Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 32(4): 300-305 (2017)
http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2017.32.4.300 ISSN 1225-7117 / eISSN 2288-8268

Research Paper

대장균을 이용한 북극 효모 *Glaciozyma* sp. 유래 재조합 결빙방지단백질 LeIBP의 Pilot-scale 생산

김은재[1,2], 이준혁[2,3], 이성구[2,3], 한세종[1,2]*

Pilot-scale Production of Recombinant LeIBP from Arctic Yeast *Glaciozyma* sp. by *Escherichia coli*

Eun Jae Kim[1,2], Jun Hyuck Lee[2,3], Sung Gu Lee[2,3], and Se Jong Han[1,2]*

Received: 27 October 2017 / Revised: 27 November 2017 / Accepted: 28 November 2017
© 2017 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs) have a unique feature to bind to ice nuclei, and are referred to ice-binding protein (IBP). The AFP, expressed in the cells of some polar organisms, controls cell damage in subzero temperature environments by inhibiting the ice growth and recrystallization. In this study, recombinant LeIBP (*Leucosporidium* ice-binding protein) from the arctic yeast *Glaciozyma* sp. (former known as *Leucosporidium* sp.) was produced in *E. coli* using a cold shock induction system. The final cell density and concentration of the purified LeIBP were measured to be 8.2 g/L and 1.1 g/L, respectively. The thermal hysteresis (TH) activity of LeIBP was 0.39±0.02°C at 13.25 mg/mL, which means that the scale-up was successfully performed for the production of recombinant LeIBP in heterologous bacterial expression system.

Keywords: arctic, antifreeze protein, LeIBP, *Glaciozyma* sp., pilot scale fermentation

[1]한국해양과학기술원 부설 극지연구소 극지생명과학연구부
[1]Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon 21990, Korea
Tel: +82-32-760-5521, Fax: +82-32-760-5509
e-mail: hansj@kopri.re.kr

[2]과학기술연합대학원대학교 극지과학전공
[2]Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Korea

[3]한국해양과학기술원 부설 극지연구소 유전체사업단
[3]Unit of Polar Genomics, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon 21990, Korea

1. INTRODUCTION

결빙방지단백질 (AFP; antifreeze protein) 또는 얼음결합단백질 (IBP; ice-binding protein)은 얼음에 친화성을 갖는 단백질로 정의할 수 있다 [1]. 극한의 지역에서 서식하는 어류, 식물, 곰팡이, 세균 등이 생성하는 단백질로 초저온의 환경에서 생존하게 한다. 이 단백질은 영하의 온도에서 세포내 얼음 결정의 성장과 재결정화 작용을 억제하여 세포의 손상을 막는다 [2]. 이러한 단백질 특성을 이용하면 생물자원의 냉동 보존, 의료용 생체 조직의 동결 보존, 식품 보존제, 피부보호제로 활용할 수 있다 [3]. 이러한 산업적 활용을 위해서는 결빙방지단백질의 이종 발현에 대한 연구와 대량 배양을 통한 단백질의 생산기술연구를 필요로 한다. 본 연구팀은 북극 효모 *Glaciozyma* sp. AY30으로부터 결빙방지단백질 LeIBP (*Leucosporidium* ice-binding protein)을 분리하였고, 이종 발현을 통해 생성된 단백질의 특성 및 대량생산 연구를 수행하였다 [4-7]. LeIBP생산을 위해 재조합 *Pichia pastoris*를 이용하여 300-L 규모의 배양을 수행하였고, 온도이력 (Thermal Hysteresis; TH) 활성이 0.42°C인 LeIBP를 0.3 g/L를 생산하였다 [7]. 또한 남극세균 *Flavobacterium frigoris*에서 유래된 FfIBP를 발현하는 재조합 대장균을 20 L 배양하여, TH 활성이 1.53°C인 FfIBP를 0.42 g/L를 생산하였다 [8]. 이번 연구에서 결빙방지단백질 LeIBP의 파일럿규모의 생산을 위해 재조합 대장균에 발현 유전자를 삽입하였고 modified R배지에서 배양하였다. 7-L 발효조를 이용하여 IPTG 농도별 단백질 생산량 비교 실험을 하였고, 이를 기반으로 파일럿규모의 30-L 발효조를 이용하여 결빙방지단백질 LeIBP를 생산하였다. 발현

