

*Pichia pastoris*에서 *Aspergillus ficuum* 유래 Acetyl Xylan Esterase 유전자의 과발현

임재명¹ · 김성구¹ · 박승문² · 남수완*

동의대학교 생명공학과, ¹부경대학교 생물공학과, ²전북대학교 생물과학부

High-Level Expression of *Aspergillus ficuum* Acetyl Xylan Esterase Gene in *Pichia pastoris*. Lim, Jae-Myung¹, Sung-Koo Kim¹, Seung-Moon Park², and Soo-Wan Nam*. Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ¹Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ²Division of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonbuk 561-756, Korea. – Acetyl xylan esterase gene (AXE) from *Aspergillus ficuum* was cloned and its *Pichia* expression plasmid, pPICZαC-AXE (4.6 kb), was constructed, in which the AXE gene was under the control of the *AOX1* promoter and connected downstream of mating factor α-1 signal sequence. The plasmid linearized by *SacI* was integrated into the 5'*AOX1* region of the chromosomal DNA of *P. pastoris*. In the flask batch culture of *P. pastoris* transformant on methanol medium, the cell concentration and total AXEase activity reached at 6.0 g-dry cell weight/l and 77 unit/ml after 36 h cultivation, respectively. In the fed-batch culture employing the optimized methanol and histidine feeding strategy, the cell concentration and total AXEase activity were significantly increased to about 97 g-dry cell weight/l and 930 unit/ml. Most of AXEase activity (>90%) was found in the extracellular medium and the majority of extracellular protein (>80%) was AXEase enzyme (33.5 kDa). This result means that about 9.8 g/l of AXEase protein was produced in the extracellular medium.

Key words: acetyl xylan esterase, fed-batch fermentation, *Pichia pastoris*, secretion

Hemicellulose의 생분해 산물인 xylan은 자연상태에서 부분적으로 acetyl화 된 형태로 존재하며, lignin 등도 hemicellulose의 β-1,4-D-xylose backbone에 연결되어 있는 α-(1,5) glucuronyl 또는 α-(1,3)-L-arabinose과 ester 결합을 하고 있는데 이러한 잔기 결합구조는 cellulose 못지 않게 natural xylan의 효소적 분해에 대하여 강한 저항성을 가진다고 보고되고 있다[10]. 이러한 natural xylan의 완전 가수분해를 위해서는 β-1,4-interglycosidic linkage 절단 효소인 endoxylanase와 β-xylosidase는 물론이고, β-1,4-D-xylose backbone에 연결되어 있는 분자를 절단할 수 있는 debranching enzymes 즉 acetyl xylan esterase(AXEase; EC 3. 1. 1. 72), α-arabinofuranosidase 및 glucuronidase 등의 협동 작용이 필수적이다[1]. 또한 hardwood xylan과 forage xylan의 구성 xylose 잔기의 50~70%가 아세틸화되어 있는 것으로 확인되었으며, xylan 가수분해반응에 endoxylanase와 β-xylosidase 및 debranching enzymes과의 협동 상승 효과가 있다는 결과도 보고되어져 있다[1]. 최근에 acetyl 함량이 높은 hardwood xylan에 특이성이 높은 곰팡이 유래 AXEase 특

성에 관해 관심이 집중되고 있다. AXEase는 아세틸화 xylan 으로부터 acetic acid 방출을 촉매하며, xylan의 완전한 분해에 필요한 효소이다. 탈아세틸화된 xylan은 다른 xylolytic enzymes 조합과 함께 AXEase를 처리한 후 생산되며, 이를 다시 endoxylanase로 처리하면 특정크기의 xylo-oligosaccharide를 생산할 수 있다.

현재 유전자재조합 단백질 생산에 사용되어지고 있는 *Pichia pastoris*와 같은 메탄올 자화 효모는 몇 가지 장점을 가지고 있다. 즉 외래유전자를 숙주세포 발현계의 염색체 DNA에 삽입시킬 수 있어 발현계의 안정성이 높아지며, 고농도 세포배양시 발생되었던 단백질 발현을 저하를 막을 수 있다. 또한 메탄올 자화 효모는 매우 강력한 메탄올 유도성인 alcohol oxidase 1(*AOX1*) promoter를 이용하여 외래단백질의 대량생산에 유리하다. 또한 고등생물과 동일한 진행세포로서 고등생물 유래의 유전자와 전사 및 번역 시스템이 유사하여 splicing을 통한 intron의 제거와 고등동물의 골지체와 유사한 분비기관을 갖추고 있어, 번역후 수식(post-translational modification)을 통해 활성형 단백질을 생산·분비할 수 있다[9]. Human serum albumin(3 g/l)[7], 간염 바이러스 B 표면항체[8], *Aspergillus niger* 유래 phytase(65 unit/ml)[7] 등 외래 단백질이 *P. pastoris*에서 성공적으로 발현되었다. 이때 유가배양법을 사용하였는데, 주로 메탄올 농

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2276, Fax: 82-51-891-7740

E-mail: swnam@dongeui.ac.kr

도의 on-line 분석과 함께 메탄올 공급속도를 연속적 또는 단계적 증가를 통해 외래단백질 발현을 증가시켰다. 또한 영양요구성 histidine을 따로 공급하지 않고, casamino acid를 소량 공급하여 발현을 증가시킨 보고도 있었다[3].

