

Evaluation and cloning of a (R)-stereospecific esterase from  
*Bacillus stearothermophilus* JY144

김지연, 김윤정, 최기섭, 김근중, 유연우\*

아주대학교 분자과학기술학과

전화(031) 219-2455, FAX(032) 216-8777

**Abstract**

In an effort to isolate novel strains expressing a thermostable esterase that hydrolyzed the rac-ketoprofen ethyl ester to ketoprofen in the stereospecific manner, we screened various soils and composts from broad ecological niches in which the activity was expected to be found. Three hundreds of microbial strains were tested to determine their ester-hydrolyzing activity by using an agar plate containing insoluble tributyrin as an indicative substrate, and then further screened by activity on the (R,S)-ketoprofen ethyl ester. Twenty-six strains were screened primarily at high growth and incubation temperature and further compared the ability to ethyl ester-hydrolyzing activity in terms of conversion yield and chiral specificity. Consequently, a strain JY144 was isolated as a novel strain that produced a (R)-stereospecific esterase with high stability and systematically identified as a *Bacillus stearothermophilus* JY144. The enzyme indeed stables at a broad range of temperature, upto 65 °C, and pH ranging from 6.0 to 10.0. The optimal temperature and pH for enzymatic conversion were 50 °C and 9.0, respectively. Based on the observations that resulted a poor cell growth and enzyme expression in wild type strain, we further attempted the gene cloning into a general host *Escherichia coli* and determined its primary structure, concomitantly resulting a high level expression of the enzyme. The cloned gene had an open reading frame (250 amino acids) with a calculated molecular mass of 27.4 kDa, and its primary structure showed a relative high homology (45-52 %) to the esterases from *Streptomyces* and *Bacillus* strains. The recombinant whole cell enzyme could efficiently convert the rac-ketoprofen ethyl ester to (R)-ketoprofen, with optical purity of 99 % and yield of 49 %.

**서론**

2-Aryl-substituted propionic acid계 비스테로이드성 소염 진통제인 ketoprofen

(rac-2-[3-benzoyl phenyl] propionic acid)은 류마티스성 관절염 및 통증의 치료제로 쓰이는 라세메이트 의약품이다. 이들은 체내의 prostaglandin 생합성 촉매제인 cyclooxygenase의 활성을 감소시킴으로서, 결국 prostaglandin 저해제로 작용하여 통증을 완화시킨다. Chiral drug들의 약리 활성은 대부분 한 입체 이성질체의 효과에 의한 것이고, 다른 이성질체의 경우는 약리 활성이 없거나 오히려 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 광학적으로 순수한 (S)-ketoprofen과 (R)-ketoprofen의 효소적 분할을 위한 신규 미생물들을 토양으로부터 분리하고, 그 효소를 암호화하는 유전자의 gene cloning과 sequencing을 통해 그 특성 및 관련 효소들과의 유연 관계를 규명하고, 또한 이를 통해 효소들의 구조적 특성을 추론하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 균주

본 실험실에서 분리한 (R)-ketoprofen에 광학 선택성이 있는 고온 안정한 균주 *Bacillus stearothermophilus* JY144를 사용하였다.

### 2. 배지 및 배양 조건

고온 균주를 선별하기 위해 tributyrin 배지(tributyrin 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, Peptone 3 g/L, Agar 20 g/L)를 사용하였고, 50 °C, 180 rpm 에서 48시간 배양하였다. 순수 분리된 균주는 TS broth(Tryptone 17 g/L, Soytone 3g/L, NaCl 5g/L, Glucose 7.5g/L, Potassium phosphate(dibasic) 2.5 g/L)를 사용하여, 50 °C, 180 rpm에서 24시간 배양하였다.

### 3. 실험 방법

#### 3.1 균주 선별

Tributyrin만을 탄소원으로 하는 선별 배지를 사용하여 clear zone을 형성하는 균주를 1차 screening 후, 순수 분리된 균주는 TS 배지에서 이들을 선별한 온도에서 초기 exponential phase까지 배양하여 얻은 균체를 효소원으로 이용하였다. 효소 반응은 25 mM ketoprofen ethyl ester를 기질로 사용하고, 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 첨가하여 24시간 반응시켰다.

#### 3.2 Esterase gene cloning

각각의 균체에서 분리한 chromosomal DNA를 *Sau* 3A I으로 partial digestion한 후, cloning vector로서 pBluescript II SK의 *EcoR* I 과 *Pst* I 위치에 GFP 유전자를 삽입하여 형광 단백질의 발현 여부에 따라 positive와 negative clone을 구분할 수 있도록 제작한 vector를 이용하여 유전자 library를 제작하였다. Host cell은 *E. coli* XL1-Blue를 이용하였다.  $\alpha$ -naphthyl acetate와 Fast Blue RR을 이용한 esterase activity staining을 통하여 1차 클론을 선별하였고, LB 배지에서 배양한

후, whole cell을 이용한 효소반응을 통해 최종 선별하였다.

### 3.3 Sequence analysis

Chain termination method로 DNA sequencing을 수행하였고, pBluescript II SK 의 T3, T7 universal primer를 이용하였다. 얻어진 결과는 Gen Bank와 Protein data bank를 통한 BLAST search를 수행한 후, 관련된 유전자들과 Clustal X를 통해 비교하였다. ORF의 예측 및 분석은 DNA Club program을 이용하였다.

