



사람 분변에서 분리한 *Enterococcus faecalis*가 생성하는 Bile Salt Hydrolase의 특징

엄 석 진 · 김 근 배*

중앙대학교 동물자원과학과

Cloning and Characterization of a Bile Salt Hydrolase from *Enterococcus faecalis* Strain Isolated from Healthy Elderly Volunteers

Seok Jin Eom and Geun-Bae Kim*

Dept. of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

ABSTRACT

Bile salt hydrolase (BSH, EC 3.5.1.24) activity, which cleaves amide bond between carboxyl group (bile acid) and amino group (glycine or taurine), is commonly detected in gut-associated species of human and animal. During the screening of BSH active strains from the fecal samples of elderly human volunteers, strain CU30-2 was isolated on the basis of the highly active BSH producing activity. A *bsh* gene of the isolate was cloned into the pET22b expression vector and overexpressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) Gold by induction with 1mM IPTG. The overexpressed BSH enzyme with 6x His-tag was purified with apparent homogeneity using a Ni⁺-NTA agarose column and characterized. The BSH enzyme of *E. faecalis* CU30-2 exhibited approximately 50 times higher activity against glycol-conjugated bile salts than tauro-conjugated bile salts having the highest activity against glycocholic acid. Considering the prevalence of *E. faecalis* strains in the human GI tract and glycol-conjugates dominated bile acid composition of human bile, further study is needed to investigate the impact of the BSH activity exerted by *E. faecalis* strains to the host as well as to the BSH producing strains.

Keywords: bile salt hydrolase, *Enterococcus faecalis*, overexpression, substrate specificity

서 론

간에서 콜레스테롤로부터 만들어진 담즙산은 glycine 또는 taurine과 결합이 되어 십이지장으로 배출된다. 담즙으로 분비되는 담즙산은 소화장관의 전역에서 흡수되거나 회장 하부로부터 재흡수되어 간장으로 돌아오는 간문맥순환계를 통한 장간순환(entero hepatic circulation, EHC)을 하는데, 이때 담즙산의 97%가 이 경로로 재흡수된다(Begley *et al.*, 2006). Bile salt hydrolase(BSH, EC 3.5.1.24)의 작용에 의해 분리된

유리형 담즙산은 물에 대한 용해도가 떨어지고 장간순환에 의하여 재흡수되기보다는 주로 분변으로 배출된다(De Smet *et al.*, 1994). 체내에는 일정량의 담즙산이 유지되어야 하기 때문에 분변으로 배출된 양 만큼의 담즙산이 생성되어야 하는데, 이때 담즙산의 전구체인 콜레스테롤을 이용하게 되므로, 장내 미생물의 BSH 활성은 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추는 역할을 할 수도 있다고 보고되었다(McAuliffe *et al.*, 2005; Sridevi *et al.*, 2009). 이러한 작용은 BSH라고 하는 담즙산 가수분해효소가 아미노기와 카르복실기의 amide 결합을 끊어주는 역할을 하여 일어난다. 이런 BSH는 장내 균총인 *Bifidobacterium bifidum*(Kim *et al.*, 2004), *Lactobacillus plantarum*(McAuliffe *et al.*, 2005), *L. acidophilus*(Oh *et al.*, 2008;

* Corresponding author: Geun-Bae Kim, Dept. of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea. Tel: +82-31-670-3027, Fax: +82-31-676-5986, E-mail: kimgun@cau.ac.kr

Pinto *et al.*, 2006), *Enterococcus*(Franz *et al.*, 2001; Knarreboeg *et al.*, 2002), *Clostridium perfringens*(Gospal-Srivastava and Hylemon, 1988), *Bacteroides fragilis*(Stelling and Hylemon, 1976)에서 생성이 보고되었다. 이 연구는 BSH 효소를 만드는 세균 중 건 강한 성인의 분변에서 분리한 *Enterococcus faecalis*를 이용하여 재조합 유전자를 만들어 BSH 효소를 발현시키고, 그의 특징을 규명하였다.

