Korean Journal of Microbiology (2021) Vol. 57, No. 1, pp. 46-51
DOI https://doi.org/10.7845/kjm.2021.0126

pISSN 0440-2413
eISSN 2383-9902

# *Klebsiella pneumoniae*의 esterase유전자 cloning과 대장균에서의 고발현

정용준*
전주대학교 의과학대학 바이오기능성식품학과

# Cloning and high-level expression of the esterase gene from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*

Yong-Joon Chung*
*Department of Functional Food and Biotechnology, School of Medical Science, Jeonju University, Jeonju 55069, Republic of Korea*

(Received December 14, 2020; Accepted January 6, 2021)

Optically active D-β-Acetylthioisobutyric acid (DAT) is used as a starting material in the synthesis of captopril as a valuable chiral drug in the treatment of hypertension. For an efficient DAT production by a stereo-selective hydrolysis, *Klebsiella pneumoniae* CJ-317 producing a thermostable esterase was isolated in previous study. In order to construct an esterase hyper-producing strain, the esterase gene of *K. pneumoniae* CJ-317 was cloned into *Escherichia coli* and was found to show a high-level expression, which the esterase activity of the recombinant *E. coli* was more than 800 times higher than that of parental strain. The nucleotide sequences of 1.6 kb *Bam*HI-*Eco*RI fragment containing the esterase gene were sequenced and found to include an open reading frame (ORF) of 837 bp coding 278 amino acid residues. The deduced amino acid sequence of the ORF was classified as an α/β hydrolase superfamily and showed the highest identity of 71% with that of an esterase from *Pseudomonas putida* MR-2068. By using the recombinant *E. coli* as a catalyst, highly expressing the thermostable esterase gene, an efficient production of DAT by stereo-selective hydrolysis with microbial cells could be useful.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, D-β-Acetylthioisobutyric acid (DAT), esterase gene, high-level expression, nucleotide sequence

***For correspondence.** E-mail: chungyj@jj.ac.kr;
Tel.: +82-63-220-2560; Fax: +82-63-220-2054

다양한 생물종에 널리 분포되어 있는 가수분해효소인 에스터레이즈(이하 esterase)는 지방분해효소(lipase)와 함께 carboxyl ester결합을 분해하는 대표적인 효소로 알려져 있다. 특히 다양한 구조를 가진 여러 화합물의 대사 분해 과정에서 중요한 역할을 하고 있으며 따라서 이러한 esterase의 용도는 생물 촉매로서 유용한 화합물 제조에 있어서 산업적 활용 가치가 매우 크다(Romano *et al*., 2015). 예를 들어 상당수의 의약품들이 광학 활성을 지닌 키랄 화합물(chiral compounds) 형태이므로 화학 합성에 의해 제조할 때 혼합된 라세믹체(racemic mixture)로 생성되는데 그 중 하나의 거울상 이성질체(enantiomer)만이 활성을 가지는 경우, 광학이성체 분할공정은 필수적이다(Cohen *et al*., 1976; Shimazaki *et al*., 1982; Chirumamilla *et al*., 2001). 이때 생성된 비활성이성체의 존재로 인하여 제조수율이 낮아지고 이에 따른 원가가 높아지는 문제점을 해결하기 위하여 광학 순수이성체인 중간체를 제조 원료로 사용하는 제조 기술 개발이 요구되며 이를 바탕으로 한 고수율로 광학 활성을 지닌 의약품과 같은 고부가가치 화합물의 효율적인 제조도 가능하게 된다. 안지오텐신 전환 효소 저해제(angiotensin converting enzyme inhibitor)로 작용하는 대표적인 고혈압 치료제인 captopril (Ondetti *et al*., 1977)은 제조 과정의 중간체로서 광학 순수이성체인 D-β-Acetylthioisobutyric acid (이하 DAT)를 출발 물질로 사용하여 경제적인 제조 생산이 가능할 수 있다(Hasegawa *et al*., 1981; Sakimae *et al*.,1993). 이러한 captopril 중간체로서 광학이성체인 DAT를 순수하게 제조 생산하기 위한 한 방법으로 methyl 3-acetylthio-2-DL-propanoate