### 3.4 효소활성 측정

효소반응에 의한 Ketoprofen ethyl ester의 resolution은 HPLC를 사용하여 분석하였으며, 30 mM의 ammonium acetate를 methanol에 녹여 이동상으로 사용하였고, 0.8 ml/min 의 유속에서 Chiral compound 분석용 column(Chirex Phase 3005, Phenomenex Co. USA)을 이용하여 UV detector로 254 nm에서 분석하였다.

## 결과 및 토의

Tributyryn을 유일 탄소원으로 하는 배지를 통해서 1차 선별된 300여종의 균체들 중, 효소활성 및 입체 특이성이 우수한 효소원을 확보하기 위하여 ketoprofen ethyl ester에 대한 광학 분할을 수행하였고, (R)-enantiomer에 대하여 특이적인 특징을 가지며 기질 전환율이 38.68 % 이고 ee(enantiomeric excess)값이 99% 이상인 JY144를 최종 분리하였다. 본 균주의 최적 성장온도는 50 °C - 60 °C 의 분포를 보였으며, 16S rRNA 분석을 통하여 *Bacillus stearothermophilus*로 동정하였다.

On-off system의 원리를 활용한 cloning vector를 자체 제작한 후, esterase activity를 갖는 positive clone을  $\alpha$ -naphthyl acetate를 기질로 하는 activity staining을 통해 1차선별 하였고, rac-ketoprofen ethyl ester와의 효소반응을 통하여 최종 선별하였다. 이 결과 1.5 kb의 외래 유전자가 도입된 ampicillin-resistant colony를 얻을 수 있었다. Sequencing 결과 cloning된 fragment는 1424개의 nucleotide로 이루어져 있으며, JY144의 ORF(open reading frame)는 268번째 base 에 위치한 ATG를 start codon으로 하여 1020번째의 TAA를 stop codon으로 하는 753개의 nucleotide로 구성되어 있으며, 이는 250개의 amino acid를 코돈함을 알 수 있었고, esterase의 전형인 catalytic triad인 G-X-S-X-G의 염기서열을 포함하였다.

*Bacillus stearothermophilus* JY144에서 cloning된 esterase의 경우 216개의 amino acid로 구성되어진 새로운 형태의 esterase로 확인되어 졌으며, BLAST search를 통한 검색결과 *S. coelicolor* 유래의 esterase/lipase와 52 %, *B. stearothermophilus* 유래의 esterase와 47 %, *Bacillus thermoreovorans* 유래의 esterase와 45 %의 유사성을 나타내었다. rac-ketoprofen ethyl ester를 기질로 사용한 효소활성 측정에서 최적 반응온도는 50 °C 였으며, 온도에 대한 안정성은 60 °C에서 가장 안정하였고, 70 °C에서도 80 % 이상의 활성을 나타내었다(Fig 1). Recombinant를 배양한 후

whole cell을 효소원으로 하여 효소활성을 측정 한 결과, 15 % 정도 기질을 전환시키던 wild type과 비교하였을 때 27시간만에 기질을 완전히 전환시키는 활성을 나타내었다(Fig 2). *Bacillus stearothermophilus* JY144 유래의 esterase는 고온에서 안정한 효소임을 알 수 있고, 유전자 서열의 비교결과 기존의 esterase와는 다른 신규 esterase로 추정할 수 있다. 보다 정확한 효소의 특징을 규명하기 위해서는 여러 가지 racemic substrate를 사용한 기질특이성에 대한 연구와 다른 균주들에서 유래한 esterase들과의 상호분석을 통하여 본 esterase의 유전적 위치를 확인하는 연구를 수행하여야 할 것이다.

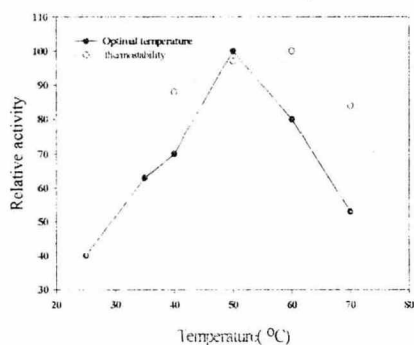


Fig 1. Optimal temperature and thermostability of the *Bacillus stearothermophilus* JY 144 .

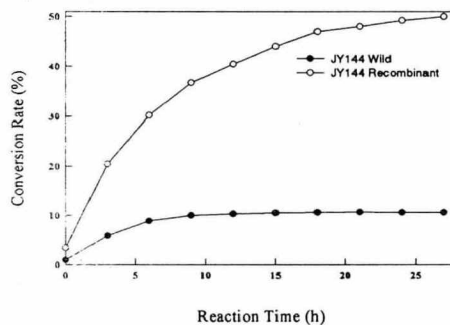


Fig. 2. Profile of enantioselective hydrolysis of (R)-ketoprofen ethyl ester *B. stearothermophilus* JY144 wild type and recombinant.

### 참고문헌

1. Patel, R. N. 2000. "Stereoselective Biocatalysis", Marcel Dekker. Inc..
2. Margolin, A. L. 1993. Enzymes in the synthesis of chiral drugs, *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 266-280.
3. Giordano, C., G. Castaldi and F. Uggeri, *Angew. 1984. Chem. Int. Ed. Engl.*, 23, 413-149.