Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 30(6): 345-349 (2015)
http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2015.30.6.345 ISSN 1225-7117 / eISSN 2288-8268

단보

저온 유도 시스템을 가진 재조합 대장균을 이용한 남극 세균 *Flavobacterium frigoris* PS1 유래 결빙방지단백질의 Pilot-scale 생산

김은재[1,2], 이준혁[1,2], 이성구[1,2], 한세종[1,2]*

Pilot-scale Production of the Antifreeze Protein from Antarctic Bacterium *Flavobacterium frigoris* PS1 by Recombinant *Escherichia coli* with a Cold Shock Induction System

Eun Jae Kim[1,2], Jun Hyuck Lee[1,2], Sung Gu Lee[1,2], and Se Jong Han[1,2]*

Received: 6 October 2015 / Revised: 23 November 2015 / Accepted: 26 November 2015
© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Antifreeze proteins (AFP) inhibit growth and recrystallization of ice, and permit organisms to survive in cold environments. The AFP from an Antarctic bacterium, *Flavobacterium frigoris* PS1, FfIBP (*Flavobacterium frigoris* ice-binding protein), was produced in *E. coli* using a cold shock induction system. The culture temperature was shifted from 37°C to 15°C and a 20 L culture scale was used. The final weights of dried cell and FfIBP were estimated to be 126 g and 8.4 g, respectively. The thermal hysteresis (TH) activity (1.53°C) of the produced FfIBP was 3.6-fold higher than that of the LeIBP (*Leucosporidium* ice-binding protein) produced in *Picha*. The current study demonstrates that large-scale production of FfIBP was successful and the result could be extended to further application studies using recombinant AFPs.

[1]한국해양과학기술원 부설 극지연구소 극지생명과학연구부 융합생명과학연구실
[1]Department of Polar Bioconvergence Research, Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon 21990, Korea

[2]과학기술연합대학원대학교 극지과학전공
[2]Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Korea
Tel: +82-32-760-5521, Fax: +82-32-760-5509
e-mail: hansj@kopri.re.kr

Keywords: Antarctica, Antifreeze protein, Cold shock induction, *Flavobacterium frigoris*, Pilot scale fermentation

1. INTRODUCTION

영하의 극한 환경에 서식하는 생물은 결빙방지단백질 (AFP; Antifreeze protein) 또는 얼음결합단백질 (IBP; Ice-binding protein)을 생산하여 생존하다 [1,2]. 얼음결정의 성장을 억제하는 특성은 냉동보관, 음식물 보존, 유전자변형 기술, 냉동수술 분야 등에 이용될 수 있어 결빙방지단백질은 학계와 산업계의 관심을 끌고 있다 [3-7]. 자연계로부터 결빙방지단백질을 획득하는 것은 자원이 제한되고 경제성도 낮아 실현하기 어려워 이종발현을 이용하여 생산하는 연구가 진행되고 있다. 본 연구팀은 북극 효모 *Glaciozyma* sp. AY30으로부터 약 25kDa의 결빙방지단백질 LeIBP (*Leucosporidium* ice-binding protein)을 분리하여 특성 및 대량생산 연구를 수행하였다 [8-11]. 또한, 본 연구팀에서는 남극 호냉성 세균 *Flavobacterium frigoris* PS1으로부터 결빙방지단백질 (FfIBP)을 분리하여 LeIBP와 얼음 결합능을 분자 구조적인 관점에서 비교하였고 [12], 재조합 *Pichia pastoris*를 이용하여 유가식 배양을 통해 생산최적화를 수행한 결과 FfIBP는 LeIBP과 유사한 3차원 구조를 가짐에도 불구하고 LeIBP의 0.42°C 보다 두 배정도 높은 0.85°C의 TH 활성을 보였다 [13] .