된 단백질은 정제하여 정량하고, TH 활성을 측정하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 플라스미드 및 생산 균주

재조합 대장균에서 발현을 위해 LeIBP를 인코딩하는 유전자를 *Glaciozyma* sp. AY30 (이전의 속명 *Leucosporidium* sp.)에서 얻었고, forward primer 5′-**CATATG**CAGCGCGACCTCTTCGT-3′와 reverse primer 3′-**CTCGAG**TTAAAGCCACTGGCGGGC-5′ (제한효소사이트 Nde I와 Xho I를 굵은 글자로 표시)를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. LeIBP 유전자를 발현 벡터인 pCold I (Takara Bio Inc., Japan)을 제한 효소 Nde I과 Xho I로 절단한 후, 삽입하여 플라스미드를 구축하고 생산 균주 *E. coli* BL21 (DE3) (Promega, USA)에 형질전환시켰다 [6].

2.2. 배양 조건

재조합 대장균은 Luria-Bertani (LB) 배지 (리터당: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl 함유)를 사용하여 37°C에서 종배양하였다. 본배양은 멸균 전 pH 7로 맞춘 modified 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; 미량금속원소 5.0 mL/L)를 이용하여 수행하였다 [9]. 이 때 미량금속원소는 리터 당 $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ 10.0 g, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 2.0 g, $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ 2.25 g, $MnSO_4{\cdot}4\text{-}5H_2O$ 0.5 g, $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 1.0 g, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}7H_2O$ 0.1 g, $Na_2B_4O_7{\cdot}10H_2O$ 0.23 g, HCl (35 %) 5.0 mL가 포함되도록 제조하였다. IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Elpis Biotech, Korea) 투입 농도 별 단백질 생산량을 비교하기 위해, 7-L 발효조 (Kobiotech, Incheon, Korea)를 사용하였다. 배양 시 산소공급을 위해 공기를 5 L/min로 투입하였다. 세포 농도가 OD_{600} 값으로 10±1일 때 0.1 mM 또는 1.0 mM 되도록 IPTG를 투입하고, 배양 온도를 37°C에서 15°C로 낮추어서 발현 유도를 하였다. 파일럿규모의 배양을 위해 30-L 발효조 (Kobiotech, Korea)에서 20 L의 modified R배지를 사용하였고, 종배양은 LB배지 0.4 L를 사용하였다. 배양액에 산소공급을 위해 공기를 25 L/min로 투입하였다. 발현 유도를 위해 OD_{600} 값이 7의 세포 농도를 보일 때 IPTG를 투입하고, 배양 온도를 15°C로 낮추었다. 배양온도를 낮추기 위해 저온순환수조 (Refrigerated Bath Circulator, JSRC-30C, JS research Inc., Korea)를 이용해 발효기 외측 항온수조 (Cooling Jacket)로 냉수를 공급하여 온도를 낮추었다 [8].

