

*Saccharomyces cerevisiae*에서 Human Procarboxypeptidase B의 과발현 분비생산과 그 특성

김미정¹ · 김미진² · 이재형² · 김연희¹ · 서진호³ · 남수완^{1,2*}

¹동의대학교 생명공학과, ²동의대학교 바이오물질제어학과, ³서울대학교 농생명공학부

Secretory Overexpression and Characterization of Human Procarboxypeptidase B from *Saccharomyces cerevisiae*. Kim, Mi Jung¹, Mi-Jin Kim², Jae Hyung Lee², Yeon-Hee Kim¹, Jin-Ho Seo³, and Soo-Wan Nam^{1,2*}. ¹Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ³Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea – The gene encoding human pancreatic pro-carboxypeptidase B (CPB) was cloned and fused to *Saccharomyces cerevisiae* mating factor alpha-1 secretion signal (MF α 1), in which the transcription of MF α 1-pro-CPB was under the control of *GAL10* promoter. The constructed plasmid pY α -hproCPB (7.72 kb) was transformed into *S. cerevisiae* 2805. The recombinant human pro-CPB (hproCPB) was successfully expressed in *S. cerevisiae* after induction of galactose, and could be secreted into the culture medium. By analyses of SDS-PAGE and western blotting, the molecular weight of the purified hproCPB was estimated to be a 45.9 kDa. The activity of extracellular hCPB after removal of pro-region by trypsin treatment reached about 10.16 unit/ml at batch culture of *S. cerevisiae* 2805/pY α -hproCPB for 60 h. Also, the *K*_m value of partially purified recombinant hCPB is about 0.43 mM.

Key words: Carboxypeptidase B, *GAL10* promoter, *Saccharomyces cerevisiae*, mating factor alpha-1 (MF α 1), secretion

서 론

전 세계 당뇨병 환자 수가 1억 1천만인 현재, 미국과 유럽 등지에서 생명공학적인 방법을 적용시켜 돼지 인슐린 (insulin)을 당뇨병에 걸린 환자의 치료에 이용한 바 있다. 이와 같은 다른 종 인슐린의 사용은 드물게 그 작용의 증가 또는 감소를 가져오기도 하나 대부분의 경우 인간 인슐린과 별 차이 없이 사용할 수 있었으며, 최근에는 유전자 재조합 (recombinant DNA) 기법을 이용한 인간 인슐린의 대량생산이 가능해짐으로써 생체에서와 동일한 인슐린을 사용할 수 있다. 인슐린은 분자량이 11.5 kDa인 prohormone으로서 N-말단 부위에 위치한 소수성 아미노산 23개로 구성된 leader peptide가 이것을 소포체로 유도하며, signal peptidase에 의해 leader sequence가 절단되면서 이황화 결합이 형성되어 3차 구조를 이루면 분자량 9 kDa인 proinsulin이 된다[16]. Proinsulin은 A와 B 사슬 사이를 연결하는 펩타이드 (connecting peptide)를 가지고 있는 것이 특징이며 골지체로 운반되면 proteolysis 과정에 의해 절단되어 성숙한 인슐린

을 형성하게 된다. Connecting peptide가 절단되는 과정에는 trypsin-like protease와 carboxypeptidase B(CPB)가 기능을 하며 proinsulin은 인슐린을 형성한 후 세포의 원형질막을 통해 exocytosis에 의해 분비되어 인체에서 고유의 기능을 나타내게 된다. 따라서 CPB는 전구체 단계(proinsulin)에서 활성 형태의 인슐린을 생산하는 전환단계에 사용되어지는 효소이다[4, 14, 17].

CPB(EC 3. 4. 17. 2)는 34.8 kDa의 아연 의존성(zinc dependent) metalloenzyme [8, 17]으로 acinar pancreatic cell에서 합성되어지며, 인슐린의 활성화와 단백질 또는 펩타이드의 C-말단의 Lys, Arg을 특이적으로 가수분해 하는 효소이다[6]. 또한 이 효소는 zymogen으로 11.1 kDa의 N-말단의 pro-domain이 trypsin에 의해 제거된다[2]. pro-domain은 intramolecular chaperone 역할을 하여 proCPB가 올바르게 folding이 될 수 있도록 하므로, 활성형 CPB를 얻기 위해서는 proCPB 형태로 발현되어야 함을 시사하고 있다[5]. 천연 CPB는 분리 비용이 높고 carboxypeptidase A와 같은 proteases와 바이러스 등에 의해 오염이 될 수 있어[3], Fayerman 등은 돼지의 체장으로부터 CPB 유전자를 cloning 하였으며[20], CPB 또는 proCPB를 *E. coli*에서 발현하여 활성형으로 전환하려는 시도가 있었지만 봉입체 형태의 발현물을 refolding 시키지는 못하였다. 본 연구에서는 효모