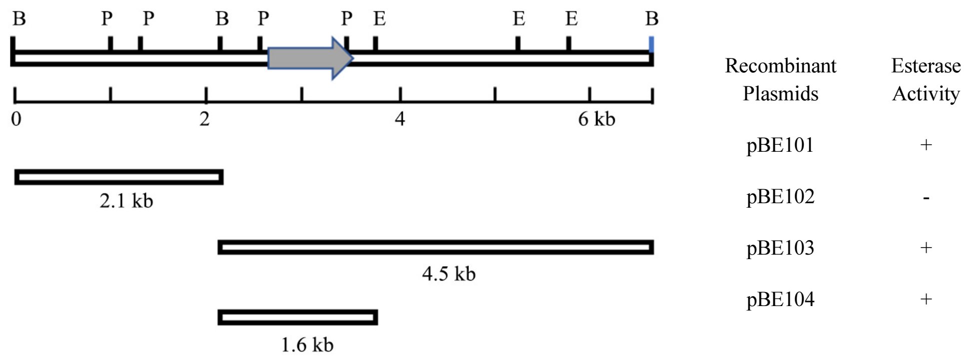


**Fig. 1. Restriction map of recombinant plasmids.** Recombinant plasmids were constructed by incorporating the DNA fragments into pUC19, and esterase activities were tested. The arrow in the fragment indicates the DNA region coding the esterase from *K. pneumoniae* CJ-317. Restriction site abbreviations are as follows: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; P, *Pst*I.

(이하 DL-ester)의 D-형 ester group만을 광학선택적(stereo-selective)으로 가수 분해하는 esterase 효소의 활성을 이용하는 기술 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 DL-ester를 광학선택적으로 분해하는 esterase를 생산하는 미생물로는 주로 *Pseudomonas*속과 *Acinetobacter calcoaceticus* 등이 보고되었다(Sakimae *et al*., 1992; Gokul *et al*., 2000; Honda *et al*., 2002; Shaw *et al*., 2006). 최근 들어 80°C까지 내열성을 유지하며 DAT 제조 활성이 우수한 광학선택적 esterase를 생산하는 *Klebsiella pneumoniae* CJ-317을 분리하고 효소 활성적 특성에 대한 연구가 보고된 바 있다(Chung, 2019).

따라서 본 연구에서는 이미 보고된 *K. pneumoniae* BR-317가 생산하는 내열성 esterase의 유전자를 대장균(*Escherichia coli*)에 클로닝(cloning)하여 고발현된 유전자 재조합주를 제조하는데 성공하였고 활성 측정 및 유전자의 염기 서열을 분석하였다. 이로써 고발현 재조합주를 생물 촉매로 활용한 captopril 합성의 중간체인 광학 순수이성체 DAT 제조의 기초 기술개발 가능성을 타진하였다.

