

Enhanced Production of Astaxanthin by Archaea Chaperonin in *Escherichia coli*

Yong Bae Seo^{1,2}, Jong Kyu Lee¹, Tae Hyug Jeong³, Soo-Wan Nam^{4*} and Gun-Do Kim^{1*}

¹Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Institute of Fisheries Science, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

³Department of Marine and Fisheries Resources, Mokpo National University, Muan 58554, Jeonnam, Korea

⁴Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received September 9, 2015 / Revised October 2, 2015 / Accepted October 2, 2015

The aim of this study is to increase production of carotenoids in recombinant *Escherichia coli* by Archaea chaperonin. The carotenoids are a widely distributed class of structurally and functionally diverse yellow, orange, and red natural pigments. These pigments are synthesized in bacteria, algae, fungi, and plants, and have been widely used as a feed supplement from poultry rearing to aquaculture. Carotenoids also exhibit diverse biological properties, such as strong antioxidant and anti-tumor activities, and enhancement of immune responses. In the microbial world, carotenoids are present in both anoxygenic and oxygenic photosynthetic bacteria and algae and in many fungi. We have previously reported cloning and functional analysis of the carotenoid biosynthesis genes from *Paracoccus haeundaensis*. The carotenogenic gene cluster involved in astaxanthin production contained seven carotenogenic genes (*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ*, *crtW* and *crtX* genes) and recombinant *Escherichia coli* harboring seven carotenogenic genes from *Paracoccus haeundaensis* produced 400 µg/g dry cell weight (DCW) of astaxanthin. In order to increase production of astaxanthin, we have co-expressed chaperone genes (*ApCpnA* and *ApCpnB*) in recombinant *Escherichia coli* harboring the astaxanthin biosynthesis genes. This engineered *Escherichia coli* strain containing both chaperone gene and astaxanthin biosynthesis gene cluster produced 890 µg/g DCW of astaxanthin, resulting 2-fold increased production of astaxanthin.

Key words : Astaxanthin, carotenogenic, chaperonin, co-expression, *Paracoccus haeundaensis*

서 론

카로티노이드(carotenoid)는 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compounds)로서 자연계에서 C₃₀, C₄₀, C₅₀ 계열의 유용한 색소 군으로 인체 내에서 비타민 A 전구체, 항산화, 활성산소 소거작용, 암세포의 증식 억제작용 등의 생물학적 기능을 통하여 순환기 질환 및 성인병 등을 예방하는 효능을 가진 것으로 알려져 있다. 또한, 카로티노이드는 면역기능을 향상시켜 자외선 노출로부터 피부의 손상을 줄여주거나 멜라닌 생합성을 억제한다는 연구 결과가 보고됨으로써 유럽이나 미국에서 미용 소재로 각광을 받고 있다[2, 3].

카로티노이드는 분자 구조에 따라 노란색, 적색, 주황색, 주황색 등 여러 색으로 자연계에 널리 분포하며, 과도한 빛에

의한 광합성 기관의 광산화적 손상에 대한 보호에 중요한 역할을 한다[1, 18]. 카로티노이드계 색소의 예로는 β-카로틴(β-carotene; 당근의 주황색 색소), 라이코펜(lycopene; 토마토의 적색 색소), 푸코잔틴(fucoanthin; 해조류의 황갈색 또는 갈색 색소), 아스타잔틴(astaxanthin; 3, 3'-dihydroxy-β, β-carotene-4, 4'-dione) 등이 있다. 이러한 카로티노이드를 생합성하는 미생물로는 효모인 *Phaffia rhodozyma* [19], 조류인 *Haematococcus pluvialis* [2, 9], 세균으로는 *Agrobacterium aurantiacum* [29], *Kocuria gwangalliensis* [22], *Paracoccus marcusii* [6], *Paracoccus carotinifaciens* [26], *Paracoccus haeundaensis* [14] 등이 보고되어 있다. 현재까지 밝혀진 카로티노이드 생합성 경로는 Fig. 1에서와 같이 mevalonate 또는 non-mevalonate pathway에서 생합성되는 이소프레노이드(isoprenoids) 전구체(IPP; isopentenyl diphosphate)를 기반으로 C₃₀, C₄₀, C₅₀ 계열의 카로티노이드가 생합성 된다[17].

이처럼 카로티노이드의 다양한 생물학적 기능성으로 인하여 이들을 대량생산하고자 하는 연구는 꾸준히 진행되어 왔다. 카로티노이드의 대량생산을 위한 연구는 생합성 미생물의 성장 및 생산 조건 확립, 돌연변이 균주 개발, 대사공학적 접근을 통한 생산량 증대 연구 등의 방향으로 초점을 맞추고 있다. 이러한 연구들은 일정 부분 생산량을 향상시키는 연구 결과를 이끌어 내었다. 하지만 앞서 연구된 카로티노이드 대량생

*Corresponding authors

Tel : +82-51-629-5618, Fax : +82-51-629-5619

E-mail : gundokim@pknu.ac.kr (Gun-Do Kim)

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

E-mail: swnam@deu.ac.kr (Soo-Wan Nam)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