재료 및 방법

1. 균주

60대 이상 노인의 분변에서 *Enterococcus faecalis*를 de Man-Rogosa-Sharpe(MRS) 배지(Difco, USA)를 이용하여 분리하였고, MRS 배지에 각각 2mM GDCA, TDCA(Sigma, USA)를 첨가하여 BSH 활성이 있는 균주를 선발하였다. *E. faecalis* CU30-2 BSH 유전자를 과잉발현하기 위하여 플라스미드와 숙주균으로 각각 pET22b(+)(Novagen, USA)와 *E. coli* BL21(DE3) Gold(NEB, USA)를 사용하였고, 배지는 Luria-Bertani(LB) 배지(Difco, USA)에 ampicillin (50 μ g/mL)(Sigma, USA)을 첨가하여 사용하였다.

2. Design of PCR Primer

CU30-2 균주의 BSH 유전자를 증폭하기 위해서 *E. faecalis* *bsh* sequence(GenBank accession number NP_814299)를 근거하여 primer를 제작하였다. *Nde*I(CATATG), *Xho*I(CTCGAG) 제한효소 site를 포함시켜 만든 BSH-EF_F(5'-ATTGGCCATATG TGTACAGCAATTAC-3')과 BSH-EF_R(5'-GGTTCACCTCGAG ATTAGCATAGTTAATTTG-3') primer와 HotStarTaq DNA polymerase(Qiagen, USA)을 이용하여 PCR로 증폭하였다. BSH 유전자의 증폭은 gradient thermal cycler(Axygen, USA)를 이용하여 증폭하였으며 PCR 조건은 95°C에서 15분 처리하고 94°C에서 1분, 50°C에서 45초, 72°C에서 1분간 반응을 30회 반복 후 마지막으로 72°C에서 10분 동안 처리하였다.

3. *E. faecalis*에서 BSH Cloning

pGEM-T easy vector(Promega, USA)를 이용하여 T/A cloning을 하였다. Primer에 있는 제한효소 처리 후 같은 효소로 처리된 pET22b vector를 T4 DNA ligase(Roche, Switzerland)를 이용하여 ligation하였다. Ligation된 vector를 *E. coli* JM109(TAKARA, Japan)에 transformation 시킨 후 ampicillin(50 μ g/mL)을 첨가한 LB 배지(Difco, USA)를 이용하여 37°C의 조건에서 배양하였다. 재조합되어 생성된 균락을 2mM TDCA가 첨가된 LB 배지에 배양 후 흰 침전이 일어나는 균체를 선발하여 ampicillin (50 μ g/mL)을 첨가한 LB 배지에 배양하였다. 배양액을 miniprep-

kit(Qiagen, USA)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다.

4. 염기서열 분석

추출한 DNA의 염기서열은 솔젠트(Solgent Ltd., Korea)에서 분석을 하였고, 염기서열은 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 BLAST tool을 이용하여 분석을 하였다.

5. *E. coli*에서 BSH 발현

BSH gene이 있는 pET22b를 *E. coli* BL21(DE3) Gold에 형질 전환하여 균체를 생성 후 이를 이용하여 BSH를 과잉 발현하였다. 형질 전환체를 Ampicillin(50 μ g/mL)이 들어있는 LB 배지가 담겨 있는 baffled flask를 37°C의 조건에서 OD₆₀₀이 0.5~1.0이 될 때까지 진탕배양하였다. BSH의 발현을 유도하기 위하여 isopropylthiogalactopyranoside(IPTG) (TAKARA, Japan)의 최종 농도가 1mM이 되도록 첨가하였다. 12,000 rpm, 4°C, 5 min의 조건으로 원심분리하여 균체를 회수하였다. Sonicator(Sonics, USA)를 이용하여 pulse on/off(2/10), 1 min, 58% amplitude의 조건으로 균체를 용해한 후 14,000 rpm, 4°C, 20 min 원심분리 한 상등액으로 SDS-PAGE(12% polyacrylamide gel)를 이용하여 BSH 효소의 발현을 확인하였다(Laemmli, 1970). 단백질 밴드는 coomassie brilliant R250(Sigma, USA)를 이용하여 확인하였고, Bradford 방법(Bio-Rad, USA)을 이용하여 정량하였다(Bradford, 1976).