재조합주의 제조를 위해 기본적으로 Sambrook 등(1989)에 따라 Nutrient agar 배지(0.3% beef extract, 0.5% bacto peptone, 1.5% agar)에서 30°C에서 18시간 배양한 *K. pneumoniae* CJ-317로부터 염색체 DNA (chromosomal DNA)를 추출 정제하였다. 제한 효소로서 *Bam*HI를 사용하여 적당한 조건 하에서 염색체 DNA (10 μg)를 부분 절단하고 0.8% 아가로오스 젤(agarose gel) 상에서 반응물을 전기 영동하였다. 제한 효소 절단 패턴을 분석한 후 2~8 kb에 상응하는 젤 영역을 절제한 후 절제한 DNA 분획을 DNA gel extraction kit (Qiagen)를 사용하여 젤로부터 용출 회수하고 TE 완충 용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0)에 용해시켜 사용하였다. 유전자 라이브러리(gene library)를 제조하기 위해 벡터(vector)로서 pUC19를 사용하였으며 숙주(host)로서 *E. coli* DH5α [*sup*E44, △*lac*U169 (φ80 *lac*Z △M15) *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *rel*A1]를 사용하여 클로닝을 행하였다. 제한 효소 *Bam*HI으로 부분 절단한 *K. pneumoniae* CJ-317의 염색체 DNA 분획과 완전 절단한 pUC19을 각각 혼합하여 16°C에서 18시간동안 $T_4$ DNA ligase를 반응시켜 재조합 DNA를 제조한 후, Hanahan 등(1983)의 방법에 따라 *E. coli* DH5α에 형질 전환시켰다. Ampicillin이 100 μg/ml가 함유된 L-broth agar (1% bacto trypton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에 isopropropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal)를 각각 1 mg/ml와 20 μg/ml을 첨가한 배지에서 37°C에서 하룻밤 배양한 후 재조합 집락(colony)을 얻었다. 이 때 흰색 집락(white colony)만을 선별하여 재조합주로 사용하였으며 형성된 집락 중 esterase 활성을 가진 재조합주를 선발하기 위해 0.1% (w/v) DL-ester와 0.01% bromocresol purple이 함유된 0.1 ml의 0.05 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)에 각 집락의 한 백금이를 넣고 30°C, 2시간 동안 배양한 후 DL-ester 용액이 노란색으로 변색된 균주를 선별하였다. 선별된 균주의 재조합된 plasmid를 분리하여 분석한 결과, 부분적으로 절단된 6.6 kb의 *Bam*HI 단편이 삽입된 *E. coli* DH5α/pBE101 재조합주가 esterase 활성을 가지고 있음을 확인하였고 재조합 DNA를 다시 *Bam*HI으로 완전하게 절단하여 subcloning한 결과, 각각 2.1 kb 단편이 삽입된 재조합주(*E. coli* DH5α/pBE102)와 4.5 kb 단편이 삽입된 재조합주(*E. coli* DH5α/pBE103)를 얻었으며 2.1 kb 단편에서는 활성을 보이지 않았으나 4.5 kb 단편이 삽입된 재조합주에서만 활성을 가지고 있었다. 좀 더 단편의 크기를 줄이기 위해 *Eco*RI을 사용하여 절단하여 얻은 subclone 재조합주 중 최종적으로 esterase 활성을 갖는 1.6 kb가 삽입된 재조합주 *E. coli* DH5α/pBE104를 얻었다. 이 때 제조된 재조합 DNA의 제한 효소 지도와 esterase 활성 유무를 확인한 결과를 Fig. 1에 나타냈다.

```
   1  gga tcc aca cgt ggg cag tcc tgg ctc tat cgc tcg ccc ctg gcg    45
  46  gcg acg cgc tgg gcc ttt ctg ctg tcg gcg gcc ggc tgg ctg ctg    90
  91  gcg ctg gtg gcc tgg tat ggc ggg cag gac tgg tcc gcc atg ctg   135
 136  ccg ggc gtg gcg tgc ggc ggg gcg ggg gcg gct gtc gcc tgg cgg   180
 181  att gcg gcg gga cgg tcg gcg cag tgt ggg ccc aga gtc gat ggc   225
 226  gca acg ctg ctg agc gtg gtc gtt gtc atc gcg gcg acg ctg ttg   270
 271  gcc caa cat acc gcc ggg gcc ggg cgc agc ggc gtg tgc ttc gcc   315
 316  ttc gcc gtg ctg ctg gac ctg tcg ctg ctc ggc gcg ctg atc gtg   360
 361  cgt atc agg cag cag gag agt gcg gcg taa cgg agt ccg gcg gca   405
 406  aat gaa gcg aga cgg ggt aag tca ccc ggc gtg gtg aca aat ttc   450
 451  ttc tac act gtt aca ggc atc aca ttc ctg tgc ggt cgg cac tcc   495
 496  tgc cgg ccg ccg tcg gcg ttc agc cca ggc acg ggc ctg cag gct   540
 541  ggt tat cct gaa aga gga gtc tgt aac atg gca ttt gtc acc acc   585
                        S D                 Met Ala Phe Val Thr Thr     6