*Corresponding author

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

E-mail: swnam@deu.ac.kr

*Saccharomyces cerevisiae*에서 인슐린의 생산에 적합한 활성형 CPB 효소를 분비 생산하고자 하였다.

외래 단백질을 대량 발현하는 경우 숙주세포나 목적 단백질의 특징에 따라서 단백질의 발현양, 수용성 여부, 발현 장소, 수식(modification) 등이 각기 다르므로 목적 단백질에 가장 적합한 발현 시스템을 선택해야만 효율적인 생산 시스템을 구축할 수 있다. 대량 발현을 위한 숙주시스템으로는 박테리아, 효모, 곰팡이, 식물 및 동물을 포함한 여러 다양한 시스템이 개발되고 있는데, 특히 적은 비용으로 고농도 균체 배양이 용이한 미생물 숙주 시스템이 일차적인 발현 시스템으로 활용되고 있다. 여러 유용한 미생물 숙주시스템들 중에서도 많은 경우 유전학적, 생리 화학적 특징이 가장 잘 밝혀져 있는 원핵세포인 박테리아와 전통 효모 *S. cerevisiae*가 일차적인 숙주 세포로 이용되어 왔다. *S. cerevisiae*는 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서, 고등생물과 동일한 진핵세포로서 고등생물 유래의 유전자와 전사 및 번역 시스템이 유사하며 splicing을 통한 intron의 제거와 고등동물의 골지체와 유사한 분비기관을 갖추고 있어, 번역 후 수식(posttranslational modification)을 통해 활성형 단백질을 생산·분비할 수 있다. 그러나 효모 세포내에서 재조합 단백질이 발현 생산될 경우 불용성, 불활성, 부정확한 아미노말단 등의 문제가 발생하며 이러한 문제들은 효모의 단백질 분비경로 중 각 단계에서 발생한다. 따라서 안정하고 활성형인 재조합 단백질을 효모로부터 생산할 경우 세포 내 축적 생산보다 배지로의 분비생산이 바람직하다. 또한 배양 배지로 분비될 경우 복잡한 여러 정제 단계를 거치지 않고도 쉽게 순수 분리할 수 있는 장점이 있다. 따라서 효모에서 재조합 단백질을 분비생산하기 위해서는 이에 적합한 분비신호를 이용하는 것이 중요하다. 효모로부터의 재조합된 단백질의 분비를 위해서는 효모의 분비신호를 이용하는 것이 효율적인데, 이전 보고에서 mating factor α -1(MF α -1) signal sequence를 이용하여 *P. pastoris* 상에서 인간 L-ferritin를 높은 수준으로 발현 분비시켰다[12]. 또한 Scotti 등[18]은 다양한 signal peptides(MF α -1, invertase, acid phosphatase)를 사용하여 *B. subtilis* 유래의 levansucrase에 대한 효모에서의 분비효율을 조사하였는데, 그 연구결과에 따르면 성숙 단백질 N-말단의 net charge와 signal peptide의 소수성 core 영역 외에 성숙 단백질 전체의 net charge 등이 개선되어야 세포체에서 골지체로, 골지체에서 분비과립으로, 분비과립에서 세포 밖으로 일련의 분비능을 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다. 재조합 미생물 발현시스템에서 상대적으로 연구가 덜 진행된 분비공학(secretion engineering) 분야에 대한 원천적인 기술 확보가 고가의 의약품 단백질을 원형에 가까운 형태로 경제적 생산이 가능하게 한다.