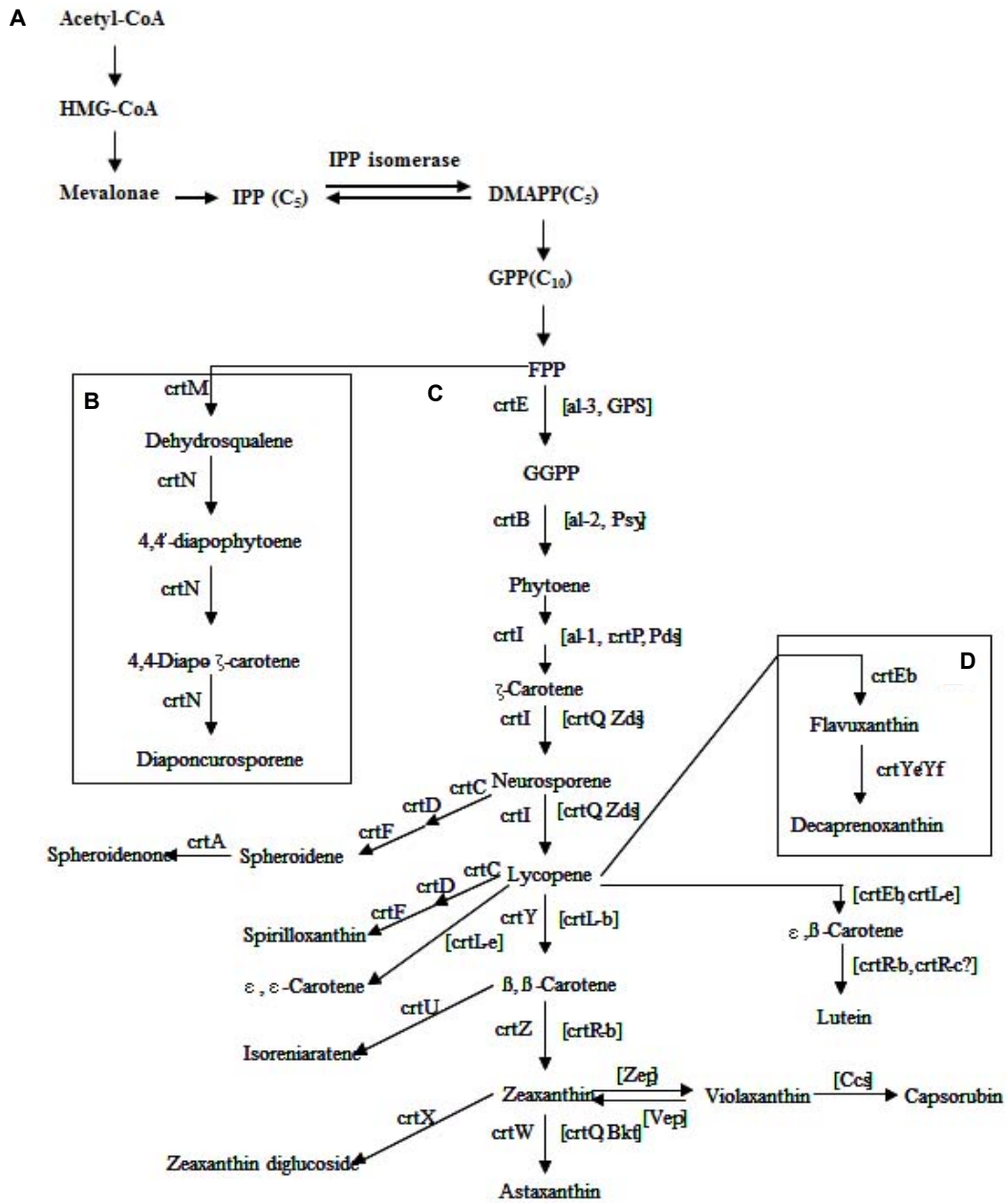


Fig. 1. Carotenoid biosynthesis pathways. Biosynthesis pathways of isoprenoid (A), C₃₀ (B), C₄₀ (C) and C₅₀ (D) carotenoids in micro-organisms and plants which the enzymes have been cloned.

산 증대 연구들은 카로티노이드 생산 조건 및 균주에 대한 연구들이 주된 부분이며, 카로티노이드 비생산 균주(예: *E. coli*)를 이용한 형질전환체에서 카로티노이드 합성에 관여하는 효소들의 안정적 발현을 통한 생산량 증대 연구는 진행된 바가 없다. 즉, 형질전환된 균주에서 외래 유전자를 발현 시킬 경우 대부분이 soluble form의 단백질로 발현되는 것이 아니라 insoluble form의 단백질로 발현되는 경우가 빈번히 발생함으로써 재조합 단백질 생산 시 native 상태로 folding이 되지 못한 단백질들이 inclusion body를 형성하는 문제점을 가지고 있다. 이러한 외래 유전자의 발현에 대한 문제점을 해결하기

위해서 molecular chaperone (GroEL/ES, DnaK/DnaJ/GrpE 등)을 이용한 재조합 단백질의 folding을 촉진시키는 방법들이 제시되고 있다[25, 27, 28]. Chaperone 중 DnaK/DnaJ/GrpE의 경우 nascent polypeptide와 반응하여 비가역적인 응집을 막고, 부분적으로 folding을 촉진시키는 기능을 가지고 있으며[4, 24] GroEL/ES는 이미 folding된 단백질과 부분적으로 반응하여 folding을 보다 완벽하게 도와주는 역할을 한다[3, 12]. 이와 같은 molecular chaperone 들과의 co-expression은 단백질 folding에 관여하여 active form의 단백질 발현 증대에 영향을 미친다[5, 6, 10, 20]. 이 뿐만 아니라 folding 이외에

도 chaperone은 단백질의 응집, 안정성, heat response의 조절, 단백질의 분비 등에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[7, 11, 21].