 586  caa gac ggc gtc aac att tac ttc aaa gac tgg ggt cca aag gaa   630
   7  Gln Asp Gly Val Asn Ile Tyr Phe Lys Asp Trp Gly Pro Lys Glu    21

 631  gct cag ccg ata gtc ttt cat cac ggc tgg ccc ctg agc gcc gac   675
  22  Ala Gln Pro Ile Val Phe His His Gly Trp Pro Leu Ser Ala Asp    36

 676  gac tgg gat aac cag atg ttg ttt ttc ctt gcc gaa ggt ttt cgg   720
  37  Asp Trp Asp Asn Gln Met Leu Phe Phe Leu Ala Glu Gly Phe Arg    51

 721  gtc atc gct atc gac cgt cgg ggt cat ggc cgc tcc gat cag gtt   765
  52  Val Ile Ala Ile Asp Arg Arg Gly His Gly Arg Ser Asp Gln Val    66

 766  agc gag ggg cac gat atg gac cat tac gcg gcg gac gtt tcg gcg   810
  67  Ser Glu Gly His Asp Met Asp His Tyr Ala Ala Asp Val Ser Ala    81

 811  gtg gtg gaa cat ctg gat ctg cac aat gcg gtc cac gtc ggg cac   855
  82  Val Val Glu His Leu Asp Leu His Asn Ala Val His Val Gly His    96

 856  tcc act ggc ggc ggc cag gtt gcc cgc tac gtc gcc cgc tac ggc   900
  96  Ser Thr Gly Gly Gly Gln Val Ala Arg Tyr Val Ala Arg Tyr Gly   110

 901  cag ccg cag ggg cgg gtg gcg aaa gcg gtg tta att agc gcc gtc   945
 112  Gln Pro Gln Gly Arg Val Ala Lys Ala Val Leu Ile Ser Ala Val   126

 946  ccg ccg ctg atg gtg aaa acc gag cag aat ccg ggc ggt acg ccg   990
 127  Pro Pro Leu Met Val Lys Thr Glu Gln Asn Pro Gly Gly Thr Pro   141

 991  atc gag gtg ttt gat ggt ttc cgc aaa gcg ctg gcg gcg aac cgc  1035
 142  Ile Glu Val Phe Asp Gly Phe Arg Lys Ala Leu Ala Ala Asn Arg   156

1036  gcc cag ttc tat ctc gac gtc gcc tct ggc ccg ttc tat ggc ttc  1080
 157  Ala Gln Phe Tyr Leu Asp Val Ala Ser Gly Pro Phe Tyr Gly Phe   171

1081  aat cgt gac ggg gca gaa gtg tcg cag ggg acg atc cag aac tgg  1125
 172  Asn Arg Asp Gly Ala Glu Val Ser Gln Gly Thr Ile Gln Asn Trp   186

1126  tgg cga cag gga atg atc ggc agc gcc aag gcc cat tat gaa ggt  1170
 187  Trp Arg Gln Gly Met Ile Gly Ser Ala Lys Ala His Tyr Glu Gly   201

1171  atc aag gcg ttt tca gag act gac cag acg gaa gac ctt aag tcg  1215
 202  Ile Lys Ala Phe Ser Glu Thr Asp Gln Thr Glu Asp Leu Lys Ser   216

1216  atc acc ttg ccg gtg ctg gtg atg cag ggg gat gac gat cag gtg  1260
 217  Ile Thr Leu Pro Val Leu Val Met Gln Gly Asp Asp Asp Gln Val   231

1261  gtt ccc tat aaa aat gca gcc att ctg cag gac aaa ctg ctg ccg  1305
 232  Val Pro Tyr Lys Asn Ala Ala Ile Leu Gln Asp Lys Leu Leu Pro   246

1306  aac agc cag cta atc att tat cct ggc ttc ccg cac ggg atg cac  1350
 247  Asn Ser Gln Leu Ile Ile Tyr Pro Gly Phe Pro His Gly Met His   261

1351  acc tcc cac gcc gat acc atc aac gcc gat ctg ctg gcg ttt atc  1395
 262  Thr Ser His Ala Asp Thr Ile Asn Ala Asp Leu Leu Ala Phe Ile   276

1396  cgc gcc tga tct tcc ccc ttt gcc ggg cag agt gcc gtt aat ggc  1440
 277  Arg Ala ***

1441  att ccg cca gcg ccc tgg tcg cca gtc gcc ggg gcg cgc tgg ttg  1485
1486  acg agc agg gga aat ctg ctt aac tca tgg gat acc tga cga cta  1530
1531  ttt tcc ccc tgg cag gat aaa acg ccg ggt ttc tct gtg gaa acc  1575
1576  cgg cag aat tc
```

