

# *Pichia pastoris*와 *Escherichia coli*를 이용한 *Candida antarctica* Lipase A의 기능적 발현

박혜정 · 김용환\*  
광운대학교 화학공학과

## Functional Expression of *Candida antarctica* Lipase A in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*

Park, Hye-Jung and Yong Hwan Kim\*

Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea.

**Abstract** *Candida Antarctica* lipase A (CaA) has been used because of its suitability in industrial applications. CaA has unique features capable to accept tertiary and sterically hindered alcohols among many hydrolases. CaA gene was cloned and constructed in expression vector such as pColdIII/CaA and pPICZαA/CaA. The gene encoding pColdIII/CaA was functionally expressed in the cytoplasm of *Escherichia coli* Origami™ B (DE3) cells. The plasmid pPICZαA/CaA linearized by *Bst*X I was integrated into 5'AOX1 region of the chromosomal DNA and was functionally expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Expressed CaA in *P. pastoris* (0.7 Unit/mL) showed 35 times higher activity than that in *E. coli* expression system (0.02 Unit/mL).

**Keywords:** *Candida antarctica* lipase A, *P. pastoris*, *E. coli*, AOX 1

### 서 론

Lipase (E.C 3.1.1.3)는 지질 (lipid)을 글리세롤과 지방산으로 가수분해하는 효소로서 1980년 중반 이래 triacylglycerol lipase의 단백질공학기술 (protein engineering)이 발전하면서 세제, 유기합성, 제지산업 등의 산업분야에 응용되었다(1, 2). 일반적으로 가수분해효소는 chiral substrates를 2차 알코올과 1차 알코올로 분해한다. 반면 *Candida antarctica* 유래 lipase A 가수분해효소는 불리한 원자의 공간적 배치로 기인한 입체장애에도 불구하고 3차 알코올로 분해한다고 보고되었다(3). 또한 가수분해 반응의 역반응인 에스테르화반응에서 lipase A만이 Sn2 위치에서 촉매 역할을 수행한다.

이러한 lipase A의 기능적 발현을 위해 효율적이고 경제적인 유전자 재조합 기술 및 발현시스템의 선정은 이 단백

질의 발현양과 활성여부에 큰 영향을 미친다. 현재 재조합 유전자의 발현 및 생산을 위해 주로 쓰이는 숙주는 대장균, 효모, 곰팡이, 동물세포 등이다. 특히 대장균 (*Escherichia coli*)에서의 외래유전자 발현은 다양하게 개발된 프로모터 (promoter), 값싼 배지, 빠른 성장 속도 등의 이점으로 인해 가장 많이 적용되는 발현시스템 방법이다(4). 그러나 황화물 결합 (disulfide bond) 형성 및 당화 (glycosylation)와 같은 번역 후 수식 (posttranslational modification) 과정이 없고, 대장균 내에서 발현된 목적 단백질이 내포체 (inclusion body) 형태로 비활성화되기도 하는 단점을 가지고 있다.

메탄올 자화 효모 (methylotrophic yeast)인 *Pichia pastoris*는 높은 발현율과 분비작용 (secretion)으로 분리가 용이하다는 장점을 가지고 있어 용해성 (soluble) 단백질의 발현 시스템으로 선호되고 있다. 즉, 외래유전자를 숙주세포 발현계의 염색체 DNA에 삽입시킬 수 있어 발현계의 안정성이 높아지고, 고농도 세포배양 시 발생되었던 단백질 발현을 저하를 막을 수 있다. 강력한 메탄올 유동성의 alcohol oxidase 1 (AOX1) 프로모터를 이용함으로써 외래단백질의 대량생산에 유리하다. 또한 진핵세포로서 고등생물 유래의