이에 본 연구는 효모 분비 신호 서열, MF α -1을 사용하여 인간 유래의 *cpb* 유전자를 *S. cerevisiae*에 도입하여 분비효

율을 조사하고 proCPB를 과발현 분비 생산하여, 이를 통해 분리된 효소를 인슐린의 산업적 생산 과정에 이용하기 위한 기초 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 재조합 Plasmid 구축

plasmid 구축 및 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 DH5 α 를 사용하였고, human carboxypeptidase B 유전자(*cpb*) 발현을 위한 효모 숙주세포는 uracil 영양요구성 변이주(*ura3-52*)이며 haploid인 *S. cerevisiae* 2805 (*MAT α pep4::HIS3 prb1-1.6R can1 GAL2 his3-200 ura3-52*)를 사용하였다. pCMV-SPORT 벡터(Invitrogen Co., USA)에 클론된 human *cpb* 유전자(GeneBank access code BC015338)의 증폭을 위해 forward primer(5'-TCTAGATAAAAGGCATCATGG-TGGTGAGCAC-3')와 reverse primer(5'-GTTCGACCTA-GTACAGGTGTTCCCAGGACGTAGC-3')로 PCR 증폭 후, pGEM-T vector(Promega Co., USA)에 subcloning하여 pGEM-T-hCPB plasmid를 얻었다. pGEM-T-hCPB와 pYEG α -Hir525 vector[19]를 *Xba*I과 *Sa*II 제한 효소로 각각 처리한 후에 T4 DNA ligase(Promega Co., USA)를 이용하여 plasmid pY α -hproCPB(7.72 kb)를 구축하였다.

효모 형질전환체 선별 및 배양조건

구축된 재조합 plasmid를 *E. coli* 내로 형질 전환하여 배양한 후, Mini-prep kit(Promega Co., USA)를 이용하여 회수하였다. 환형으로 회수된 plasmid는 효모 숙주세포 *S. cerevisiae* 2805에 LiCl 법[7, 9]을 사용하여 형질전환시켰고, 형질전환체의 선별을 위해 SD(0.67% Yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% Casamino acid, 2% Dextrose) 배지를 사용하였다. 시험관 배양에서는 SD 배지를 사용하여 30°C, 200 rpm 조건으로 전 배양 후 YPDG(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 1% Dextrose, 1% Galactose) 배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C, 200 rpm에서 48시간동안 배양하였다. Flask 배양에서도 SD 배지를 사용하여 30°C, 200 rpm 조건으로 전 배양 후 YPDG 배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C, 200 rpm에서 60시간동안 배양하였다. 배양 24시간부터 12시간 마다 3 mL 씩 배양액을 채취하였다. 발효조(KoBiotech Co., Korea) 회분배양은 재조합 효모 균주를 10 mL SD 시험관에서 전 배양 후 50 mL YPDG 배지에 1%(v/v) 접종 후 12시간 flask 배양하여 YPDG 1 L 배지에 접종하여 배양하였다. 배양온도는 30°C, 배양 중의 pH는 30% NH₃OH과 1 N HCl를 사용하여 pH를 5.0으로 조정하였다. 교반속도(400~500 rpm)의 조절로 용존산소(DO)를 공기포화 30% 이상으로 유지하였고, 통기속도는 1.5 vvm을 유지하였다.

균체농도와 잔존환원당

실험 중 세포의 농도는 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid(DNS) 방법[15]을 사용하여 잔존 환원당 농도를 측정하였다.

균체분획, carboxypeptidase 활성 측정, 분비효율 및 kinetic parameter 측정

균체 침전물은 Beadbeater(Biospec Co., Thailand)와 glass beads(0.5 mm)를 사용하여 전세포분획을 얻었으며[7], 이들 분획과 상등액을 Centricon PL-30(30,000 MW cut off, Millipore Co., USA)을 사용하여 부분정제된 후, 각 분획에서의 효소활성을 측정하였다. CPB 활성 측정을 위한 반응은 activation buffer(100 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 2 µg trypsin과 부분 정제된 CPB 효소를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응 후 0.1 mM PMSF 첨가에 의해 반응을 종료시켰다[6]. 효소 활성 측정에 사용된 기질은 1 mM Hippuryl-L-Arg(Sigma Co., USA)이었으며, 25°C에서 254 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 1 unit는 25°C에서 1분간 1 µmol의 기질을 가수분해하는 효소의 양으로 정의하였다. 각 효소들의 분비효율(secretion efficiency)은 전체 효소 활성(세포내외 활성 포함)에 대한 세포의 효소 활성비를 백분율로 나타내었다.