**Fig. 2. Nucleotide sequence encoding the esterase and the deduced amino acid sequence.** The underlined sequence preceding the ATG start codon of the *K. pneumoniae* CJ-317 esterase gene is a putative ribosome binding site (SD). The TGA stop codon is indicated with asterisks below the sequences. The deduced amino acid sequence from open reading frame is shown with the three-letter code below the nucleotide sequence. The sequence data have been summited to the GenBank nucleotide sequence database under accession number MW295354.

또한 *K. pneumoniae* CJ-317의 esterase 유전자의 염기 서열을 분석하기 위해 Sanger 등(1977)의 방법에 따라 삽입된 1.6 kb *Eco*RI-*Bam*HI 단편의 DNA 염기 서열을 분석한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 start codon인 ATG으로 시작하여 stop codon인 TGA로 끝나는 837 bp로 이루어진 open reading frame (ORF, *estK* 유전자)이 존재하였고 start codon 앞에는 ribosome binding site (SD)로 추정되는 AGAGGAG 서열이 발견되었다. 이 ORF 서열을 분석하기 위해 NCBI (The National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool)로 분석을 행하였으며 278 아미노산으로 구성된 단백질(EstK 효소 단백질)을 암호화하는 것으로 추정되었다. 또한 NCBI database를 통해 아미노산 서열을 분석한 결과, α/β hydrolase superfamily에 속하는 효소 단백질로 검색되었다. 이 계열에 속하는 대표적인 광학선택적 esterase 유전자의 염기서열은 이미 몇몇 보고된 바 있는데 이들의 아미노산 서열과의 상동성(% identity)을 비교하기 위해 서로 간 단백질 서열의 BLAST 분석을 행하였다. 이미 보고된 *P. putida* MR-2068 (Ozaki *et al*., 1995)의 esterase (AAB35246.1)와 EstK의 아미노산 서열 간 상동성을 분석한 결과, 가장 높은 71%의 상동성을 보여주었고 *P. putida* IFO12996 (Shaw *et al*., 2006)의 esterase (ABA39859.1)와 *A. calcoaceticus* F46 (Honda *et al*., 2002)가 생산하는 dihydrocoumarin hydrolase (BAC 55927.1)의 서열을 각각 EstK의 서열과 비교 분석한 결과도 각각 70%와 68%의 높은 상동성을 보여줌으로 모두 유사한 계통의 효소 단백질임을 알 수 있었다. 하지만 *P. fluorescens* SIK WI (Choi *et al*., 1990)가 생산하는 arylesterase (BAA02052.1)의 서열은 30%의 낮은 상동성을 보여주었다. 이들의 아미노산 서열에 대한 다중 정렬분석(multiple alignment analysis)을 위해 MUSCLE program을 사용하여 분석한 결과도 Fig. 3에서 보는 바와 같이 다른 단백질에 비해 비교적 짧은 236개의 아미노산을 가진 *P. fluorescens*의 arylesterase를 제외하고 모두 잘 보존되거나 유사한 서열 패턴을 보여주었다.

또한 발현된 각 재조합주들의 esterase 활성을 정량적으로 측정하여 비교하기 위해 *K. pneumoniae* CJ-317는 NB 배지, *E. coli* DH5α는 LB 배지, 각 재조합주들은 50 μg/ml ampicillin이 함유된 100 ml LB 배지에서 37°C에서 하룻밤 배양한 후, 각각