### \*Corresponding author

Tel: +82-2-940-5675, Fax: +82-2-941-1785  
e-mail: metalkim@kw.ac.kr

유전자와 전사 및 번역 시스템이 유사하여 스플라이싱(splicing)을 통한 인트론(intron)의 제거와 고등동물의 골지체와 유사한 분비기관을 갖추고 있어, 번역 후 수식을 통해 활성형 단백질을 생산, 분비할 수 있다(5, 6, 7). 최근 *P. pastoris*에서 *Chaetomium thermophilum* 유래 glucoamylase(8), Human ScFv against Botulinum Neurotoxin A(9), manganese lipoxigenase (30 mg/L)(10), *Aspergillus niger* 유래 phytase (65 unit/mL)(11)등의 외래 단백질이 성공적으로 발현되었다. 이에 본 연구는 *C. antarctica* 유래의 lipase A (CalA)를 *P. pastoris*와 *E. coli*에서 발현을 시도하였고, 각 경우의 발현시스템으로서의 유용성 여부에 대하여 비교분석하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

제한효소 (Takara, Japan), HS LA Taq (Takara, Japan), 리가아제 (New England BioLabs, USA)가 사용되었으며, electroporation을 위해서 Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 숙주는 *E. coli* Origami™ B (DE3) (Novagen, Germany), *P. pastoris* X-33 (Invitrogen, USA)이 사용되었으며, 발현벡터는 pColdIII (Takara, Japan), pPICZαA (Invitrogen, USA)가 사용되었다.

### 유전자 클로닝

*Candida antractica* ATCC 32657 유래 lipase A (CalA)를 얻기 위해 YPD 액체배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)에서 180 rpm, 30°C에서 3일간 배양한 후, 유리 bead (0.75~1.00 mm)를 이용해 세포를 깨고 원심분리

를 하여 추출했다. Gemonic DNA를 추출 한 후, Table 1에서와 같이 *Nde I/EcoR I* 제한효소가 포함된 primer와 *EcoR I/Not I* 제한효소가 포함된 primer를 각각 이용하여 PCR를 수행하였다.

### pColdIII/CalA의 형질전환 및 발현

구축된 pColdIII/CalA는 ampicillin (100 µg/mL)이 함유된 LB (10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract, 15 g/L agar) 고체배지를 이용하여 *E. coli* OrigamiB (DE3)에서 형질전환 및 선별이 수행되었다. 선별된 형질 전환체를 50 mL LB<sub>amp</sub> 액체배지에서 접종하였고, OD<sub>600</sub> 값이 0.6-1.0에 도달할 때까지 배양한 후, 30분 동안 15°C에서 cold shock을 주었고 IPTG의 최종농도를 0.01-10 mM로 유도 (Induction)하여 15°C에서 24시간 동안 발현하였다.

### pPICZαA/CalA의 형질전환 및 발현

구축된 pPICZαA/CalA, pPICZαA/CalA-his×6는 *BstX I*으로 절단하여 선형화한 후 eletroporation방법으로 *P. pastoris* X-33 숙주세포의 genome *AOX1* region에 integration시켰다. 형질전환체를 zeocin (100 µg/mL)이 함유된 YPDS (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1 M sorbitol, 2% agar)고체배지에서 선별하였고 50 mL의 BMMY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate pH 6, 1.34% YNB, 4 × 10<sup>-5</sup>% biotin, 0.5% methanol)배지로 28°C에서 20시간 동안 배양한 후, 5% (v/v) methanol를 첨가하여 유도한 후 24시간 동안 발현하였다.

### 활성 측정

본 연구에서 Cal A의 활성은 pNPP (p-nitrophenyl

**Table 1.** Overview of primers used for the amplification of the lipase A gene

Host cell	Restriction site	Primers	Function
<i>E.coli</i> Origami B (DE3)	<i>Nde I / EcoR I</i>	eCalA-N- <i>Nde I</i> 5'-GCGCCATATGGCGGCTGCCCAACCCCTACG-3'	Cloning into pColdIII
		eCalA-C- <i>EcoR I</i> 5'-GCGCGAATTCCTAAGGTGGTGTGATGGGGCCAAAGG-3'	
<i>P.pastoris</i> X-33	<i>EcoR I / Not I</i>	pCalA-N- <i>EcoR I</i> 5'-GCGCGAATTCGCGGCGCTGCCCAACCCCTACG-3'	Cloning into pPICZαA
		pCalA-C- <i>Not I</i> 5'-GCGCGCGGCCGCGCTAAGGTGGTGTGATGGGGCCAAAGG-3'	
		pCalA-C- <i>Not I</i> (+His taq××6) 5'-GCGCGCGGCCGCGAGGTGGTGTGATGGGGCCAAAGG-3'	