2.3. 분석방법

재조합 대장균의 성장률을 측정하기 위해, 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 광학밀도 (optical density, OD)와 세포건조중량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 분광광도계 (Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 600 nm에서 적절하게 희석된 배양액의 농도를 측정하였다. 세포건조중량은 배양액 1 mL를 13,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후 증류수로 2회 세척하고 60°C에서 120시간 동안 건조하여 질량을 측정하여 구했다. 단백질의 발현을 확인하기 위해 일정 간격으로 채취한 시료를 OD_{600}=1로 세포 농도를 맞춘 1 mL의 배양액을 원심분리하여 배지를 제거하고 세포만 수득하였다. 50 μL의 lysis buffer (NPI-5; 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole) 로 현탁하고 15 μL를 수득하여 5분간 끓인 후 12% polyacrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis) 분석하였다. 총 단백질 생산량을 측정하기 위해 OD_{600}=1로 세포 농도를 맞춘 1 mL의 배양액에서 세포만 수득하고 lysis buffer로 현탁한 후 초음파 분쇄기 (VCX750, Sonics, USA)로 세포를 4°C에서 pulse 35 %, 20±1 Watts, pulse on/off = 1초/ 5초의 조건으로 10분간 초음파 파쇄하여 Bradford법을 이용하여 단백질농도를 측정하였다 [10].

2.4. 결빙방지단백질의 정제

LeIBP의 정제는 배양액을 원심분리한 후 lysis buffer로 현탁하고 초음파 분쇄기로 파쇄하여 수행되었다. 분쇄된 시료를 원심 분리하여 상등액만 취한 후 Protino Ni-NTA agarose (Macherey-Nagel, Germany)로 충전된 컬럼을 NPI-5 (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole)로 평형화한 후 상등액을 주입하여 LeIBP를 결합시켰다. NPI-30 (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole)을 이용하여 결합되지 않는 단백질을 제거한 후, NPI-250 (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) 용액으로 Ni-NTA agarose와 결합된 LeIBP 단백질을 용출하였다. 정제된 LeIBP 단백질 용출액을 10-K cut-off Amicon Ultra-15 필터 (Merck Millipore, Germany)를 이용하여 농축한 후 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 용액으로 완충액 전환시켰다 [11]. 결빙방지단백질의 활성은 TH를 측정하여 확인하였다. TH활성은 정제된 용액을 희석하여 Nanoliter Osmometer (Otago Osmometers, Dunedin, New Zealand)를 이용하여 측정하였다 [4]. 정제된 LeIBP를 각각 0.27, 0.66, 1.33, 2.65, 13.25 mg/mL의 농도로 희석하여 TH 활성을 3반복 측정하였다. TH활성을 알아보기 위해 Nanoliter Osmometer에 사용되는 원형 플레이트 (7 mm × 7 mm × 0.75 mm)의 미세공 (직경 0.35 mm)에 LeIBP를 농도별로 1.5 μL씩 점적하고 영하로 온도를 낮추어 단일의 얼음핵을 만든 후 온도를 0.02°C/min 속도로 조절하여 녹는점과 어는점을 측정하고 온도차이를 기록함으로써 TH활성을 측정하였다 [12].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 발현 유도를 위한 IPTG 0.1 mM과 1 mM 처리시 단백질의 생산

결빙방지단백질 LeIBP를 생산하기 위해 IPTG 농도가 0.1 mM

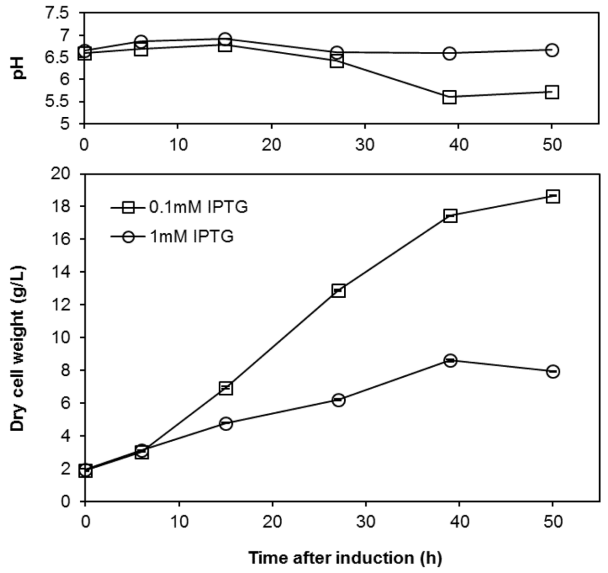

Fig. 1. Time course of cell growth by dry cell weight. Cells were grown in a 7-L jar fermenter and expression of LeIBP was induced by addition of IPTG (0.1 or 1.0 mM).