이에 본 연구는 *Aspergillus ficuum* 유래의 AXEase 유전자(AXE)를 *P. pastoris* 균주에 도입하여 메탄올과 histidine의 최적공급전략을 채용한 유가배양 기법으로 AXEase의 과발현·분비생산을 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 발현 plasmid

본 연구에 사용한 *P. pastoris*는 histidine 영양요구성 변이주인 GS115 균주이며, 발현벡터는 pPICZ α C였다(Invitrogen Co., USA). *A. ficuum* 유래의 acetyl xylan esterase 유전자(AXE, 1063 bp)는 분비신호서열(84 bp)과 2개의 intron(71 bp, 80 bp)과 3개의 exon으로 구성되어 있으며[5], primer-1(5'-AATCGATTAGTGGCAGCCTCCAACAAATC-3')과 primer-2(5'-TTCTAGAGCAAACCCAAACCATTCATA-3')를 이용하여 분비신호서열을 제외한 부위를 PCR 증폭하였다.

형질전환 및 선별배지

구축된 pPICZ α C-AXE를 *P. pastoris* GS115 숙주세포의 genome *AOX1* locus에 electroporation법으로 integration시켰다[15]. 형질전환체의 선별배지로 zeocin(100 mg/l)이 함유된 YPD배지(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% dextrose)를 사용하였다.

회분 배양 조건

Flask 배양 또는 종균배양시 BMGY 배지(pH 6.0, 100 mM 인산완충액, yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, yeast nitrogen base without amino acids 13.4 g/l, biotin 0.004 g/l, glycerol 20 g/l)를 사용하여 30°C, 170 rpm에서 배양하였다. Flask 배양시 AXE 발현을 위한 BMMY배지는 BMGY배지의 glycerol 대신 메탄올을 12시간 간격으로 5 g/l되게 첨가하는 배지를 사용하였으며, 100 ml BMGY배지에서 배양(OD₆₆₀=6) 후 5000×g에서 5분간 원심분리하여 균체(pH 6.0, 100 mM 인산완충액 5 ml에 현탁)만 BMMY배지로 옮겨 AXE를 발현시켰다.

유가 배양 조건

메탄올의 간헐적 공급 또는 일정속도 공급의 유가배양시 초기 회분배양 배지 조성은 CaSO₄ 0.2 g/l, MgSO₄·7H₂O 3 g/l, KOH 0.8 g/l, K₂SO₄ 3.5 g/l, glycerol 40 g/l, casamino acid 10 g/l, H₃PO₄ 10 ml/l를 사용하였고, two-stage 유가 배양에서는 CaSO₄ 0.7 g/l, MgSO₄·7H₂O 11.7 g/l, KOH 4.1 g/l, K₂SO₄ 13.65 g/l, glycerol 40 g/l, casamino acid 10 g/l,

H₃PO₄ 20 ml/l를 사용하였다. Trace elements 용액은 배양초기에 배지 11당 5 ml을 첨가하였고, 그 조성은 다음과 같다(g/l): CuSO₄·5H₂O 0.06 g, KI 0.08 g, MnSO₄·H₂O 0.3 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2 g, H₃BO₃ 0.02 g, ZnSO₄·7H₂O 2 g, FeCl·6H₂O 4.8 g, CoCl₂ 0.5 g, biotin, 0.2 g, H₂SO₄ 5 ml. Glycerol feeding시 50% glycerol 용액 100 ml당 trace elements 용액을 5 ml 첨가하였다. 초기배지의 pH 보정시 NH₃OH 원액을 사용하였으며, 배양시는 30% NH₃OH를 사용하였다. 종배양은 시험관(2.5 cm×19 cm)에 10 ml BMGY배지를 넣고, zeocin (100 µg/ml) 첨가하여 24시간 배양하며, 이를 flask 50 ml에 5% 접종하여 12시간 배양한 후 OD₆₆₀=20일 때 원심분리하여 균체만 100 mM 인산완충액(pH 6.0)에 현탁하여 발효조(Ko BioTech Co., Korea)에 접종하였다. 배양 조건은 초기 배양 부피 1 l, 온도 30°C, pH 5.0~5.3, 교반속도 400~800 rpm, DO>10%, 통기속도 1.0~1.5 vvm였다.