CPB의 K_m 값(Michaelis-Menten 상수)은 초기속도 실험(initial-rate experiments) 값으로 Lineweaver-Burk(이중 역수 도표) 방법을 통하여 분석을 하였다[1]. 기질로 0.01, 0.05, 0.2, 0.5, 1 mM의 Hippuryl-L-Arg를 각각 희석하여 CPB와 25°C에서 반응시켰으며, 254 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

SDS-PAGE 및 western blot

전기영동은 Laemmli 등[10]의 방법에 따라 각기 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS)가 포함된 10% polyacrylamide(Sigma Co., USA) 농도의 separating gel과 5% polyacrylamide 농도의 stacking gel을 사용하여 행하였다. 90 volt에서 약 1시간 30분 정도 전기영동을 행한 후 gel을 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. CPB 발현 유무 확인을 위한 western blot을 수행하기 위해 먼저 각각의 시료를 12% SDS-PAGE gel에 loading하여, 90 volt에서 약 2시간 정도 전기영동을 행하였다. 전기영동 후의 gel은 50 V에서 약 1시간 30분 동안 PVDF 막에 transfer하였고, transfer가 끝난 PVDF 막에 blocking buffer[5% skim milk에 1 M Tris-HCl(pH 8.0) 5 mL이 첨가된 buffer]와 1차 항체를 넣어 12시간 반응을 수행하였다. 1차 항체 반응이 끝난 후 2차 항체 반응을 3 시간 행한 후 발색하였다[11].

Western blot을 위한 1차 항체로는 rabbit antibody-porcine carboxypeptidase B(Sigma Co., USA)가 사용되었으며, 2차 항체로는 anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase(antibody produced in goat)가 사용되었다. 발색을 위해 NBT/BCIP solution(Sigma Co., USA)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid의 구축

재조합 효모의 균체 증식과 동시에 mating factor α -1의 분비 신호 서열(MF α -1 ss; 89개 아미노산 잔기로 구성; MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGGLALEGDFDVVVLFPFSNSFNGLLFINTTIAZIAAKKQGVSLDKRQAQA)을 이용하여 인간 *procpb* 유전자를 발현·분비시키기 위해 *GAL10* promoter 하류에 *procpb*의 자체 분비 서열을 제외한 *procpb* 유전자를 cloning하여 pY α -hproCPB(7.72 kb)을 구축하였다. MF α -1 분비 신호와 *procpb* 연결 부위의 서열은 5'-TCT CTA GAT AAA AGG CAT CAT GGT-3'로서 *Xba*I로 절단하여 연결함으로써 SLDKRHHG의 아미노산 서열을 가지게 되어 번역 후 분비 과정 중 *KEX2* protease에 의해 절단된다(Fig. 1). 구축된 발현 plasmid는 선택표지로 *URA3* 유전자를 함유하고 있어 uracil 영양요구성 변이주 효모세포 *S. cerevisiae* 2805 (*ura3*)를 숙주세포로 사용할 수 있다.

효모 형질전환체의 선별 및 발현 유무 확인

구축된 pY α -hproCPB plasmid를 uracil 영양요구성 변이주인 *S. cerevisiae* 2805에 형질전환 후 최소배지(SD)에서 형질전환체를 1차 선별한 다음 10 mL test tube에서 배양하였다. 각 형질전환체들의 발현 확인을 위하여 western blot을 수행한 결과, 배양 후 12시간째부터 45.9 kDa에 밴드를 확인하였다(Fig. 2). 이는 MF α -1 분비 신호와 CPB 유전자 연결 부위의 서열이 번역 후 분비 과정 중 *KEX2* protease에

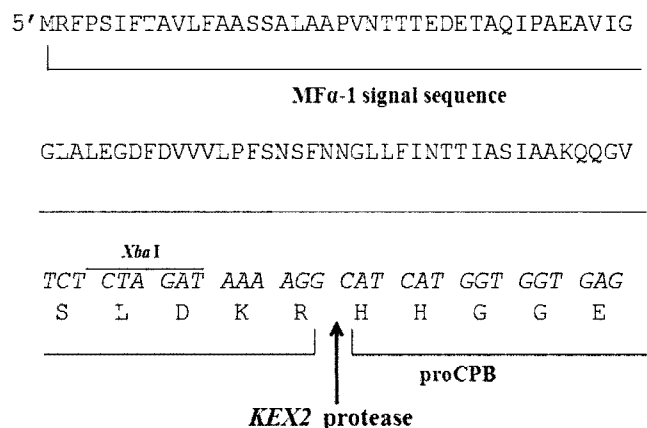


Fig. 1. Cleavage site of yeast *KEX2* protease on the junction region of MF α -1 signal sequence and proCPB.

