

Pichia pastoris에서 Zobellia galactanivorans 유래 재조합 β -Agarase의 고효율 분비생산

석지환¹ · 박희균¹ · 이상현³ · 남수완^{1,2} · 전승종^{1,2} · 김종현⁴ · 김연희^{1,2*}

¹동의대학교 생명공학과, ²동의대학교 바이오물질제어학과

³신라대학교 제약공학과, ⁴오사카대학 응용생물공학과

High-level Secretory Expression of Recombinant β -Agarase from Zobellia galactanivorans in Pichia pastoris. Seok, Ji-Hwan¹, Hee-Gyun Park¹, Sang-Hyeon Lee³, Soo-Wan Nam^{1,2}, Sung-Jong Jeon^{1,2}, Jong-Hyun Kim⁴, and Yeon-Hee Kim^{1,2*}. ¹Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Department of Biomaterial Control (Brain Korea 21 program), Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ³Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea, ⁴Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan – The gene encoding β -agarase (*agaB*) which hydrolyzes β -1,4 linkages of agarose from *Zobellia galactanivorans* was cloned and fused to *Saccharomyces cerevisiae* mating factor alpha-1 secretion signal (MF α 1), in which the transcription of MF α 1-AgaB was under the control of *AOX1* (alcohol oxidase 1, methanol inducible) promoter. The constructed plasmid pPIC-AgaB (9 kb) was integrated into *HIS4* gene locus of *Pichia pastoris* genome. Successful integration was confirmed by performing colony PCR. The transformed cells showed red halos around its colonies in methanol agar plate by adding iodine solution, indicating the active expression of *agaB* in *P. pastoris*. By SDS-PAGE and zymographic analysis, the molecular weight of β -agarase was estimated to be a 53 kDa and about 15% N-linked glycosylation was occurred. The activity of extracellular β -agarase reached 1.34, 1.42 and 1.53 units/mL by inducing 0.1, 0.5, and 1% methanol, respectively, at baffled flask culture of *P. pastoris* GS115/pPIC-AgaB for 48 hr. Most of the enzyme activity was found in the extracellular fraction and the secretion efficiency showed 98%. Thermostability of recombinant β -agarase was also increased by glycosylation.

Key words: β -agarase, overexpression, secretion, *Zobellia galactanivorans*, *Pichia pastoris*

서 론

한천(agar)은 해조류 중 하나인 홍조류의 세포벽을 구성하는 점질성 복합다당류로서, galactose와 galactopyranose의 중합체이며 agarose(70%)와 agaropectin(30%)으로 구성되어 있다[4]. Agarose는 단당류인 D-galactose와 3,6-anhydro-L-galactose가 β -1,4-glycosidic bond로 연결된 중성다당류이며, agaropectin은 agarose와 같은 기본구조를 가지고 있으나 부분적으로 향산염, pyruvic acid, glucuronic acid 등의 치환기를 가지는 산성다당류이다. 한천은 국내에 풍부하게 존재하고 있어 오래 전부터 젤리 등을 생산하는 식품산업과 다이어트 식품으로 널리 이용되고 있으며[3], 의약품, 그리고 미생물 및 식물배양을 위한 배지 고형제 등 중요한 산업 원료

로 사용되고 있다. 더욱이, 지구온난화에 따른 친환경 바이오연료의 공급이 시급해짐에 따라 바이오에탄올 생산을 위한 새로운 바이오매스로서 해조류 유래 다당류의 이용도 기대할 수 있을 것이다. 또한, agarose로부터의 분해산물인 agarooligosaccharide 및 neoagarooligosaccharide는 항산화, 항염증, 항암효과 및 세포사멸유도와 같은 생리적 활성 및 전분노화에 대한 억제작용, 보습효과 그리고 미백효과 등 많은 유용한 기능을 나타내며 이들을 활용한 제품은 부가가치가 매우 높은 것으로 알려져 있다[7, 11, 17, 25].