palmitate)를 기질로 선택하여 측정하였다. *P. pastoris*에서 발현된 CalA 시료를 회수하기 위해 5000 g로 원심분리한 후 상등액을 채취하였다. 반면 *E. coli*에서 발현된 CalA 시료를 회수하기 위해 먼저 5000 g로 원심분리한 후 상등액을 제거하고, bugbuster (2.5 mL/50 mL broth, Novagen, USA)를 첨가하여 재현탁하고 다시 원심분리한 후 상등액을 채취하였다. 각 채취된 시료 10  $\mu$ L를 pNPP reaction solution (10 mM para-nitrophenyl palmitate : EtOH : 50 mM Tris-HCl = 95 : 4 : 1, pH 8.0) 3 mL에 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu 1650PC, Japan)를 사용하여 OD<sub>405</sub> 값을 측정하였다. 1 Unit는 45°C에서 1분 동안 pNPP를 가수분해하여 1  $\mu$ mol의 pNP (p-nitrophenol)을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

milk/100 mL PBS buffer) 용액에서 1시간 동안 배양하였다. PBS-T (0.1% (v/v) tween20/PBS buffer) 용액으로 3회 세척 한 후, 토끼로부터 생산된 1차 anti-lipase A (Peptron, Korea)와 2차 anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, USA) 용액을 순차적으로 가하여 각각 상온에서 1시간 동안 면역반응을 진행하였다. 다시 PBS-T 용액으로 3회 세척 한 후, NBT/BCTP 반응용액 (Thermo, USA)을 가하여 밴드를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

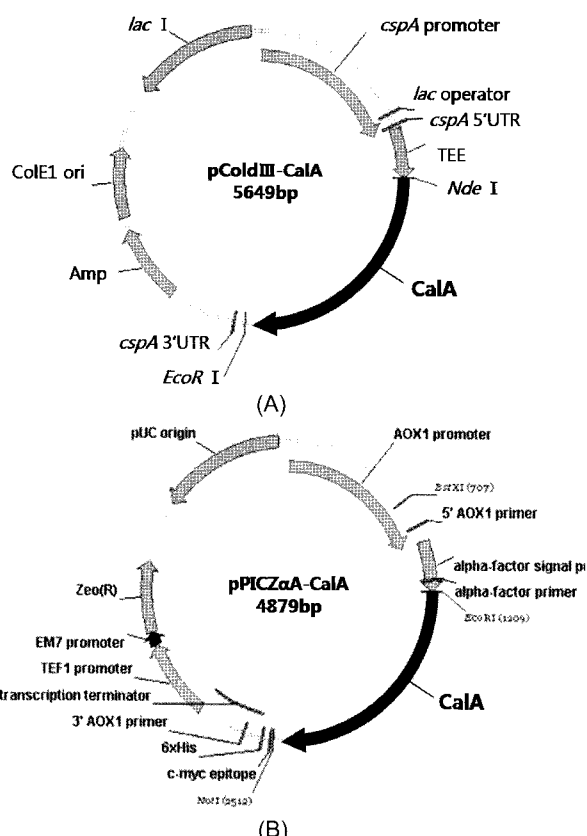
### 유전자 클로닝과 재조합 Plasmid 구축

Genomic *C. antarctica* DNA로부터 propeptide 부분을 제외한 CalA (1296 bp)의 유전자를 PCR로 증폭하였고 pColdIII, pPICZ $\alpha$ A plasmid에 삽입하여 재조합 pColdIII/CalA, pPICZ $\alpha$ A/CalA, pPICZ $\alpha$ A/CalA-his $\times$ 6를 구축하였다. ClustwerW 프로그램(12)을 이용하여 기존에 발표된 CalA의 서열 (PDB ID : 2VEO)과 비교한 결과 99%의 sequence homology를 나타내었으며 재조합 CalA의 227번째 아미노산이 세린 (serine)에서 글리신 (glycine)으로 변화한 것을 확인 하였다(13, 14).