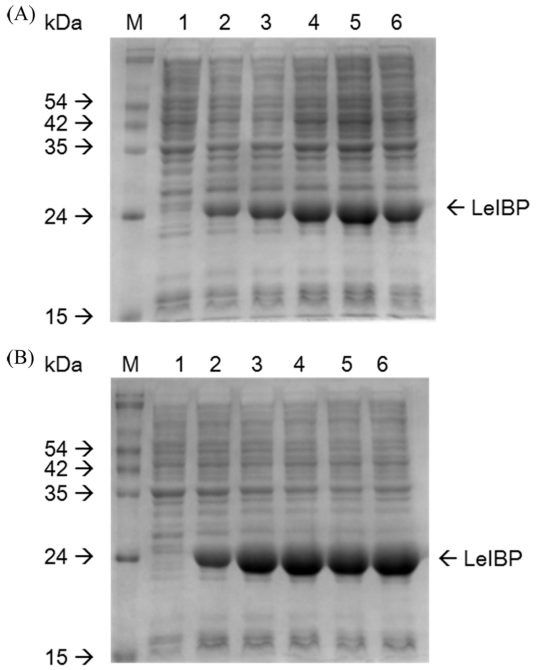

Fig. 2. Expression of LeIBP by recombinant *E. coli* BL21 (DE3) at different IPTG concentrations. The expression of LeIBP was visualized using 12% SDS-PAGE by running the pellets obtained from the culture of 7-L fermenter. (A) IPTG 0.1mM treatment. (B) IPTG 1mM treatment. Lane M, size marker; lane 1, 0 h of induction; lane 2, 6 h of induction; lane 3, 15 h of induction; lane 4, 27 h of induction; lane 5, 39 h of induction; lane 6, 50 h of induction.

또는 1 mM이 되도록 각각 투입하여 재조합 대장균의 생장률과 단백질 생산량을 비교하였다. Park et al. (2012)에 따르면 LeIBP 단백질 발현을 위해 IPTG를 1 mM 농도로 사용하였고, Jung et al. (2014)에 의해 연구된 결빙방지단백질 pgAFP와 Do et al. (2014)에 연구된 FfIBP는 발현을 위해 각각 1 mM의 농도로 IPTG를 사용하였다 [5,10,13]. Larentis et al. (2014)의 LigB 생산 연구에 따르면, IPTG 농도를 0.1mM, 1mM로 처리했을 때, 4시간후 세포 농도 (DCW)는 각각 1.6 g/L과 1.3 g/L이었고, LigB 단백질의 생산량은 각각 288 mg/L와 221 mg/L이었다 [14]. Jones et al. (2016)의 연구에 따르면 eriodictyol 생산하는 공정을 위해 IPTG 농도를 0.1 mM, 1 mM로 각각 처리하였고, 6시간후 0.1 mM로 처리했을 때 약 1.6배 높은 생산성을 나타냈다 [15]. 이를 통해 IPTG 농도를 0.1 mM로 처리하여 결빙방지단백질 LeIBP의 생산량을 측정하였고, 1 mM로 처리하는 경우와 비교하였다. 재조합 대장균의 세포 농도를 리터당 세포건조중량으로 구한 결과 IPTG 0.1 mM로 처리하였을 때 발현 유도 후 50시간에 리터당 18.7 g의 세포 농도에 도달하였다. IPTG 1 mM로 처리한 배양액의 세포 농도보다 2.4배 높은 값을 보였다 (Fig. 1). 높은 IPTG 농도가 세포 생장을 저해하는 것으로 해석된다 [16]. 각 시간별 시료를 채취하여 OD_{600}=1로 세포 농도를 맞춘 1 ml의 배양액을 원심분리하여 SDS-PAGE를 수행한 결과 두 경우 모두 발현 유도 6시간 후부터 24 kDa 부근에 LeIBP가 형성되는 것을 확인하였고 IPTG 1 mM로 처리한 단백질의 밴드가 IPTG 0.1 mM로 처리한 것보다 진한 형상을 보였다 (Fig. 2). 이는 IPTG를 1 mM 농도로 처리했을 때에 IPTG 0.1 mM 처리구보다 단위 세포당 단백질의 발현량 (LeIBP/cell)이 높음을 보여준다. 단백질 생산량을 비교하기 위해 각각의 최종 시료를 정제하였고,

