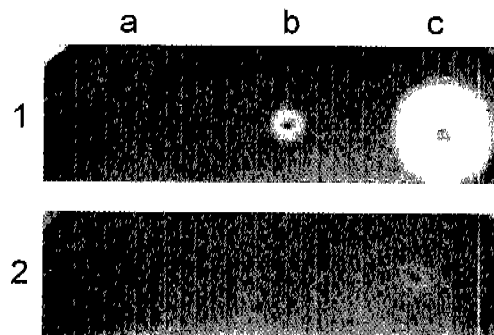


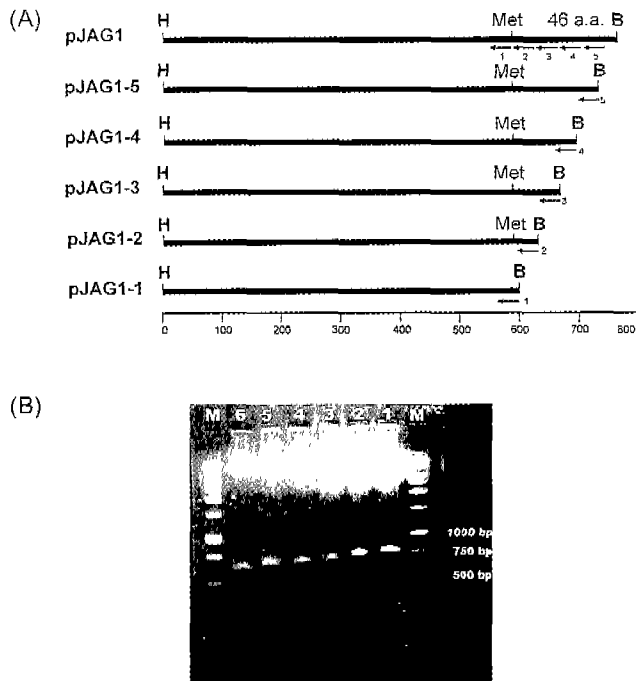
Fig. 3. Agarolytic activity and catabolite repression of pJAG1. a. pUC19, b. pJA1(agarase gene in pUC19), c. pJAG1, 1. 1.5% agar plate(LB+ampicillin), 2. 1.5% agar plate(LB+ampicillin+3% glucose)

유전자 발현에도 catabolite repression을 받고 있음을 보여 주고 있으며 이와 같은 catabolite repression효과는 promoter region이 중요하게 작용하고 있음을 암시하고 있다.

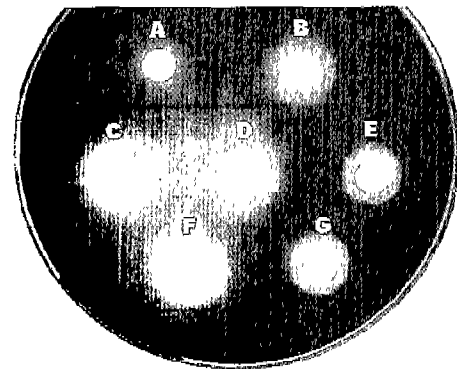
**N말단 아미노산 서열제거에 의한 발현 효과**

*Aly* promoter의 46개의 alginate lyase N-terminal amino acid residues가  $\beta$ -agarase 유전자의 대량발현과 catabolite repression에 미치는 영향을 검토하기 위해 약 9개씩의 alginate lyase유전자의 N-terminal amino acid가 제거될 수 있도록 *Bam*HI site를 포함하는 5개의 primer를 제작하여 PCR을 행하여 promoter region은 그대로 지나면서 단지 46개의 alginate lyase N-terminal amino acid residues가 순차적으로 제거된 각각의 plasmid인 pJAG1-1(containing 2 a.a.), pJAG1-2(containing 12 a.a.), pJAG1-3 (containing 21 a.a.), pJAG1-4(containing 30 a.a.), pJAG1-5 (containing 39 a.a.)를 제조하였다(Fig. 4A). 제조된 5개의 deletion mutant들을 확인하기 위해 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리하여 DNA 전기영동을 통해 N-terminal amino acid 코딩 유전자가 제거되었음을 확인하였다(Fig. 4B).