6. BSH 효소의 분리 정제

BSH 효소를 분리 정제하기 위해 상기 균체를 용해한 상등액을 이용하였다. Chromatography column(Bio-Rad, USA)에 packing한 Ni⁺-NTA agarose(Qiagen) column을 이용하여 BSH 효소를 분리정제였다. Lysis buffer(300mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, pH 8.0)로 평형을 만들고, 20mM imidazole이 첨가된 lysis buffer를 이용하여 column을 세척한 후 150mM imidazole이 섞여있는 lysis buffer를 이용하여 분리하였다.

7. 기질 특이성

분리 정제한 BSH의 기질 특이성을 측정하기 위해 서로 다른 6가지 담즙산염을 이용하였다. Tanaka 등(1999)과 Tanaka 등(2000)의 방법에 의하여, 10mM 담즙산염, 50mM sodium phosphate buffer(pH 6.5), BSH를 섞어서 37°C, 10 min 반응 후 15% trichloroacetate(Sigma, USA)를 이용하여 반응을 중단하였다. Conjugated bile salt로 부터 유리된 아미노산의 양을 측정하기 위해 ninhydrin reagent(0.5 mL of 1%(wt/vol) ninhydrin in 0.5M sodium citrate buffer(pH 5.5), 1.2 mL of glycerol, and 0.2 mL of 0.5M sodium citrate buffer(pH 5.5) 1.9 mL를 첨가하여 14분간 끓인 후 흐르는 물에 3분간 냉각시켜 SP-1900PC

UV/VIS spectrophotometer(Youngwoo, Korea)를 이용하여 OD₅₇₀에서 측정하였다. 위의 방법을 토대로 적정 pH를 측정하기 위해서 pH 3.0~5.0은 100mM sodium acetate buffer, pH 6.0~8.0은 100mM sodium phosphate buffer를 이용하였고, 적정 온도를 측정하기 위해서 BSH와 기질은 반응온도 범위를 20~60°C로 맞추어 실험하였다.

결과 및 고찰

1. 선별된 균주를 이용한 bsh Cloning

건강한 성인의 분변을 회석해서 MRS에 1mM GDCA, TDCA (Sigma, USA)를 첨가한 배지에 배양시켜 흰색 침전을 일으키는 균주를 선별하여 실험을 진행하였다. BSH activity site를 cloning하기 위하여 *E. faecalis* BSH sequence를 이용하여 *Nde*I과 *Xho*I site를 넣어서 만든 primer를 이용하였다. PCR 후 1% agarose gel에 전기 영동하여 band를 확인하였고 PCR Purification kit(Qiagen)으로 cleaning하여 pGEM-T easy vector에 cloning 후 sequence를 확인하였다. LBGCT(LB agar, 1% glucose, 0.035%

CaCl₂, 2mM TDCA) 고체배지에 형질 전환시킨 *E. coli* JM109를 37°C에 배양하여 주위에 침전이 생기는 clone을 선별하였다.

2. *E. faecalis* BSH의 유전적인 특징

pET22b expression vector를 이용하여 *E. coli* JM 109에 construction하였다. 위의 것을 다시 sequence한 결과(Fig. 1), 하나의 ORF가 stop codon을 제외한 996 bp의 nucleotide로 이루어 졌고 이론적인 분자량과 pI값이 각각 38,0 kDa, 5.22인 것을 알 수 있었다.