Agarose로부터 이런 유용한 oligosaccharide를 생산하기 위해서는 염산 등을 이용한 화학적 가수분해법[10] 및 효소학적 방법을 이용할 수 있는데, 화학적 산가수분해법은 생리활성이 높은 저중합도의 활성형 oligosaccharide를 선택적으로 생산하는 것이 매우 어렵고, 식품첨가물로서의 부적합성 및 안정성 등에 문제가 있는 반면, 효소학적 방법은 agarose를 선택적으로 oligosaccharide로 분해할 수 있는 기질 특이성 때문에 효소적 가수분해 방법이 활성형 oligosaccharide의 생산에 더 유리하다고 할 수 있다. 한천분해효

*Corresponding author
Tel: 82-51-890-2281, Fax: 82-51-890-2632
E-mail: yeonheekim@deu.ac.kr

소로는 agarose의 α -1,3-glycosidic bond를 절단하는 α -agarase와 β -1,4-glycosidic bond를 절단하는 β -agarase가 있는데, agarase는 식품, 화장품, 의학산업 분야뿐만 아니라 agarose gel에서 DNA의 추출, marine algae의 세포벽 분해를 통한 protoplast 제작 등 생물공학적 측면에서도 그 잠재적 응용이 가능하다[1, 13, 24]. Agarase는 주로 *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Thalassomonas* sp., *Agarivorans* sp. 등 여러 해양미생물에서 분리가 되어 그 특성이 보고되어 있고[5, 14, 21, 26], 관련 특허도 다수 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 두 가지 agarase효소 중 대부분을 차지하는 β -agarase의 대량 생산 최적화를 위해 효모 *Pichia pastoris*에서 재조합 β -agarase를 분비 생산하고자 하였다. 사용된 *agaB* 유전자(ORF 1,062 bp)는 해양미생물 *Zobellia galactanivorans* 유래의 extracellular endo- β -agarase를 코드하고, agarose fragment를 효율적으로 분해한다고 보고되어 있으며, 대장균에서 재조합 agarase가 유도 발현되었을 때 100 unit/ μ g의 specific activity를 보였다[9].

외래 재조합단백질의 대량 생산에는 숙주세포와 적합한 발현시스템의 선택으로 인한 효율적 생산 시스템의 구축이 중요시 되는데, 여러 미생물 숙주세포 중 많은 경우 유전학적, 생리 화학적 특징이 잘 밝혀져 있는 박테리아와 효모가 그 대표적인 숙주시스템으로 이용되고 있다. 특히 미생물이면서도 진핵생물의 단백질 발현 및 분비 특징을 갖는 효모 *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* 등은 재조합 단백질 대량생산을 위한 이상적인 숙주시스템으로 각광을 받고 있다[8, 19, 22]. 그 중 메탄올 자화효모인 *P. pastoris*는 외래 유전자를 숙주세포 염색체 DNA에 삽입시켜 발현시스템의 안정성을 높일 수 있으며, 고농도 세포 배양 시 발생되었던 단백질 발현을 저하를 막을 수 있는 잇점이 있다. 또한 번역 후 수식(posttranslational modification) 과정을 통해 재조합 단백질을 효과적으로 생산, 분비 가능하며, 메탄올 유도성 *alcohol oxidase 1(AOX1)* promoter를 이용하여 활성형 외래 단백질의 대량생산에 유리하다. 실제로 Human procarboxypeptidase B[12], *Fusarium solani*유래 cutinase[15], *Aspergillus niger* 유래 phytase[2], 등 많은 외래 단백질이 *P. pastoris*에서 성공적으로 발현되었다. 그러나 *P. pastoris*에서 β -agarase의 대량생산, 분비 및 생산 최적화에 관한 연구는 보고된 적이 없다. 이에 본 연구에서는 β -agarase 단백질의 분비생산을 위한 효모 mating factor α -1(MF α 1)의 분비신호서열(secretory signal sequence)을 이용하여 *Z. galactanivorans* 유래의 *agaB*유전자를 *P. pastoris*에 도입해 분비효율을 조사하고 β -agarase의 과발현을 유도하여 생산된 β -agarase 효소를 산업적으로 이용하기 위한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmids

Z. galactanivorans 유래의 β -agarase 유전자(*agaB*) 발현 plasmid 구축 및 증폭을 위한 숙주세포로 *E. coli* DH5 α 가 사용되었고, 효모숙주세포는 histidine 영양요구성 변이주인 *P. pastoris* GS115(his4, Mut+) 균주(Invitrogen Co., San Diego, CA, USA)를 사용하였다. Plasmid 구축에 사용된 vector는 대장균용 pGEM T-easy vector(Promega, Madison, WI, USA)와 메탄올 자화효모 발현 vector인 pPIC9 vector(Invitrogen Co., USA)를 사용하였다. pPIC9 vector에는 메탄올 첨가에 의해 강력히 유도되는 *alcohol oxidase 1(AOX1)* promoter와 영양 요구성 요구 선별표지로 이용할 수 있는 *HIS4* 유전자가 형질전환체 선별 및 발현 cassette의 효모염색체 내로의 integration을 위한 표적유전자로서 함유되어 있다. 또한 도입된 외래단백질의 세포 외로의 효율적 분비 생산을 위해, MF α 1 signal sequence(ss)[12]가 *AOX1* promoter 하류에 연결되어 있다.