본 연구에서는 재조합 FfIBP를 저온 유도 발현 시스템을

ATGAAGATATTAAAAAGAATTCCGGTCTTAGCAGTGCTTTTGGTCGGCTTAATGAC
GAATTGTAGCAATGATTCGGATTCAAGCTCTCTATCAGTTGCAAATTCAACTTATGA
GACGACCGCCTTAAATTCACAAAAGTCTTCAACTGACCAACCCAATTCAGGCTCG
AAAAGCGGCCAAACCTTGGATCTAGTAAATCTTGGTGTTGCAGCTAACTTTGCTAT
ACTTTCAAAAACAGGAATAACCGATGTGTATAAATCGGCAATTACAGGTGATGTTG
GTGCAAGTCCAATTACAGGAGCCGCTATTCTTTTAAAATGTGATGAAGTAACTGGT
ACCATATTTTCAGTTGATGCTGCAGGACCTGCTTGCAAAATAACTGATGCTTCACG
TCTAACTACAGCTGTAGGTGACATGCAAATTGCTTATGATAATGCTGCAGGACGAC
TAAACCCAGACTTTTTAAATTTAGGGGCTGGAACTATCGGTGGAAAAACTCTTACA
CCAGGTTTATATAAATGGACAAGTACATTAAACATCCCTACAGATATCACCATTTCA
GGTAGCTCAACTGATGTTTGGATTTTCCAAGTTGCAGGAAACCTGAATATGAGTTC
TGCAGTTAGAATAACTTTAGCCGGAGGTGCACAAGCCAAAAATATTTTCTGGCAA
ACAGCTGGTGCAGTTACGCTAGGATCAACTAGCCATTTTGAAGGAAATATATTAAG
TCAAACTGGTATAAATATGAAAACAGCCGCTTCAATAAACGGAAGAATGATGGCA
CAAACAGCAGTTACACTACAAATGAATACCGTTACCATACCACAATAA

Fig. 1. DNA sequence of FfIBP.

가진 대장균을 통해 대량으로 생산 가능성을 알아보기 위하여 20 L 규모의 발효조를 사용하여 배양하였다. 발현 생산된 재조합 FfIBP는 정제하여 정량하고 TH 활성을 측정하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 균주 및 플라스미드

FfIBP의 이종발현은 플라스미드 벡터 pCold I (Takara Bio Inc., Japan)와 호스트 균주 *E. coli* BL21 (DE3) (Promega, USA)를 이용하여 수행하였다. 플라스미드 벡터 pCold I를 제한효소 *Nde*I과 *Xho* I로 절단한 후에 FfIBP 유전자 (Fig. 1)를 삽입하여 발현 플라스미드를 제작하고 이를 대장균 BL21 (DE3)에 형질전환하였다 [12].

2.2. 배양 및 발효 조건

재조합 대장균의 종배양은 1 L의 Luria-Bertani (LB) 배지 (bactotryptone, 10 g/L; yeast extract, 5 g/L; Sodium chloride, 10 g/L)를 이용하였으며 본 배양은 미량금속원소 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10.0 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2.0 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.25 g/L; $MnSO_4 \cdot 4\text{-}5H_2O$, 0.5 g/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.0 g/L; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 7H_2O$, 0.1 g/L; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0.23 g/L; HCl (35%) 5.0mL/L)가 1% 포함된 변형된 R배지 ($(NH_4)_2HPO_4$, 4.0 g/L; KH_2PO_4, 13.5 g/L; citric acid, 1.7 g/L; bactotryptone, 10.0 g/L; yeast extract, 20.0 g/L; lactose, 20.0 g/L; glycerol, 50.0 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.2 g/L)를 이용하여 수행하였다 [14].

20 L의 배지를 함유한 30-L 발효조 (Kobiotech, Incheon, Korea)에 37°C에서 배양을 하다가 접종 후 약 9시간 후에 세포농도가 약 2.0 g/L일 때 15°C로 낮춘 후 IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 최종농도 0.5 mM로 맞추어 투입하여 FfIBP을 발현을 유도하였다. 거품의 발생을 방지하기 위하여 소포제가 사용되었다. 세포의 성장을 모니터링하기 위하여 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 세포농도와 총단백질의 양을 측정하였다. 발현 유도 약 50시간 후 배양을 종료하였다.