본 연구에서는 아스타잔틴을 생합성하는 해양세균 *Paracoccus haeundaensis* [14]의 genomic DNA에서 분리한 카로티노이드 생합성 유전자군을 대장균에 형질전환시켜 대장균에서 아스타잔틴의 생합성을 유도하는 연구이다. 대장균에 외래 유전자인 카로티노이드 생합성 유전자군이 도입됨으로써 대장균에서 카로티노이드를 생합성 할 수 있으나 이들 외래 유전자들은 대장균에서 발현 시 inclusion body를 형성할 수 있어, 본 연구에서는 단백질 응집을 막고 안정적으로 folding할 수 있도록 도움을 줄 수 있는 molecular chaperone을 이용하여 활성형 형태의 효소 생산 증대를 유도하여 대장균에서 아스타잔틴의 생산량을 증대 시키는 연구를 진행하였다. 이러한 결과는 카로티노이드 비생산 균주에서 카로티노이드 및 아스타잔틴의 생산량 증대를 위한 기초 데이터를 제공할 것으로 기대되는 연구이다.

재료 및 방법

초고온성 archaea 유래 genomic DNA

Aeropyrum pernix K1는 지금까지 알려진 호기적 초고온성 Archaea 중 가장 높은 성장온도(각각 $T_{opt} = 90 \sim 95^{\circ}\text{C}$)를 나타내는 균주이며, *A. pernix* K1 유래 chaperonin의 shotgun clones (APE0907, NBRC No. G02-001-443 and G02-001-445)은 NITE Biological Resource Center (NBRC, Chiba, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

균주 및 재조합 plasmid

본 연구에서 사용한 숙주세포로는 *E. coli* BL21, Rosetta, Codon plus (DE3) [F-, *ompT*, rB-, mB-] 등이며, plasmid 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 DH5a (*sup44 Δlac U169 (ϕlacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 Tri-1 relA1*)이다. *E. coli* 숙주세포에서 초고온성 *A. pernix* K1 유래의 Archaea chaperonin A와 chaperonin B를 발현하기 위하여 *ApcpnA* (1,871 bp ORF)와 *ApcpnB* (1,665 bp ORF) 각각을 PCR로 증폭하여 발현용 vector, pET21a에 cloning 하였다. 이 때 사용한 primer는 table 1에 정리하였다. 또한, 대장균에서 아스타잔틴의 생합성을 위해서 사용된 plasmid는 앞선 연구에서 사용된 pCR-XL-TOPO-*Crt full* [16]를 사용하였다.

*E. coli*에서 외래 단백질과 chaperonin의 공발현

모델 단백질로써 porcine pancreas 유래 pro-carboxypeptidase (pro-CPB)를 발현하는 pET24a-Mpcb를 선택하였으며, 이는 T7 promoter에 의해 조절되고, kanamycin 내성 유전자를 함유하고 있다. Pro-CPB 발현을 위해 $OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$

(mid-exponential phase)일 때 $5 \mu\text{M}$ IPTG를 첨가하였고, IPTG에 의해 전사되지 않는 *ApcpnA* 최적·최대 발현을 위한 배양시간을 결정하기 위해 6~12시간 동안 10 ml LB tube에서 배양하였다. 그리고 공발현 시 *ApcpnA* 최대 발현 후 IPTG의 유도시간을 결정하기 위해 같은 조건으로 10 ml LB에서 배양하였다. *ApcpnB*의 경우 mid-exponential phase에서 pro-CPB와 함께 각각 0.5, 1 mM IPTG에 의해 조절되도록 하여 8시간 동안 10 ml LB tube에서 배양한 뒤, pro-CPB의 가용성 전환·발현 양상을 확인하였다. 또한, 대장균에 내에서 카로티노이드 생산을 위해서 위와 동일한 방법을 사용하였으며, pET24a-Mpcb plasmid를 대체하여 pCR-XL-TOPO-*Crt full* plasmid DNA를 형질전환시켜 chaperonin과 공발현 시켰다.

가용성과 비가용성 분획의 분리 및 SDS-PAGE 분석

E. coli 내 chaperonin의 유도적 발현 정도를 확인하기 위해 각각의 세포 배양액 10 ml을 원심 분리하여 균체 침전물만 분리하였다. *ApcpnA*의 경우는 buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 15 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA and 1 mM DTT)로 현탁하여, 초음파(Sonoplus HD2070, Bandelin, Germany)파쇄하였다. *ApcpnB*의 경우 buffer B (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 2% glycerol, 20 mM NaCl, 1 mM DTT)로 현탁하여, 초음파 파쇄를 하였다. 1 ml 파쇄 단백질을 2,500 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 상등액을 가용성(soluble) 분획, 침전물을 다시 1 ml의 상기 동등한 완충액에 재현탁하여 비가용성(insoluble) 분획으로 분리하였다. 재조합 chaperonin의 분자량과 발현 정도를 확인하기 위해 SDS-PAGE (12% gel)를 수행하였다. pro-CPB 발현 유무 확인을 위해서는 Western blot을 수행하여 분석하였다.