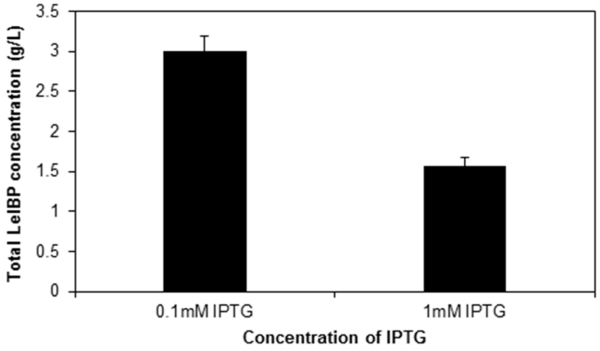

Fig. 3. Effect of IPTG concentration on the production of LeIBP. LeIBP was purified using a sample at 50 h after induction and the final concentration was determined by multiplying the OD_{600} value.

Bradford법으로 농도를 결정하였다. 각 배양액의 단위부피에 따라 단백질의 생산량을 나타내었을 때, 0.1 mM의 IPTG로 처리하였을 경우 LeIBP의 단백질 생산량은 리터당 3.0 g이었고, 1 mM의 IPTG로 처리하였을 경우 단백질 생산량은 리터당 1.6 g을 나타내었다 (Fig. 3). Fig. 2의 SDS-PAGE 상에서 IPTG 0.1 mM로 처리했을 경우 단위 세포당 단백질 생산량 (g LeIBP / g cell)은 낮았지만 Fig. 1의 배양 부피당 세포 농도 (g DCW / L)는 더 높기 때문에 단위 부피당 단백질 생산량 (g