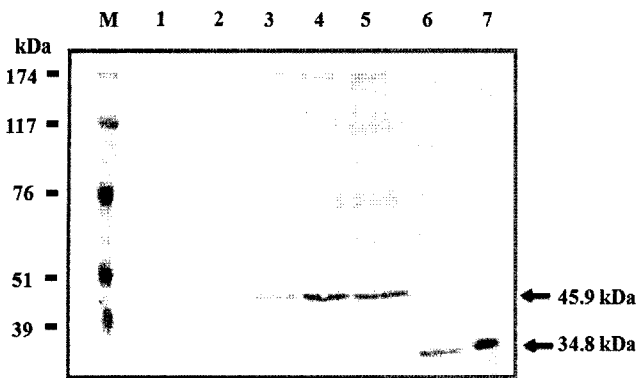


Fig. 2. Western blot analysis of procarboxypeptidase B expressed in *S. cerevisiae* 2805/pY α -hproCPB. Lane M; Protein molecular weight marker, Lane 1; *S. cerevisiae* 2805 extracellular proteins after 48 h culture, Lane 2; extracellular proteins after 12 h culture in YPDG, Lane 3; after 24 h culture, Lane 4; after 36 h culture, Lane 5; after 48 h culture, Lane 6; 48 h culture after removal of proregion by trypsin treatment, Lane 7; Porcine CPB.

의해 절단되어, 배양 상등액으로 성공적으로 proCPB가 발현 분비되었음을 보여주며, 재조합 proCPB의 경우 별도의 당쇄 부가가 되지 않은 상태로 발현되었음을 알 수 있다. 또한 proCPB를 trypsin으로 처리 후 pro-domain(11.1 kDa)이 절단된 mature CPB(34.8 kDa)를 western blot을 통해 확인하였다(Fig. 2, lane 6). 발현된 CPB의 활성을 확인하기 위하여 배양 상등액을 trypsin 처리 후 기질 Hippuryl-L-Arg과 반응하여 흡광도 변화를 각 재조합 균주 별 5회 실시하여 활성을 조사하였다. 10개의 재조합 균주 중 가장 높은 CPB 활성(0.87 unit/mL)을 보이는 재조합 균주를 선별하였고, 최종 선별된 재조합 균주는 *GAL10* promoter의 조절 하에서 안정적으로 *procpb* 유전자가 발현되고 번역산물은 배양 상등액으로 분비되고 trypsin 처리로 활성형으로 전환됨을 확인하였다.

재조합 carboxypeptidase B의 발현과 분비

재조합 균주 *S. cerevisiae* 2805/pY α -hproCPB를 30°C, YPDG 배지에서 60시간동안 flask 배양한 다음 extracellular와 intracellular로 분획하여 활성 측정된 결과, 배양 상등액에서 배양 60시간째 2.59 unit/mL의 활성을 보임을 확인하였다. 세포 내(intracellular) 활성 측정을 수행한 결과, 배양 60시간째 0.20 unit/mL로 상대적으로 활성이 낮음을 확인하여, proCPB 단백질은 대부분이 세포 밖으로 분비되며 분비효율은 92.8%임을 확인하였다. 재조합 균주 *S. cerevisiae* 2805/pY α -hproCPB를 발효조에서 회분배양한 결과 galactose가 소모되는 12시간째부터 서서히 proCPB가 발현되면서 48시간에서 60시간까지 두배 이상의 proCPB가 꾸준히 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 배양 60시간 때 균체농도는 OD₆₀₀=45에 도달하였으며, 배양 60시간 때 세포밖 활성은 10.16 unit/ml이었고, 세포 내 활성은 0.28 unit/ml로 97.3%