대장균에서 생합성된 카로티노이드의 추출 및 분석

대장균에서 생합성된 카로티노이드 분석을 위해 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 사용하였다. 형질전환된 대장균 균주에서 카로티노이드를 추출하기 위해 90% acetone으로 3분간 homogenizer 하여 카로티노이드를 추출하고, 13,000 rpm로 2분간 원심분리하여, 상등액만 주사기 필터($0.22 \mu\text{m}$ nylon filter)를 이용해 여과하였다. HPLC 분석을 위한 샘플로 20 μl 을 주입하고 분리시간은 30분 동안 진행하였다. HPLC는 Bio-Rad사의 Automated Biologic HR system (#750-0047)를 이용하였다. Column은 Nova-Pak HR 6 U C18 column ($3.9 \times 300 \text{ mm}$)을 사용하였고 column 온도는 40°C 이다. HPLC 작동 중 용매의 농도는 다음과 같다: 14% 0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 84% acetonitrile, 2% methanol (0-15 분); 68% methanol과 32% ethyl acetate (15~20분). Post-running은 10분간 이루어졌으며 사용된 용매의 농도는 시작할 때의 용매 농도와 같다. Column 내의 유속은 분당 1 ml이 되게 하였다[15, 23]. 분리된 각각의 카로티노이드들은 photo-

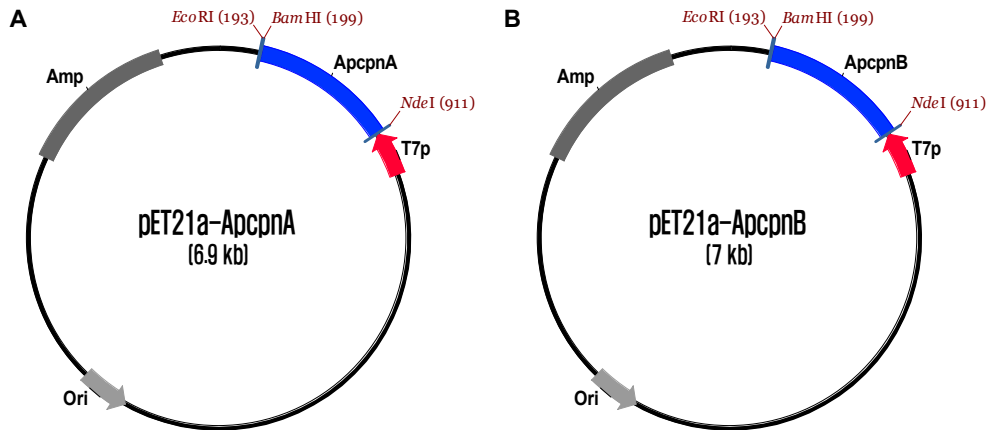


Fig. 2. Constructions of archaea chaperonin expression plasmid. (A) pET21a-*ApcpnA* carrying the archaea chaperonin A gene and (B) pET21a-*ApcpnB* carrying the archaea chaperonin B gene of *Aeropyrum pernix* K1.

diode array detector를 이용하여 absorption maxima인 470 nm에서 측정하여 표준물질과 비교 분석하였으며 astaxanthin, β -carotene, lycopene standard는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, zeaxanthin는 Roth Karlsruhe (Germany)에서 구입하여 사용하였다.

결과 및 고찰

초고온성 archaea chaperonin의 과발현 구축

ApcpnA, *ApcpnB* 유전자로 추정되는 ORF (open reading frame) 부분만을 PCR 증폭하여 pET21a vector에 cloning하여 pET21a-*ApcpnA* (6.9 kb)와 pET21a-*ApcpnB* (7 kb)로 재조합 DNA를 구축하였다. 그리고 *ApcpnA*, *ApcpnB* 전사는 T7 promoter에 의해 조절되며, ampicillin 내성 유전자를 함유하고 있다(Fig. 2). 형질전환체 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus/pET21a-*ApcpnA*, B를 LB배지에서 4~12시간 배양한 결과, *ApcpnA*, *ApcmpB*의 최적·최대의 발현을 위한 최적 유도시간은 각각 8시간으로 결정하였다. 또한 IPTG 유도에 따른 발현율은 0.5 mM IPTG 유도 때가 가장 높은 발현량을 보였다.