### 발현 시스템

*E. coli* 시스템에서, pColdIII 발현 플라스미드에 포함된 대장균 유전자 *cspA* 프로모터는 저온에서도 전사 (transcription) 활성이 떨어지지 않기 때문에 15°C cold shock을 가능하게 한다. 게다가 N말단의 5'UTR (untranslated region)이 37°C에서 상당히 불안정한 반면 저온에서는 구조안정성을 가지게 되어 ribosome trap 현상으로 고효율의 단백질 발현을 유도한다(15, 16). 또한 발현숙주인 OrigamiB (DE3) 균주는 thioredoxin reductase (*trxB*), glutathione reductase (*gor*)를 포함하고 있어 세포질에서의 황화 결합의 형성을 강화시켜 이종 (heterogeneous) 외래단백질의 발현 시 야기되는 문제를 개선하였다. 하지만 이와 같은 시도에도 불구하고 발현 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *E. coli* 발현 시스템에서 내포체 (inclusion body) 형태로 발현되는 양이 많았고 목적 단백질 이외의 다른 단백질과 섞여 있어 분리정제의 어려움이 있었다.

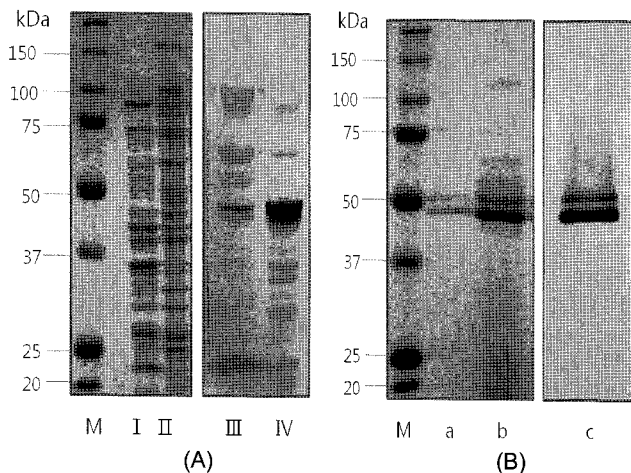
*P. pastoris* 시스템에서, pPICZ $\alpha$ A/CalA와 histidine을 tagging한 pPICZ $\alpha$ A/CalA-his $\times$ 6를 각각 발현하였다. SDS PAGE Gel 분석 시 3' 방향에 tagging한 경우에는 밴드의 확인이 어려울 만큼 발현양이 적었으며 활성 또한 wild type보다 7배가 낮았다. pPICZ $\alpha$ A 발현 플라스미드는 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 유래된  $\alpha$ -factor를 포함하고 있어 분비작용 (secretion)을 유도함으로써 목적 단백질의 발현을 향상시키고 회수를 용이하게 한다.



**Fig. 1.** Construction of lipase A expression plasmid in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. : (A) The lipase A gene was cloned into the plasmid pColdIII. (B) The lipase A gene was cloned into the plasmid pPICZ $\alpha$ A.

### SDS-PAGE 분석 및 Western blotting

단백질 시료는 4  $\times$  SDS loading buffer와 섞어 SDS-PAGE (15% gel)을 이용하여 10분간 90°C에서 가열한 후 전기영동하였다. 이 gel을 100 V에서 90분 동안 nitrocellulose membrane (Amershan Bioscience, UK)으로 옮긴 후, membrane을 blocking하기 위해 5% skim milk (5 g non-fat