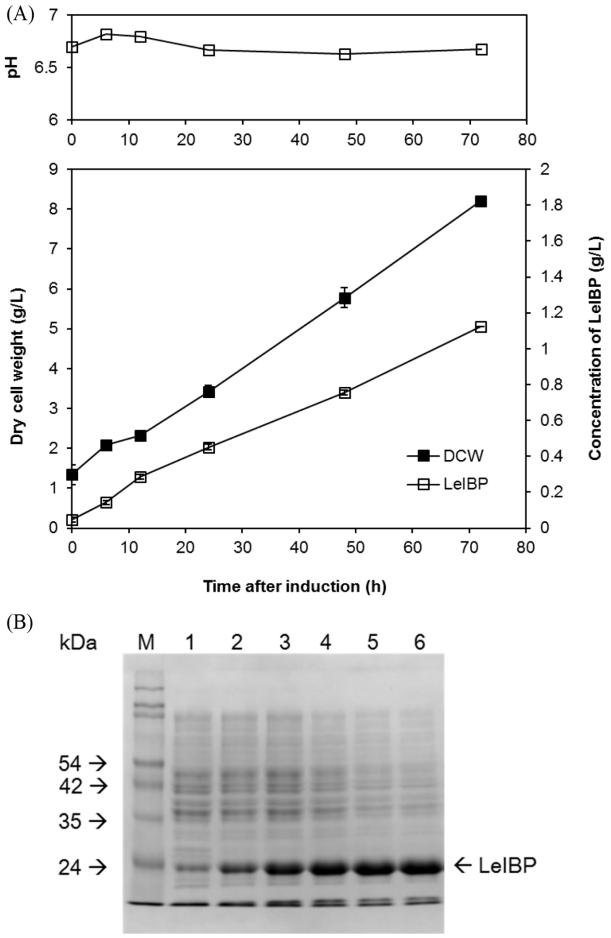

Fig. 4. (A) Time course of cell growth (■) and LeIBP concentration (□) using a 30-L scale fermenter. Recombinant *E. coli* producing LeIBP was grown at 37°C for 14h after inoculation, and then the culture temperature was changed to 15°C with 0.1 mM IPTG addition to induce the protein expression. (B) Expression of LeIBP was visualized using SDS-PAGE; Lane M, size marker; lane 1, 0 h of induction; lane 2, 6 h of induction; lane 3, 12 h of induction; lane 4, 24 h of induction; lane 5, 48 h of induction; lane 6, 72 h of induction.

LeIBP / L)으로 환산 시 IPTG 1 mM로 처리했을 때보다 0.1 mM로 처리했을 경우에 총 단백질 생산량이 더 높은 것으로 분석되었다 (Fig. 3). 이는 Larentis et al. (2014)와 Jones et al. (2016)에 의해 연구된 IPTG 0.1 mM로 처리할 경우 1 mM로 처리할 때보다 세포 농도와 단백질 생산량이 증가하는 결과와 일치한다 [14,15]. 이러한 결과는 결빙방지단백질 LeIBP를 생산할 때 IPTG의 처리 농도를 1 mM이 아닌 0.1 mM로 처리하는 것이 IPTG의 사용량을 줄이면서 동시에 단백질의 생산량을 증대시킬 수 있음을 의미한다 [15]. 단위 세포당 발현량은 1 mM의 IPTG를 처리한 경우가 높지만 단위 부피당 생산량은 0.1 mM의 IPTG를 처리한 경우가 높기 때문이 파일럿 규모의 실험에서는 0.1 mM의 IPTG를 투입하였다.

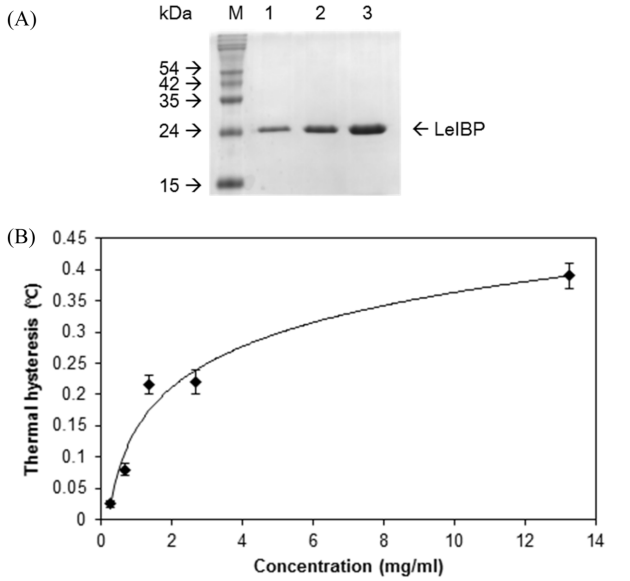

Fig. 5. (A) Purification of LeIBP obtained from 30-L jar fermenter. LeIBP was purified using a sample at 72 h after induction. The purified LeIBP was visualized using SDS-PAGE; lane M, size marker; lane 1, 0.07 mg/mL; lane 2, 0.13 mg/mL; lane 3, 0.27 mg/mL. (B) Thermal hysteresis activity of LeIBP. The LeIBP concentrations are 0.27, 0.66, 1.33, 2.65, and 13.25 mg/mL. Measurements of TH activity were carried out in triplicate.