Archaea chaperonin과 모델단백질(pro-CPB)의 공발현

E. coli BL21 (DE3) Codon Plus에서 활성이 없는 내포체로 발현되는 procarboxypeptidase B (pro-CPB)를 가용성 형태로 생산하기 위해 *ApcpnA* 및 *ApcpnB*와의 공발현을 수행하였다. *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus/pET24a-Mpcb에서 pro-CPB의 단독발현을 위한 IPTG의 첨가시기는 mid-exponential phase에서 5 μ M IPTG로 첨가하였을 때 insoluble 분획에서 가장 많은 발현량을 보였으며, 이를 토대로 공발현계 함유 형질전환체 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus/[pET24a-Mpcb + pET21a-*ApcpnA* 및 pET21a-*ApcpnB*]를 배양 8시간 제 5 μ M IPTG 첨가한 후, 이때를 0으로 하여 8시간 유도하였다. Western blotting한 결과, pro-CPB (45.8 kDa)의 비가용성 분획의 발현

량이 줄어들었으며, 가용성으로의 전환에 따른 발현량도 증가된 것을 확인할 수 있었다. 두 chaperonin A와 B 중 가용성 pro-CPB의 발현량 증가는 chaperonin A가 보다 더 효과적인

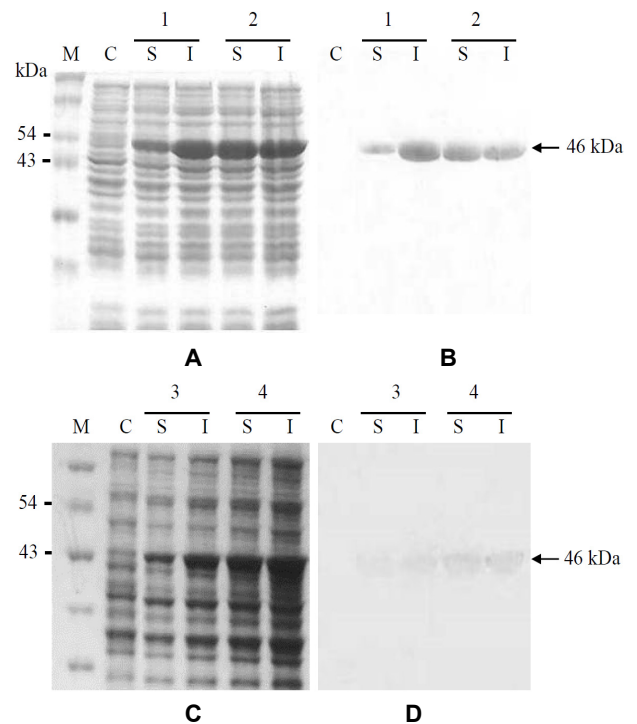


Fig. 3. Analysis of the expressed proteins using 12% SDS-PAGE and Western blot analysis. (A) and (C) The expressed proteins were analyzed using 12% SDS-PAGE. (B) and (D) Western blot analysis of the expressed proteins. M, standard protein molecular weight markers; C, proteins from uninduced cell extracts (control); S, soluble protein; I, insoluble protein; 1 and 3, the expression of procarboxypeptidase B (pro-CPB); 2, the co-expression of pro-CPB and archaea chaperonin A; 4, the co-expression of pro-CPB and archaea chaperonin B.

것으로 확인되었다(Fig. 3).

아스타잔틴 생합성 유전자군과 chaperonin의 공발현 및 카로티노이드 추출

모델 단백질의 가용성화 결과를 바탕으로 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus에서 카로티노이드 및 아스타잔틴 생산량 증대를 위해 pCR-XL-TOPO-*Crt full* plasmid와 chaperonin A (*ApcpnA*) 및 chaperonin B (*ApcpnB*)를 각각 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus에 형질전환하여 공발현 시켰다. *E. coli*에서 재조합 단백질의 비활성 단백질, 즉 inclusion body 형성을 최대한 감소 시키기 위해서 모델 시스템을 이용한 가용성 효소로 생산 조건의 결과를 토대로 동일한 조건의 chaperonin의 최적 발현 시간과 IPTG 농도를 적용하여 *E. coli*에서 카로티노이드

를 생산 하였다(Fig. 4).

*E. coli*에서 생산된 카로티노이드의 추출을 위해서 모든 실험은 4°C에서 진행하였다. 대조군과 형질전환체 배양액을 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액은 버리고 pellet (균체)만을 사용하였으며, homogenizer로 분쇄 후 아세톤과 에탄올(1:1, vol.) 혼합용매에서 1시간 교반 추출하였다.

공발현 시스템으로 발현된 카로티노이드의 분석

카로티노이드는 종류의 따라 각각 최대 흡수(absorption maxima) 파장대가 다르다. Phytoene의 경우 270-280 nm에서 absorption maxima로 보고 되었으며, 이를 제외한 나머지 카로티노이드인 lycopene, β-carotene, zeaxanthin, astaxanthin의 absorption maxima는 470 nm로 알려져 있다. 본 연구에서

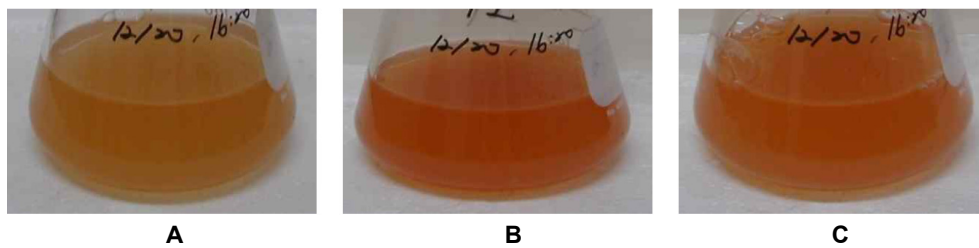


Fig. 4. Carotenoids production from recombinant *E. coli* on LB broth. (A) *E. coli* containing plasmid pCR-XL-TOPO-*Crt full* only; (B) *E. coli* containing pCR-XL-*Crt full* and pET-21a-*ApcpnA*; (C) *E. coli* containing pCR-XL-*Crt full* and pET-21a-*ApcpnB*.

