

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 *Pichia*. 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.

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

¹한국해양과학기술원 부설 극지연구소 극지생명과학연구부 융합생명과학연구소

²Department of Polar Bioconvergence Research, Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon 21990, Korea

³과학기술연합대학원대학교 극지과학전공

³Department 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

```

ATGAAGATATTA AAAAGAATTCCGGTCTTAGCAGTGCTTTTGGTCGGCTTAATGAC
GAATTGTAGCAATGATTCCGATTCAAGCTCTCTATCAGTTGCAAATTC AACTTATGA
GACGACCGCCTTAAATTCACAAAAGTCTTCAACTGACCAACCCAATTCAGGCTCG
AAAAGCGGCCAAACCTTGGATCTAGTAAATCTTGGTGTTCAGCTAACTTTGCTAT
ACTTTCAAAAACAGGAATAACCGATGTGTATAAATCGGCAATTACAGGTGATGTTG
GTGCAAGTCCAATTACAGGAGCCGCTATTCTTTTAAAATGTGATGAAGTAACTGGT
ACCATATTTTCAGTTGATGCTGCAGGACCTGCTTGCAAAAATAACTGATGCTTCACG
TCTAACTACAGCTGTAGGTGACATGCAAATTGCTTATGATAATGCTGCAGGACGAC
TAAACCCAGACTTTTTAAATTTAGGGGCTGGA ACTATCGGTGGAAAACTCTTACA
CCAGGTTTATATAAATGGACAAGTACATTA AACATCCCTACAGATATCACCATTTCA
GGTAGCTCAACTGATGTTTGGATTTTCCAAGTTCAGGAAACCTGAATATGAGTTC
TGCAGTTAGAATAACTTTAGCCGGAGGTGCACAAGCCAAAAATATTTTCTGGCAA
ACAGCTGGTGCAGTTACGCTAGGATCAACTAGCCATTTTGAAGGAAATATATTAAG
TCAA ACTGGTATAAATATGAAAACAGCCGCTTCAATAAACGGAAGAATGATGGCA
CAAACAGCAGTTACTACTACAAATGAATACCGTTACCATACCACAATAA

```

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 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.0 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.25 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{-}5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.23 g/L; HCl (35%) 5.0mL/L)가 1% 포함된 변형된 R배지 ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 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; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 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 모니터링하

기 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 μ L를 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 OD₆₀₀=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 μ M 농도에서 Nanoliter Osmometer (Otago Osmometers, Dunedin, New Zealand)를 이용하여 측정하였다 [8].

3. RESULTLS 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)). 최

중세포농도는 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 μ M에서 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 측정된 TH 활성의 최대값인 2.5에는 미치지 못하였는데, 이는 완벽하게 정제되지 않은 시료를 사용하여 상대적으로 낮은 농도에서 측정했기 때문으로 풀이된다 [12]. 온도를 낮추어 얼음결정을 유도할 때 FfIBP가 첨가된 경우 결정이 제대로 형성되지 않았다 (Fig. 3(B)).

