

재조합 *Pichia pastoris*의 유가식 배양을 통한 남극세균 *Flavobacterium frigidum* PS1 유래 결빙방지단백질의 생산

김은재^{1,2}, 도학원^{1,2}, 이준혁^{1,2}, 이성구^{1,2}, 김학준³, 한세종^{1,2*}

Production of Antifreeze Protein from Antarctic Bacterium *Flavobacterium frigidum* PS1 by using Fed-batch Culture of Recombinant *Pichia pastoris*

Eun Jae Kim^{1,2}, Hackwon Do^{1,2}, Jun Hyuck Lee^{1,2}, Sung Gu Lee^{1,2}, Hak Jun Kim³, and Se Jong Han^{1,2*}

접수: 2014년 7월 4일 / 게재승인: 2014년 7월 31일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Antifreeze proteins (AFP) inhibit ice growth to permit the survival of polar organisms in the cold environments. The recombinant AFP from an Antarctic bacterium, *Flavobacterium frigidum* PS1, FfIBP (*Flavobacterium frigidum* ice-binding protein), was produced using *Pichia pastoris* expression system. The optimum fermentation temperature (30°C) and pH (5) for FfIBP production were determined using a fed-batch culture system. The maximal cell density and purified FfIBP were 112 g/L and 70 mg/L, respectively. The thermal hysteresis (TH) activity (0.85) of FfIBP obtained using a glycerol-methanol fed-batch culture system was 2-fold higher than that of the LeIBP (*Leucosporidium* ice-binding protein). This work allows for large-scale production of FfIBP, which could be extended to further application studies using recombinant AFPs.

Keywords: Antarctica, Antifreeze protein, *Flavobacterium frigidum*, Ice-binding protein, Fed-batch fermentation

1. INTRODUCTION

극지 생물은 결빙방지단백질 (AFP; Antifreeze protein) 또는 얼음결합단백질 (IBP; Ice-binding protein)을 생산하여 얼음 결정의 성장을 억제함으로써 극한의 환경에 적응하여 서식한다 [1]. 결빙방지단백질은 냉동보관, 음식물 보존, 유전자 변형 기술, 냉동 수술 분야 등에 이용할 수 있어 학계와 산업계의 관심을 끌고 있다 [2-6]. 어류 등 자연계로부터 결빙방지단백질을 획득하는 것은 자원이 제한되고 경제성도 낮아 실현하기 어려워 이중발현을 이용하여 생산하는 연구가 진행되고 있다. 본 연구팀은 북극 효모 *Glaciozyma* sp. AY30 (이전 *Leucosporidium*으로 명명)으로부터 약 25 kDa의 결빙방지단백질 LeIBP (*Leucosporidium* ice-binding protein)을 분리하여 특성 연구를 수행해오고 있다 [7-9]. LeIBP의 대량생산을 위해 재조합 *Pichia pastoris*에 코돈 최적화된 유전자를 삽입하여 실험실 규모 (7 L)의 유가식 배양을 통해 최적생산 조건을 찾았고 (25°C, pH 6), 파일럿 규모 (700 L)에서 rLeIBP (recombinant LeIBP)를 300 mg/L 생산하였다 [10]. 한편, rLeIBP의 온도이력 (Thermal hysteresis, TH) 활성은 0.42였으며 이는 야생형 LeIBP와 유사한 값이었다. 최근에 본 연구팀에서는 남극 호냉성 세균 *Flavobacterium frigidum* PS1으로부터 결빙방지단백질 (FfIBP)을 분리하여 LeIBP와 얼음 결합능을 분

¹한국해양과학기술원 부설 극지연구소 극지생명과학연구부
¹Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon 406-840, Korea
Tel: +82-32-760-5521, Fax: +82-32-760-5509
e-mail: hansj@kopri.re.kr

²과학기술연합대학원대학교 극지과학전공
²Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 406-840, Korea

³부경대학교 화학과
³Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan 608-739, Korea

자 구조적인 관점에서 비교하였다 [11]. FfIBP는 LeIBP과 유사한 3차원 구조를 가짐에도 불구하고 LeIBP보다 10배 이상 높은 TH 활성을 가지고 있다.