균체 농도, glycerol, 메탄올 및 단백질 측정

균체 농도는 채취한 배양액을 적절히 희석하여 분광광도계(UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 사용하여 660 nm에서 흡광도(O.D.: optical density)를 측정하였다. 배지내 glycerol 분석은 glycerol kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였으며, 배양액을 5,000×g로 원심분리하고, 그 상등액을 적절히 희석하여 glycerol을 정량하였다. 건조균체를 측정하기 위하여 균체를 5,000×g에서 원심분리하여 증류수로 세척한 후 100°C에서 향량이 될 때까지 건조시켰다. 배양 중의 메탄올 농도는 gas chromatograph(HP6890, Hewlett-Packard, USA)를 사용하였고, column은 J&W DB-WAX이며, 검출기는 불꽃 이온화 검출기(FID)를 이용하였다. Carrier gas는 질소를 사용하였으며, 분석 조건은 주입부 230°C, 오븐 최초 50°C에서 마지막 108°C, 검출부 250°C이었다. 상등액 중의 단백질농도 측정은 변형된 Lowry법[16]을 이용하였다.

AXEase 활성 측정

AXEase 활성은 pNPA(*p*-nitrophenyl acetate)과 0.2 mM 인산완충액(pH 7.0)을 사용하여 측정하였으며, AXEase 1.0 unit는 37°C에서 1분 동안 pNPA를 분해하여 1 µmole의 pNP(*p*-nitrophenol)를 방출하는 효소의 양으로 정의하였다. 또한 세포내의 AXEase를 분석하기 위해 원심분리하여 얻은 세포침전물을 여러 번 세척한 후 glass bead(φ 0.45 mm)와 vortex를 이용하여 세포를 파쇄하였으며, 파쇄 전에 protease 활성을 억제하기 위해 PMSF를 1 mM이 되게 첨가하였다. 파쇄된 것은 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 그 상등액을 이용하여 AXEase 활성을 측정하였다.

SDS-PAGE 분석

SDS-PAGE(10% gel)는 시료를 6배 SDS loading buffer와 섞어 15분간 boiling한 후 전기영동을 행하였다[14].

결과 및 고찰

재조합 Plasmid 구축 및 형질전환체 선별

A. ficuum 유래의 acetyl xylan esterase 유전자를 primer-1과 primer-2를 이용하여 PCR 증폭한 후, pPICZ α C vector의 *Xba*I, *Cla*I 부위에 subcloning하여 plasmid pPICZ α C-AXE(4.6 kb)를 구축하였다(Fig. 1).

pPICZ α C-AXE를 *Sac*I로 절단하여 linear form으로 만들고 *P. pastoris* GS115 숙주세포의 genome *AOX1* locus에 integration시켰다. Zeocin이 100 mg/l 농도로 함유된 YPD 배지에서 형질전환체를 선별하였으며, 선별된 균주는 Mut⁺ 균주였다.

회분 배양

BMGY 배지에서 배양 후 균체만 BMMY 배지로 옮겨 flask 배양한 결과, 36시간째 총 77 unit/ml의 효소 활성을 나타내었다(Fig. 2). 이 때 최대비증식속도인 μ_m 는 0.089 h⁻¹ 이고, 건조균체 1 g당 효소활성은 12,833 unit/g-dry cell weight(DCW), 배양액 중 단백질 농도에 대한 효소활성인 specific activity는 14.61 unit/mg였다. 90% 이상의 효소활성은 배양 상등액 내에 있었다. 발효조 회분배양은 BMGY 배지를 사용하여 균체 증식 후 메탄올을 공급하여 발현을 유도하였으나, AXE 유전자가 거의 발현되지 않았다(data not shown). 이는 증식단계에서 histidine 고갈에 의한 것으로 보인다. 발효조 배양시 glycerol을 탄소원으로 소모하여 증식

할 때 최대비증식속도(μ_m)는 0.32 h⁻¹이었다.

Intermittent fed-batch culture

모든 유가 배양의 경우 메탄올 feeding시 기본적으로 DO-stat 방식으로 하였다. 발효조 배양에서 casamino acid는 *P. pastoris* GS115의 histidine원으로 초기에 사용되었으며, 이후 12~14 시간 또는 OD₆₆₀ 값 60 전후로 histidine 고갈로 인한 균체 증식이 정지되는 것으로 판단하여, histidine 1 g을 첨가하여 배양하였다. 실제로 초기 배양시 casamino acid를 대체해 histidine을 1 g/l 포함하여 배양하면 최대 OD₆₆₀는 140까지 증식하였다(data not shown).