β -agarase 발현 plasmid 제작 및 형질전환

Z. galactanivorans(KCTC #12921)의 genomic DNA를 주형으로 *agaB* 유전자의 자체 signal sequence(54 bp)가 제거된 1,008 bp의 *agaB* 유전자를 PCR로 증폭한 뒤, pGEM T-easy vector에 subcloning하여, pGEM-*agaB* plasmid를 구축하였다. *P. pastoris*에서 *agaB* 유전자의 분비 발현을 위한 plasmid 구축을 위해서는 먼저 forward primer(5'-GCGCTC-GAGAAAAGAGGCGACAATTCAAAATT-3')와 reverse primer(5'-CGCGAATTCTTATTCTCTACAGGTTT-3')를 제작했다. 이 primer를 이용하여 pGEM-*agaB* plasmid(4.0 kb)를 주형으로 양쪽에 *Xba*I과 *Eco*RI site를 가진 *agaB* 유전자를 PCR로 증폭하였다. 얻어진 단편을 *Xba*I과 *Eco*RI으로 처리한 후, *Pichia* 발현용 vector, pPIC9에 cloning하여 pPIC-AgaB plasmid(9.0 kb)를 구축하였다. Cloning된 *agaB* 유전자의 서열을 ABI 3730XL DNA analyzer(Applied Biosystems, Vernon Hills, Illinois, USA)로 확인한 후, pPIC-AgaB plasmid를 *Pichia* 균주 염색체내 *HIS4* gene locus에 integration하기 위해 *HIS4* 유전자내의 *Sal*I으로 처리한 후, *P. pastoris* GS115 균주에 electroporation법을 이용하여 형질전환하였다[12].

효모 형질전환체 선별 및 배양조건

효모 형질전환체의 선별을 위한 배지로 MD 배지(1.34% yeast nitrogen base without amino acids(YNB), 2% dextrose, 0.004% biotin, 18.2% sorbitol)를 사용하였다. 선별된 형질전환체는 colony PCR과 plate active staining법을 통해 1차 선별되었다. Colony PCR은 94°C에서 5분간 1cycle의 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서

30초간 annealing, 72°C에서 1분간의 polymerization으로 30cycles을 수행했고, 마지막으로 72°C에서 5분간 post polymerization을 수행했다. Colony PCR로 *agaB* 유전자의 integration이 확인된 재조합 형질전환체를 선별한 후 단백질의 발현 여부를 확인하였다. Test tube와 flask 배양에서 종균 배양시 BMGY 배지(pH 6.0 100 mM 인산완충액, 1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen without amino acid, 0.004% biotin, 1% glycerol)를 사용하여 30°C, 190 rpm 조건으로 OD₆₀₀=2정도 일 때 까지 배양 후, 10분간 원심분리하여 균체단(pH 6.0, 100 mM 인산완충액 5mL에 혼탁) BMMY 배지(BMGY 배지의 glycerol 대신 0.05% 메탄올 첨가)로 옮겨 30°C, 190 rpm에서 48시간 동안 배양하였다. 이때 메탄올 첨가에 의한 효율적 단백질 발현 유도를 위해 12시간마다 BMMY 배지에 각각 0.1%, 0.5%, 1% 농도로 메탄올이 첨가되었다.