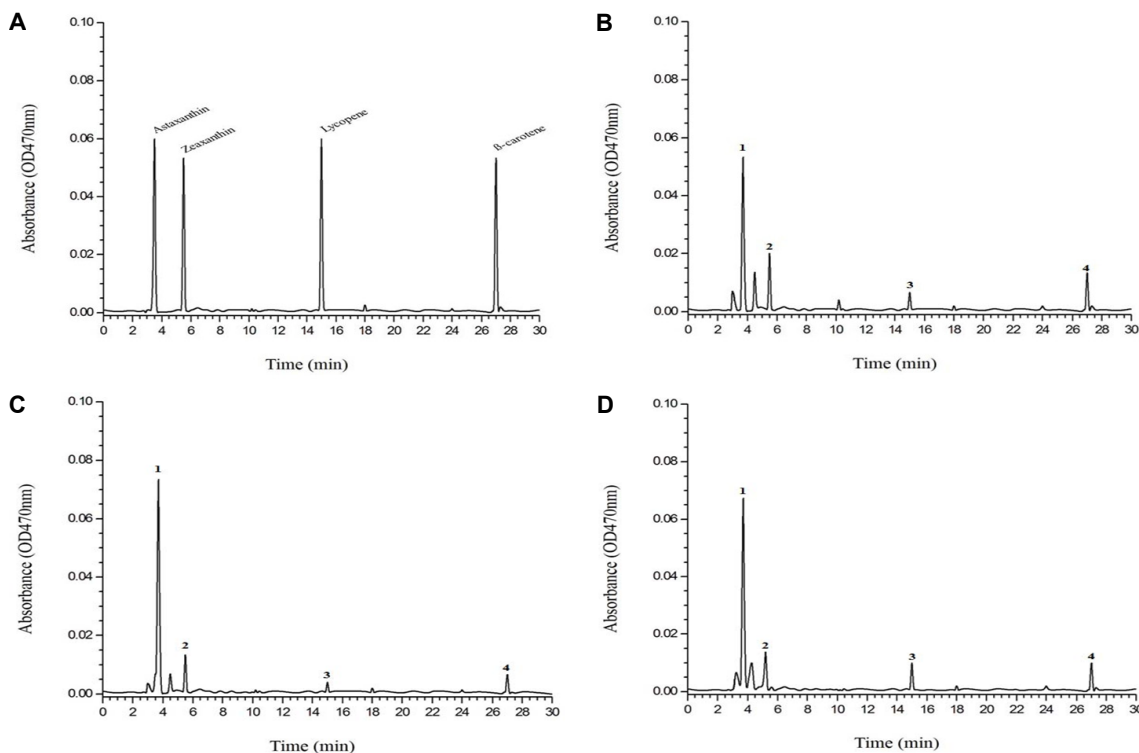


Fig. 5. HPLC analysis of carotenoids produced in *E. coli*. (A) Standard substrate; (B) *E. coli* containing plasmid pCR-XL-*Crt full* only; (C) *E. coli* containing pCR-XL-*Crt full* and pET-21a-*ApcpnA*; (D) *E. coli* containing pCR-XL-*Crt full* and pET-21a-*ApcpnB*. Peak 1, astaxanthin; Peak 2, zeaxanthin; Peak 3, lycopene; Peak 4, β-carotene.

Table 1. Comparison of produced carotenoids from the transformant cells with pCR-XL-TOPO-Crt full and archaea chaperonins (*ApcpnA* and *ApcpnB*)

Plasmids	Total carotenoids ($\mu\text{g/g DCW}^*$)	Astaxanthin ($\mu\text{g/g DCW}$)
pCR-XL-Topo-Crt full	639 (± 10)	400 (± 10)
pCR-XL-Topo-Crt full and <i>ApcpnA</i>	959 (± 10)	890 (± 10)
pCR-XL-Topo-Crt full and <i>ApcpnB</i>	877 (± 10)	500 (± 10)

*DCW is abbreviation of dry cell weight.

는 phytoene을 제외한 생산된 이들 카로티노이드에 대하여 HPLC 분석을 위하여 Fig. 5에서 나타낸 것처럼 표준물질과 추출된 카로티노이드를 각각 470 nm에서 측정하여 분석하였다. *E. coli*에서 생산된 카로티노이드의 정량을 위해서 검량선은 카로티노이드 표준물질(재료 및 방법 참조)을 제조한 다음, HPLC 분석을 통해 peak의 면적을 알아내어 농도 대 면적 비율에 따른 최소자승법을 이용하여 분석하였다.