회분 배양시 glycerol 고갈 후 1시간 동안 기아 상태를 유지하는데, 이는 ATP와 탄소 2개 이상의 탄수화물에 의한 promoter 기능 저해를 막아 메탄올 feeding시 *AOX1* promoter 발현을 증가시키기 위해서이다[3, 4, 17, 19]. 이 기간 동안에 OD₆₆₀는 5 정도 감소하게 된다. 이는 세포의 용혈 현상이나 세포의 질량이 감소하는 시기로 세포내 축적된 산물을 분해 또는 생산된 에너지의 소모 단계로 보인다. 이후 메탄올을 feeding하여 AXEase 생산을 유도하였다. Intermittent fed-batch 배양시 메탄올은 8 g/l로 첨가했으며, 최초 메탄올 소모하는데 걸린 시간은 4.5 시간 정도였으나, 이후 2 시간까지 줄어들었다. 이는 균체 증식에 따른 메탄올 소모속도가 증가한 것으로 보인다. 최종 47 시간 때 균체 농도는 OD₆₆₀ 값으로 150, AXEase 총발현량은 150 unit/ml 이었다(Fig. 3). 이때 최대 AXEase 생산 속도는 6.5 unit/ml · h였다.

Constant fed-batch culture

초기 메탄올을 낮은 농도로 공급하였는데, 이는 메탄올 축적에 의한 *AOX1* promoter 기능 저해를 막기 위해서이다[12, 13]. *AOX1* promoter에 의한 AXE 유전자 발현까지는

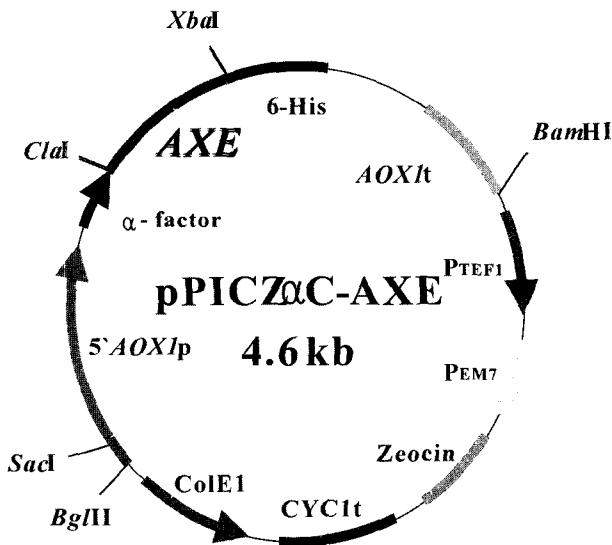


Fig. 1. Construction of acetyl xylan esterase expression plasmid, pPICZ α C-AXE. P_{TEF1}, *TEF1* promoter for selection in *P. pastoris*; P_{EM7}, EM-7 promoter for selection in *E. coli*; Zeocin, zeocin resistant gene; CYC1t, *CYC1* terminator; ColE1, ColE1 replication origin; 5'*AOX1* p, *AOX1* promoter; α -factor, secretion signal sequence of mating factor- α ; 6-His, polyhistidine (6xHis) tag; *AOX1* t, *AOX1* terminator.

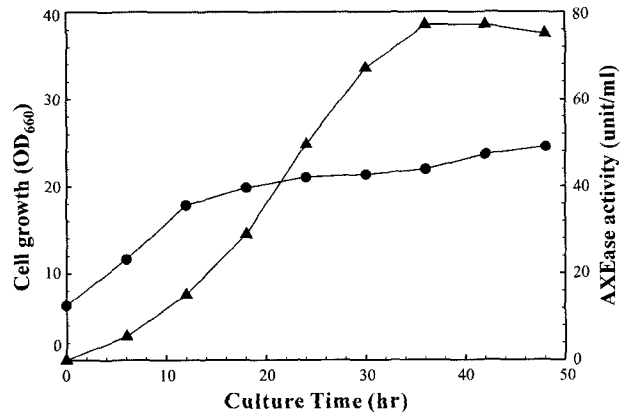


Fig. 2. Time profiles of cell growth and AXEase activity in the flask culture of *P. pastoris* GS115/pPICZ α C-AXE. The yeast transformant was grown on BMGY medium until 6.0 OD₆₆₀, and then cells were harvested and transferred to BMMY medium in which methanol was fed to make 5 g/l at the intervals of 12 h. Symbols : (●), Cell growth; (▲), Total AXEase activity.