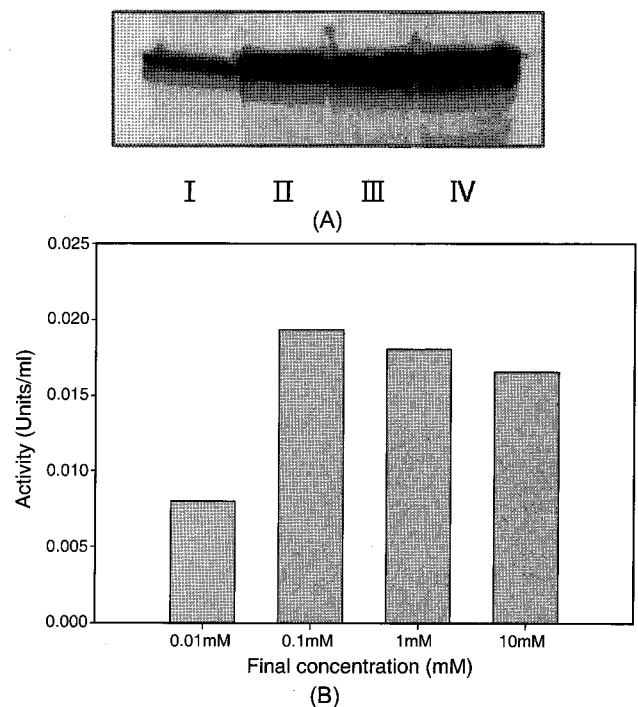
**Fig. 2.** Analysis of SDS PAGE Gel and Western blotting (M: size marker); (A) expressed lipase A in OrigamiB (DE3), (I) soluble fractions (II) insoluble fractions by SDS PAGE Gel, (III) soluble fractions (IV) insoluble fractions by Western blotting; (B) expressed lipase A in X-33, (a) supernatant, (b) concentrated supernatant by SDS PAGE Gel, (c) supernatant by Western blotting.

### 발현 조건에 따른 CalA의 활성

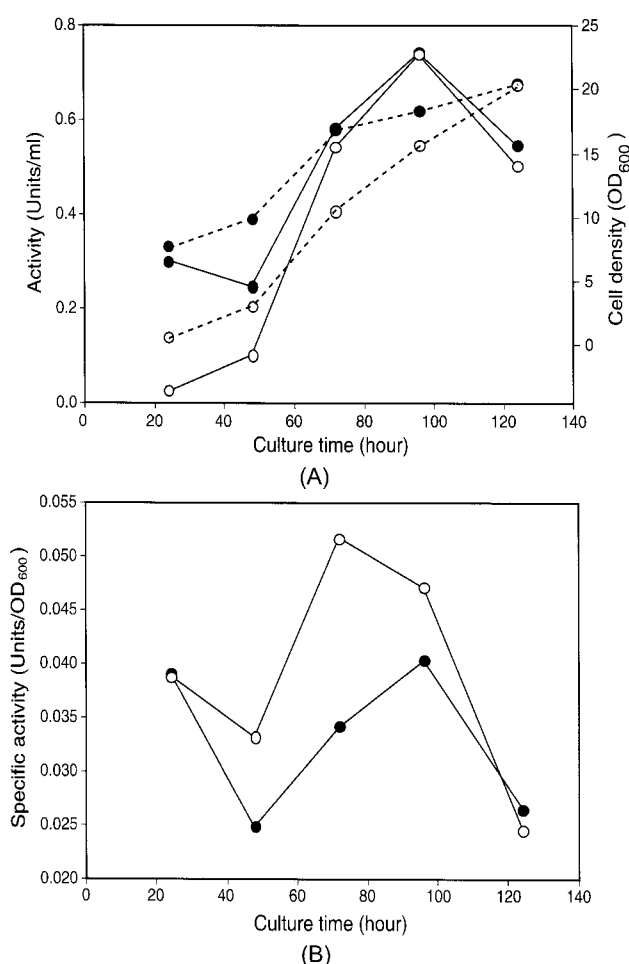
*E. coli* OrigamiB (DE3) 발현 시스템에서 유도물질 (inducer) IPTG는 lac 프로모터에 결합되어 있던 억제자 (repressor)와 대신 결합함으로써 RNA 폴리머레이즈 (polymerase)가 전사 (translation)의 개시를 가능하게 한다. 그러나 목적 단백질에 따라 발현 시 IPTG 최적농도가 결정된다. 본 연구에서 LB<sub>amp</sub> 발현배지에 IPTG의 최종농도를 0.01-10 mM로 첨가하여 각각의 활성과 발현량을 측정하였고 Fig. 3에 도시하였다. 최종농도 0.1 mM 이후부터 발현량은 증가하였지만 활성 값은 오히려 저하되는 것을 확인하였다. 과량의 IPTG 농도는 발현속도를 비이상적으로 증가시키고 이는 잘못된 접힘 구조로 형성된 CalA를 생산하여 활성의 저하를 일으키는 것으로 생각된다.