균체분획, β -agarase 활성 측정 및 분비효율

균체 침전물은 beadbeater(Biospec, Thailand)와 glass beads(0.5 mm)를 사용하여 crude extracts 분획을 얻었으며[18], 이를 분획과 상등액을 사용하여 각 분획에서의 효소활성을 측정하였다. β -agarase 효소 활성은 DNS법(3,5-dinitrosalicylic acid)[20]을 이용하여 측정하였는데, 0.25%(w/v) agar(Junsei chemical Co., Tokyo, Japan)가 포함된 기질 용액(50 mM TAPS(*N*-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid) buffer, pH 8.5)에 효소용액을 첨가해서 40°C에서 15분간 반응시킨 후 DNS용액을 첨가하였다. 5분간 boiling하고 ice에서 5분간 cooling 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 40°C에서 1분간 1 μ mol의 galactose를 생산하는 효소의 양으로 정의하였으며 표준적정곡선의 작성을 위해 0.2% galactose를 사용하였다. 각 효소들의 분비효율(secretion efficiency)은 전체 효소활성(세포외 활성 + 세포내 활성)에 대한 세포외 효소 활성비를 백분율로 나타내었다. Plate 상에서의 효소활성도를 확인하기 위한 정성분석(plate active staining)에는 I₂ solution(0.05M I₂/0.12M KI)을 이용하여 agar의 분해 정도를 측정하였다[14]. BMMY plate 배지에서 자란 형질전환체의 균체를 중류수로 washing한 후, 적당량의 I₂ solution을 배지 위에 부어 β -agarase가 분해한 agar의 분해환 크기를 비교 조사하였다.

단백질 확인 및 활성분석

β -agarase 단백질의 농도는 세포 배양 후 13,000 g에서 5분간 원심분리한 배양 상등액을 회수하여 Bio-Rad protein assay kit를 이용한 Bradford method로 측정하였다. Standard 단백질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다. SDS-PAGE는 Laemmli법[16]에 따라 0.4% sodium dodecyl sulfate(SDS)의 존재 하에서 10% polyacrylamide gel 농도로 PAGE를 수행하였고, 전기영동 후 gel을 coomassie

brilliant Blue R로 염색하여 분석하였다. β -agarase 활성의 zymographic analysis를 위해 SDS-PAGE가 끝난 gel은 2.5% Triton X-100(25 mM Tris-HCl, pH 8.0) 용액에서 10분간 washing 한 후, 20% isopropanol 용액에서 10분, 중류수에서 10분간 2번의 washing을 통해 SDS를 제거하였다. SDS가 제거된 gel은 TAPS buffer에서 10분간 담근 후, 1.5% agar plate에 중층한 후, 40°C에서 40분간 반응하고, I₂ solution을 이용하여 활성을 확인하였다.

β -agarase의 carbohydrate 제거 및 열안정성 조사

배양 상등액으로 분비된 재조합 β -agarase의 carbohydrate chains의 제거를 위해 endoglycosidase H(Endo-H)(*Streptomyces plicatus*에서 clone되었고, *E.coli*에서 과발현됨. New England Biolabs, Beverly, MA, USA)를 사용하였다. 분비된 β -agarase 10 μ g에 Endo-H(2,000 unit)와 G5 buffer(Endo-H reaction buffer) 3 μ L를 혼합하고 이 반응액을 37°C에서 1시간 반응시켰다. Carbohydrate chains의 제거는 SDS-PAGE를 통해 확인되었다. 또한 재조합 β -agarase의 열안정성은 효소액을 각각 40, 45, 50, 55, 60°C에서 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, O/N으로 반응시킨 후, 효소활성을 측정함으로써 조사되었다.

결과 및 고찰

β -agarase 발현 plasmid의 구축

agaB 유전자를 *Pichia* 균주 내에서 발현·분비시키기 위한 plasmid를 구축하기 위해서, *agaB* 유전자의 자체 signal sequence가 제거된 *agaB* 유전자를 *S. cerevisiae* MF α 1 signal sequence(ss) 하류에 연결시켜 *AOX1* promoter 하류에 *agaB* 유전자를 cloning한 pPIC-AgaB plasmid(9.0 kb)를 구축하였다. MF α 1 분비신호서열과 *agaB* 유전자와의 연결부위는 5'-CTCGAGAAAGAGGGCGACAATTCAAAA-3' 서열을 가지고 있어 *Xba*I으로 절단하여 연결함으로서 LQKRGDNSK의 아미노산 서열을 가지게 되어, 번역 후 분비과정에서 *KEX2* protease에 의해서 절단되어 β -agarase 단백질을 분비할 수 있게 된다. 구축된 pPIC-AgaB plasmid는 효모 형질전환체 선별마커로서 *HIS4* 유전자를 가지고 있어 *P. pastoris* GS115(*his4*)를 숙주세포로 사용할 수 있다.

