

## 대장균에서의 *Candida antarctica* lipase B 최적 발현

김 현 숙 · † 김 용 환  
광운대학교 공과대학 화학공학과  
(접수 : 2008. 7. 30., 게재승인 : 2008. 10. 7.)

### Functional expression of CalB in *E.coli*

Hyun Sook Kim and Yong Hwan Kim†  
Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea  
(Received : 2008. 7. 30., Accepted : 2008. 10. 7.)

*Candida antarctica* lipase B (CalB) is an efficient biocatalyst for many organic synthesis reactions. To make full use of CalB, we need effective expression system. Previously recombinant CalB was successfully expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. In addition, we succeed in the functional expression of CalB in the *Escherichia coli* cytoplasm. This CalB expression system in *E.coli* has many considerable advantages in comparison with other expression systems and enables high-throughput screening of gene libraries as those derived from directed evolution experiments. To optimize *E.coli* system, we investigate comparing between *OrigamiB* (DE3) and *BL21* (DE3) and observing effect of IPTG amount.

**Key Words** : Lipase, *Candida antarctica* lipase, *OrigamiB*, cold-shock promoter

#### 서 론

Lipase (EC 3.1.1.3)는 식물유의 에스테르 결합을 가수분해하여 글리세롤과 지방산을 만드는 반응을 촉진한다. 이 효소는 동물의 췌장에서 처음 발견되었고, 동물, 식물, 곰팡이, 박테리아 등 생물계 전반에 존재함이 알려졌다. 현재 lipase는 세제, 유지 분해, 식품 첨가제, 의학, 정밀화학 등을 포함하는 여러 산업분야에서 유용하게 사용되고 있다(1).

그 중 *Candida antarctica* lipase B (CalB)는 많은 화학 반응을 촉매하는 유용한 효소로서, esterification, transesterification, hydrolysis, aminolysis, stereoselective transformation 그리고 폴리에스터 합성 등을 한다. 또한 CalB는 다른 효소와 다르게 유기용매에서 안정하며, 특히 2차 알코올에 대한 높은 enantioselectivity를 가지는 점 때문에 CalB는 생명공학기술 분야에서 매우 중요한 lipase중에 하나가 되었다(2).

이제까지 반응을 촉매하는 능력을 갖는 많은 효소들이 광범위한 스크리닝에 의해 밝혀졌다. 그러나 대부분의 경우 주어진 효소의 특징은 원하는 반응에 충분치는 않기 때문에, 원하는

특성을 갖는 효소를 만드는 것이 생명공학 산업의 과제 중에 하나이다. 이에 따라 효율적인 발현 시스템은 유전자의 방향적 진화 (directed evolution)나 합리적 디자인 (rational design)을 하기 전에 미리 확립되어야 한다.

CalB에 대한 많은 연구가 활발하게 진행된 결과, 여러 가지 발현 시스템이 발표된 바 있다. 산업용도로 대량 생산이 목적인 *Aspergillus oryzae* (Hoegh et al. 1995), 연구 응용이 목적인 효모균 *Pichia pastoris* (Rotticci-Mulder et al. 2001), 그리고 *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang et al. 2003)이 대표적인 발현 시스템이다. 특히 최근 발표된 *E.coli*에서의 발현 (Schmid et al. 2006)은 바람직한 특성을 갖는 효소를 스크리닝하거나, 선별된 변이체들의 특성을 확인하는 데에 소요되는 시간과 비용을 단축시켜 줄 것이다.

재조합 단백질 발현에 있어서 발현 시스템의 확립과 동시에 중요한 것이 발현 조건 및 환경이다. 그 중에서 유도체의 영향은 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 *E.coli* 발현 시스템에서는 유도체의 영향이 매우 중요하다. *E.coli* 균주에서 단백질을 생산할 경우, 유도체의 농도에 따라서 단백질의 접힘 구조가 잘못되어 불활성 또는 불용성의 단백질을 생산할 가능성이 높기 때문이다.