3.2. 20 L 배양에 의한 결빙방지단백질의 생산

20 L의 modified R배지에서 재조합 대장균의 세포 농도는 발현 유도 후 72시간에 리터당 세포건조중량 8.2 g을 나타내었다 (Fig. 4A). 각 시간 별 시료를 채취하여 OD_{600}=1로 세포 농도를 맞춘 1 mL의 배양액을 원심분리하여 세포내 발현된 총 단백질량을 Bradford법으로 측정하였고, SDS-PAGE를 수행하여 LeIBP의 발현을 확인하였다 (Fig. 4B). 발현 유도 후 72시간된 배양액으로부터 재조합 대장균을 분리하여 초음파분쇄기로 세포를 파쇄한 후 Ni-NTA agarose 컬럼을 이용하여 정제된 LeIBP의 단백질 농도는 리터당 1.1 g으로 나타났다 (Fig. 4A). Park et al. (2012)에 의한 연구에 따르면, LeIBP를 생산하기 위해 1리터의 LB배지에서 재조합 대장균 BL21 (DE3)을 배양하였고, pCold I 시스템에서 1 mM의 IPTG유도를 통해 얻은 정제된 LeIBP의 단백질 농도는 리터당 24.5 mg 이었다 [5]. 또한 LeIBP의 대량생산을 위해 300-L 규모로 배양한 Lee et al. (2012)의 연구에 따르면, 발현을 위해 *Pichia pastoris*를 사용하였고, pPICZαA 시스템에서 메탄올의 유가식 배양을 통해 정제된 LeIBP의 농도는 리터당 0.3 g으로 보고하였다 [7]. 다른 결빙방지단백질의 경우, Kim et al. (2015)에 의해 연구된 FfIBP는 재조합대장균에서 pCold I 시스템을 사용하여 30-L 규모로 생산되었고 정제된 FfIBP를 리터당 0.42 g 수득하였다. 또한 *Pichia pastoris*에서 pPICZαA 시스템을 사용하여 7-L 규모로 배양했을 때 정제된 FfIBP는 리터당 75 mg로 보고하였다 [8,11]. 본 연구에서 재조합대장균을 이

용하여 30-L 규모로 생산하여 정제된 LeIBP는 리터당 1.1 g을 나타냈지만, 산소나 영양성분의 혼합, pH, IPTG 적정 농도 등의 배양 조건이 최적화가 된다면 단백질 생산이 더 증대될 것으로 예상되어 향후 이에 대한 환경적 요인들을 보정하는 연구가 필요하다 [17].

3.3. TH 활성 측정

일반적으로 영하의 온도에 노출된 생물은 세포 내 얼음결정화 작용으로 얼음이 성장해 세포가 손상을 입지만 극지생물은 체내 또는 체외에 발현한 결빙방지단백질이 초기에 생성된 얼음핵의 성장을 억제하여 세포손상을 막는다. 결빙방지단백질은 얼음결정에 결합하여 얼음결정의 크기와 모양, 발달방향 등에 영향을 미치며 특정한 농도에서 용액의 어는 점의 온도를 낮추는 온도이력현상을 나타낸다. 이러한 단백질의 성질을 이용하여 결빙방지단백질의 활성을 측정 할 수 있다 [18]. 정제된 LeIBP를 농도별로 희석하여 TH활성을 측정하였다. 단백질 농도가 증가될수록 TH활성이 증가되었고 13.25 mg/mL의 농도에서 TH값은 0.39±0.02°C로 나타났다. 기존에 보고된 재조합 대장균에서 생산된 LeIBP의 최대 활성인 0.43°C 및 *P. pastoris*에서 300-L 규모로 배양되어 발현된 LeIBP의 최대 활성인 0.42°C와 거의 유사한 값을 나타내었다 (Fig. 5) [5,7].