반면 *P. pastoris* X-33 발현 시스템에서는 15°C와 28°C에서 BMMY배지를 이용하여 24시간 마다유도물질 (0.5% (v/v) methanol)을 첨가하면서 배양하였고 활성을 측정하여 Fig. 4에 도시하였다. 효모의 최적 성장 온도인 28°C보다 낮은 온도에서 천천히 CalA를 발현할 경우 단백질의 3차원 접힘 (folding)이 천천히 일어나게 되고, 이로써 정확하고 정교한 접힘 구조의 CalA가 발현되어 높은 활성을 나타낼 것을 예상하였으며 본 연구에서 실험으로 증명하고자 하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 15°C, 28°C에서 각각 발현된 lipase A의 활성값이 둘 다 96시간 배양되었을 때 최고 0.74 U/ml에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 15°C에서 배양되는 경우에 상대적으로 미생물의 성장속도가 느리기 때문에 발현량이 불충분하여 낮은 활성 값이 측정될 수 있으므로 단위세포 농도 당 활성을 비교하기 위해 활성 값을 OD<sub>600</sub>에서 측정된 cell density로 나누어

비활성 (specific activity, Units/OD<sub>600</sub>)을 계산하였다. 15°C에서 배양한 경우 전반적으로 28°C에서 보다 높은 비활성을 나타내었으며, 72시간 배양하였을 때 최고 0.05 U/OD<sub>600</sub> 값을 보였고 그 이후로는 오히려 감소하였다. 배양이 진행됨에 따라 탄소원인 글루코스 (glucose)가 고갈되어 미생물의 성장주기가 정상기에서 사멸기로 접어들면서 lipase A의 발현저하현상으로 인해 비활성 값이 감소하였다. 28°C에서 배양한 경우에는 24시간 이후부터 92시간까지 비활성 값이 크게 변하지 않았으며, 오히려 48시간 배양하였을 때는 약간 감소하기도 하였다. 24-48시간 사이에서는 미생물의 성장속도가 목적 단백질의 전사속도에 비해 상대적으로 빠른 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 28°C의 배양조건은 숙주인 *P. pastoris*의 성장 최적 온도로서 미생물의 성장속도를 빠르게 유도하므로 강력한 프로모터인 AOX1에 의해 조절되는 목적 단백질의 생산속도의 증가가 예상된다. 이는 세포자체에 큰 스트레스를 줌으로써 3차원 접힘 (folding) 구조가 형성되는 메커니즘 상에서 정확성을 방해한다(17). 그러나 이 같은 현상은 발현량이 많은 몇몇 특수한 단백질에만 해당한다는 보고가 있었다(6). 실제 본 연구결과에서도 온도에 따라 약간의 비활성이 차이를 보이지만 미미한 수준으로 고려된다. 결론적으로 lipase A의 경우, 28°C 배양조건을 이용해도 목적단백질의 발현 및 분비가 원활하게 이루어지는 것을 확인하였다.



**Fig. 3.** The effect of IPTG concentration on *Escherichia coli* expression system. (A) Western blotting of lipase A; I : final Con. 0.01 mM IPTG, II : final Con. 0.1 mM IPTG, III : final Con. 1 mM IPTG, IV : final Con. 10 mM IPTG, (B) Activity assay of lipase A : activity was measured by pNPP reaction solution at 45°C for 30 min.



**Fig. 4.** The effect of different culture temperature on *Pichia pastoris* expression system. The lipase A was transformed into X-33 and expressed in BMMY medium at 15°C (○) and 28°C (●) for 3 days. (A) Time course of activity (solid line) and cell density (dotted line). (B) Time course of specific activity at different culture temperature.