따라서 본 연구에서는 *E.coli* 균주 종류와 IPTG 투여양에 따른 CalB의 효과적인 발현양상을 비교하여 최적 발현 조건을 탐색하였다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea  
Tel : +82-2-940-5675, Fax : +82-2-941-1785  
E-mail : metalkim@kw.ac.kr

## 재료 및 방법

이 실험에서 사용된 OrigamiB 균주는 Novagen (70837), BL21 균주는 RBC (RH217), pCold 플라스미드는 TaKaRa (3360)에서 구입하여 사용하였다. 기타 화학물질들은 BD, Duchefa, Novagen, Bio-rad, PIERCE 그리고 Sigma-Aldrich에서 구입하여 전처리 없이 사용하였다.

### 유전자 클로닝 및 형질전환

Lipase B의 크기는 33 kDa으로 317개의 아미노산으로 구성되어있으며, *E. coli* codon usage에 근거하여 합성된 유전자를 사용하였다(3). 이 CalB는 pCold 플라스미드에 재조합되어, pCold-CalB의 형태로 각각 OrigamiB (DE3)와 BL21 (DE3)에 형질전환 하였다.

### 플라스미드의 재조합

OrigamiB (DE3)와 BL21 (DE3)에 형질전환하기 위해서 Fig. 1과 같이 pCold 플라스미드와 CalB를 재조합하였다. pCold 플라스미드는 *E. coli* 균주로부터 유래한, cold-shock 단백질을 코딩하는 cspA 유전자 (cold-shock protein)를 기본으로 구성되어, cspA 프로모터, TEE를 포함하고 있다. TEE (translation-enhancing element)란 단백질의 번역을 촉진하는 서열을 말한다. 제한효소 NdeI과 EcoRI를 사용하여, 정방향 프라이머인 5'-GCGC CATATG CTA CCT TCC GGT TCG GAC CCT-3' (31 mer)과 역방향 프라이머인 5'-GCGC GAATTC TCA GGG GGT GAC GAT GCC GG-3' (30 mer)를 사용하였다.

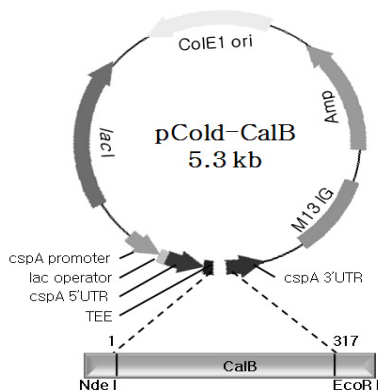


Figure 1. Construction of the plasmid.

### 균주의 배양 및 유도

균주는 250 ml 플라스크에서 LB-A배지 50 ml에 미리 배양된 3 ml를 접종하여 37°C, 200 rpm에서 O.D 0.4~0.6까지 배양하고, 얼음에서 30분간 방치한 후 (cold-shock), 0.05~1.0 mM IPTG로 유도하여 15°C, 200 rpm에서 24시간 배양하였다.

배지는 25 mg/ml Ampicillin이 포함된 Luria-Bertani 배지를 사용하였다.

### 균주의 회수

배양 및 유도가 끝난 배양액 50 ml는 4500 rpm에서 15분간 원심분리한 후, cell pellet을 BugBuster® Master Mix (Novagene) 2.5 ml로 현탁시켰다. 현탁액을 상온에서 10~20분 정도 회전배양

한 후, 불용성 cell debris를 제거하기 위해, 4500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후에 얻어진 상등액을 회수하였다.

### 효소의 활성 측정

효소의 활성은 p-nitro phenyl palmitate의 가수분해로 측정하였다. 에탄올 4%, 10 mM p-nitro phenyl palmitate 1%, 50 mM Tris-HCl 95%로 구성된 반응용액 3 ml과 회수된 단백질 상등액 10  $\mu$ l로 45°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 반응액을 UV-spectrophotometer를 이용하여 O.D<sub>405nm</sub>에서 관찰하였다.