agaB 유전자 integration 확인 및 효모 형질전환체의 선별

구축된 pPIC-AgaB plasmid를 *Sal*I 처리한 후, *Pichia* GS115 균주에 형질전환하여 MD배지에서 1차 선별하였다. 13개의 형질전환체를 선별하여 *agaB* 유전자의 integration 여부를 확인해보기 위해 colony PCR을 수행한 결과, 13개 중 8개의 형질전환체에서 1 kb의 *agaB* 유전자가 증폭되었고, *agaB* 유전자를 가진 cassette가 성공적으로 *Pichia* 균주 염색체 내로 integration 되었음을 확인할 수 있었다. 또한

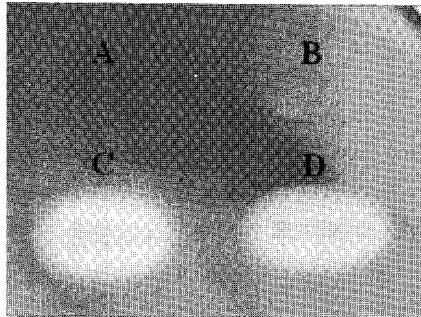


Fig. 1. Active staining of β -agarase expressed in *P. pastoris* transformants that were grown on BMGY medium containing 0.5% methanol. These cells were incubated at 30°C for 2 days and then stained by iodine solution. A; *P. pastoris* GS115 (host, control), B; *P. pastoris* GS115/pPIC9 vector (negative control), C; *P. pastoris* GS115/pPIC9-AgaB No.1, D; *P. pastoris* GS115/pPIC9-AgaB No.2.

integration된 *agaB* 유전자의 발현 유무를 plate active staining을 통해 확인해 본 결과, 선별된 재조합 균주에서 선명한 agar 분해환이 나타나 β -agarase가 성공적으로 분비·발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

단백질 확인 및 zymographic analysis

Methanol 첨가에 의해 발현 유도된 β -agarase는 자체 signal sequence 대신 고효율 분비서열인 MF α 1 s.s를 가지고 있어 배양 상등액으로의 분비가 가능함으로 배양 상등액을 이용하여 재조합 β -agarase의 단백질을 확인해 보았다(Fig. 2). 10% polyacrylamide gel을 이용한 SDS-PAGE 결과, β -agarase 단백질로 추정되는 위치에 두 개의 band가 관찰되었고, iodine용액을 이용한 zymographic analysis에서 이 두 개의 band는 58 kDa과 67 kDa의 분자량을 가진 재조합 β -agarase임을 확인하였다(Fig. 2A). 효모를 숙주세포로 이용하여 외래 단백질을 생산하는 경우에는 번역 후 수식(post-translational modification) 과정의 하나로 N-linked glycosy-

lation이 일어나 발현된 단백질의 분자량 증가를 보이는 경우가 많다. 재조합 β -agarase를 Endo-H 처리를 하여 분자량의 변화를 확인해 본 결과, glycosylation이 되었을 거라 생각되는 67 kDa의 단백질은 약 53 kDa으로 분자량이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 또한 당 제거에 의한 β -agarase 활성의 변화는 보이지 않았다. 따라서 53 kDa 재조합 β -agarase 단백질의 asparagine 잔기(Asn-X-Ser/Thr)에 high-mannose type의 N-linked glycosylation이 발생하여 약 15% 정도의 glycosylation이 일어나 단백질의 분자량 증가를 보였음을 알 수 있었다. 또한 *E. coli*에서 재조합 β -agarase의 분자량을 측정해보면 약 45kDa 정도 나오는 것을 확인 할 수 있는데[9], 이와 비교해서 *Pichia*에서 53 kDa의 더 큰 β -agarase의 분자량이 확인 된 것은 polypeptide에 결합된 carbohydrate(e.g., N-acetyl-glucosamine)가 Endo-H에 의해서 완전히 제거되지 않았기 때문이라 생각된다.

Methanol 유도조건에 따른 재조합 β -agarase의 발현 · 분비를 비교

Colony active staining에서 분해환을 보이는 *P. pastoris* GS115/pPIC-AgaB 균주 8개를 10 mL test tube에서 배양하였다. 그 중 가장 높은 활성을 보이는 *P. pastoris* GS115/pPIC-AgaB 균주(0.34 unit/mL)를 선별하여 50 mL baffled flask 배양을 수행하였다. 먼저 BMGY 배지에서 세포의 성장을 증가시키고 methanol이 포함된 BMGY 배지에서 단백질의 발현을 유도하였다. 이때 methanol의 농도에 따른 β -agarase 활성에의 영향을 비교하기 위해 매 12시간마다 methanol 0.1, 0.5, 1%의 농도로 발현을 유도하였다. 배양이 끝난 배양액을 회수하여 배양 상등액, 균체 파쇄물로 분획하여 효소 활성을 측정하였다. Methanol 유도농도에 따른 효소활성은 배양시간에 따라 증가되어 배양 48시간째 최대 1.34~1.53 units/mL을 보였고, 최대 균체농도는 OD₆₀₀=27~32에 도달하였다(Fig. 3). 첨가된 methanol은 탄소원으로

