

*E. coli*에서 *Pseudoalteromonas carageenovora* 유래 Arylsulfatase의 구성적 발현과 Agarose 제조에의 응용

김미진 · 장연화 · 성문희¹ · 김연희² · 남수완*

동의대 생명공학과 바이오품질제어학과, ¹(주)바이오리더스, ²오사카대학 응용생물공학과

Constitutive Expression of Arylsulfatase from *Pseudoalteromonas carageenovora* in *E. coli* and Its Application to Preparation of Agarose. Kim, Mi-Jin, Yhon-Hwa Jang, Moon-Hee Sung¹, Yeon-Hee Kim², and Soo-Wan Nam*. Department of Biotechnology and Bioengineering, Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ¹BioLeaders Corp, Daejeon 305-500, Korea, ²Department of Biotechnology, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan – The arylsulfatase gene (*astA*, 984 bp ORF) from *Pseudoalteromonas carrageenovora* genome was amplified by PCR and subcloned into the pHCE-IA vector, in which the hyper constitutive expression (HCE) promoter from the D-amino acid aminotransferase (D-AAT) gene of *Geobacillus toevii* was employed. The transformant cell, *Escherichia coli* BL21(DE3)/pHCE-AST, on LB agar plate containing 4-methylumbelliferyl sulfate, showed an intense fluorescence at 360 nm, indicating that 4-methylumbelliferone was liberated by desulfatase activity. When BL21(DE3)/pHCE-AST was grown on LB media containing 0.4% glucose or 0.4% glycerol, the arylsulfatase activity was higher at glycerol rather than at glucose. On 2% glycerol medium, the arylsulfatase activity reached 15.0 unit/ml, which was 2.6-fold higher expression level than that with 1% glycerol. The DNA ladder in agarose prepared from agar by this recombinant enzyme revealed similar resolution and migration patterns with a commercial agarose. This results suggests that arylsulfatase overexpressed in *E. coli* could be applicable to the economic production of electrophoretic-grade agarose.

Key words: Arylsulfatase, constitutive HCE promoter, *Pseudoalteromonas carrageenovora*, agarose, *E. coli*

서 론

한천(agar)은 홍조류에 함유되어 있는 점질성의 다당류이며, galactose 중합체로 구성된 agarose(약 70%)와 이들에 황산기가 부착된 상태의 agarpectin(약 30%)으로 구성되어 있다[8, 10, 12, 24]. Agarose는 탄소 1,3과 β-D-galactopyranosyl 잔기들이 연결되어 있고 탄소 1,4와 3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyl 잔기들이 연결되어 교차되어 있으며, 반복된 구조로 구성되어 있으며, agarpectin은 agarose에 황산기, pyruvic acid 및 uronic acid 잔기를 함유하고 있다[2, 27, 31, 32]. 한천에 결합되어 있는 산성기는 실질적으로 음전하를 띠고 있으므로 전기장 하에서 물질의 이동에 영향을 줄 뿐만 아니라 겔 강도를 약화시킨다[26]. 따라서 전기영동으로 사용되는 한천의 제조법은 여러 단계의 유기 용매 분획을 통하여 한천중의 agarpectin을 제거함으로써 agarose 순도를 높여 의학과 생명공학 분야에 사용되고 있다.

외국의 경우, 의학, 생명공학의 발달과 더불어 agarose 수

요의 급증으로 다양한 방법들을 이용한 agarose 제조 방법들이 연구되었다. Agarose 제조사들이 사용하고 있는 여러 가지 방법들, 즉, pyridine-무수초산법[15], dimethylsulfoxide 분리법[3], cetylpyridinium chloride 및 cetyltrimethyl ammonium 추출법[3], polyethylene glycol 추출법[14], sodium iodide 분리법[12], nal-acrinol 분리법[20], ethanol 침전법[16] 및 양이온 계면활성제 분리법[12] 중에서 2-3가지 정제 방법을 병용하여 agarose를 정제하고 있다. 이러한 유기용매에 의한 agarose의 정제법은 공정비가 과도하게 소요될 뿐만 아니라 고가의 장비와 이에 따른 고도의 기술을 요구하고 있다. 따라서 agarpectin에서 sulfate를 제거할 수 있는 arylsulfatase을 대량생산 및 생물학적 공정을 도입하여 한천으로부터 고순도 agarose를 직접 생산하는 생물생산 공정을 적용할 경우 유기용매와 계면활성제의 사용을 감소시킬 수 있으므로 공정비용을 절감할 수 있다[12]. 따라서 agarose 생산을 위해 탈황효소(arylsulfatase 또는 desulfatase)를 이용하는 생물공정을 생각할 수 있다.