1.5시간 이상 소요되며, 발현 후에 메탄올 소모가 현저하였다. 이후 DO 값의 증가·감소에 따라 메탄올 공급을 결정하였다. 최대 균체 농도는 OD₆₆₀ 값으로 235, AXEase 총발현량은 251 unit/ml 이었다(Fig. 4). Intermittent feeding에 비해 constant feeding시 균체 증식이 더 좋았으며, AXEase 최대생

산 속도 또한 8.5 unit/ml·h로 조금 높아졌다. 이는 메탄올 연속 공급에 따른 균체농도 증가에 기인한다고 보여진다. 34시간 전후로 AXEase 생산속도가 현저히 느려지게 되는데 이는 histidine 고갈로 인한 것으로 보이며, 46시간째 feeding한 histidine에 의해 다시 균체증식이 계속되고 AXEase 생

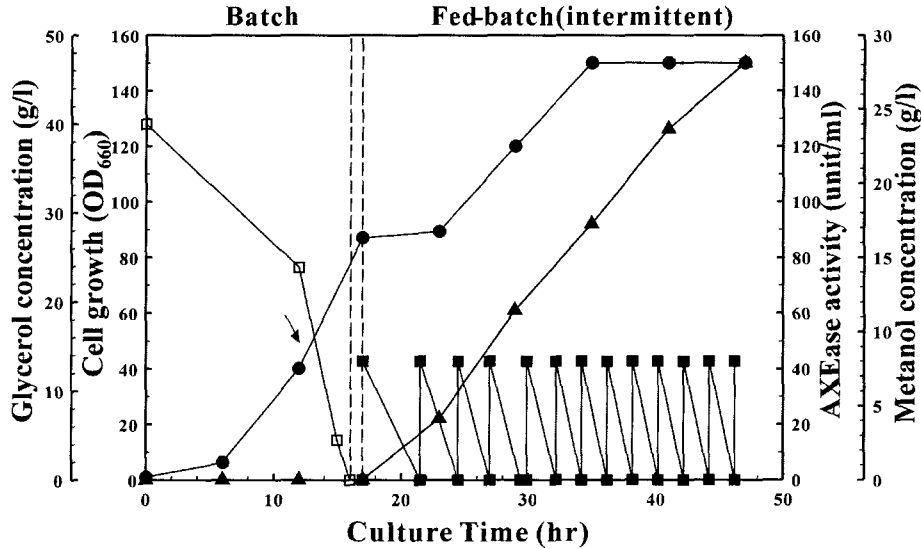


Fig. 3. Time profiles of cell growth, AXEase activity, glycerol and methanol concentrations in the intermittent fed-batch fermentation of *P. pastoris* GS115/pPICZ α -C-AXE. The yeast transformant was batchwisely cultivated on the semi-synthetic glycerol medium for 16 h, and thereafter 1 h methanol was fed by DO-stat method. Symbols : (●), Cell growth; (▲), Total AXEase activity; (■), Methanol concentration; (□), Glycerol concentration; (↘), feeding time of 1.0 g histidine.