46개의 amino acid가 순차적으로 제거된 후에 각각의 plasmid를 포함하는 *E. coli*가  $\beta$ -agarase의 발현에 영향을 미치는가를 확인하기 위해 100  $\mu$ g/ml의 ampicillin이 첨가된 LB medium을 사용하여 배양한 후 동일한 양의 상등액



**Fig. 4. (A) Construction of pJAG1. (B) Electrophoresis of pJAG1 derivatives after digestion with *Bam*HI and *Hind*III.** M, size marker; lane 6, pJAG1(748 bp); lane 5, pJAG1-5(721 bp); lane 4, pJAG1-4(694 bp); lane 3, pJAG1-3(667 bp); lane 2, pJAG1-2(640 bp); lane 1, pJAG1-1(613 bp)



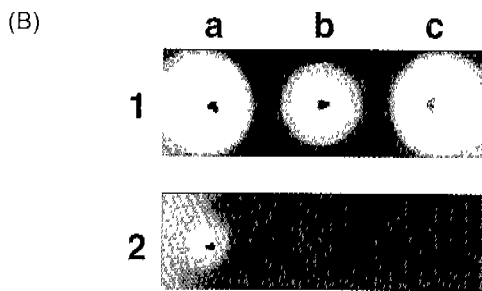
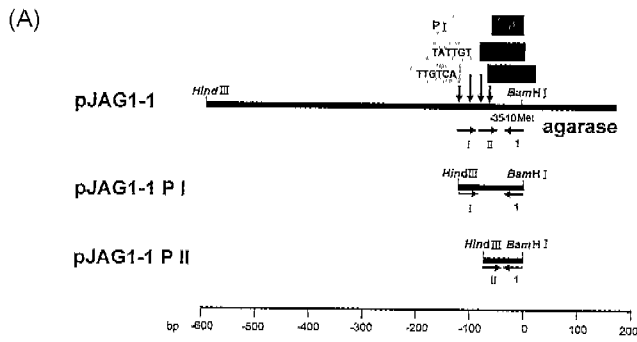
**Fig. 5. Effect of N-terminal amino acid deletion on the agarolytic activity of  $\beta$ -agarase.**

A, pUC19; B, pJAG1(containing 46 a.a.); C, pJAG1-5(containing 2 a.a.); D, pJAG1-4(containing 30 a.a.); E, pJAG1-3(containing 21 a.a.); F, pJAG1-2(containing 12 a.a.); G, pJAG1-1(containing 2 a.a.)

을 1% agar평판에 뿌린 후 12시간 반응시키고 Gran's iodine solution을 뿌렸을 때 각각의 활성에는 별다른 변화가 없는 것으로 나타나 46개의 alginate lyase N-terminal amino acid residue들이 발현에는 영향을 미치고 있지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 전보에서 gilthead seabream의 growth hormone 유전자를 *aly* promoter와 연결시켰을 때 46개 alginate lyase 유전자의 N-terminal amino acid sequence의 존재가 growth hormone의 발현에 매우 중요하게 작용하게 작동하고 있음을 보고하였으나[6] 본 실험의  $\beta$ -agarase의 발현에서는 alginate lyase 유전자의 46개의 amino acid가 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 나타나고 있어 발현시키거나 하는 단백질에 따라서 alginate lyase 유전자의 N-terminal amino acid가 필요한 것으로 추정된다.