세균의 탈황효소에 관한 연구로는 *Klebsiella aerogenes*가 대표적이며, sulfate 또는 cysteine에 의해 arylsulfatase 생산이 억제되고 tyramine의 첨가에 의해 arylsulfatase의 생산이 증가되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 효과는 arylsulfatase

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2276, Fax: 82-51-890-2632

E-mail: swnam@deu.ac.kr

와 monoamine oxidase의 operon이 공동 조절되기 때문인 것으로 알려졌다[18]. 이 외 미생물 arylsulfatase에 관한 대부분의 연구는 *K. pneumoniae*[28], *Salmonella typhimurium* [18], *Pseudomonas aeruginosa*[5, 7] 및 *Escherichia coli* [21]와 같은 병원성 미생물이 생산하는 효소에 관하여 국한된 실정이다. 이상과 같이 sulfatase에 대한 연구는 극히 제한적이지만, sulfatase 생산균에 관한 연구는 모두가 토양으로부터 분리된 세균에 관한 것이 대부분이다.

한천은 해조류에 다량으로 함유되어 있는 화합물이며 대부분의 갈조류와 홍조류의 세포벽을 구성하고 있다. 해조류를 섭취하는 해양 동물 중에는 소화효소의 일부로써 arylsulfatase가 분포하는 것으로 알려져 있으며, 이 효소는 해조류에 함유되어 있는 다당류의 sulfate ester 결합을 분해하여 해조 다당류의 체내 이용도를 높이고[19, 29], 특히 해조류에서의 황의 동화와 이화작용에 관여하는 것으로 알려져 있다[6].

최근 arylsulfatase를 생산하는 해양 미생물 *Sphingomonas* sp. AS6330 유래의 arylsulfatase가 분리·정제되어 그 특성이 조사된 바 있으며[23], 또한 *Pseudoalteromonas carrageenovora*가 분리·동정되어[1], arylsulfatase 유전자가 cloning되었다[4]. 본 연구에서는 *P. carrageenovora*로부터 arylsulfatase 유전자를 증폭하여 *Geobacillus toebii*의 D-amino acid aminotransferase 유전자 유래의 HCE promoter [17] 하류에 연결함으로써 구성적 발현체를 구축하고 대장균 형질전환체를 얻었다. 단백질의 구성적 발현은 유도적 발현에 비해 몇 가지 이점이 있다. 첫째는 비싸고 독성이 있는 유도 물질을 사용하지 않아도 되고, 둘째는 발현시킬 때의 유도물질 첨가시기, 농도 등의 과정을 생략할 수 있다는 것이다. 본 연구에서 이러한 구성적으로 발현된 재조합 arylsulfatase 효소를 이용하여 값싼 agar로부터 고부가가치이고 환경 친화적인 agarose 생산에 적용하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 재조합 Plasmid 구축

숙주 세포로 *E. coli* BL21(DE3)을 사용하였다. Arylsulfatase 유전자는 *Pseudoalteromonas carrageenovora* ATCC 43555의 genomic DNA로부터 PCR을 통해 984 bp의 유전자를 증폭하여 사용하였다[11]. 유전자 증폭을 위한 primer는 다음과 같다. Forward : 5'-GTACTC ATATGATCGAGGTCATT-3', Reverse : 5'-TGCCGGTCTGACTTAACGTATCTT-3'. 증폭된 arylsulfatase 유전자는 *Bam*HI과 *Hind*III 제한 효소로 처리한 후 pHCE-IA vector(BioLeaders Co., Korea)에 subcloning 하여 plasmid pHCE-AST(4.8 kb)를 구축하였다.

배양 배지 및 배양 조건

형질전환된 *E. coli* 균주는 50 µg/ml의 ampicillin이 포함

된 LB(1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 0.5% NaCl) 배지에 0.4% glycerol 또는 0.4% glucose를 첨가하여 baffled-flask에서 37°C, 200 rpm 조건으로 30시간 배양하였다. 배양 3시간 마다 5 ml씩 배양액을 채취하였다. 발효조(KoBiotech Co., Korea) 회분배양은 재조합 균주를 10 ml LB 시험관에서 전배양 후 50 µg/ml의 ampicillin이 포함된 50 ml LB 배지에 1% 접종 후 6시간 flask 배양하여 1% 또는 2% glycerol이 첨가된 LB 1 L 배지에 접종하여 배양하였다. 배양온도는 37°C, 배양 중의 pH는 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조정하였다. 교반속도(300~600 rpm)의 조절로 용존산소(DO)를 공기포화 30% 이상으로 유지하였고, 통기속도는 1.5 vvm을 유지하였다.