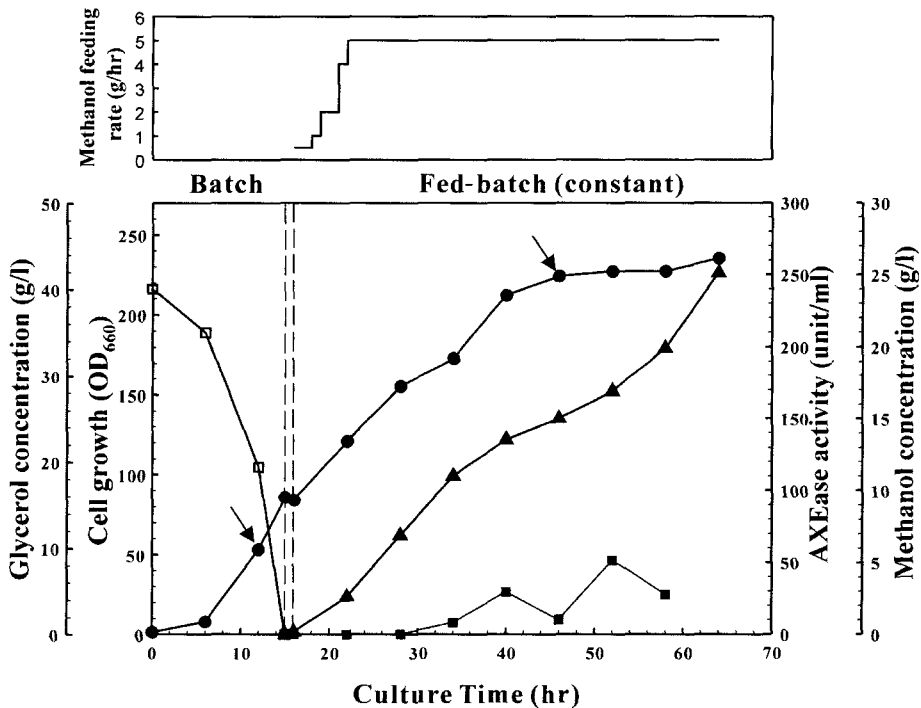


Fig. 4. Time profiles of cell growth, AXEase activity, glycerol and methanol concentrations in the constant fed-batch fermentation of *P. pastoris* GS115/pPICZ α -C-AXE. The yeast transformant was batchwisely cultivated on the semi-synthetic glycerol medium for 15 h, and thereafter 1 h methanol was fed with the constant rates indicated. Symbols are the same as Fig. 3.

산 속도도 증가하였다.

Two-stage constant fed-batch culture

Glycerol 고갈 후 메탄올 feeding 전에도 AXEase는 소량 발현되었는데, 이는 세포 내의 ATP와 배지 내의 glycerol 고갈에 따른 조절유전자의 억제인자 해체에 의한 것으로 보인다 [12, 18]. 그 양은 배양방법에 따라 차이는 있으나 0.069~0.35 unit/ml 정도로 전체 활성의 2%이하였다. Two-stage constant fed-batch 배양시의 균체 농도는 OD₆₆₀ 값으로 19, AXEase 총발현량은 930 unit/ml이며, AXEase 최대생산속도는 14.41 unit/ml·h로 constant fed-batch에 비해 두 배 정도 빨랐다(Fig. 5). 그러나 배양 후반으로 갈수록 생산속도가 3 unit/ml·h까지 떨어졌다. 이는 용존산소 제한에 따라 AXEase 생산속도가 결정되는 것으로 보인다. 이러한 배양 결과를 보면 유도 초기에는 세포농도에 따라서 생산속도가 결정되나 후반으로 갈수록 DO level에 따라서 결정되는 것을 알 수 있었다. 즉 메탄올 소모를 위한 산소가 충분히 필요하다는 것이다. Intermittent, constant, two-stage constant fed-batch 배양의 건조 균체당 효소활성은 각각 3,348 unit/g-DCW, 4,648 unit/g-DCW, 9,577 unit/g-DCW로써 메탄올 feeding 시간에 비례하여 증가한다는 것을 알 수 있었다.

Intermittent fed-batch 배양과 constant fed-batch 배양 사이의 차이가 적은 이유는 constant fed-batch의 최적 메탄올 농도(0.8 g/l)를 유지하지 못한 것에 기인한다고 보여진다 [12]. 최적 메탄올 농도를 유지하며, 메탄올 산화에 필요한 최적 DO인 20%이상을 유지하며 배양한다면 본 실험에서 생산한 것 보다 최소 1.5배 이상을 생산할 수 있을 것으로 보이며, 이를 위해서는 기질 공급과 용존 산소를 높이는 배양 기술이 필요하다[7].

이상의 결과를 Table 1에 간단히 요약하였다. 유가배양 방법에 따라 균체 농도, AXEase 발현량, specific activity 등이 크게 차이가 남을 알 수 있었고, two-stage constant fed-batch 일 때 가장 높은 균체 증식과 AXE의 발현량을 보였다. Fig. 6는 two-stage constant fed-batch 배양의 각 시간 때 배양 상등액을 전기영동한 것이며, 상등액 내에 상당량의 효소를 포함하고 있다는 것을 알 수 있다. *P. pastoris*에서 생산한 AXEase의 분자량은 33.5 kDa으로 *Asp. ficuum*의 AXEase(29.5 kDa)에 비해 분자량이 증가하였다. 이는 AXE 유전자 내 1개의 N-linked glycosylation 가능 부위가 있으며 이 곳에 당쇄 부과된 것으로 보인다[5]. 배양 143 시간째 배양액 중 AXEase가 차지하는 단백질 비율을 전기영동 band로 scanning한 결과, 81%에 달하였다. 이때 배양 상등액 중 총 단백질 농도가 12.1 g/l임을 감안하면, 이중