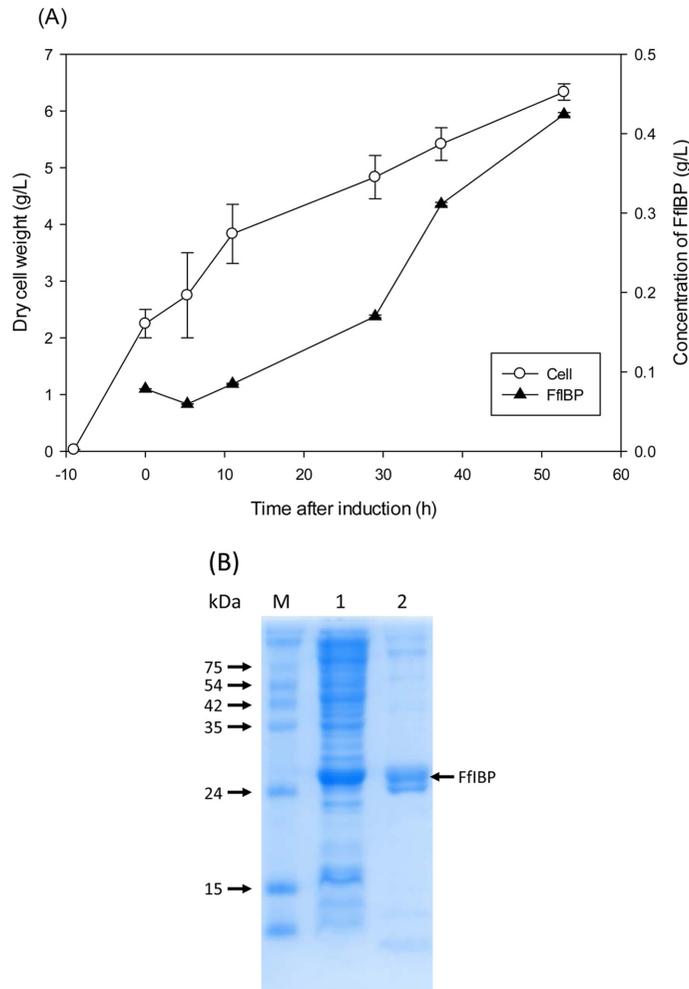


Fig. 2. Pilot-scale production of FfIBP by recombinant *E. coli* with a cold shock induction system. Cells were grown in a 30-L jar fermenter at 37°C for 9 h after inoculation, and then the culture temperature was shifted to 15°C to induce the FfIBP expression. (A) Time profile of cell growth by dry 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; lane 2, semi-purified FfIBP.

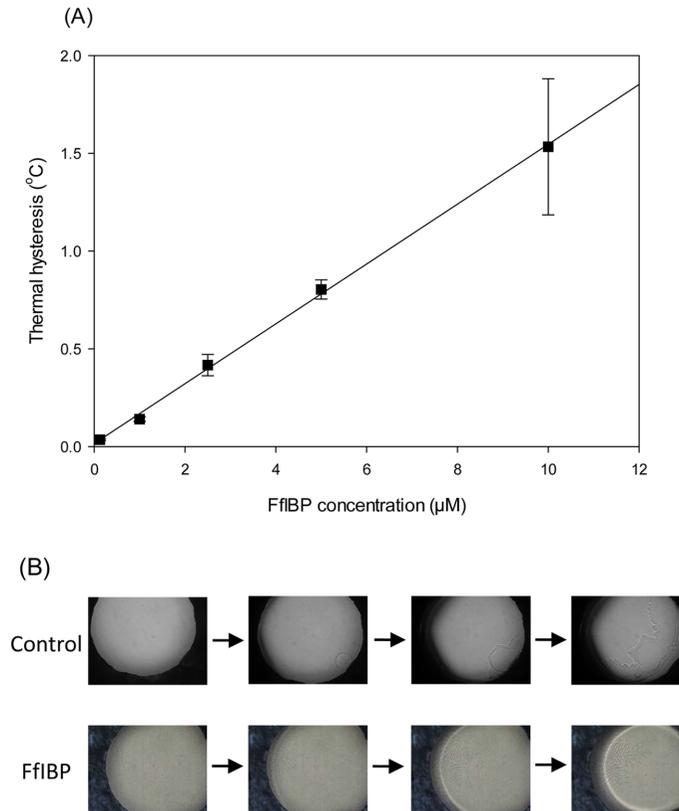


Fig. 3. Demonstration of antifreeze activity of the produced FfIBP. (A) Thermal hysteresis activity of FfIBP (B) Comparison of ice morphology modifications at different conditions: upper case, without FfIBP; lower case, with FfIBP.

4. CONCLUSION

남극 세균 *Flavobacterium frigidis* 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

- Jia, Z. and P. L. Davies (2002) Antifreeze proteins: An unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem. Sci.* 27: 101-106.
- Venketesh, S. and C. Dayananda (2008) Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 57-82.
- Barrett, J. (2001) Thermal hysteresis proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 105-117.
- Ben, R. N. (2001) Antifreeze glycoproteins-preventing the growth of ice. *Chembiochem.* 2: 161-166.
- Bouvet, V. and R. N. Ben (2003) Antifreeze glycoproteins: structure, conformation, and biological applications. *Cell Biochem. Biophys.* 39: 133-144.
- Fuller, B. J. (2004) Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Lett.* 25: 375-388.
- Harding, M. M., P. I. Anderberg, and A. D. Haymet (2003) 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish. *Eur. J. Biochem.* 270: 1381-1392.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. Lowehaupt, S. Y. Park, S. J. Sim and Y. G. Kim (2013) Recombinant tagging system using ribosomal frame-shifting to monitor protein expression. *Biotechnol. Bioeng.* 110: 898-904.