균체농도와 효소 활성 측정

균체 농도를 측정하기 위해서 660 nm에서 탁도(OD₆₆₀)를 측정하였다. *E. coli* 배양액을 원심분리 후 얻은 균체 침전물을 초음파 파쇄 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액으로 arylsulfatase 활성을 측정하였다. Arylsulfatase의 효소 활성은 *p*-nitrophenyl sulfate(pNPS)로부터 분리된 *p*-nitrophenol의 양으로 측정하였다. 반응액 700 µl(200 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5) 400 µl, 25 mM pNPS 200 µl, 희석된 효소 100 µl 포함)를 40°C에서 2분간 반응 후 5 N NaOH 용액을 첨가시켜 반응을 멈추고, 생성된 *p*-nitrophenol의 흡광도를 410 nm에서 측정하였다. Arylsulfatase 1.0 unit는 1분당 1 µmol의 *p*-nitrophenol을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

Agarose의 제조와 DNA 전기영동

한천을 탈황시켜 agarose를 제조하기 위해 LB에 2% glycerol 함유 배지를 사용하여 37°C에서 16시간 발효조 회분배양 후 원심분리로 균체만 모아서 초음파 파쇄하여 arylsulfatase 조효소액을 얻었다. 0.6% 한천(Junsei, Japan) 용액에 5 unit/ml arylsulfatase 조효소로 40°C에서 3시간 반응시킨 후 200 ml의 acetone으로 침전시키고 3배 양의 증류수로 세척한 다음 동결건조하여 분말상태로 만들었다. 이렇게 제조된 agarose를 0.6% 농도로 겔을 만든 다음, DNA *Hind*III marker(Takara Co., Japan)와 1 kb DNA ladder marker(Elpis Co., Korea)를 사용하여 DNA 전기영동을 하였다. 이때 agar(Junsei Co., Japan)와 시판용 agarose(Cambrex Co., USA)로 0.6% 겔을 만들어 같은 DNA markers로 전기영동하여 DNA 이동도와 해상도의 성능을 서로 비교하였다.

결과 및 고찰

Arylsulfatase 발현체 구축과 형질전환체 선별

P. carrageenovora 유래의 *astA*는 *E. coli* 발현 plasmid (pHCE-IA)에 subcloning 하였다. *E. coli* 발현 시스템인

pHCE vector는 *Geobacillus toebii*의 D-amino acid amino-transferase(D-ATT) 유전자의 upstream 영역을 promoter (HCE promoter)로 사용하여 외래 단백질을 구성적으로 높은 수준까지 발현시킬 수 있다. 또한 단백질 발현 유도물질인 고가의 IPTG를 첨가하는 유도 과정이 필요 없고, 항시적 고발현 시스템 작동에 의해 발현 단백질의 양은 대장균 균체 단백질의 20~70%에 달해 재조합 단백질의 대량 생산에 사용이 가능하다[17]. Arylsulfatase 유전자(*astA*)를 T7 promoter를 함유하는 pET21a vector에 subcloning하여 IPTG에 의해서 유도된 arylsulfatase 발현 정도와 구성적 HCE promoter를 사용했을 때의 발현 정도를 비교하기 위하여 동일한 숙주 세포인 *E. coli* BL21(DE3)를 사용하였다. 구축된 구성적 arylsulfatase 발현체(pHCE-AST, 4.8 kb)를 함유한 *E. coli* 형질전환체(BL21(DE3)/pHCE-AST)에서 arylsulfatase가 성공적으로 발현되는지를 가시적으로 확인하기 위해서 평판배지 상에서 arylsulfatase 활성을 먼저 확인하였다. 이때 50 mM 4-methylumbelliferyl sulfate가 함유된 LB 배지를 사용하였다. 숙주세포와 벡터만 함유한 형질전환체는 형광을 띄지 않은 반면, BL21(DE3)/pHCE-AST는 기질인 MUFS의 sulfate를 가수 분해하여 형광을 띄는 4-methylumbelliferone을 생산하였다. 이는 형질전환체 BL21(DE3)/pHCE-AST가 desulfatase 활성을 보임을 의미하였고, 이는 대장균에서 *P. carrageenovora* arylsulfatase가 활성형으로 생산됨을 시사하였다(Fig. 1).