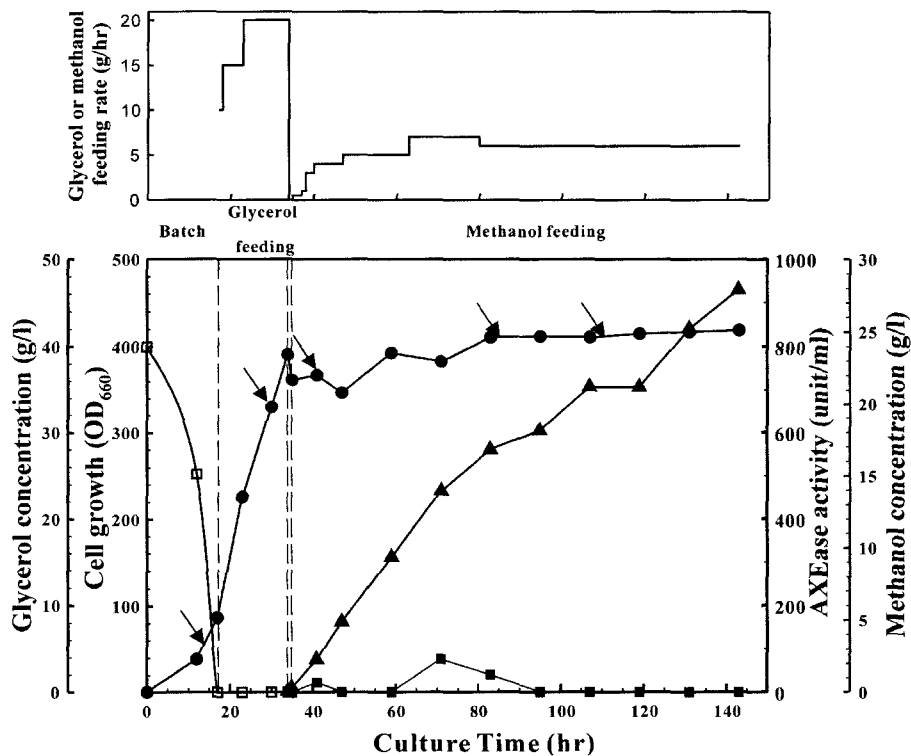


Fig. 5. Time profiles of cell growth, AXEase activity, glycerol and methanol concentrations in the two-stage constant fed-batch fermentation of *P. pastoris* GS115/pPICZ α C-AXE. The yeast transformant was batchwisely cultivated on the semi-synthetic glycerol medium for 16 h, and then glycerol and trace elements were fed till 34 h. Methanol feeding was started at 35 h with the constant rates. Symbols are the same as Fig. 3.

Table 1. Comparison of cell concentration, AXEase activity, protein concentration, and specific activity in the various cultures of *P. pastoris* GS115/pPICZ α C-AXE.

Culture mode	Cell conc. (g-DCW/l)	AXEase activity (unit/ml)		Extracellular protein conc. (mg/l)	Specific activity (unit/mg)
		Extracellular	Intracellular		
Batch (Flask) ¹	6.0	70	7	5,270	13.28
Fed-batch (Fermentor)	Intermittent ²	34.5	140	3,002	46.63
	Constant ³	54.1	232	4,100	56.58
	Two-stage constant ⁴	97.0	855	12,090	70.71

¹Results at 36 h cultivation. ²Results at 47 h cultivation. ³Results at 64 h cultivation. ⁴Results at 143 h cultivation.

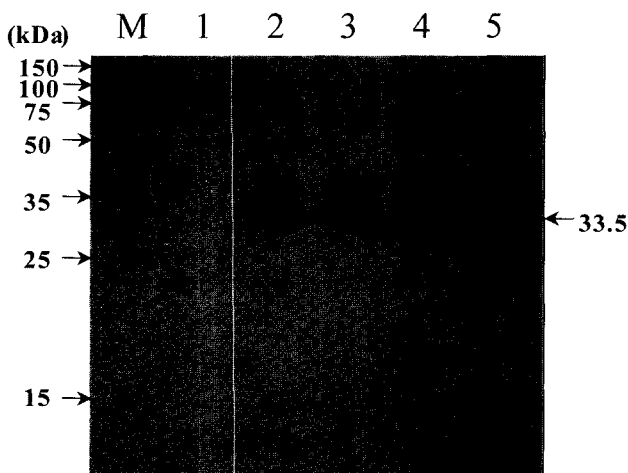


Fig. 6. SDS-PAGE of recombinant AXEase expressed in the two-stage constant fed-batch culture of *P. pastoris* GS115/pPICZ α C-AXE. Samples of 5 μ l were taken before methanol induction (lane 1), after 24 h (lane 2), 48 h (lane 3), 84 h (lane 4), and 108 h (lane 5) induction. Lane M is protein marker.