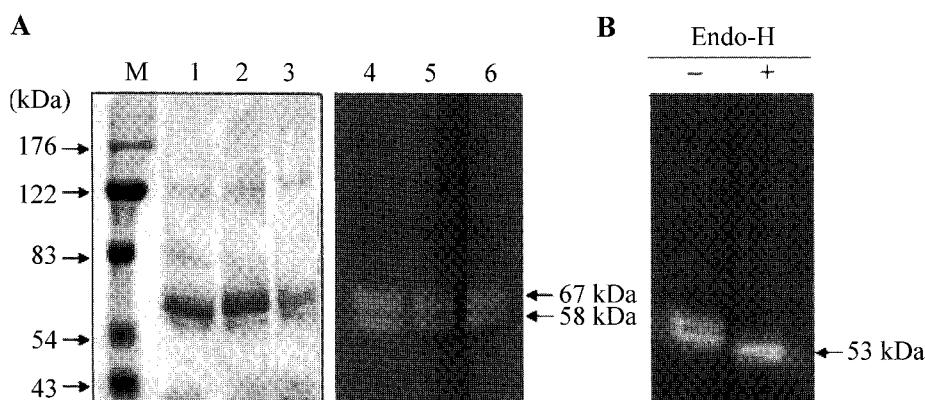


Fig. 2. SDS-PAGE analysis and staining of secreted recombinant β -agarase in *P. pastoris* transformants (A) and active staining of non-glycosylated β -agarase after Endo-H treatment. Lane M, protein molecular weight marker; lane 1,4, secreted β -agarase after 0.1% methanol induction; lane 2,5, secreted β -agarase after 0.5% methanol induction; lane 3,6, secreted β -agarase after 1% methanol induction.

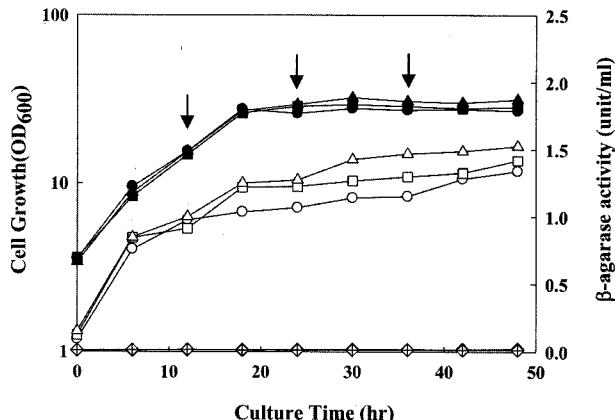


Fig. 3. Comparison of cell concentration and β -agarase expression according to induction of different methanol concentration in baffled flask of *P. pastoris*/pPIC-AgaB on BMMY medium. Symbols: (●, ○), cell concentration and extracellular β -agarase activity under 0.1% methanol induction; (■, □), cell concentration and extracellular β -agarase activity under 0.5% methanol induction; (▲, △), cell concentration and extracellular β -agarase activity under 1% methanol induction; (◇), intracellular β -agarase activity; (↓), methanol feeding point.

이용될 수 있으므로 methanol 농도 증가에 따른 균체농도의 증가 및 효소활성은 비례적인 증가를 보임을 알 수가 있었고, 균체농도당 효소활성(specific activity)을 측정해 보았을 때, 그 차이가 나지 않는 것으로 보아(약 0.05 unit/mL/OD₆₀₀), 0.1%의 methanol 농도로도 충분히 유전자의 발현을 유도시킬 수 있음을 알 수 있다. 또한 최종 선별된 재조합 균주에서 발현된 β -agarase는 *AOX1* promoter와 MFα1 s.s의 조절 하에 안정적으로 배양상동액으로 분비됨을 확인하였고, 세포 내 효소활성은 약 0.02 units/mL로 활성이 거의 없어 모든 유도조건에서 약 98% 이상의 분비효율(secretion efficiency)을 보임을 알 수 있었다.