2.3. 분석 방법

세포의 농도는 건조중량 (Dry cell weight, DCW)를 측정하여 표시하였다. 배양액 1 mL를 13,000 rpm에서 원심분리한 후 증류수로 2회 세척한 시료를 60°C에서 120시간 동안 건조하여 질량을 측정하였다. 분광광도계 (Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 OD=1로 조절한 후 1 mL를 원심분리하여 수거한 후 sonication buffer 50 μL를 투입하고 초음파 파쇄하였다. 파쇄된 시료를 이용하여 FfIBP의 발현을 SDS-PAGE로 확인하였고, BSA를 표준시약으로 Bradford 방법을 이용하여 단백질의 농도를 결정하였다. 배양액 내의 FfIBP의 농도는 SDS-PAGE 내 발현된 band가 차지하는 비율을 측정한 후 총 단백질의 농도와 곱하여 계산하였다.

2.4. 결빙방지 단백질의 정제

농도를 OD_{600}=10으로 맞춘 최종 배양액 10 mL를 10분간 8,000×g에서 원심분리하여 균체를 취한 후 sonication buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl) 20 mL를 투입한 후 10분 간 초음파 분쇄하였다. 분쇄된 시료를 원심분리하여 상등액을 취한 후 Protino Ni-NTA agarose로 충전된 컬럼을 NPI-5로 평형화한 후 상등액을 주입하여 FfIBP를 결합시켰다. NPI-30을 agarose resin부피의 10배를 컬럼에 2회 주입하여 agarose resin에 결합하지 않은 단백질을 제거한 후, NPI 250 용액으로 FfIBP 단백질을 용출하였다. 정제된 FfIBP 단백질 용출액을 10-K cut-off Amicon Ultra-15 필터 (Merck Millipore, Germany) 원심분리 농축한 후 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 용액으로 완충액 전환시켰다. 결빙방지 활성은 온도이력 (Thermal hysteresis, TH)을 측정하여 확인하였다. TH

활성은 정제된 용액을 희석하여 1, 2.5, 5, 10 μM 농도에서 Nanoliter Oscometer (Otago Osmometers, Dunedin, New Zealand)를 이용하여 측정하였다 [8].

3. RESUTLS AND DISCUSSION

3.1. 20 L 배양에 의한 결빙방지 단백질의 생산

Pilot 규모에서 재조합 결빙방지 단백질을 생산하기 위하여 30-L 발효조에 변형된 R배지 20 L를 투입하여 37°C에서 재조합 대장균을 배양하였다. 배양 9시간 후 세포농도가 2.25 g/L일 때 배양온도를 15°C로 낮추었고 IPTG를 최종농도 0.5 mM로 맞추어 투입하였다. 발현 유도 후 5-18시간 간격으로 시료를 채취하여 분석한 결과, 성장속도는 발현유도 후에 감소하지만 세포농도는 지속적으로 증가하였다 (Fig. 2(A)). 최종세포농도는 6.3 g/L였고 이때 계산된 FfIBP의 양은 약 0.42 g/L 였다. SDS-PAGE 분석 결과 26 kDa 부근에서 짙은 밴드가 형성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 2(B)).

3.2. TH 활성측정

정제된 FfIBP의 농도 별 TH활성을 측정하였다. TH활성은 FfIBP의 농도에 따라 증가하는 경향을 보였고 10 μM에서 1.53°C였다 (Fig. 3(A)). 재조합 *P. pastoris*에서 생산된 FfIBP의 최대 TH활성이 0.85 인 것에 비해 1.8배 높은 값이다 [13]. 결정화된 FfIBP를 이용하여 측정한 TH 활성의 최대값인 2.5에는 미치지 못하였는데, 이는 완벽하게 정제되지 않은 시료를 사용하여 상대적으로 낮은 농도에서 측정한 때문으로 풀이된다 [12]. 온도를 낮추어 얼음결정을 유도할 때 FfIBP가 첨가된 경우 결정이 제대로 형성되지 않았다 (Fig. 3(B)).