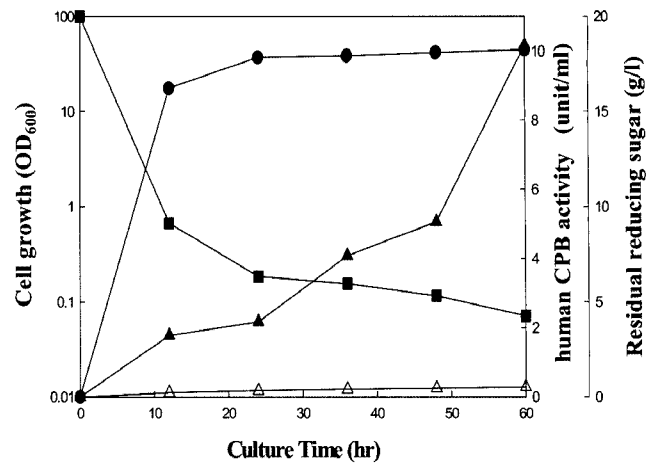


Fig. 3. Time profiles of cell growth and carboxypeptidase B expression in the batch fermentation of *S. cerevisiae* 2805/pY α -hproCPB on YPDG medium. Symbols: (●), cell growth; (■), residual reducing sugar (g/L) (▲), extracellular human CPB activity (unit/mL); (△), intracellular human CPB activity (unit/mL).

분비효율을 나타내었다. Flask 배양과 비교했을 때, proCPB의 시간대 별 발현 양상은 유사하였으나 발효조 회분배양에서 분비효율이 다소 증가 되었으며, 세포농도의 증가와 높은 CPB 활성도 얻을 수 있었다. 향후 *cpb* 유전자의 자체 signal sequence 또는 invertase나 acid phosphatase signal peptides를 이용한 분비효율성과, 본 연구의 MF α -1을 이용한 proCPB의 분비효율성의 비교시 참고가 될 것으로 사료된다. 최근 Wang 등[21]의 연구에 의하면 *P. pastoris*에서 rat *procpb*의 발현시 재조합 CPB의 비활성도(specific activity)는 110 unit/mg로 보고하였다. 또한 구입한 human carboxypeptidase B(Sigma Co., USA)의 비활성도는 약 55 unit/mg이었다. 본 연구의 *S. cerevisiae*에서 발현된 human CPB의 경우 상등액으로부터 한외여과만으로 최소한의 부분정제에 활성을 측정하였기 때문에 정확한 비활성도를 비교하기 어렵지만, 재조합 인간 CPB의 비활성도는 발효조 회분배양시 약 30 unit/mg로 측정되어 상대적으로 낮게 나타났다. 그러나 향후 순수정제에 의한 비활성도의 측정 시 이보다 높을 것으로 예상된다.

재조합 carboxypeptidase B의 Km 값 및 특성

재조합 균주 *S. cerevisiae* 2805/pY α -hproCPB에서 회분배양에 의해 얻어진 CPB의 Km 값을 이중 역수 도표를 통하여 측정하였다(Table 1). 재조합 human CPB의 Km 값은 0.43 mM로 나타났으며, 이것은 porcine 유래 CPB의 Km 값[1]과 유사하였으며, Rabbit lung 유래 CPB의 Km 값[13]보다는 낮은 것으로 나타나 Hippuryl-L-Arg 기질과의 친화성이 높음을 알 수 있다. 또한 Vmax는 1.66 μ mol/mL·min이었다.

이상의 결과를 근거로 하여 본 연구에서 발현된 재조합

Table 1. Comparison of Km value of CPB. Hippuryl-L-Arg was used as a substrate.

Enzyme	Km (mM)
Recombinant human CPB	0.43
Porcine CPB ^a	0.39
Ostrich CPB ^a	0.54
Rabbit lung CPB ^b	16.00

^aData from Bradley *et al.* [1]; ^bData from Lones *et al.* [13].

CPB는 향후 proinsulin을 이용한 mature insulin으로의 전환 연구에 사용될 수 있을 것이며, proinsulin과 proCPB의 공발현을 통한 insulin의 *in situ* 생산 연구에도 응용될 수 있을 것으로 보인다.