BLAST search를 하여 예상되는 BSH의 아미노산 BSH 서열을 비교한 결과 *E. faecium*이 82% identity/92% similarity (GenBank Accesion No. ZP_05921438)로 가장 유사한 것으로 확인되었다. 이 외에도 *E. gallinarum*(78%/88%) (ZP_05648674), *L. monocytogenes*(74%/88%)(YP_002758780), *L. seeligeri*(72%/88%)(YP_003465289), *E. casseliflavus*(73%/87%)(ZP_05647529), *C. perfringens*(71%/85%)(YP_209678), *L. plantarum*(70%/85%)(NP_786739)에서 유사성이 확인되었다.

```

1 atgtgtacagcaattactttatgtatcaaaagatcattactttggaaggaattttgattatgaaatttcttataatgaggtggttactatt
M C T A I T Y V S K D H Y F G R N F D Y E I S Y N E V V T I
91 acgccgagaaattataagttttcatttcgagaagttggaatttagatcatcattttgcaataattggaattgctgctgggattgctgat
T P R N Y K F S F R E V G N L D H H F A I I G I A A G I A D
181 tatccgctttattatgatgcaataaatgaaaaaggatttaggaatggctggattaaacttttcaggctatgcagattataaaaaaattgaa
Y P L Y Y D A I N E K G L G M A G L N F S G Y A D Y K K I E
271 gaagggaaaagaaaatgtttctccatttgagtttattccttgggtattgggccaatgctctactgtagatgaagcaaaaaaattattgaag
E G K E N V S P F E F I P W V L G Q C S T V D E A K K L L K
361 aatcttaatttagtaaatattaatttagtgatgaacttccgttatccccctccattggctgtggctgataaagagcaatctattgtg
N L N L V N I N F S D E L P L S P L H W L L A D K E Q S I V
451 gttgaaagcacgaaagaaggcttacgtgatattgataatcctgtaggcgtattaacaaataaccaacatttgattaccaattatttaat
V E S T K E G L R V F D N P V G V L T N N P T F D Y Q L F N
541 ttaacaattatcgtgtactttcaactagaactccaaaaaataatttttcagatcaaatagagttagatattatagtagaggaatgggt
L N N Y R V L S T R T P K N N F S D Q I E L D I Y S R G M G
631 ggtattgggttgccaggagattatcatcagttatctagatttgtaaaagcaacttttactaagttaaattctgtatcaagaagtcagaa
G I G L P G D L S S V S R F V K A T F T K L N S V S R S S E
721 tatgaaagtattagccaattttttcatattttaagttctgtcgaacaacaaaaggattgtgtgatgttggtgatgaaaaatagagtat
Y E S I S Q F F H I L S S V E Q Q K G L C D V G D E K Y E Y
811 acgatttattcttcatgttgtaacctggaaaagggaattttattactatcgtacgtatgacaatagttcaaattactgctgtggatagaa
T I Y S S C C N L E K G I Y Y Y R T Y D N S Q I T A V D M N
901 aaggaaaaatttagagaaggatagcttaattgtttatccaatgggtggaacacacaaaattaactatgctaatctcgagcaccaccaccac
K E N L E K D S L I V Y P M V E T Q Q I N Y A N L E H H H H
991 caccactga 999
H H *
    
```

Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequence of the *Enterococcus faecalis* CU30-2 *bsh* gene. The five proposed active site (C, D, N, N, R) are underline.

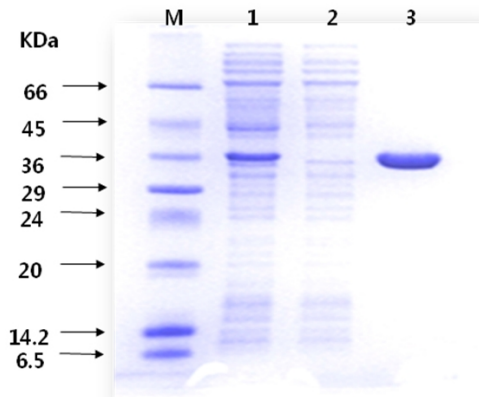


Fig. 2. Expression and purification of *Enterococcus faecalis* BSH enzyme. Lane M, Sigma Marker (Sigma, USA); lane 1; cell free extract, lane 2; flow through fraction, lane 3; eluted fraction.

3. 단백질 발현

단백질 발현을 위해 *E. coli* BL21(DE3) Gold에 transformation 하였다. IPTG의 농도를 1mM로 맞춰서 induction하여 단백질을 발현하였다. SDS-PAGE를 이용하여 확인한 결과, 단백질의 분자량이 약 38 KDa로 측정되었다(Fig. 2).

4. *E. faecalis* BSH 효소의 기질 특이성

분리 정제한 BSH 효소에 대한 기질 특이성을 알아보기 위하여 6가지의 담즙염을 이용하여 측정하였다. 측정 결과, *E. faecalis* CU30-2의 유전자를 이용하여 발현한 효소는 glycine이 결합된 담즙염에 대한 분해 능력이 taurine이 결합된 것