### SDS-PAGE

10% SDS, 30% acrylamide mix, 10% ammonium persulfate, 1.5 M Tris buffer의 SDS-PAGE용 겔을 제조한다. 회수된 단백질 상등액을 전압 30 mA에서 100분간 전기영동 한다. 전기영동을 마치고 coomassie brilliant blue가 포함된 용액으로 염색한 후, coomassie brilliant blue가 포함되지 않은 용액으로 탈색하였다.

### Western Blot

SDS-PAGE와 동일한 방법으로 전기영동한 겔에서 stacking 겔 부분을 제거시킨다. stacking 겔이 제거된 running 겔을 transfer 장치에 놓고, 전압 100 V에서 100분간 membrane (Nitrocellulose transfer membrane)에 transfer시킨다. transfer된 membrane을 5% skim milk로 60분간 blocking시킨다. 0.1% tween 20이 포함된 PBS buffer로 세척한 후, 5% skim milk에 녹인 1차 rabbit polyclonal anti-CalB(Peptron)로 60분간 반응시킨다. 0.1% tween 20이 포함된 PBS buffer로 세척하고, 5% skim milk에 녹인 2차 alkalinephosphatase-labeled goat-anti-rabbit로 60분간 반응시킨다. 반응이 끝난 membrane을 1-Step™ NBT/BCIP (Bio-rad)로 반응시켜 염색성을 관찰한다.

## 결과 및 고찰

CalB의 신속한 스크리닝 및 변이체 확인을 위한 *E. coli* 발현 시스템 중, 발현용 균주로 대표적인 BL21과 CalB의 단백질 구조 형성을 도와주는 OrigamiB에 관하여 분석하였다.

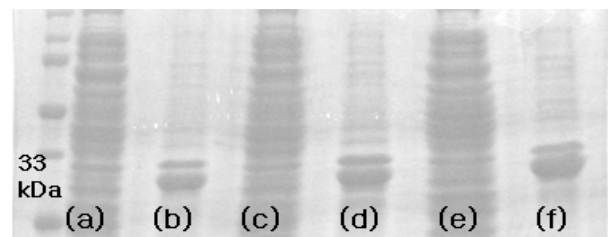


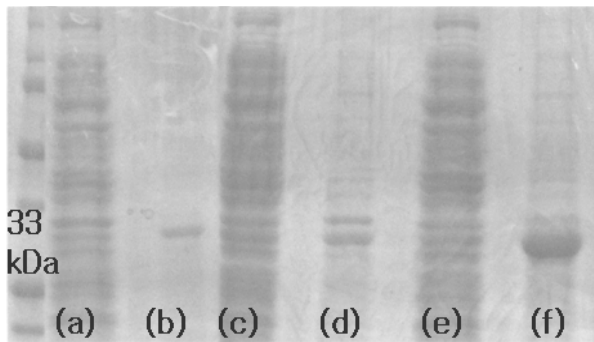
Figure 2. SDS-PAGE separation of soluble(S) and insoluble(I) fractions obtained from expression of CalB in BL21 (DE3).

(a) 0.05 mM IPTG(S), (b) 0.05 mM IPTG(I), (c) 0.5 mM IPTG(S), (d) 0.5 mM IPTG(I), (e) 1.0 mM IPTG(S), (f) 1.0 mM IPTG(I).

*E. coli* 균주에서 Lipase의 기능적인 발현이 어렵기 때문에 불용성 단백질 생산을 극복하기 위하여 IPTG의 농도를 조절하였다. 그 결과 Fig. 2~3에서 보이듯이 예상대로 많은 양의 불용성의 inclusion body를 형성하였다. BL21에서 발현된 CalB는 IPTG