재조합 β -agarase의 열안정성 조사

균체 외 재조합 β -agarase를 사용하여 열안정성을 조사하였다. 재조합 β -agarase의 열안정성은 45°C에서 4시간 후에도 약 70% 정도로 활성을 유지하며, 50°C에서는 반감기가 약 40분이었다(Fig. 4). *E.coli*에서 발현된 재조합 β -agarase가 45°C, 50°C에서 반감기가 20분 이하임을 감안하면(data not shown), *Pichia*에서 발현된 재조합 β -agarase의 열안정성은 매우 향상되었음을 알 수 있고, 이는 재조합 효소에 발생한 hyper-glycosylation에 기인하는 것으로 판단된다. 실제로 세균의 glucanase와 glucoamylase를 효모에서 발현시켰을 경우 glycosylation에 의한 열안정성 증가가 보고 되어 있다[6, 23].

이상의 결과로 재조합 β -agarase는 *Pichia* 효모균주에서 *AOX1* promoter와 MFα1 분비신호를 이용하여 효율적으로 과발현분비생산되며, 분비 시의 glycosylation에 의해 재조합

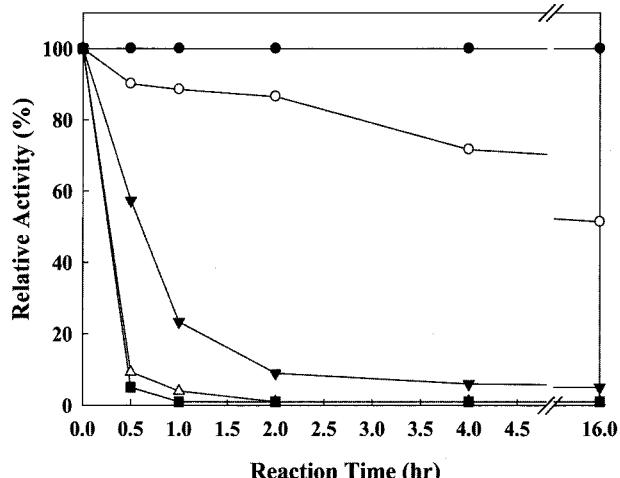


Fig. 4. Thermostability of recombinant β -agarase. After incubating the enzyme in 50 mM TAPS buffer (pH 8.5) at different temperatures [(●), 40°C; (○), 45°C; (▼), 50°C; (△), 55°C; (■), 60°C] for various time intervals, the remaining activity was measured under the standard assay conditions.

단백질의 열안정성도 크게 향상됨을 알 수 있었다.

요약

Agarose의 β -1,4결합을 분해하는 *Zobellia galactanivorans* 유래의 β -agarase 유전자(*agaB*)는 클로닝되었고, *AOX1* (alcohol oxidase 1, methanol inducible) promoter 하류에 *Saccharomyces cerevisiae* mating factor alpha-1 secretion signal(MFα1)를 연결하여 MFα1-AgaB를 구축하였다. 구축된 plasmid pPIC-AgaB(9 kb)를 *Pichia pastoris* genome에 *HIS4* gene 위치에 integration하였고, colony PCR을 통해 확인하였다. Methanol 첨가 배지에서 자란 형질전환체는 iodine solution의 첨가에 의해 red halos를 보였으며, *P. pastoris*에서 *agaB*의 효율적 분비 발현을 확인하였다. SDS-PAGE와 zymographic analysis에서 β -agarase의 분자량은 약 53 kDa으로 추정되었으며, 15% 정도의 N-linked glycosylation이 일어났음을 알 수 있었다. *P. pastoris* GS115/pPIC-AgaB의 48시간 baffled flask culture에서 세포외 β -agarase의 활성은 각각 0.1, 0.5, 1% methanol의 유도에 의해 1.34, 1.42 그리고 1.53 units/mL의 활성을 보였다. 대부분의 β -agarase의 활성은 세포 외에서 관찰되었고, 분비효율은 98%였으며 분비 시의 glycosylation에 의해 열안정성도 증가되었다.