요 약

인간 췌장 유래 pro-carboxypeptidase B(CPB) 유전자를 클로닝한 후 *GAL10* promoter 하류에 *Saccharomyces cerevisiae* mating factor alpha-1 secretion signal(MF α -1)과 연결하여 MF α -1-pro-CPB를 구축하였다. 구축된 plasmid pY α -hproCPB(7.72 kb)를 *S. cerevisiae* 2805에 형질전환시켰다. 재조합 인간 proCPB(hproCPB)는 galactose 유도로 *S. cerevisiae*에서 성공적으로 발현되었고, 배양상등액으로 분비되었다. SDS-PAGE와 western blot 분석에 의해, 정제된 hproCPB 단백질이 약 45.9 kDa임을 확인하였다. *S. cerevisiae* 2805/pY α -hproCPB의 발효조 회분배양 시 trypsin 처리에 의해 pro 영역을 제거한 후 hCPB의 세포외 활성은 60시간째에 10.16 unit/mL이었다. 또한 재조합 hCPB의 Km 값은 약 0.43 mM 이었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 목적기초연구(과제번호 : R01-2004-000-10221-0) 지원으로 수행되었으며, 이 연구에 참여한 김미진과 이재형은 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bradley, G., R. J. Naude, K. Muramoto, F. Yamauchi, and W. Oelofsen. 1996. Ostrich (*Struthio camelus*) carboxypeptidase B: purification, kinetic properties and characterization of the pancreatic enzyme. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**: 521-529.
- Burgous, F. J., M. Salva, F. Soriano, E. Mendez, and F. X. Aviles. 1991. Analysis of the activation process of porcine pro-carboxypeptidase B and determination of the sequence of its activation segment. *Biochemistry* **30**: 4082-4089.
- Datar, R. and C. G. Rosen. 1990. Process economics downstream separation processes in biotechnology. pp. 741-793, New York:Marcel Dekker Inc.
- Donald, F. S., S. Cho, P. E. Oyer, S. Terris, J. D. Peterson, and A. H. Rubenstein. 1971. Isolation and characterization of proinsulin C-peptide from bovine pancreas. *J. Biol. Chem.* **246**: 1375-1382.
- Fayerman, J. T., D. P. Greenen, C. L. Hershberger, J. L. Larson, J. L. Sterner, and H. Zhang. 1997. DNA sequences encoding porcine pancreatic carboxypeptidase B. US Patent 5672496.
- Folk, J. E., K. A. Piez, W. R. Carroll, and J. A. Gladner. 1960. Carboxypeptidase B. *J. Biol. Chem.* **235**: 2272-2277.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Jolk, J. E. and J. A. Gladner. 1958. Purification of the zymogen and specificity of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **231**: 379-391.
- Kramer, B., W. Kramer, M. S. Williamson, and S. Fogel. 1989. Heteroduplex DNA correction in *Saccharomyces cerevisiae* is mismatch specific and requires functional PMS genes. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4432-4440.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laemmli, U. K. and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
- Lee, J. M., S. N. Yang, C. S. Park, D. I. Jeoung, and H. Y. Kim. 2004. Purification and glycosylation pattern of human L-ferritin in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 68-73.
- Lones, M., R. Chatterjee, H. Singh, and G. Kalnitsky. 1983. Lysosomal carboxypeptidase B from rabbit lung purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **221**: 64-78.
- Mergulhao, F. J. M., G. A. Monteiro, G. Larsson, A. M. Sanden, A. Farewell, T. Nystrom, J. M. S. Cabral, and M. A. Taipa. 2003. Medium and copy number effects on the secretion of human proinsulin in *Escherichia coli* using the universal stress promoters *uspA* and *uspB*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 495-501.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**: 952-959.
- Nolan, C., E. Margoliash, J. D. Peterson, and D. F. Steiner. 1971. The Structure of Bovine Proinsulin. *J. Biol. Chem.* **246**: 2780-2786.
- Philip, E. O., S. Cho, J. D. Peterson, and D. F. Steiner. 1970. Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide. *J. Biol. Chem.* **246**: 1365-1373.
- Scotti, P. A., M. Praestegaard, R. Chambert, and M. R. P. Glatron. 1996. The targeting of *Bacillus subtilis* levansucrase in yeast is correlated to both the hydrophobicity of the signal peptide and the net charge of the N-terminus mature part. *Yeast* **12**: 953-963.
- Sohn, J. H., S. K. Lee, E. S. Choi, and S. K. Rhee. 1991. Gene expression and secretion of the anticoagulant hirudin

- in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 266-273.
20. Vendrell, J., E. Querol, and F. X. Avils. 2000. Metallo-carboxypeptidases and their protein inhibitors structure, function and biomedical properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**: 284-298.
21. Wang, D. J., L. Miao, H. Chen, Y. Y. Chen, and H. Q. Fang. 2007. Expression, purification and characterization of rat procarboxypeptidase B in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* **23**: 61-66.

(Received Dec. 18, 2007/Accepted Feb. 4, 2008)