4. CONCLUSION

결빙방지단백질은 얼음 결정의 초기 성장을 억제하여 어는 점을 낮추는 활성이 있어 영하의 온도에서 생성되는 얼음으로부터 살아있는 세포조직이나 생화학적 조직의 물리적 손상을 줄이거나 억제할 수 있기 때문에 이를 산업적으로 활용하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 이번 연구에서 북극 효모 *Glaciozyma* sp. 유래 결빙방지단백질 LeIBP를 재조합 대장균 BL21(DE3) 균주를 이용하여, 7-L와 30-L 규모로 배양해 단백질을 생산하였다. 단백질 발현유도를 위해 IPTG를 각각 0.1 mM과 1 mM의 농도로 처리하였고, 1 mM의 농도로 처리했을 때보다 0.1 mM로 처리했을 때 높은 세포 농도와 1.9배 증가된 LeIBP 생산성을 보였다. 30-L 파일럿규모에서 modified R배지를 사용하여 IPTG 0.1 mM 농도와 15°C 저온유도하여 생산한 결과 TH활성은 0.39°C, 단백질생산성은 1.1 g/L로 나타났다. 본 연구 결과를 재조합 결빙방지단백질 LeIBP의 대량생산을 위한 자료로 활용하면 향후 발현 시스템 및 배양 조건 등 환경적 요인들의 최적화를 통한 생산성 증대가 가능할 것으로 기대된다.

Acknowledgements

본 연구는 한국해양과학기술원 부설 극지연구소 (계정번호 PE17100)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Jia, Z. and P. L. Davies (2002) Antifreeze proteins: An unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem. Sci.* 27: 101-106.
2. Ben, R. N. (2001) Antifreeze glycoproteins-preventing the growth of ice. *Chembiochem.* 2: 161-166.
3. Venketesh, S. and C. Dayananda (2008) Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 57-82.
4. 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.
5. Park, K. S., H. Do, J. H. Lee, S. I. Park, E. J. 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.
6. 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.
7. 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 production of an ice-binding protein by fed-batch culture of *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 3383-3393.
8. Kim, E. J., J. H. Lee, S. G. Lee, and S. J. Han (2015) Pilot-scale production of the antifreeze protein from antarctic bacterium *Flavobacterium frigoris* PS1 by recombinant *Escherichia coli* with a cold shock induction system. *KSBB J.* 30: 345-349.
9. 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.
10. 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.
11. Kim, E. J., J. H. Lee, S. G. Lee, and S. J. Han (2017) Improving thermal hysteresis activity of antifreeze protein from recombinant *Pichia pastoris* by removal of N-glycosylation. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 47: 299-304.
12. Chakrabartty, A. and C. L. Hew (1991) The effect of enhanced α-helicity on the activity of a winter flounder antifreeze polypeptide. *Eur. J. Biochem.* 202: 1057-1063.
13. Jung, W., Y. Gwak, P. L. Davies, J. J. Kim, and E. Jin (2014) Isolation and characterization of antifreeze proteins from the antarctic marine microalga *Pyramimonas gelidicola*. *Mar. Biotechnol.* 16: 502-512.
14. Larentis, A. L., J. F. Nicolau, G. S. Esteves, D. T. Vareschini, F. V. de Almeida, M. G. dos Reis, R. Galler, and M A. Medeiros (2014) Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Res. Notes*. 7: 671.
15. Jones, J. A., S. M. Collins, V. R. Vernacchio, D. M. Lachance, and M. A. Koffas (2016) Optimization of naringenin and p-coumaric acid hydroxylation using the native *E. coli* hydroxylase complex, HpaBC. *Biotechnol. Prog.* 32: 21-25.

16. Malakar, P. and K. V. Venkatesh (2012) Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 2543-2549.
17. Ruffoni, B., L. Pistelli, A. Bertoli, and L. Pistelli (2010) Plant cell cultures: Bioreactors for industrial production. *Adv. Exp. Med. Biol.* 698: 203-221.
18. Griffith, M. and K. V. Ewart (1995) Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnol. Adv.* 13: 375-402.