***Aly* promoter 영역의 subcloning**

보고된 alginate lyase유전자의 promoter region에는 *E. coli*에서 작용할 수 있는 가능한 consensus promoter sequence 2개가 존재하고 있음을 보여주고 있다[7]. 본 실험에서는 2개의 가능한 consensus promoter sequence 중 어떤 consensus promoter sequence가 발현에 미치는지를 결정하기 위해서 PCR을 사용하여 consensus promoter sequence PI, PII 모두를 포함한 plasmid(pJAG1-1 and pJAG1-1PI)와 뒤쪽에 존재하는 PII만을 지닌 plasmid(pJAG1-1PII)를 제조한 후(Fig. 6A) agarase의 활성을 평판배지상에서 측정할 결과 모두의 경우에서 강한 활성을 보여주었다(Fig. 6B). 이와 같은 결과는 alginate lyase유전자의 promoter region에 존재하는 2개의 가능한 consensus promoter sequence중 뒤쪽에 존재하는 promoter PII sequence만 존재할때도 대량 발현이 가능한 것으로 나타나 PII promoter가 유전자의 발현에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보여지고 있다. 또한

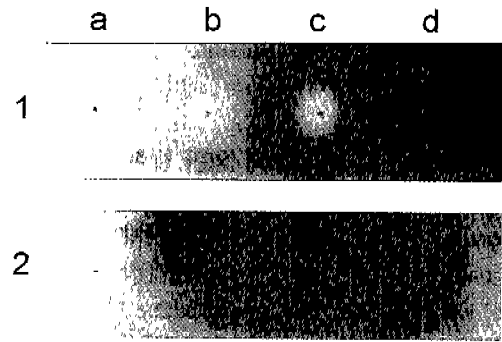


**Fig. 6. (A) Deletion of promoter region by PCR. (B) Agarolytic activity and catabolite repression.**  
 a, pJAG1; b, pJAG1-1PI; c, pJAG1-1PII.  
 1, 1.5% agar plate(LB+ampicillin); 2, 1.5% agar plate(LB+ampicillin+3% glucose).

glucose에 의한 catabolite repression이 promoter PII만을 지닌 plasmid에서도 나타나고 있어(Fig. 6B) catabolite repression은 promoterII와 첫번째 methionine사이에 있는 sequence의 존재에 의해 일어나는 것으로 추측할 수 있었다. 현재까지 *E. coli* 내에서 glucose에 의해 catabolite repression을 담당하는 repressor가 결합할 수 있는 특이 염기서열이 밝혀져 있는데 alginate lyase의 PII promoter 내에서는 repressor와 결합할 수 있는 특이 염기 서열을 가지고 있지 않아 또다른 형태의 regulation이 아닌가 하는 추측이 가능하며 catabolite repression을 담당하는 정확한 부분의 결정과 repressor와의 결합에 관한 생화학적 연구는 앞으로의 과제라 할 수 있다.

**Inverted repeat sequence의 제거**

Promoter sequence내에 존재하는 inverted repeat sequence [7]가 agarase발현에 어떤 영향을 주는지를 확인하기 위해 Fig. 2에서와 같이 megaprimer method[11]를 사용하여 PCR을 통해 pJAG1, pJAG1-1, pJAG1-PII과 pJAG1-PII에서 inverted repeat sequence를 제거하여 pJAG1-A, pJAG1-1A, pJAG1-1AI, pJAG1-1AII를 얻어 *E. coli*에 transformation 시킨 후 평판배지에서 colony의 환의 크기를 비교하여 보았다.(Fig. 7) 그 결과 평판배지에서 agarase활성이 inverted repeat sequence가 제거되면 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있어 이 sequence가 대량발현에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 7. Agarolytic activity and catabolite repression by of  $\beta$ -agarase with a deletion of inverted repeat sequence.**  
 a, pJAG1-A(containing 46 a.a); b, pJAG1-1A(containing 2 a.a); c, pJAG1-1AI(containing PI and PII sequence); d, pJAG1-1AII(containing P sequence).  
 1, 1.5% agar plate(LB+ampicillin); 2, 1.5% agar plate(LB+ampicillin+3% glucose).