## 요약

본 연구에서는 *Candida antarctica*로부터 genomic DNA를 추출하여 lipase A(CalA) 유전자를 PCR 증폭하였고, 재조합 pColdIII/CalA, pPICZαA/CalA, pPICZαA/CalA-his×6을 구축하였다. 재조합 CalA 유전자의 기능적 발현을 위해 최적화된 시스템을 구축하고자 *Escherichia coli*와 *Pichia pastoris* 시스템에서 각각 수행하여 비교, 분석하였다. SDS PAGE gel을 통해 CalA의 발현의 여부 및 발현양을 확인하였고, pNPP를 기질로 한 가수분해 반응을 통해 활성을 측정하였다. *E. coli* 발현 시스템은 형질전환 방법이 간단하고, 미생물의 성장 속도가 빠르다는 장점을 갖지만 CalA의 활성이 0.02 Unit/ml로 비교적 낮았으며 세포질(cytoplasm)에서 발현되므로 비목적 단백질과의 분리 및 정제과정이

필요하다. 재조합 pPICZαA/CalA을 *P. pastoris* 시스템에서 발현한 경우 높은 발현양 뿐만 아니라 분비작용으로 인해 고순도 발현이 용이하였고, 활성 또한 약 0.7 Unit/ml로 가장 높았다. 결론적으로 CalA의 기능적 발현을 위해 *P. pastoris* 시스템을 구축하는 것이 가장 적합함을 확인하였다.

접수 : 2009년 7월 17일, 게재승인 : 2009년 8월 25일

## REFERENCES

1. Svendsen, A. (2000), Lipase protein engineering, *Biochim. Biophys. Act.* **1543**, 223-238.
2. Schmid, R. D. and R. Verger (1998), Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1608-1633.
3. Krishna, S. H., M. Persson, and U. T. Bornscheuer (2002), Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*, *Tetrahed. Asym.* **13**, 2693-2696.
4. Pfeffer, J., M. Rusnak, C. E. Hansen, R. B. Rhlid, R. D. Schmid, and S. C. Maurer (2007), Functional expression of lipase A from *Candida antarctica* in *Escherichia coli* : A prerequisite for high-throughput screening and directed evolution, *J. Mol. Catal.* **45**, 62-67.
5. Daly, R. and Milton T. W. Hearn (2005), Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production, *J. Mol. Recognit.* **18**, 119-138.
6. Macauley-Patrick, S., M. L. Fazenda, B. McNeil, and L. M. Harvey (2005), Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, *Yeast* **22**, 249-270.
7. Pfeffer, J., S. Richter, J. Nieveler, C. E. Hansen, R. B. Rhlid, R. D. Schmid, and M. Rusnak (2006), High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 931-938.
8. Chen, J., Y. Q. Zhang, C. Q. Zhao, A. N. Li, Q. X. Zhou, and D. C. Li (2007), Cloning of a gene encoding thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris*, *J. Appl. Microbiol.* **103**, 2277-2284.
9. Wang, H., S. Yin, X. Hou, and H. Xing (2005), High-level secretion expression of human ScFv against Botulinum neurotoxin A in *Pichia pastoris*, *Microbiol. in China* **32**, 50-53.
10. Cristea, M., A. Engstrom, C. Su, L. Hornsten, and E. H. Oliw (2005), Expression of manganese lipoxigenase

- in *Pichia pastoris* and site-directed mutagenesis of putative metal ligands, *Arch. Biochem. Biophys.* **434**, 201-211.
11. Cregg, J. M., S. V. Thomas, and C. R. William (1993), Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.* **11**, 905-910.
  12. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>.
  13. Hoegh, I., S. Patkar, T. Halkier, and M. T. Hansen (1995), Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Can. J. Bot.* **73**, 869-875.
  14. Ericsson, D. J., A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandstrom, J. E. Backvall, and S. L. Mowbray (2008), X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation, *J. Mol. Biol.* **376**(1), 109-19.
  15. Xia, B., J. P. Etchegaray, and M. Inouye (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.
  16. Stephanie, J., E. Evguenieva-Hackenberg, and G. Klug (2004), Temperature-dependent processing of the *cspA* mRNA in *Rhodobacter capsulatus*, *Microbiol.* **150**, 687-695.
  17. Hohenblum, H., B. Gasser, M. Maurer, N. Borth, and D. Mattanovich (2004), Effects of gene dosage, promoters and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 367-375.