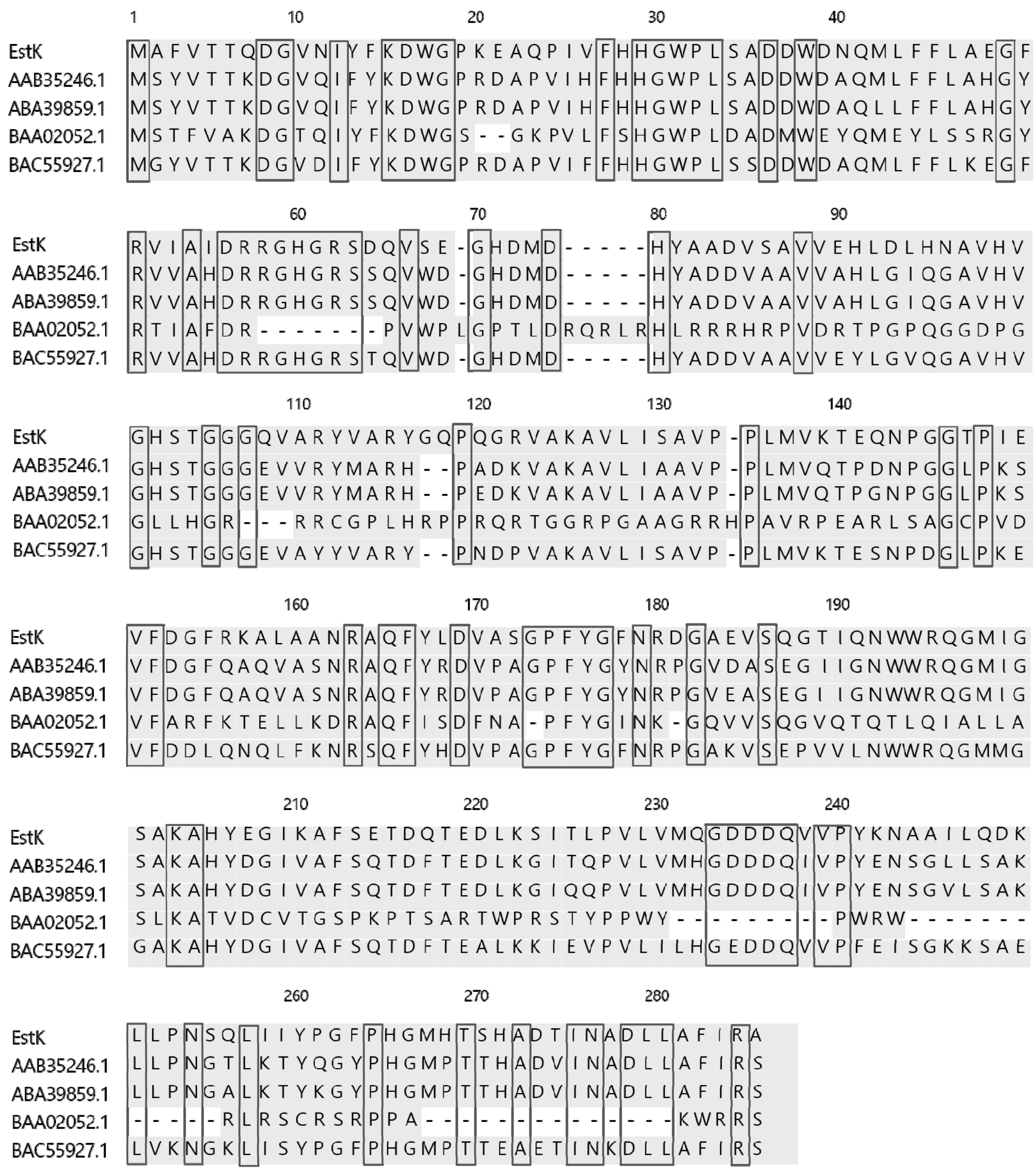


**Fig. 3. Comparison of amino acid sequences of esterases by multiple alignment.** The aligned sequences are the representative esterases: EstK, esterase from *K. pneumoniae* CJ-317 (278 AAs) in this study; accession number AAB35246.1, esterase from *P. putida* MR-2068 (276 AAs); ABA39859.1, esterase from *P. putida* IFO12996 (276 AAs); BAA02052.1, arylesterase from *P. fluorescens* SIK WI (236 AAs); BAC55927.1, dihydrocoumarin hydrolase from *A. calcoaceticus* F46 (276 AAs). The alignment was performed using the MUSCLE program. Identical amino acids are shown in the box, where a gray background indicates identical or equivalent amino acids.