Fig. 5는 pCR-XL-TOPO-Crt full plasmid가 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus에 chaperonin A (*ApcpnA*) 및 chaperonin B (*ApcpnB*)가 이입된 균주에서 생산된 카로티노이드의 생산량을 비교하기 위해서 HPLC 분석한 결과이다. Fig. 5 (A)는 카로티노이드 표준물질에 대한 분석 결과이며, Fig. 5(B)-(D)는 각각 pCR-XL-TOPO-Crt full plasmid, pCR-XL-TOPO-Crt full plasmid와 pET-21a-*ApcpnA*, pCR-XL-TOPO-Crt full plasmid와 pET-21a-*ApcpnB*가 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus에 생산된 카로티노이드의 분석 결과이다. 카로티노이드 표준물질 분석 결과 retention time 약 3분대에서 아스타잔틴 peak를 확인 할 수 있었고 retention time 약 5분, 15분, 27분 대에서 각각 zeaxanthin, lycopene, β -carotene의 peak를 확인 할 수 있었다. 나머지 공발현된 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus에서 각각의 카로티노이드가 같은 retention time에서 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이들로부터 생산된 카로티노이드 및 아스타잔틴의 생산량을 비교 분석하였으며, 이를 Table 1에 정리하였다. 이들 형질전환된 비카로티노이드 생산 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus에서 pCR-XL-TOPO-Crt full과 pET-21a-*ApcpnA* plasmid 공발현하는 숙주세포에서 가장 많은 카로티노이드를 생산하였으며 생산량은 959 $\mu\text{g/g DCW}$ (± 10)였으며, 카로티노이드 중 아스타잔틴 생산량은 890 $\mu\text{g/g DCW}$ 이었다. 이는 공발현되지 않고 카로티노이드 생합성 유전자군만 형질전환된 대장균 숙주에서 생산되는 astaxanthin의 생성량과 비교했을 때 약 2배 정도 생산량을 증대 시키는 결과를 도출하였다.

본 연구에서는 비카로티노이드 생산 균주인 *E. coli*에서 카로티노이드 생합성 유전자군과 이들을 활성형 단백질로 발현시키기 위한 chaperonin을 공발현 시켜 카로티노이드 생산량을 증대시키는 연구 결과를 도출하였다. 본 연구자들은 선행 연구에서 초고온성 archaea chaperonin을 이용하여 *E. coli*에서 가용성 lyase 발현량을 높이는 결과를 도출하였다[8]. 또한,

*E. coli*에서 카로티노이드의 생산량 증대를 위한 카로티노이드 전구물질을 생합성 유전자를 형질전환하여 카로티노이드의 생산량을 증대시키는 연구 결과를 도출하기도 하였다[16]. 카로티노이드는 산업적 유용성 때문에 대량 생산을 위한 다양한 연구를 진행하고 있으나 대부분이 단순히 생산 균주(예: *Haematococcus pluvialis*)를 이용한 생산량 증대 연구에 초점이 맞춰져 있다[2]. 이 이외에 카로티노이드 생합성에 관여하는 유전자군을 이용한 대사공학적인 연구 방법을 통하여 생산량 증대 연구가 진행되었다[15]. 그러나 대사공학적인 접근 방법으로 카로티노이드 생산량 증대 연구는 생산 균주를 이용한 카로티노이드 생산량 증대 연구에 비해 괄목할 만한 연구 결과를 도출하지 못하였다. 그 가장 큰 이유는 대장균 등의 숙주에서 외래 유전자를 발현 시킬 경우 inclusion body 형성에 따른 활성형 단백질이 생합성되지 못하기 때문이다.

본 연구에서는 카로티노이드 생합성 유전자군이 *E. coli*에서 발현될 시 활성형 효소로 folding되게 도움을 줄 수 있는 초고온성 archaea chaperonin을 공 발현 시킴으로써 *E. coli*에서 카로티노이드의 생산량을 2배 이상 증대 시키는 연구 결과를 도출하였다. 이는 비카로티노이드 생산 숙주에서 카로티노이드의 생산량을 향상 시킬 수 있는 결과로서 향후 대장균 등의 비카로티노이드 생산 숙주에서 대사공학적인 접근 방법에 의한 카로티노이드 생산 시 그 생산량을 향상 시킬 수 있는 기초 데이터를 제공할 수 있는 연구 결과로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부경대학교 자율창의기술연구비(2015년)에 의하여 연구되었음.

References

- Bartley, G. E. and Scolink, P. A. 1995. Pigment for photo-protection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7, 1027-1038.
- Bubrick, P. 1991. Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresour. Technol.* 38, 237-239.
- Gonzalez-Montalban, N., Carrio, M. M., Cuatrecasas, S., Aris, A. and Villaverde, A. 2005. Bacterial inclusion bodies are cytotoxic *in vivo* in absence of functional chaperones DnaK or GroEL. *J. Biotechnol.* 10, 406-412.

