

## A Cloning of Novel Esterase from a Metagenomic Library

Sang-Young Yoon, Seung-Bum Kim, Yeon-Woo Ryu

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University

TEL: +82-2-219-2455 , FAX: +82-2-216-8777

### Abstract

A novel esterase showing high enantioselectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester was selected from fosmid environmental DNA library which is provided by Microbial Genomic & Applications Center. As a result of Blast search, the gene wasn't registered in Gene Bank yet. And as we know, conserved domain region of esterase , G-X-S-X-G, wasn't discovered.<sup>4)</sup> And it is similar to Beta-lactamase. The DNA sequence of cloned esterase include an open reading frame consisting of 1170 bp, designated as EST-Y29, encoding a protein of 389 amino acids with a molecular mass of about 42.8 kDa. And amino acid sequence analysis revealed only a few identity (28%) to the known esterases/lipases in the databases containing the conserved sequence motifs of esterases/lipases. when being comparison to other esterase revealed , this enzyme seems to be classified as a new member of esterase family. EST-Y29 was functionally overexpressed in a soluble form in *E. coli* with maximum conversion yield of (S)-ketoprofen at 65°C. This study demonstrates that functional screening combined with the sequential uses of restriction enzymes to exclude already known enzymes is a useful approach for isolating novel enzyme from a metagenome.

### Introduction

의약품이나 제초제 등의 유기합성 공정 중에서 광학 이성질체의 선택적 분할에 이용할 수 있는 esterase를 다양한 서식환경의 Metagenome으로부터 esterase 유전자 군을 선별하여 library를 만들고, 방향적 진화방법으로 효소의 열안정성과 유기용매에 대한 내성이 향상된 새로운 효소를 찾아 개량시키고자 한다. 여기서는 많은 환경에서

미생물 생태학적인 중요한 역할과 현재 배양 불가능한 미생물의 생물로부터 ketoprofen등에 대한 광학분할에 적용시킬 수 있으며, 좀 더 높은 온도에서 내성을 갖는 새로운 esterase를 찾아내었다.

## Material & Methods

Metagenome Pool에서 기질로써  $\alpha$ -Naphthyl acetate (0.05 mg/ 1 mL-ethoxy ethanol ) 과, Fast blue RR salt (0.05 g/ 2 mL-Tris-HCl )을 bacto agar (0.8 g/ 10 mL-Tris-HCl )이 들어있는 flask에 넣어, LB(with chloramphenicol) plate 위에 5 mL 씩 agar overlay 하였다.<sup>1)</sup> 그 중 Activity 가 있는 positive clone을 selection 하고, 온도 활성을 확인하였다(fig.1). 온도는 50°C, 60°C, 70°C, 80°C 순으로 각각 selection하여 온도test를 통해 다시 Activity가 있는 positive clone의 활성을 확인하였다(fig.2). 그것 중 (S)-ketoprofen에 반응하는 esterase를 발현시키는 colony를 찾기 위해 다시 ketoprofen배지에 selection을 하였다. 그리고 Screening작업을 통해 selection된 colony들을 모아서 HPLC분석을 하였다.<sup>2,3)</sup> 그 결과 ketoprofen-activity 선명하게 보였던 대부분의 colony들이 (S)-ketoprofen에 specific한 esterase였던 것을 확인하였다(fig.3). novel한 esterase 유전자만 cloning 하기 위해 불필요한 유전자와 이미 알려진 *Pseudomonas*와 *Bacillus* esterase 유전자를 배제시키기 위해서 여러 가지 제한효소로 절단하였다. 또한, 제한효소의 선정 기준은 토양에 90% 이상을 차지하는 이미 알려진 *Pseudomonas* 와 *Bacillus* esterase 유전자를 절단하는 제한효소 site가 많으면서, 그 외 다른 type의 종들이 가지는 esterase 유전자를 절단하는 제한효소 site가 적은 순서대로 선정하였다.