감사의 글

본 연구는 2008학년도 동의대학교 일반연구과제(과제번호; 2008AA195) 지원으로 이루어졌습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Araki, T., M. Hayakawa, Z. Lu, S. Karita, and T. Morishita. 1998. Purification and characterization of agarases from a marine bacterium. *J. Mar. Biotechnol.* **6**: 260-265.
2. 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.
3. Do, J. H. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Korean Fish Soc.* **30**: 423-427.
4. Duckworth, M. and W. Yaphe. 1971. Structure of agar. I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbo. Res.* **16**: 189-197.
5. Fu, X. T., C. H. Pan, H. Lin, and S. M. Kim. 2009. Gene cloning, expression, and characterization of a beta-agarase, agaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 257-264.
6. Han, Y. J., D. O. Kang, S. J. Lee, B. Y. Kim, H. H. Suh, J. M. Kim, T. I. Mheen, and J. S. Ahn. 1994. Secretion of *Bacillus* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* by its own signal sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 24-29.
7. Hatada, Y., Y. Ohta, and K. Horikoshi. 2006. Hyperproduction and application of alpha-agarase to enzymatic enhancement of antioxidant activity of porphyrin. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9895-900.
8. Jahic, M., A. Veide, T. Charoenrat, T. Teeri, and S.O. Enfors, 2006. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Prog.* **22**: 1465-1473.
9. Jam, M., D. Flament, J. Allouch, P. Potin, L. Thion, B. Kloareg, M. Czjzek, W. Helbert, G. Michel, and T. Barbeyron. 2005. The endo- β -agarase AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans* : two parologue enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours. *Biochem. J.* **385**: 703-713.
10. Joo, D. S., O. S. Kim, S. Y. Cho, and C. H. Cho. 2003. Preparation condition of agar oligosaccharide with organic acids. *J. Korean Fish Soc.* **36**: 6-10.
11. Kato, I. 2000. Antioxidative and antitumorigenic properties of agarooligosaccharide. *Bio Industry* **17**: 13-19.
12. Kim, M. J., S. H. Kim, J. H. Lee, J. H. Seo, J. H. Lee, J. H. Kim, Y. H. Kim, and S. W. Nam. 2008. High-level secretory expression of human procarboxypeptidase B by fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* and its partial characterization. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 1938-1944.
13. Kobayashi, R., M. Takisada, T. Suzuki, K. Kirimura, and S. Usami. 1997. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci Biotechnol Biochem.* **61**: 162-163.
14. Kong, J. Y., S. H. Hwang, B. J. Kim, S. K. Bae, and J. D. Kim. 1997. Cloning and expression of an agarase gene from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. w7. *Biotechnol. Lett.* **19**: 23-26.
15. Kwon, M. A., H. S. Kim, T. H. Yang, B. K. Song, and J. K. Song. 2009. High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **68**: 104-109.
16. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **277**: 680-685.
17. Lee, D. G., M. K. Jang, O. H. Lee, N. Y. Kim, S. A. Ju, and S. H. Lee. 2008. Over-production of a glycoside hydrolase family 50 beta-agarase from *Agarivorans* sp. JA-1 in *Bacillus subtilis* and the whitening effect of its product. *Biotechnol. Lett.* **30**: 911-918.
18. 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.
19. Li, P., A. Anumanthan, X. G. Gao, K. Ilangoian, V. V. Suzara, N. Düzunges, and V. Renugopalakrishnan. 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **142**: 105-124.
20. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
21. Ohta, Y., Y. Hatada, M. Miyazaki, Y. Nogi, S. Ito, and K. Horikoshi. 2005. Purification and characterization of a Novel α -agarase from a *Thalassomonas* sp. *Curr. Microbiol.* **50**: 212-216.
22. Scotti, P. A., M. Praestgaard, R. Chambert, and M. R. Perir-Glatron. 1996. The targeting of *Bacillus subtilis* levansucrase in yeast is correlated to both the hydrophobicity of the signal peptide and the net charge of the N-terminus mature part. *Yeast* **12**: 953-963.
23. Solovicova, A., J. Gasperik, and E. Hostinova. 1996. High-yield production of *Saccharomyces fibuligera* glucoamylase in *Escherichia coli*, refolding, and comparison of the nonglycosylated and glycosylated enzyme forms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **224**: 790-795.
24. Yano, J. K., and T. L. Poulos. 2003. New understandings of thermostable and peizostable enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 360-365.
25. Yoshizawa, Y., A. Ametani, J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Itoh, F. Fukui, and S. Kaminogawa. 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 1933-1937.
26. Zhang, W. W. and L. Sun. 2007. Cloning, characterization, and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2825-2831.

(Received Jan. 21, 2010/Accepted Feb. 24, 2010)