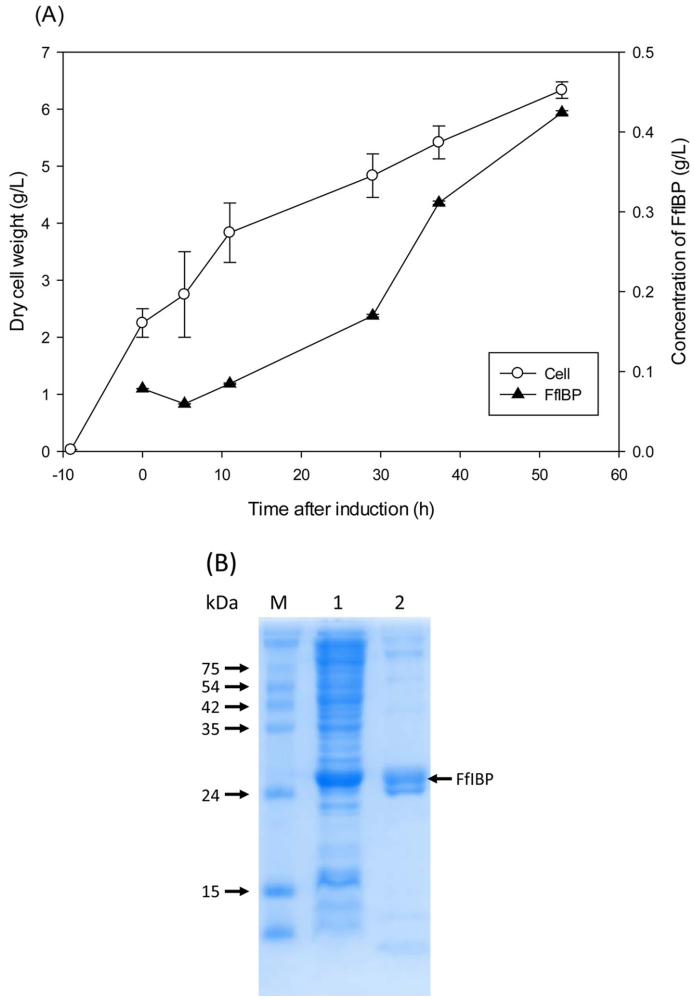

Fig. 2. Pilot-scale production of FfIBP by recombinant *E. coli* with a cold shock induction system. Cells were grown in a 30-L jar fermenter at 37°C for 9 h after inoculation, and then the culture temperature was shifted to 15°C to induce the FfIBP expression. (A) Time profile of cell growth by dry cell weight (open circle) and production of FfIBP (solid triangle) (B) FfIBP expression was visualized using 12% SDS-PAGE and Commassie staining after running the samples obtained from the 30-L fermenter. Lane M, size marker; lane 1, expressed FfIBP before purification; lane2, semi-purified FfIBP.