본 연구에서는 높은 활성을 갖는 재조합 FfIBP를 *Pichia pastoris*의 유가식 배양을 통해 생산함에 있어 최적 배양 조건을 찾고자 하였다. 다양한 온도 및 pH 조건하에서 재조합 FfIBP 생산하고 분비된 단백질을 정량하고 TH 활성을 비교하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 균주 및 배지

FfIBP의 이중발현은 플라스미드 벡터 pPICZ α A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 호스트 균주 *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 수행하였다 [12]. 재조합 *P. pastoris*의 종배양은 YPD 배지 (yeast extract, 10 g/L; peptone, 20 g/L; dextrose, 20 g/L)를 이용하였으며 발효기를 사용한 본 배양은 미량금속원소 (CuSO $_4$ ·5H $_2$ O, 6.0 g/L; NaI, 0.08 g/L; MnSO $_4$ ·H $_2$ O, 3.0 g/L; NaMo $_2$ ·H $_2$ O, 0.2 g/L; H $_3$ BO $_4$, 0.02 g/L; CoCl $_2$, 0.5 g/L; ZnCl $_2$, 20.0 g/L; FeSO $_4$ ·7H $_2$ O, 65.0 g/L; biotin, 0.2 g/L; H $_2$ SO $_4$, 5.0 mL)가 포함된 FBS (Fermentation basal salts)배지 (glycerol, 40 g/L; CaSO $_4$, 0.93 g/L; K $_2$ SO $_4$, 18.2 g/L; MgSO $_4$ ·7H $_2$ O, 14.9 g/L; KOH, 4.13 g/L; H $_3$ PO $_4$ [85%], 26.7 mL)에서 수행되었다 [10].

2.2. 배양 및 발효 조건

FfIBP의 생산을 위한 유가식 배양은 메탄올을 탄소원 및 발현유도체로 사용하여 7-L 발효조 (Kobitech, Incheon, Korea)에서 다양한 온도와 pH 하에서 수행되었다. YPD 배지에서 30°C, 200 rpm, 20시간 동안 배양한 종배양액은 미량금속원소가 13.1 mL 함유된 3 L의 FBS 배지가 들어있는 발효조에 접종되었다. 배양액의 pH를 5.0으로 유지하면서 배양온도 25°C 또는 30°C에서 FfIBP를 생산하였고, 배양온도를 30°C로 유지하면서 배양액의 pH를 6.0으로 변경하여 발효를 수행하였다. 배양액의 pH는 암모니아수를 자동적으로 주입하여 유지하였다. 거품의 발생을 방지하기 위하여 소포제가 사용되었다. 접종 후 약 16~24시간 동안에는 회분식으로 배양을 진행하였고 이 후 글리세린이 모두 소모되면서 용존산소가 농도가 증가하는 시점에서 1차 유가식 배양을 시작하였다. 1차 유가식 배양은 약 9~12시간 동안 DO-stat 방식으로 미량금속원소 3 mL가 포함된 250 mL의 50% 글리세린 수용액을 주입하였다. 이 후 글리세린이 소모되는 시점에서 2차 유가식 배양을 시작하였다. 2차 유가식 배양은 약 120시간 동안 DO-stat 방식으로 미량금속원소 24 mL가 포함된 2 L의 메탄올 용액을 3.6 mL/h L의 초기 속도로 주입하였다. DO-stat 유가식 배양은 1분 단위로 용존산소 농도를 측정하여 설정농도인 공기포화농도의 20% 이하로 내려가면 메탄올 용액의 주입을 멈추었다가 다시 회복되면 주입을 하는 식으로 수행하였다.

2.3. 분석 방법

세포의 농도는 건조중량 (Dry cell weight, DCW)를 측정하여 표시하였으며 간접적으로 분광광도계 (Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences, USA)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 흡광도 OD=1은 DCW=0.23 g/L에 해당하는 값이다. FfIBP의 발현은 SDS-PAGE로 확인하였고, 결빙방지 활성은 온도이력 (Thermal hysteresis, TH)을 측정하여 확인하였다. TH 활성은 배양액을 적절하게 희석하여 Nanoliter Osmometer (Otago Osmometers, Dunedin, New Zealand)를 이용하여 측정하였다 [7].