대장균에서 Arylsulfatase의 과발현

탄소원에 따른 균체 증식과 arylsulfatase 발현 양상을 알아보기 위해 *E. coli* BL21(DE3)/pHCE-AST를 50 ml baffled flask(LB에 0.4% glycerol과 0.4% glucose를 첨가한 배지 사용) 배양하여 균체 증식과 세포내·외에서의 arylsulfatase

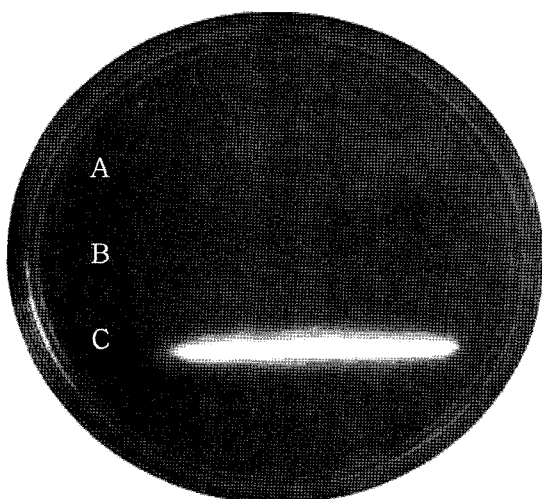


Fig. 1. Activity staining of *E. coli* host and transformant cells grown on LB plate containing MUFS. A, *E. coli* BL21(DE3); B, *E. coli* BL21(DE3)/pHCE-IA; C, *E. coli* BL21(DE3)/pHCE-AST.

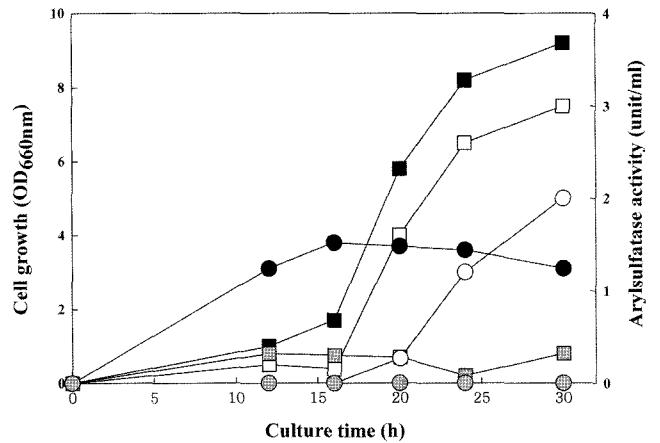


Fig. 2. Time profiles of cell growth and arylsulfatase activity in the flask cultures of *E. coli* BL21(DE3)/pHCE-AST on LB medium containing 0.4% glycerol or glucose. Black symbols, cell growth; white symbols, intracellular activity; gray symbols, extracellular activity. ●○●, LB containing 0.4% glucose; ■□■, LB containing 0.4% glycerol.

활성을 측정하였다. 그 결과 탄소원 glycerol을 첨가한 배지에서의 균체 증식은 배양 24시간에 정지기에 들어갔으며 배양말기 균체 증식은 9.2 OD₆₆₀ 였으며, 세포내 arylsulfatase 활성은 배양 30시간째 3.4 unit/ml 였다(Fig. 2). 그에 반해 glucose를 첨가하여 배양했을 때 균체 증식은 배양 12시간 부터 정지기에 들어갔으며 배양말기 균체 증식은 3.1 OD₆₆₀ 였으며, 세포내 arylsulfatase 활성은 배양 30시간째 2.0 unit/ml로 glycerol이 glucose보다 약 1.5배 증가된 arylsulfatase 생산성을 보였다. Glucose를 사용했을 때 세포의 arylsulfatase 활성은 거의 나타나지 않은 반면, glycerol을 사용했을 때 세포의 arylsulfatase 활성은 0.5 unit/ml로 미약하나마 세포밖으로 약간 분비되었다. 또한 기본 LB 배지 보다는 LB에 glycerol을 첨가하여 배양했을 때 효소 활성은 약 2배 증가 되었다(data not shown).

Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 생산에 있어서도 glucose을 첨가하였을 때 보다 glycerol를 첨가 했을 때 약 2배 증가된 생산성을 보인 바 있다[30]. 탄소원으로 glucose를 사용했을 때 1.8 g/l의 높은 acetate 농도 때문에 균체 증식과 외래 유전자 발현이 70% 정도 저해되는데, 탄소원으로 glycerol을 첨가했을 때는 낮은 acetate의 배출로 인해 glucose 첨가했을 때보다 균체 증식과 발현이 각각 3.16배와 2.24배 증가되어 TRAIL의 생산에 있어서 탄소원으로 glycerol이 효과적인 것으로 확인되었다. 또한 발효에 있어서 효소 생산 비용의 60~80%가 원료 물질의 비용으로 효소 생산 단가의 대부분이 탄소원의 가격에 영향을 받는데, glycerol은 100 ml 당 10,000원 정도으로써 glucose보다 약 2배정도 값이 저렴(Sigma사 기준)하므로 저비용으로 arylsulfatase 효소를 대량 생산할 수 있음을 의미한다.

발효조 회분 배양

탄소원 glycerol 첨가에 따른 균체증식과 활성의 증가를 확인 후 균체 증식과 *astA* 발현을 더 증가시키기 위하여 glycerol 농도를 1%, 2%까지 높여서 발효조 회분 배양을 하였다. 그 결과 배양 18시간째 균체 증식은 약 12.0 OD₆₆₀로 비슷하였으나, arylsulfatase 활성은 5.8, 15.0 unit/ml로, 1% glycerol 때 보다는 2% glycerol 때 약 2.6배 정도 증가하였다(Fig. 3). Flask 배양에서와 마찬가지로 glucose를 사용했을 때 세포의 arylsulfatase 활성은 거의 검출되지 않았고, glycerol을 사용했을 때 세포의 arylsulfatase 활성은 0.8 unit/ml로 세포밖으로 약간 분비되었다.

이상의 배양조건과 균체농도, arylsulfatase 활성 등을 Table 1에 정리하였다. 구성적 발현계를 이용한 arylsulfatase의 과발현 생산시 탄소원으로 glucose는 값이 비싼 화학성분으로 상업적 효소 생산을 위하여는 효과적이지 못할 뿐 아니라 flask 배양시 낮은 효소 생산성을 보였다. Glycerol을 탄소원으로 사용한 발효조 회분 배양에서 glycerol 농도를 2%까지 높였을 때 균체 농도 12.0 OD₆₆₀값은 0.4% glycerol 농도 때의 flask 배양(9.2 OD₆₆₀)에 비해 크게 증가하지 않

Table 1. Comparison of cultivation results of *E. coli* BL21(DE3)/pHCE-AST.

Culture medium	Culture time (h)	Cell growth (OD ₆₆₀)	Arylsulfatase activity (unit/ml)
LB ¹⁾	30	4.8	1.7
LB+0.4% Glucose ¹⁾	30	3.1	2.0
LB+0.4% Glycerol ¹⁾	30	9.2	3.4
LB+1% Glycerol ²⁾	18	12.7	5.8
LB+2% Glycerol ²⁾	18	12.1	15.0

¹⁾50 ml flask culture

²⁾1 L fermentor culture.

았으나, 세포내 arylsulfatase 효소 활성은 18시간 만에 15.0 unit/ml로 증가되어 flask 배양 때보다 4.4배 증가된 값을 보였다. 이는 발효조 배양을 통해 비교적 짧은 시간에 고효율로 arylsulfatase를 생산할 수 있음을 의미하고 특히 glycerol을 계속 공급하는 유가배양을 통해 저비용으로 대량의 arylsulfatase 효소를 생산할 수 있음을 나타낸다.

현재 대장균에서 구성적 발현을 한 예로는, human leptin (146 amino acid)이 유가 배양으로 0.86 g/l로 높은 효율로 생산되었고[22], 강력한 구성적 발현 시스템인 pHCE-IIB vector를 사용하여 4.1 mg/ml의 human necrosis factor- α (rhTNF α)을 생산한 예가 보고되어 있다[17]. IPTG 유도 발현계인 pET14b 벡터를 사용했을 때의 rhTNF α 발현 양이 3.9 mg/ml 임을 감안하면 HCE promoter는 T7 promoter와 비슷한 수준으로 rhTNF α 를 발현시켰음을 알 수 있었다. 본 연구의 *astA* 유전자를 pET21a 벡터(T7 promoter)에 subcloning하여 발현시킨 경우에서도 세포내 arylsulfatase 활성은 약 2.1 unit/ml에 달하여[25] pHCE promoter가 강력한 구성적 promoter임을 다시 확인할 수 있었다.