**요 약**

Strong promoter로 밝혀진 alginate lyase유전자의 promoter부위에 대한 특성을 검토하기 위해 alginate lyase 유전자의 46개 N-terminal amino acid가 포함된 promoter 부분과, 같은 균으로부터 분리한  $\beta$ -agarase의 유전자를 연결시켜 agarase의 activity를 평판배지에서 보다 쉽게 확인하는 방법으로 promoter의 활성을 측정한 결과 alginate lyase유전자 promoter에 의해서  $\beta$ -agarase유전자의 대량발현이 유도되고 있었으며 glucose의 존재하에서  $\beta$ -agarase 유전자 발현이 일어나지 않는 catabolite repression양상을 나타내고 있다. PCR로써 alginate lyase 유전자의 promoter하류에 존재하는 alginate lyase의 46개 N-terminal amino acid 부분이 순차적으로 제거된 plasmid를 제조하여 대량발현을 조사한 결과 46개의 아미노산이 제거된 후에도  $\beta$ -agarase의 활성에는 변화가 없어 46개의 N-말단이 정상적인 상태에서 발현에는 영향을 미치고 있지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 alginate lyase유전자의 promoter region에 존재하는 가능한 2개의 promoter consensus sequence PI, PII를 subcloning한 결과 promoter PII만이 존재할 때도 대량발현이 유도되고 있음을 확인할 수 있었으며 동시에 glucose가 존재할때 catabolite repression이 역시 나타나고 있어 이 부분이 발현 및 glucose에 의한 regulation에 매우 중요하게 작용하는 부분이라는 것을 확인할 수 있었다.

**감사의 말**

본 연구는 과학기술부의 기술개발용역사업(사업명: 산업용 단백질의 고효율생산을 위한 미생물의 분자육종 및 발효조절기술)의 연구비에 의해 수행된 연구로 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Gran, H. H. 1941. Studien uber meeresbackterien. f. Uever die hydrolysis des agar durch ein neues enzym. die gelase. Bergen Museums Aarvog No. 2, Cited in Stanier, R. Y.: Studies on marine agar digesting enzymc. *J. Bacteriol.* **42**: 529–559.
2. He, B., A. Shiau, K. Y. Choi, H. Zalkin. and J. M. Smith. 1990. Genes of the *Escherichia coli pur* regulon are negatively controlled by a repressor-operator interaction. *J. Bacteriol.* **172**: 4555–4562.
3. Ish-Horowicz, D and J. F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acid Res.* **9**: 2982.
4. Kim, G. T., J. M. Kim, J. H. Yù, and I. S. Kong. 1996. Characterization of catabolite repression and the promotcr of the alginate lyase gene (*ALY*) from *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1271–1276.
5. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.
6. Lee, J. H., S. Y. Choi, S. B. Lee, C. H. Jin, S. H. Huh, and I. S. Kong. 1999 Gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone expression in *E.coli* using alginate lyase gene promoter of *Pseudomonas* sp. *J. Fish. Sci. Tech.* **2**: 93–97.
7. Lee, J. H., J. H. Kang, Y. O. Kim, J. M. Kim, and I. S. Kong. 1998. Nucleotide sequence analysis and expression of the alginate lyase gene from *Pseudomonas* sp. W7 in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 531–535.
8. Lee, S. B., J. H. Park, S. C. Yoon, J. M. Kim, and I. S. Kong. 2000. Sequence analysis of  $\beta$ -agarase (*pJAI*) from *Pseudomonas* sp. isolated from marin enviroment. *J. Biosci. Bioeng.* **89**: 485–488.
9. Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512–538.
10. Mandel, M and A. Higa. 1970. The calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159–162.
11. Pont-Kingdon, G. 1994. Construction of chimeric molecules by a two-step recombinent PCR Method. *Biotechniques* **16**: 1010–1011.
12. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. A laboratory manual 2nd ed., Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring harbor, N.Y.
13. Sawers, G and M. Jarsch. 1996. Alterative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 1–9.

(Received Feb. 3, 2001/Accepted Mar. 10, 2001)