AXEase 단백질이 9.8 g/l 수준임을 알 수 있었다. 재조합 *P. pastoris*에서 외래유전자는 300시간 이상 메탄올으로 유도할 수 있으며[2], tetanus toxin fragment C의 경우 12 g/l 이상[6], hydroxynitrile lyase는 22 g/l[11] 생산할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 적용한 유가배양법을 좀더 개선하여 용존산소를 충분히 유지하고 메탄올과 histidine의 최적 공급 전략을 도입하여 배양시간을 연장할 경우 AXEase를 10 g/l 이상 생산할 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 염색체에 삽입된 AXE 발현계의 안정성은 100%로 측정되어 고농도세포 배양에서 장기적이고, 안정적인 재조합 단백질 생산에 적합하다는 것을 알 수 있었다.

요 약

Aspergillus ficuum 유래 acetyl xylan esterase(AXEase) 유전자(AXE)를 *Pichia pastoris*에서 과발현·분비 생산하기 위해 *AOX1* promoter와 mating factor α -1 분비신호서열 하

류에 AXE를 연결한 염색체 삽입 발현계(pPICZ α C-AXE, 4.6 kb)를 구축하였다. 이것을 *SacI*로 절단한 뒤 *P. pastoris*의 염색체 DNA 5'*AOX1* 부위에 삽입시켰다. 형질전환된 *P. pastoris* 균주를 메탄올 배지에서 플라스크 회분배양한 결과, 배양 36시간 때의 건조균체농도는 6 g-DCW/l, AXEase 총 발현량은 77 unit/ml이었다. 최적화된 methanol과 histidine 공급방법을 채용한 유가배양시 균체농도는 97 g-DCW/l, AXEase 총발현량은 930 unit/ml로 크게 증가하였다. 효소활성의 90% 이상은 배양 상등액에 존재하였으며, 상등액 단백질의 80% 이상이 AXEase 단백질(33.5 kDa)이었다. 이러한 결과는 9.8 g/l의 AXEase 단백질을 배양 상등액으로 대량 분비·생산할 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 동의대학교의 2001년도 교내 연구과제(자유공모 과제)지원에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Biely, P., C.R. Mackenzie, J. Puls, and H. Schneider. 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Bio/technology* **4**: 731-733.
- Cereghino, J. L. and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 45-66.
- Chauhan, A. K., D. Arora, and N. Khanna. 1999. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* **34**: 139-145.
- Chiruvolu, V., M. C. James, and M. M. Michael. 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 277-283.
- Chung, H. J., S. M. Park, M. S. Yang, and D. H. Kim. 2002. Cloning the gene encoding acetyl xylan esterase from *Aspergillus ficuum* and its expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* (in press).

5. Clare, J. J., F. B. Rayment, S. P. Ballantine, K. Sreekrishna, and M. A. Romanos. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* **9**: 455-460.
7. Cregg, J. M., S. V. Thomas, and C. R. William. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **11**: 905-910.
8. Cregg, J. M., J. F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegal, M. Akong, W. S. Craig, R. G. Buckholz, K. R. Madden, P. A. Kellaris, G. R. Davies, B. L. Smiley, J. Cruze, R. Torregrossa, G. Velicelebi, and G. P. Thill. 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**: 479-485.
9. Grinna, L. S. and J.F. Tschopp. 1989. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**: 107-112.
0. Grohmann, K., D. J. Mitchell, M. E. Himmel, B. E. Dale, and H. A. Schroeder. 1989. The role of ester groups in resistance of plant cell wall polysaccharides to enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20**: 45-61.
1. Hasslacher, M., M. Schall, M. Hayn, R. Bona, K. Rumbold, J. Luckl, H. Griengl, S. D. Kohlwein, and H. Schwab. 1997. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr. Purif.* **11**: 61-71.
2. Kang, W. K., K. J. Cho, and J. H. Kim. 2000. The optimization of expression system for recombinant protein production by *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**: 174-180.
13. Kang, W. K., M. W. Lee, and H. J. Chun. 1998. The optimization of fermentation parameters for heterologous protein productivity enhancement with *Pichia pastoris*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**: 325-330.
14. Laemmli, U. K. and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
15. Lee, K. W., K. K. Cho, S. W. Kwak, J. H. Woo, J. D. Bok, C. K. Sung, and Y. J. Choi. 2001. Expression of antimicrobial cationic peptide by *Pichia pastoris* (methylotrophic yeast). *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **43**: 465-476.
16. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
17. Rosenfeld, S. A. 1999. Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **306**: 154-169.
18. Tschopp, J. F., G. Sverlow, R. Kosson, W. Craig, and L. Grinna. 1987. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**: 1305-1308.
19. Wim, H. and G. Anthony. 1990. *Yeast, Biotechnology and Biocatalysis*, pp. 395-428. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.

(Received July 27, 2002/Accepted Sep. 16, 2002)