탈황 조건에 따른 Agarose 제조 및 DNA 전기영동

재조합 arylsulfatase로 제조된 agarose를 agar와 시판용 agarose와 함께 λ DNA *Hind*III marker와 1 kb DNA ladder marker를 사용하여 DNA 전기영동 성능을 비교하였다. 그 결과 agar보다는 arylsulfatase 처리로 제조한 agarose가 이동성이나 분리능에서 우수하였으며, 시판용 agarose와는 이동성과 분리능이 약간 떨어지는 결과를 볼 수 있었다(Fig. 4). 이렇게 재조합 arylsulfatase 효소로 제조된 agarose의 품질을 평가하기 위한 황 함량과 gel 강도를 측정[11]했을 때 황산기 함량은(10 unit/ml의 효소량으로 처리 하였을 때) 0.94%에서 0.3% 정도로 감소하였고, gel 강도도 250 g/cm²에서 800 g/cm²로 상업적 agarose의 강도 수치(900~1,000 g/cm²)와 비슷한 결과를 볼 수 있었다[25]. 또한 우뭇가사리로부터 추출한 한천을 polyethylene glycol(PEG)를 이용하여 한천을 정제하였을 때 황산기 함량은 1.79%에서 0.38%로 감소하였고 전기영동용 agarose의 특성을 나타내는

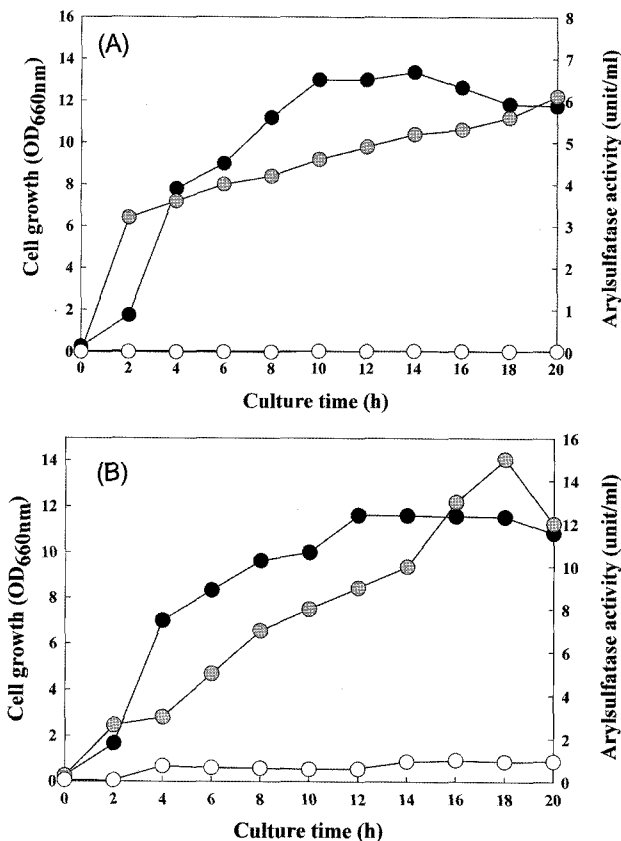


Fig. 3. Time profiles of cell growth and arylsulfatase activity in the fermentor batch cultures of *E. coli* BL21(DE3)/pHCE-AST on LB + 1% glycerol medium (A) and LB + 2% glycerol medium (B). (●), cell growth; (■), intracellular activity; (○), extracellular activity.

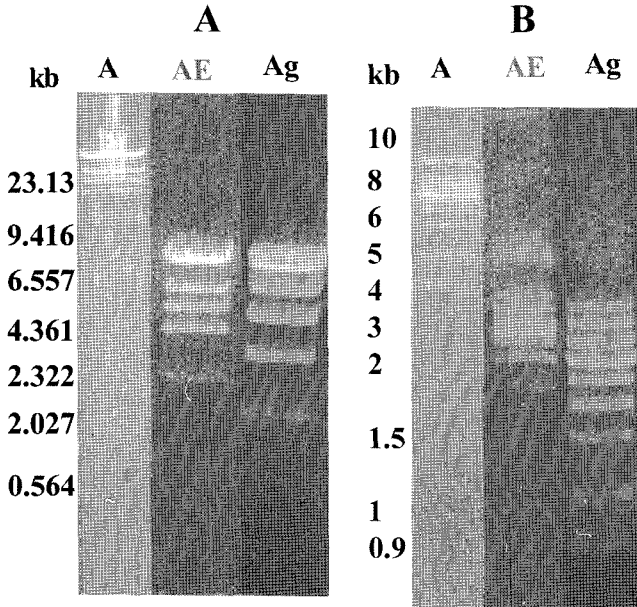


Fig. 4. Electrophoretic performance of agarose prepared by recombinant arylsulfatase. A, Agar (Junsei Co.); AE, Agar + arylsulfatase (5 unit/g-agar); Ag, Agarose (Cambrex Co.). 0.6% gel and 0.4 µg λDNA *Hind*III marker (A) and 1 kb DNA ladder marker (B) were used.