2.4. 결빙방지 단백질의 정제

발효액을 10분간 8,000×g에서 원심분리하여 상등액을 취한 후 3.0- μ m Whatman 필터로 불순물을 제거하였다. Protino Ni-NTA agarose로 충전된 컬럼을 NPI-5 (5 mM imidazole) 용액으로 평형화한 후, 불순물이 제거된 상등액을 공급하여 주었다. 10배 부피의 NPI-15 (15 mM imidazole)를 컬럼에 2회 주입하여 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 제거한 후, NPI-300 (300 mM imidazole) 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) 용액으로 완충액 전환시켰다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 유가식 배양에 의한 결빙방지 단백질의 생산

재조합 결빙방지 단백질을 생산하는 최적의 온도 및 pH 조건을 탐색하기 위하여 pH 5 또는 6에서 각각 30°C 및 25°C에서 *P. pastoris*를 배양하면서 FfIBP를 생산하였다.

3.1.1. pH 5, 30°C에서 배양

우선, pH 5, 30°C에서 *P. pastoris*를 배양하면서 FfIBP를 생산한 경우, 접종 후 약 26시간 후에 글리세린 유가배양이 종료되었고, 이 후 메탄올을 투입하여 FfIBP의 발현을 유도하였다. 최대 세포농도는 FfIBP의 발현 유도 97시간 후 약 112 g/L에 도달하였다. 이 후 발현 유도 121시간 후에 세포농도는 약간 감소하여 110 g/L였다 (Fig. 1A, ○). 배양액을 채취하여 SDS-PAGE를 수행한 결과, 발현 유도 7.5시간 후부터 FfIBP가 생산되는 것이 확인되었다 (Fig. 2A). 배양이 종료된 최종 상등액을 정제하여 FfIBP를 획득한 결과 배양액 1 L당 75 mg (75 mg/L)을 얻었다 (Fig. 1B).

3.1.2. pH 5, 25°C에서 배양

FfIBP는 남극세균유래의 결빙방지단백질이므로 온도를 낮추는 것이 단백질 생산에 유리할 수 있으므로 배양액의 pH를 5로 유지시키고 온도를 25°C로 낮추어 생산을 시도하였다. 최대 세포농도는 발현 유도 95시간 후 84 g/L 였고, 120시간 후에는 81 g/L로 감소하였다 (Fig. 1A, □). SDS-PAGE 결과

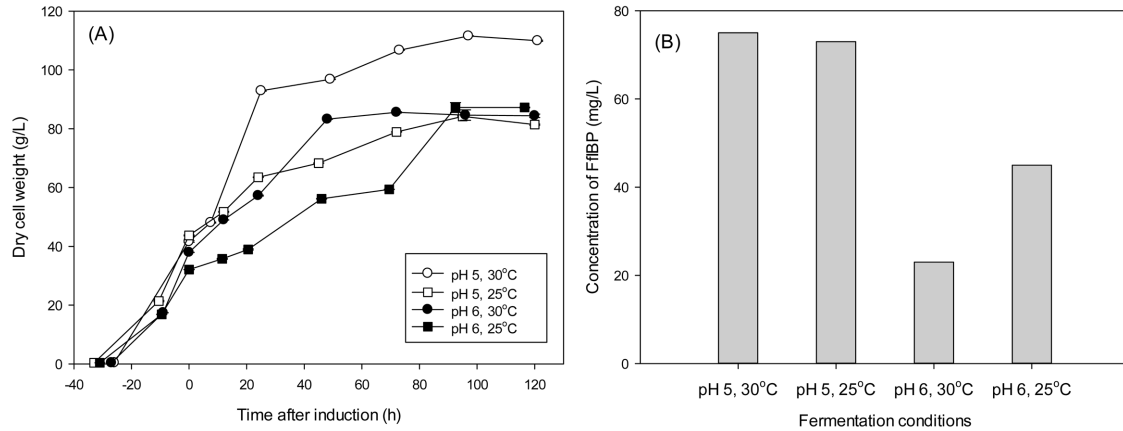


Fig. 1. Optimization of the FfIBP production condition in *P. pastoris* during fed-batch fermentation. Cells were grown in a 7-L jar fermenter in combination of two different culture temperatures (25°C and 30°C) and pHs (5 and 6). (A) Time course of dry cell weight (B) Concentration of FfIBP produced from different culture conditions.