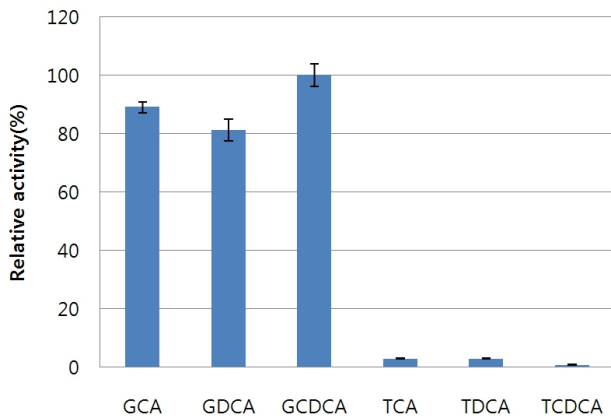


Fig. 3. Substrate specificity of the purified BSH enzymes. Six major bile salts are shown: glycocholic acid (GCA), glycodeoxycholic acid (GDCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), taurocholic acid (TCA), taurodeoxycholic acid (TDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA). The relative activity was calculated using GCDCA as a standard at 100%.

보다 더 높다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 이것으로 보아 glycine이 결합된 담즙산염이 BSH에 대한 친화력이 높다는 것을 알 수 있다. 일반적으로 사람의 담즙산염은 glycine이 결합된 담즙산염과 taurine이 결합된 것과의 비율이 3:1 정도로 glycine이 결합된 형태가 많으므로 장내 미생물의 일종인 *Enterococcus faecalis*의 BSH 활성은 소장 안에서 담즙산의 변형에 어느 정도 관여하는 미생물일 것으로 사료된다 (De Smet *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2003).

5. 온도와 pH 조건에 의한 *E. faecalis* BSH 활성

BSH 활성이 최적인 온도 조건은 대략 40°C 정도이고, 50~60°C에서도 활성이 확인되었다. 최적 pH는 7이었고, 그 이상이거나 5 이하에서는 활성이 감소하는 것으로 확인되었다 (Fig. 4). 다른 genus, species의 BSH의 경우를 보면, *B. longum*은 30~40°C에서 적정 온도가 관찰되었고, 적정 pH는 5~7에서 확인되었다(Grill *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2000). *L. acidophilus* PF01는 40°C 정도에서 가장 높은 활성을 보였고, 적정 pH는 6(Oh *et al.*, 2008)이었는데, 두 가지는 *E. faecalis* CU30-2와 비슷한 특성을 보였다. *B. fragilis* subsp. *fragilis*는

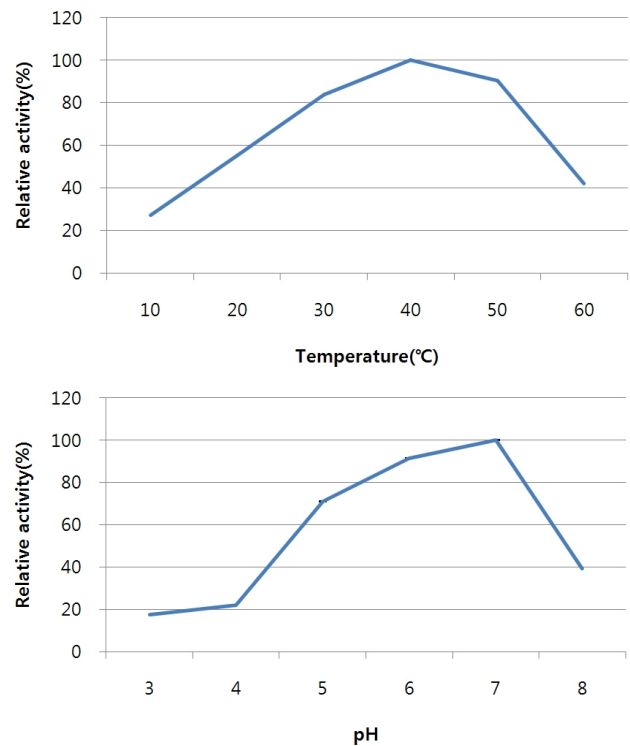


Fig. 4. Effects of temperature (above) and pH (below) on BSH activity. BSH activity at different temperature was measured in 50mM sodium phosphate buffer (pH 6.5). BSH activity at various pHs was measured in 50mM sodium acetate buffer at pH 3.0~5.0 and 50mM sodium phosphate buffer at pH 6.0~8.0.