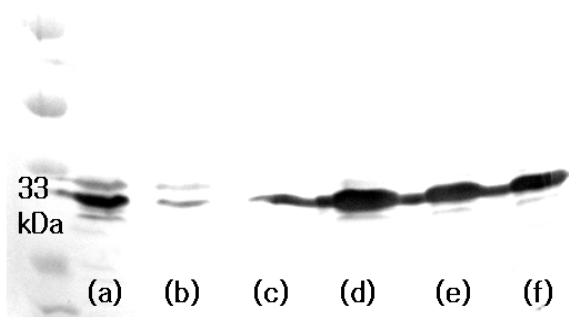
의 농도에 관계없이 불용성의 inclusion body를 형성함을 보였고(Fig. 2), 반면 OrigamiB에서 발현된 CalB는 IPTG의 농도에 따라 inclusion body 형성의 차이를 보였다. IPTG의 농도 0.05 mM에 비해 1.0 mM일 때, 불용성의 inclusion body를 많이 형성하였다(Fig. 3).

보통 *E.coli* 발현 시스템에서 유도체로 쓰이는 IPTG의 최적 농도는 0.1 mM~0.2 mM 이다. T7 polymerase를 가지고 있는 lysogenic strain의 경우, IPTG의 유도작용이 없을 때에도 T7 polymerase의 약한 발현이 있기 때문에 미량의 IPTG 첨가도 T7 polymerase를 개시하기에 충분하다.



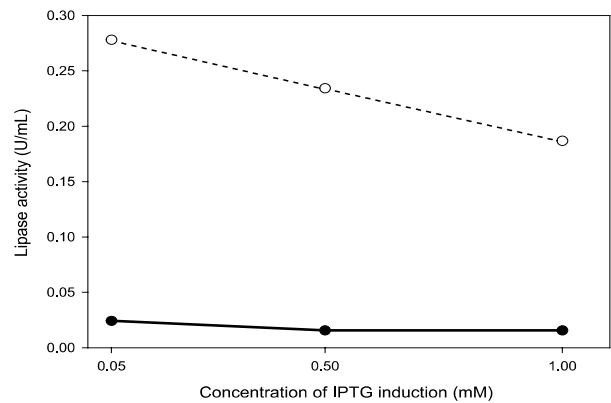
**Figure 3.** SDS-PAGE separation of soluble(S) and insoluble(I) fractions obtained from expression of CalB in OrigamiB (DE3). (a) 0.05 mM IPTG(S), (b) 0.05 mM IPTG(I), (c) 0.5 mM IPTG(S), (d) 0.5 mM IPTG(I), (e) 1.0 mM IPTG(S), (f) 1.0 mM IPTG(I).

*E.coli* 발현 시스템을 통하여 생산된 단백질을 세포로부터 회수하는 과정에서 *P.pastoris* 균주는 플라스미드내에 존재하는  $\alpha$ -factor signal sequence로 인하여 단백질이 세포 밖으로 분비가 되는 반면에, *E.coli* 균주는 분비가 되지 않기 때문에 세포를 파쇄하는 과정이 필요하다. 세포의 파쇄 시 lipase 이외에 다른 불필요한 단백질들이 섞이게 되어 별도의 정제가 필요하다. Fig. 3~4에서 보이듯이 용해성 단백질부분에서는 여러 가지 단백질이 섞여있어 CalB의 위치가 잘 나타나지 않기 때문에, Western Blot을 통하여 CalB를 확인할 수 있었다. 확인한 결과 가장 높은 농도를 보이는 것은 0.05 mM IPTG를 OrigamiB (DE3)에 투여한 것이다(Fig. 4).



**Figure 4.** Western Blot of soluble fractions obtained from expression of CalB in BL21 (DE3) and OrigamiB (DE3). (a) 0.05 mM IPTG, (b) 0.5 mM IPTG, (c) 1.0 mM IPTG [BL21 (DE3)], (d) 0.05 mM IPTG, (e) 0.5 mM IPTG, (f) 1.0 mM IPTG [OrigamiB (DE3)].