electroendosmosis(EEO)는 0.21에서 0.08로 감소하였으며 [13], cetylpyridium chloride(CPC)를 이용하여 한천을 정제 하였을 때 황산기 함량은 0.72%, EEO는 0.21에서 0.08로 감소된 agarose의 특성이 조사되어 보고된 바 있다[9]. 본 연구에서 제조한 agarose의 EEO도 비슷한 수치를 보일 것으로 예상되며, 성능 개선을 위해서는 arylsulfatase 효소 처리 후 PEG 또는 CPC를 이용하여 agarose를 고도 정제하는 효소와 용매 병용 공정을 개발할 필요가 있음을 알았다.

이상의 결과를 바탕으로 본 연구에서 발현 생산한 재조합 arylsulfatase는 한천으로부터 고순도 agarose를 직접 생산하는 생물 생산 공정에 적용가능하며, 유기용매와 계면활성제의 사용을 감소시킴으로써 공정비용도 크게 절약할 수 있음을 알 수 있었다.

요 약

Pseudoalteromonas carrageenovora 유래의 arylsulfatase 유전자는 PCR로 증폭한 후 *Geobacillus toebii*의 D-amino acid aminotransferase(D-ATT) 유전자 유래의 구성적 발현 promoter를 함유하는 pHCE-IA vector로 subcloning 하였다. 4-Methylumbelliferyl sulfate가 포함된 LB 평판배지 상에서 자란 형질전환체 *Escherichia coli* BL21(DE3)/pHCE-AST는 360 nm상에서 4-methylumbelliferone에 의한 강한 형광을 보였고, 이는 대장균에서 arylsulfatase가 활성형으로 생산되었음을 의미하였다. *E. coli* BL21(DE3)/pHCE-AST를

0.4% glycerol 또는 0.4% glucose가 포함된 LB 배지로 배양했을 때 arylsulfatase 활성은 glycerol이 포함된 배지에서 활성이 더 높게 나타났다. 2% glycerol이 포함된 LB 배지에서 arylsulfatase 활성은 약 15.0 unit/ml에 달했으며, 이는 1% glycerol을 첨가해서 배양했을 때보다 2.6배 이상의 높은 발현 수준이었다. 재조합 arylsulfatase 효소로 제조된 agarose와 시판용 agarose를 DNA markers를 이용해서 전기영동 성능을 비교했을 때 우수한 이동성과 분리능을 보였다. 본 연구의 결과, *E. coli*에서 과발현·생산된 arylsulfatase 효소를 이용하여 전기영동용 고순도 agarose 생산 공정에 적용 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 산업자원부 청정생산기술사업의 지원에 의하여 이루어 졌으며, 이 연구에 참여한 김미진은 교육인적자원부의 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Akagawa-Matsushita, M., M. Matsuo, Y. Koga, and K. Yamasato. 1992. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 621-627.
2. Allan, G., P. G. Johnson, Y. Lay, and K. V. Sarkanen. 1971. Marine polymers; Part 1. A new procedure for the fractionation of agar. *Carbohydr. Res.* **17**: 234-236.
3. Araki, C. 1937. Agar-agar. III. Acetylation of the agar-like substance of *Gelidium amansii*(L). *J. Chem. Soc. Japan.* **58**: 1338-1350.
4. Barbeyron, T., P. Potin, C. Richard, O. Collin, and B. Kloareg. 1995. Arylsulphatase from *Alteromonas carrageenovora*. *Microbiology* **141**: 2897-2904.
5. Beil, S., H. Kehrl, J. Peter, W. Staudenmann, A. M. Cook, T. Leisinger, and M. A. Kertesz. 1995. Purification and characterization of the agaropectin sulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *Eur. J. Biochem.* **229**: 385-394.
6. De Hostos, E. L., R. K. Togasaki, and A. Grossman. 1988. Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **106**: 29-37.
7. Delisle, G. and F. H. Milazzo. 1970. The isolation of arylsulphatase isoenzymes from *pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **212**: 505-508.
8. Do, J. R. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Kor. Fish. Soc.* **30**: 423-427.
9. Do, J. R. and S. W. Oh. 1999. Preparation of agarose from