적정 pH가 4.5로 조금 낮게 확인되었다(Stelling과 Hylemon, 1976). 호열성 미생물인 *Brevibacillus* sp.에서도 BSH가 관찰되는데 적정 온도가 60°C이고 적정 pH가 8에서 관찰되었다(Sridevi *et al.*, 2009).

적 요

담즙산 분해효소(Bile salt hydrolase, EC 3.5.1.24) 활성은 담즙산의 카르복실기와 결합되어 있는 아미노기(glycine or taurine)와의 amide 결합을 끊는 작용을 하며, 이 효소 활성은 사람이나 동물의 장내 미생물들에서 널리 분포하고 있다. 노인 분변으로부터 분리한 여러 균주의 *Enterococcus faecalis* 중에서 BSH activity가 가장 높은 CU30-2를 선발하였다. BSH 유전자를 pET22b expression vector에 클로닝하여 *Escherichia coli* BL21(DE3) Gold를 이용하여 단백질을 발현하였다. 6x His-tag이 있는 BSH 효소를 Ni²⁺-NTA agarose column을 이용하여 분리 정제하였고, 6가지의 다른 담즙산염을 이용하여 기질 특이성을 비교하였다. *E. faecalis* CU30-2의 BSH 효소는 glycine이 결합된 담즙산염에 대한 효소활성이 taurine이 결합된 것에 대한 활성보다 약 50배 정도 높게 나타났다. 이 효소의 최적 pH와 온도는 각각 7.0과 40°C로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

참고문헌

- Begley, M., Hill, C. and Gahan, C. G. M. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1729-1738.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- De Smet, I., Hoorde, L. V., De Saeyer, N., Woestyne, M. V. and Verstraete, W. 1994. *In vitro* study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 7:315-329.
- Fuller, S. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
- Franz, C. M. A. P., Specht, I., Harberer, P. and Holzapfel, W. H. 2001. Bile salt hydrolase activity of enterococci isolated from food: Screening and quantitative determination. *J. Food Prot.* 64:725-729.
- Gospal-Srivastava, R., and Hylemon, P. B. 1988. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Clostridium perfringens*. *J. Lipid Res.* 29:1079-1085.
- Grill, J. P., Schneider, F., Crociani, J. and Ballongue, J. 1995. Purification and characterization of conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2577-2582.
- Kim, G. B., Miyamoto, C. M., Meighen, E. A. and Lee, B. H. 2004. Cloning and characterization of the bile salt hydrolase genes (*bsh*) from *Bifidobacterium bifidum* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5603-5612.
- Knarrebog, A., Engberg, R. M., Jensen, S. K. and Jensen, B. B. 2002. Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacterial isolated from the small intestine of chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6425-6428.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- McAuliffe, O., Cano, R. J. and Klaenhammer, T. R. 2005. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activity in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4925-4929.
- Oh, H. K., Lee, J. Y., Lim, S. J., Kim, M. J., Kim, G. B., Kim, J. H., Hong, S. K. and Kang, D. K. 2008. Molecular cloning and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus acidophilus* PF01. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:449-456.
- Pereira, D. I. A., McCartney, A. L. and Gibson, G. R. 2003. An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile salt hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol lowering properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4743-4752.
- Pinto, M. G. V., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. 2006. *Lactobacillus* spp. With *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109:205-214.
- Sridevi, N., Vishwe, P. and Pradhune, A. 2009. Hypochlosteremic effect of bile salt hydrolase form *Lactobacillus bunchneri* ATCC 4005. *Food Res. Int.* 42:516-520.
- Sridevi, N., Srivastava, S., Khan, B. M. and Prabhune, A. A. 2009. Characterization of the smallest Dimeric bile salt hy-

- drolase from a thermophile *Brevibacillus* sp.. Extremophile 13:363-370.
17. Stelling, E. J. and Hylemon, P. B. 1976. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. Biochim. Biophys. Acta. 452:165-176.
18. Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T. and Mierau, I. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. J. Dairy Sci. 82:2530-2335.
19. Tanaka, H., Hashiba, H., Kok, J. and Mierau, I. 2000. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*: Biochemical and genetic characterization. Appl. Environ. Microbiol. 66:2502-2512.

(Received 2011.6.10/Revised 2011.6.24/Accepted 2011.6.27)