균주와 IPTG의 농도에 따라 효소의 활성 또한 차이를 나타냈다. Fig. 5에서 보이듯이 Lipase의 가수분해 활성 측정 결과, BL21에서 발현된 CalB는 IPTG의 농도와 무관하게 거의 활성을 나타내지 않았다. 반면에 OrigamiB에서 발현된 CalB는 IPTG의 농도에 따라 차이가 나타났다. IPTG의 농도가 증가함에 따라 활성은 감소함을 보이는데, 이는 불용성의 inclusion body형성과 관계가 있는 것으로 생각된다. IPTG의 농도가 증가할수록 많은 단백질이 생산되기 때문에 단백질이 정상적으로 구조 형성을 하기도 전에 서로 응집되어 불용성의 inclusion body가 형성되어 활성이 있는 단백질의 생성을 저해하기 때문으로 판단된다(4).



**Figure 5.** Activity of CalB according to IPTG induction concentration. (○ : OrigamiB (DE3), ● : BL21 (DE3))

*E.coli* 균주에서 lipase와 같은 단백질을 생산하는 것은 세포 환경, 접힘구조 형성, 그리고 진핵생물과는 다른 원핵생물의 단백질 구조를 형성하는 조절장치 등의 이유로 매우 도전적인 과제이다.

*E.coli* 발현 시스템과 비교하여 *P.pastoris* 발현 시스템의 또 다른 장점은 번역 후 수식 (post-translational modification)이 가능하기 때문에 단백질 내에서 이황화결합을 생성 할 수 있고, 당화 (glycosylation)가 가능한 것이다. 그리하여 단백질 내에 이황화결합이 존재하는 경우에는 특히 *P.pastoris*를 생산균주로 사용한다. *E.coli* 발현 시스템에서는 단백질의 접힘구조가 잘못 되어 불활성 또는 불용성의 단백질을 생산할 가능성이 높다.

이 결과에서도 알 수 있듯이, BL21에서는 CalB의 기능적 발현이 전혀 되지 않고 있다. 반면에 OrigamiB에서는 CalB가 기능적으로 발현됨을 알 수 있다.

*E.coli* 균주 중에서 유전자 thioredoxin reductase (*trxB*)와 glutathione reductase (*gor*)이 변이된 OrigamiB 균주는 산화환경을 형성하여 세포질 내에서 이황화결합이 환원되어 파괴되는 것을 방지한다. 따라서 CalB내에 존재하는 세 개의 이황화결합의 형성을 가능하게 하여 세포질 내에서 단백질 구조를 잘 형성하게 한다(5).

기존 대부분의 *E.coli* 발현 시스템은 37°C에서 빠른 속도로 단백질을 유도하기 때문에, 단백질이 생성은 빠르게 되지만 단백질 구조가 바르게 형성되지 못하고 응집되어 불활성 또는 불용성의 inclusion body를 형성하게 된다. pCold 플라스미드는 cold-shock 프로모터인 *cspA*를 사용하여 15°C의 낮은 온도에서 서서히 유도를 함으로써 단백질 구조가 바르게 형성될 수 있는 충분한 시간이 있기 때문에, *E.coli* 발현에서 문제가

되는 불용성의 inclusion body 형성을 감소시켜준다. 또한 cspA 프로모터에서의 전사는 37°C에서도 이루어지지만, cspA 5'UTR이 37°C에서는 불안정하므로 번역이 효율적으로 이루어지지 않는다. 따라서 15°C에서 유도하면 cspA 5'UTR의 구조가 안정되어, 효율적으로 단백질의 합성이 이루어진다(6).

*E.coli* 발현 시스템은 대량생산이 가능한 *S.cerevisiae* 발현 시스템보다 더 많은 이점을 가지고 있다. 비용이 저렴하며 다루기에 용이하고, 하루에 스크리닝할 수 있는 양이 훨씬 더 많다. *S.cerevisiae* 발현 시스템이 발현하는 데에 약 9일이 걸리는 반면, *E.coli* 발현 시스템은 약 2일이면 충분하다. 그러므로 *E.coli* 발현 시스템은 바람직한 특성을 갖는 CalB를 스크리닝하거나, 선별된 변이체들의 특성을 확인하는 데에 적합하다. CalB는 현재 생명공학분야에서 중요한 효소 중에 하나이기 때문에, 앞으로의 여러 연구를 통해 최적화된 *E.coli* 발현 시스템으로 유용한 특성을 지닌 CalB를 선별해낼 수 있을 것이다.