발현 유도 12시간 후부터는 FfIBP가 생산되었으며 (Fig. 2B), 정제된 FfIBP는 73 mg/L를 얻었다 (Fig. 1B). 배양액의 pH를 5로 유지한 상태에서 온도를 5°C 낮추어도 FfIBP의 생산성은 큰 차이가 없음을 의미한다.

3.1.3. pH 6, 30°C에서 배양

결빙방지단백질 LeIBP의 최적조건 탐색에 관한 선행연구에

서 pH 6에서 생산성이 pH 5에서의 생산성보다 높았다 [10]. 이러한 결과를 반영하여 배양액의 pH를 6으로 조절하면서 30°C에서 *P. pastoris*를 배양하면서 메탄올을 투입하여 FfIBP의 발현을 유도하였다. 이 경우 최대 세포농도는 발현 유도 72시간 후 86 g/L였고, 120시간 후에 84 g/L로 약간 감소하였다 (Fig. 1A, ●). SDS-PAGE 결과 pH 5에서 배양한 결과와 달리 발현유도 초기에 FfIBP가 발현되지 않았으며 (Fig. 2C), 총

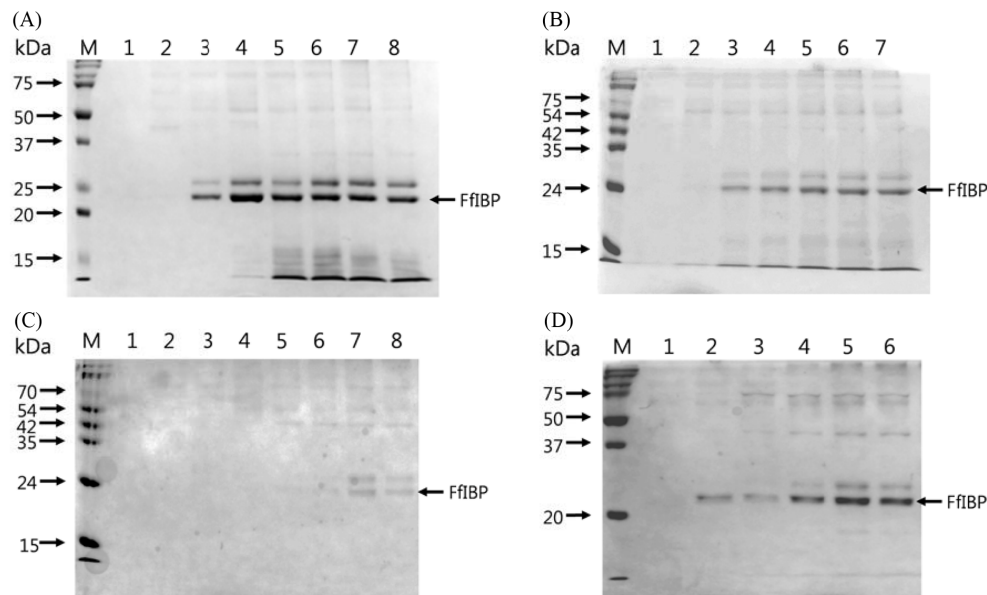


Fig. 2. The amount of expressed FfIBP at different culture conditions. Expression of FfIBP was visualized using 12% SDS-PAGE by running the supernatants obtained from the 7-L fermenter. (A) pH 5, 30°C; lane M, size marker; lane 1, before induction; lane 2, 0 h of induction; lane 3, 7.5 h of induction; lane 4, 25 h of induction; lane 5, 49 h of induction; lane 6, 73 h of induction; lane 7, 97 h of induction; lane 8, 121 h of induction. (B) pH 5, 25°C; lane M, size marker; lane 1, before induction; lane 2, 0 h of induction; lane 3, 12 h of induction; lane 4, 24 h of induction; lane 5, 45 h of induction; lane 6, 72 h of induction; lane 7, 95 h of induction. (C) pH 6, 30°C; lane M, size marker; lane 1, before induction; lane 2, 0 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; lane 7, 96 h of induction; lane 8, 120 h of induction. (D) pH 6, 25°C; lane M, size marker; lane 1, 0 h of induction; lane 2, 20.5 h of induction; lane 3, 46 h of induction; lane 4, 69.5 h of induction; lane 5, 92.5 h of induction; lane 6, 116 h of induction.