- Gelidium amansii* for gel electrophoresis using various purification methods and its resolution characteristics for DNA. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**: 110-114.
10. Do, J. R., J. H. Park, and K. S. Jo. 1998. A manufacturing technique of agar with strong gelling ability from *Gelidium amansii*. *J. Kor. Fish. Soc.* **31**: 673-676.
 11. Dodgson, K. S. and R. G. Price. 1963. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. *Biochem. J.* **84**: 350-356.
 12. Duckworth, M. and W. Yaphe. 1971. The structure agar. Part 1. The fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**: 189-197.
 13. Fielding, A. H. and G. Russell. 1974. The Competitive properties of marine algae in culture. *J. Ecol.* **62**: 689-698.
 14. Flemenger, G. B., Solomon, T. Wolf, and E. Hadas. 1990. Effect of polyethylene glycol on the non-specific adsorption of proteins to Eupergit C and agarose. *J. Chromatogr.* **510**: 271-279.
 15. Guiseley, K. B. 1970. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. *Carbohydr. Res.* **13**: 247-256.
 16. Guiseley, K. B., F. H. Kirpatrick, R. B. Provonchee, M. M. Dumais, and S. Nochumson. 1993. A further fractionation of agarose. *Hydrobiologia* **260**: 505-511.
 17. Haryonug, P., J. J. Song, S. P. Hong, Y. H. Choi, S. W. Yun, J. H. Kim, S. C. Lee, S. G. Lee, and M. H. Sung. 2002. Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of humal tumor necrosis factor- α . *Biotechnol. Lett.* **24**: 1185-1189.
 18. Henderson, M. J. and F. H. Milazzo. 1979. Arylsulfatase in *salmonella typhimurium*: Detection and influence of carbon source and tyramine on its synthesis. *J. Bacteriol.* **139**: 80-87.
 19. Hoshi, M. and T. Moriya. 1980. Arylsulfatase of sea-urchin sperm. 2. Arylsulfatase as a lysin of sea-urchins. *Dev. Biol.* **74**: 343-350.
 20. Izumi, K. 1970. A new method for fractionation of agar. *Agr. Biochem.* **34**: 1739-1740.
 21. Jansen, H. J., C. A. Hart, J. M. Rhodes, J. R. Saunders, and J. W. Smalley. 1999. A novel mucin-sulphatase activity found in *Bukholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **48**: 551-557.
 22. Jeong, K. J., J. H. Choi, W. M. Yoo, K. C. Keum, N. C. Yoo, S. Y. Lee, and M. H. Sung. 2004. Constitutive production of human leptin by fed-batch culture of recombinant rpoS-*Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **36**: 150-156.
 23. Kim, J. H., D. S. Byun, J. S. Godber, J. S. Choi, W. C. Choi, and H. R. Kim. 2004. Purification and characterization of arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. AS6330. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 553-559.
 24. Lee, H. S., C. Rhee, and H. C. Yang. 1985. A study on the purification by protein precipitants and washing of agar. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **17**: 340-344.
 25. Lim, J. M., Y. H. Jang, H. R. Kim, Y. T. Kim, T. J. Choi, J. K. Kim, and S. W. Nam. 2004. Overexpression of arylsulfatase in *E. coli* and its application to desulfatation of agar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 777-782.
 26. Mackie, W. and R. D. Preston. 1974. Cell wall and intracellular region polysaccharides. In: Stewart WDP (eds) Algal physiology and biochemistry. *Antarct. Sci.* **13**: 64-65.
 27. Melo, M. R. S., J. P. A. Feitosa, A. L. P. Freitas, and R. C. M. de Paula. 2002. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydr. Polym.* **49**: 491-498.
 28. Miech, C., T. Dierks, T. Selmer, K. V. Figura, and B. Schmidt. 1998. Arylsulfatase from *Klebsiella pneumoniae*-carries a formylglycine generated from a serine. *J. Biol. Chem.* **273**: 4835-4837.
 29. Milanese, A. A. and J. W. C. Bind. 1972. Lysosomal enzymes in aquatic species II. Distribution and particle properties of thermally acclimated muscle lysosomes of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* **41**: 473-491.
 30. Qingping, L., Y. L. Shen, D. Z. Wei, and W. Cao. 2006. Optimization of culture on the overproduction of TRAIL in high-cell-density culture by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 184-191.
 31. Renn, D. 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. *Trends Biotechnol.* **15**: 9-14.
 32. Yoon, H. S. and Y. H. Park. 1984. Studies on the composition of agarose and agartin in agar-agar. *Bull Kor. Fish. Soc.* **24**: 27-33.

(Received Jan. 31, 2007/Accepted Feb. 28, 2007)