## 요 약

생명공학분야에서 매우 중요한 효소 중에 하나인 lipase는 여러 산업에 유용하게 사용되고 있다. lipase를 선별하기 위해서는 최적화된 발현 시스템이 필요하다. 많은 발현 시스템 중에 *E.coli* 발현 시스템은 바람직한 특성을 갖는 효소를 스크리닝하거나, 선별된 변이체들의 특성을 확인하는 데에 소요되는 시간과 비용을 단축시켜 줄 것이다. 본 연구에서는 그 중에 BL21와 OrigamiB에서 CalB를 발현하였다. 그 결과 BL21 균주에서 발현된 CalB는 대부분이 불용성의 inclusion body를 형성하고, 전혀 활성을 나타내지 않았다. 이전의 타 연구와 더불어 이 결과에서 *E.coli* 균주에서 CalB의 기능적 발현이 상당히 어렵다는 것을 알 수 있다. 특히 불용성의 inclusion body형성과 lipase의 세포에 대한 유독성이 원인이 될 수 있다. 그러나 BL21와 비교해보면, OrigamiB에서 발현된 CalB 또한 많은 양의 inclusion body를 형성하지만, lipase의 주요 특성중의 하나인 가수분해 활성이 상당히 나타나 있는 것을 알 수 있다. lipase의 구조 형성을 도와주는 변형된 OrigamiB와 저온유도시스템인 pCold 플라스미드를 사용했기 때문이다. 이처럼 균주나 플라스미드의 선택, 유도조건의 변경 등의 여러 연구를 통하여 유용한 효소를 선별할 수 있다.

## 감 사

본 연구는 지식경제부 차세대 산업기술개발사업 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Taipa, M. A., Aires-Barros, M. R., and Cabral, J. M. (1992), Purification of lipases, *J. Biotechnol.* **26**, 111-142.
2. Liu, D., Schmid, R. D., and Rusnak, M. (2006), Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 1024-1032.
3. Jung, S. and Park, S. (2008), Improving the expression yield of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by mutagenesis, *Biotechnol. Lett.* **30**, 717-722.
4. Cha, H. J., Srivastava, R., Vakharia, V. N., Rao, G., and Bentry, W. E. (1999), Green fluorescent protein as a noninvasive stress probe in resting *Escherichia coli* cells, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 409-41.
5. Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A., and Beckwith, J. (1997), The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm, *J. Biol. Chem.* **272**, 15661-15667.
6. Qing, G., Ma, L. C., Khorchid, A., Swapna, G. V. T., Mal, T. K., Takayama, M. M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H., Acton, T., Montelione, G. T., Ikura, M., and Inouye, M. (2004), Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* **22**, 877-882.
7. Blank, K., Morfill, J., Gump, H., and Gaub, H. E. (2006), Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* **125**, 474-483.
8. Kleber-Janke, T. and Becker, W. M. (2000), Use of modified BL21 (DE3) *Escherichia coli* cells, *Protein Expr. Purif.* **19**, 419-424.
9. Hoegh, I., Patkar, S., Halkier, T., and Hansen, M. T. (1995), Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*, *Can. J. Bot.* **73**, 869-875.
10. Rotticci-Mulder, J. C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K., and Martinelle, M. (2001), Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain, *Protein Expr. Purif.* **21**, 386-392.
11. Zhang, N., Suen, W. C., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V., and Zaks, A. (2003), Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution, *Protein Eng.* **16**, 599-605.
12. Mitta, M., Fang, L., and Inouye, M. (1997), Deletion analysis of cspA of *Escherichia coli* requirement of the AT-rich UP element for cspA transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction, *Mol. Microbiol.* **26**, 321-335.
13. Xia, B., Etcheagaray, J. P., and Inouye, M. (2001), Nonsense Mutations in cspA Cause Ribosome Trapping Leading to Complete Growth Inhibition and Cell Death at Low Temperature in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **276**, 35581-35588.