4. Gragerov, A., Nudler, E., Komissarova, N., Gaitanaris, G. A., Gottesman, M. E. and Nikiforov, V. 1992. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10341-10344.
5. Han, N. S. and Tao, B. Y. 1999. Enhancement of solubility of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase by thio-redoxin fusion. *Food Sci. Biotechnol.* **8**, 216-279.
6. Harker, M., Hirschberg, J. and Oren, A. 1998. *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange Gram negative coccus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **48**, 543-548.
7. Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.
8. Kim S. W., Kim, G. D. and Nam, S. W. 2015. Coexpression of alginate lyase with Hyperthermophilic archaea chaperonin in *E. coli*. *J. Life Sci.* **25**, 130-135.
9. Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N and Tsuji, Y. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 94-97.
10. Kondo, A., Kohda, J., Endo, Y., Shiromizu, T., Kurokawa, Y., Nishihara, K., Yanagi, H., Yura, T. and Fukuda, H. 2000. Improvement of productivity of active horseradish peroxidase in *Escherichia coli* by coexpression of Dsb proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 600-606.
11. Kwak, Y. H., Kim, S. J., Lee, K. Y. and Kim, H. B. 2000. Stress responses of the *Escherichia coli* groE promoter. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 63-68.
12. Kwon, M. J., Park, S. L., Kim, S. K. and Nam, S. W. 2002. Overproduction of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase in *E. coli* by coexpression of GroEL/ES chaperone. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 1002-1005.
13. Lee, J. H., Kim, Y. S., Choi, T. J., Lee, W. J. and Kim, Y. T. 2004. *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1699-1702.
14. Lee, J. H. and Kim, Y. T. 2006. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene cluster from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis*. *Gene* **370**, 86-95.
15. Lee, J. H., Seo, Y. B., Jeong, S. Y., Nam, S. W. and Kim, Y. T. 2007. Functional analysis of combinations in astaxanthin biosynthesis genes from *Paracoccus haeundaensis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **12**, 312-317
16. Lee, J. H., Seo, Y. B. and Kim, Y. T. 2008. Enhanced production of astaxanthin by metabolic engineered isoprenoid pathway in *Escherichia coli*. *J. Life Sci.* **18**, 1764-1770.
17. Lee, P. C. and Schmidt-Dannert, C. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 1-11.
18. Melis, A., Spangfort, M. and Andersson, B. 1987. Light absorption and electron transport balance between PSII and PSI in spinach chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* **45**, 129-136.
19. Miller, M., Yoneyama, W. M. and Soneda, M. 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **26**, 286-291.
20. Nishihar, K., Kanemori, M., Yanagi, H. and Yura, T. 2000. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 884-889.
21. Nishihar, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. and Yura, T. 1998. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694-1699.
22. Seo, Y. B., Kim, D. E., Kim, G. D., Kim, H. W., Nam, S. W., Kim, Y. T. and Lee, J. H. 2009. *Kocuria gwangalliensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2769-2772.
23. Seo, Y. B., Choi, S. S., Nam, S. W., Lee, J. H. and Kim, Y. T. 2009. Cloning and characterization of the zeaxanthin glucosyltransferase gene (crtX) from the astaxanthin-producing marine bacterium, *Paracoccus haeundaensis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1542-1546.
24. Szabo, A., Langer, T., Schroder, H., Flanagan, J., Bukau, B. and Hartl, F. U. 1994. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system-DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10345-10349.
25. Thomas, J. G., Ayling, A. and Baneyx, F. 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 197-238.
26. Tsubokura, A., Yoneda, H. and Mizuta, H. 1999. *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic Gram negative astaxanthin producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **49**, 277-282.
27. Wall, J. G. and Pluckthun, A. 1995. Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 507-516.
28. Wegryzn, R. D. and Deuring, E. 2005. Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2727-2738.
29. Yokoyama, A., Izumida, H. and Miki, W. 1994. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1842-1844.

초록 : 대장균에서 고세균 샤페론을 이용한 아스타잔틴 생산능 향상을 위한 연구

서용배^{1,2} · 이종규¹ · 정태혁³ · 남수원^{4*} · 김군도^{1*}

(¹부경대학교 미생물학과, ²부경대학교 수산과학대 수산과학연구소, ³목포대학교 해양수산자원학과, ⁴동의대학교 생명공학과)

본 연구는 카로티노이드 생합성 유전자군이 형질전환된 *Escherichia coli*에서 archaea chaperonin을 공발현 시킴으로 카로티노이드의 생산량을 증대시키는 것이 목표이다. 카로티노이드는 식물, 박테이라, 조류 등이 생합성하는 노란색, 오렌지색, 붉은색 계통의 색소로 이들은 식품 또는 양식 사료로 주로 이용되는 물질이다. 본 연구자들은 선행연구를 통하여 *Paracoccus haeundaensis*로부터 카로티노이드 유전자군을 cloning하였고 이들 유전자군의 생화학 및 효소학적 기능성을 분석하는 연구 결과와 카로티노이드 생합성 유전자군(*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ*, *crtW*, *crtX*)을 대장균에 형질전환하여 400 µg/g dry cell weight (DCW)의 아스타잔틴을 생산하는 연구 결과를 보고 하였다. 본 연구에서는 이들 유전자군과 archaea chaperonin을 공발현시켜 대장균에서 astaxanthin을 890 µg/g dry cell weight (DCW)로 생산하였으며, 이는 선행 연구된 결과 보다 약 2배 이상의 astaxanthin 생산량을 향상 시키는 연구 결과이다.