## Result

Blast search를 통해 지금까지 알려진 esterase들의 nucleotide sequence와의 유사성을 분석한 결과 아직까지 Gene Bank에 등록되지 않은 유전자였으며, 가장 근연관계가 높은 amino acid 서열은 다른 어떤 esterase보다 *Silicibacter*의 Beta-lactamase가 34%로써 가장 높게 일치함을 보였다. 물론 Conserved Domain Search의 결과에서 3D esterase structure 의 alignment 결과, 유사 protein 서열까지 합쳐 88%의 Beta-lactamase와 그 구조가 유사하였다. 하지만, 새로운 사실은 기존 통상의 esterase의 active site인 G-X-S-X-G가 여기선 존재하지 않았다는 점과 기존의 esterase라고 알

려진 gene 중에서 일치된 서열은 28%정도로서 기존의 esterase와는 근연관계가 먼 novel한 esterase임을 확인 할 수 있었다.<sup>4)</sup> 이 Beta-lactamase 근거로 ORF를 추정하였고, PCR과 Restriction enzyme site를 이용하여, Activity를 본 후에, Beta-lactamase(AmpC Beta-lactamase 포함)보다는 좀 더 긴(약 250bp정도, 총 1170bp) 부분으로 활성을 갖고 있는 것을 확인할 수 있었다.(fig.4) 그 결과 Protein의 size는 약 42.8 kDa의 예상 size를 확인할 수 있었다.

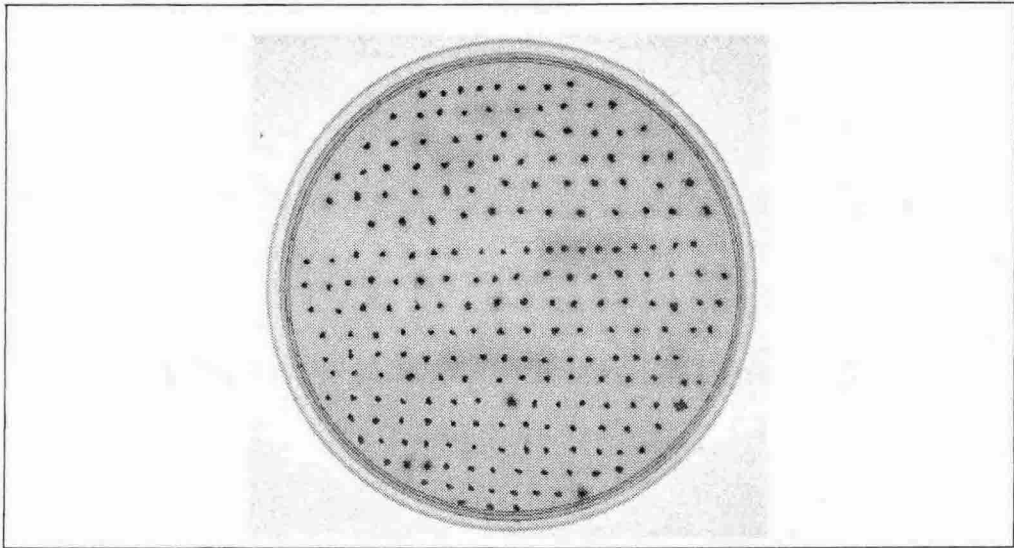


Fig. 1. Activity staining of Fosmid

(Primary screening - Positive clones showed dark brown colour at 50°C.)