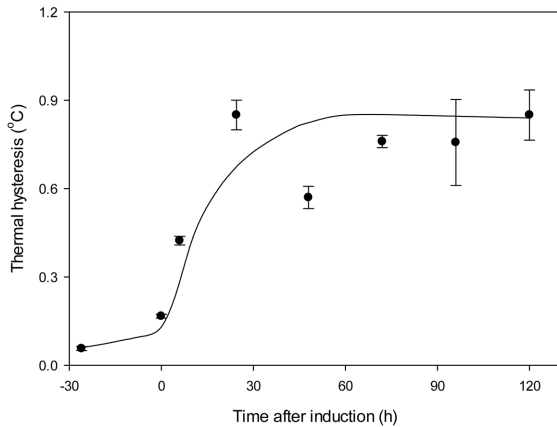


Fig. 3. Thermal hysteresis activity of FfIBP. Samples were taken from the culture broth of *P. pastoris* grown at 30°C, pH 5.

발현량도 크게 낮아 정제된 FfIBP는 23 mg/L를 얻었다 (Fig. 1B).

3.1.4. pH 6, 25°C에서 배양

배양액의 pH를 6으로 유지시키고 온도를 25°C로 낮추어 FfIBP를 생산한 경우 최대 세포농도는 발현 유도 92시간 후 87 g/L였고, 116시간 후까지 유지되었다 (Fig. 1A, ■). SDS-PAGE 결과 pH 5에서 배양한 결과와 유사하게 발현유도 초기에 FfIBP가 발현되었다 (Fig. 2D). 총 발현량은 30°C의 경우보다 약 2배 상승하여 정제된 FfIBP는 45 mg/L를 얻었다 (Fig. 1B). 전체적으로 pH 5에서 배양한 경우가 pH 6에서 배양한 경우보다 높은 발현량을 보였고 pH 5, 30°C에서 최대 발현량을 보였다.

3.2. TH 활성측정

배양액의 pH 5, 30°C에서 유가식 배양할 경우 시간에 따른 FfIBP의 TH활성을 비교하였다. TH활성은 발현유도 후에 급격하게 증가하여 24시간이 되면 0.85로 최대값을 보였고 발효 종료 시까지 거의 일정하게 유지되었다 (Fig. 3). 재조합 *P. pastoris*에서 생산된 FfIBP의 최대 TH활성은 LeIBP의 최대값 0.42보다 2배 이상 높은 반면, *E. coli*에서 생산된 FfIBP의 TH 활성 최대값 2.5보다는 낮았다 [10-11].

4. CONCLUSION

남극 세균 *Flavobacterium frigoris* PS1 유래 결빙방지 단백질 FfIBP를 *Pichia pastoris*의 유가식 배양을 통해 생산한 결과 30°C, pH 5의 조건에서 최대 생산성을 보였다. 정제된 FfIBP의 TH활성은 0.85로 같은 농도에서의 LeIBP보다 약 2배 높

았다. 본 연구는 재조합 FfIBP 등 다양한 결빙방지단백질의 대량생산을 위한 기초자료로 사용될 것이다.

Acknowledgements

본 연구는 한국해양과학기술원 부설 극지연구소 (계정번호 PE13270, PE14140)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Jia, Z. and P. L. Davies (2002) Antifreeze proteins: An unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem Sci.* 27: 101-106.
- 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. *CryoLetters* 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. *Cryobiology* 60: 222-228.
- 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.
- 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. *Cryobiology* 64: 286-296.
- 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.
- Do, H., S. J. Kim, H. J. Kim, and J. H. Lee (2014) Structure-based characterization and antifreeze properties of a hyperactive ice-binding protein from the Antarctic bacterium *Flavobacterium frigoris* PS1. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70: 1061-1073.
- Lee, S. G., H. Y. Koh, S. J. Han, H. Park, D. C. Na, I. C. Kim, H. K. Lee, and J. H. Yim (2010) Expression of recombinant endochitinase from the Antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KO PRI 21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. *Protein Expr. Purif.* 71: 108-114.