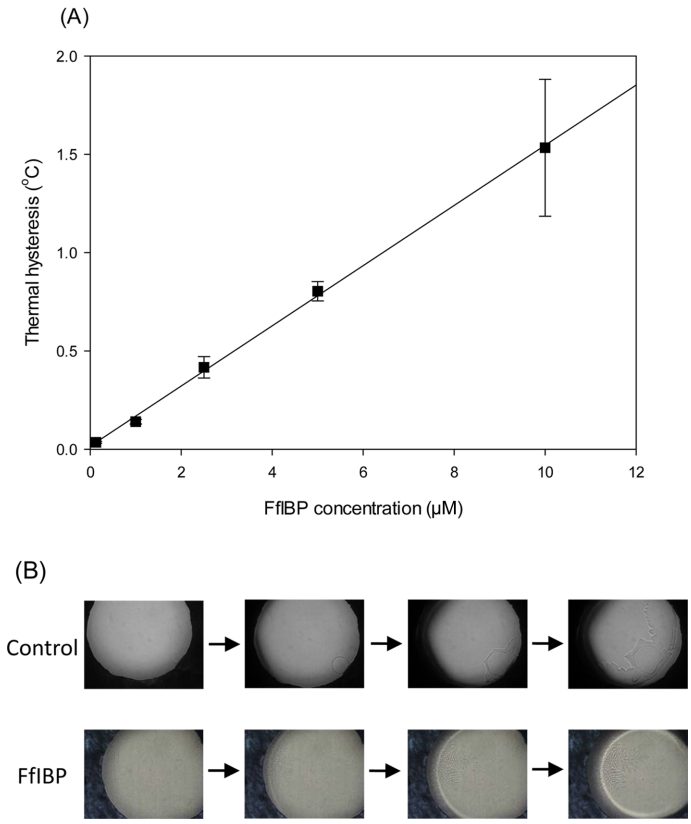

Fig. 3. Demonstration of antifreeze activity of the produced FfIBP. (A) Thermal hysteresis activity of FfIBP (B) Comparison of ice morphology modifications at different conditions: upper case, without FfIBP; lower case, with FfIBP.

4. CONCLUSION

남극 세균 *Flavobacterium frigoris* PS1 유래 결빙방지 단백질 FfIBP를 발현하는 재조합 대장균을 20-L pilot 규모에서 배양하여 15°C 저온 유도하여 생산한 결과 TH활성은 1.53°C로 *P. pastoris*에서 생산된 FfIBP보다 약 2배 높았다. 본 연구를 통해 저온 유도 방법을 통한 재조합 결빙방지단백질의 대량 생산이 가능함을 알 수 있었다.

Acknowledgements

본 연구는 한국해양과학기술원 부설 극지연구소 (계정번호 PE15140)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Jia, Z. and P. L. Davies (2002) Antifreeze proteins: An unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem. Sci.* 27: 101-106.
2. Venketesh, S. and C. Dayananda (2008) Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 57-82.
3. Barrett, J. (2001) Thermal hysteresis proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 105-117.
4. Ben, R. N. (2001) Antifreeze glycoproteins-preventing the growth of ice. *Chembiochem.* 2: 161-166.
5. Bouvet, V. and R. N. Ben (2003) Antifreeze glycoproteins: structure, conformation, and biological applications. *Cell Biochem. Biophys.* 39: 133-144.
6. Fuller, B. J. (2004) Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Lett.* 25: 375-388.
7. Harding, M. M., P. I. Anderberg, and A. D. Haymet (2003) 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish. *Eur. J. Biochem.* 270: 1381-1392.
8. Lee, J. K., K. S. Park, S. Park, H. Park, Y. H. Song, S. H. Kang, and H. J. Kim (2010) An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast. *Cryobiol.* 60: 222-228.
9. Park, K. S., H. Do, J. H. Lee, S. I. Park, E. Kim, S. J. Kim, S. H. Kang and H. J. Kim (2012) Characterization of the ice-binding protein from Arctic yeast *Leucosporidium* sp. AY30. *Cryobiol.* 64: 286-296.
10. Lee, J. H., A. K. Park, H. Do, K. S. Park, S. H. Moh, Y. M. Chi, and H. J. Kim (2012) Structural basis for antifreeze activity of ice-binding protein from arctic yeast. *J. Biol. Chem.* 287: 11460-11468.
11. Lee, J. H., S. G. Lee, H. Do, J. C. Park, E. Kim, Y. H. Choe, S. J. Han, and H. J. Kim (2013) Optimization of the pilot-scale produc-

tion of an ice-binding protein by fed-batch culture of *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 3383-3393.

12. Do, H., J. H. Lee, S. G. Lee, and H. J. Kim (2012) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of an ice-binding protein (FfIBP) from *Flavobacterium frigoris* PS1. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68: 806-809.
13. Kim, E. J., H. Do, J. H. Lee, S. G. Lee, H. J. Kim, and S. J. Han (2014) Production of antifreeze protein from Antarctic bacterium *Flavobacterium frigoris* PS1 by using fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 29: 303-306.
14. Han, S. J., S. Cho, K. Lowehhaupt, S. Y. Park, S. J. Sim and Y. G. Kim (2013) Recombinant tagging system using ribosomal frameshifting to monitor protein expression. *Biotechnol. Bioeng.* 110: 898-904.