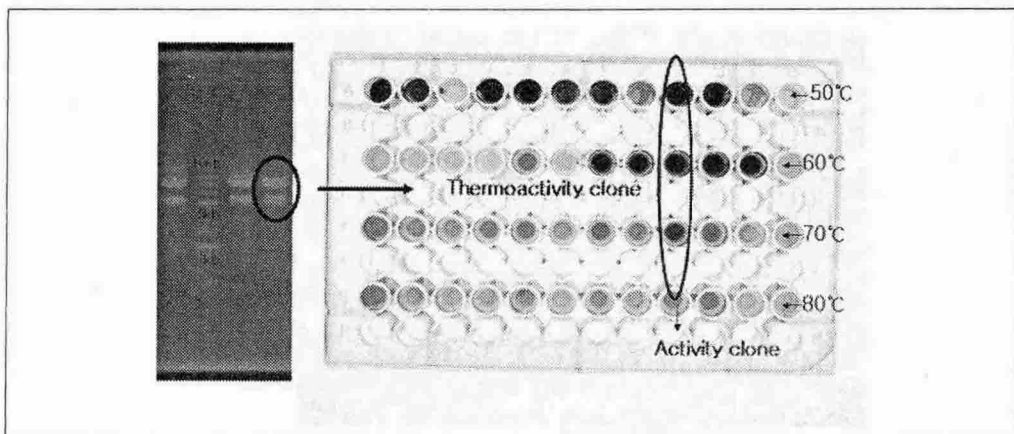


Fig. 2. *kpn* I과 *Apa* I 으로 digestion된 여러 fragment 중 thermoactivity확인.  
(pBluescriptSK II(+)) cloning vector 약 3kb와 insert DNA가 약5kb임을 보이고 있다.)

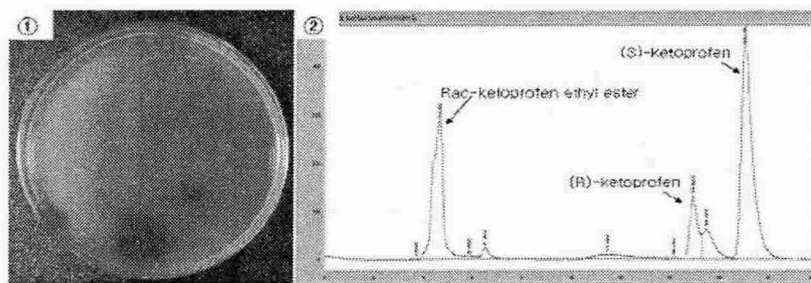


Fig.3 1.7kb clone의 ① ketoprofen activity ② HPLC Analysis (60°C)

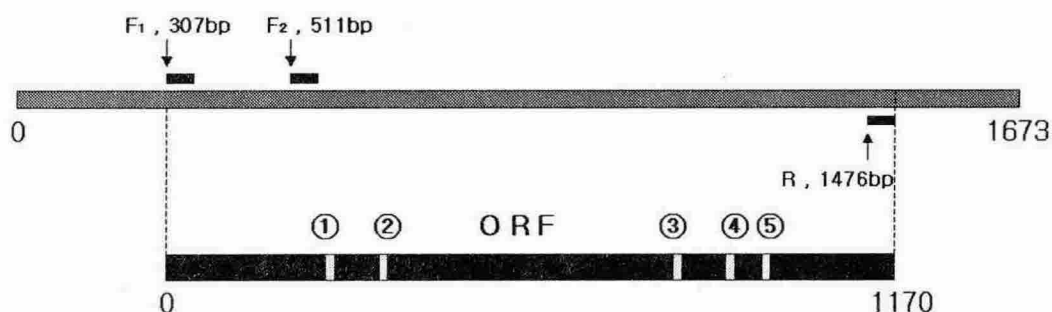


Figure 4. PCR과 enzyme site를 이용해 ORF confirm.

(F1, F2, R은 Primer , ORF 상에서 Restriction Enzyme Site - ①*Cla* I(287bp)  
 ②*Nde* I(366bp) ③*Sph* I(927bp) ④*Nde* I(1005bp) ⑤*Eco*R I(1024bp))

### Reference

1. R.B. Miller and R.C. Karn, A rapid spectrophotometric method for the determination of esterase activity, *J. Biochem. Biophys. Methods* 3 (1980), pp
2. G.-J. Kim, G.-S. Choi, J.-Y. Kim, J.-B. Lee, D.-H. Jo and Y.-W. Ryu, Screening, production and properties of a stereospecific esterase from *Pseudomonas* sp. S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 17 (2002), pp. 29-38.
3. J.-Y. Kim, G.-S. Choi, Y.-J. Kim, Y.-W. Ryu and G.-J. Kim, A new isolate *Bacillus stearothermophilus* JY144 expressing a novel esterase with high enantioselectivity to (R)-ketoprofen ethyl ester: strain selection and gene cloning, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 18 (2002), pp. 133-145.
4. C.C. Akoh, G.-C. Lee, Y.-C. Liaw, T.-H. Huang and J.-F. Shaw, GDSL family of serine esterases/lipases, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004), pp. 534-552.