**Table 1. Esterase activity of strains**

| Strain used | Esterase activity (U)[a] |
|---|---|
| *Klebsiella pneumoniae* CJ-317 | 300 |
| *E. coli* DH 5α[b] | 0 |
| *E. coli* DH 5α/pBE101[b] | 260,000 |
| *E. coli* DH 5α/pBE103[b] | 240,000 |
| *E. coli* DH 5α/pBE104[b] | 260,000 |

[a] Esterase activities (units/g dry cell) were measured as described previously.
[b] Strains in this study.

의 균체를 원심 분리하여 5 g DL-ester와 95 ml 균체 현탁액(0.05 M phosphate buffer; pH 7.0)으로 전체용액이 100 ml가 되도록 한 후, 30°C에서 1시간 동안 반응하고 0.1 N-NaOH로 pH 7.0을 유지하도록 자동조절하면서 반응 후 소모된 0.1 N-NaOH 양을 측정함으로써 이미 보고된 활성측정방법(Chung, 2019)에 따라 효소활성(Unit)을 결정하였다. 원균주인 *K. pneumoniae* CJ-317와 제조한 각각의 재조합주들의 esterase 활성을 측정비교한 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 각각의 재조합 plasmid를 함유한 대장균 재조합주들은 *K. pneumoniae* CJ-317에 비해

800배 이상의 활성이 증가되었으며 이는 재조합에 의해서 대장균 내에서 esterase의 유전자가 고발현된 결과로 판단되었다. 또한 6.5 kb와 4.5 kb와 1.6 kb가 각각 삽입된 재조합주의 활성이 각각 240,000~260,000 U (U/g dry cell) 사이에서 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인됨으로써 1.6 kb *Bam*HI-*Eco*RI 단편 외의 상위(upstream)와 하위(downstream)서열은 esterase 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

또한 *K. pneumoniae* CJ-317 및 고발현된 재조합주(*E. coli* DH5α/pBE104) 각각의 esterase의 효소 활성 및 각각 제조된 최종 산물인 DAT의 광학활성적 동일성을 비교하기 위해 효소의 내열성, 최적 반응 온도 및 DAT의 비선광도, 순도, 효소의 가수분해율 등을 조사하였는데 제조 조건 및 분석은 이미 보고된 방법(Chung, 2019)에 따라 행하였다. 그 결과 각각 *K. pneumoniae* CJ-317와 재조합주를 이용하여 DAT 제조 시, esterase의 가수분해율은 각각 50%이었으며 DAT의 비선광도 $[\alpha]_D^{25}$는 각각 -56.58 (c = 2.1578, $CHCl_3$)와 -59.68 (c = 2.0259, $CHCl_3$)로 분석되었고 각각의 순도는 99.1%와 98.3%이었으며 이때 DAT의 수율은 각각 91.2%와 90.3%로 매우 유사한 특성을 지닌 광학활성 카본산이 생성됨을 확인하였으며, 효소 활성의 내열성 및 최적 반응 온도 등을 검토한 결과도 동일한 특성을 나타냄으로써 동일한 효소 활성의 작용으로 확인되었다.

결과적으로 *K. pneumoniae* CJ-317 유래의 esterase 유전자가 함유된 1.6 kb 단편이 삽입된 재조합 *E. coli* DH5α/pBE104를 제조하는데 성공하였으며 이렇게 제조한 고발현 재조합 대장균 균주는 앞으로 DAT의 제조 과정에 생물 촉매로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 한편 미쓰비시 레이욘사의 Sakimae 등(1992)이 분리한 *P. putida* MR-2068의 경우, 재조합에 의해 esterase 활성이 대장균 내에서 200배 이상 고발현된 재조합주 제조에 이미 성공한 바 있지만(Ozaki *et al.*, 1994), 본 연구에서 제조한 대장균 재조합주에서 고발현된 *K. pneumoniae* CJ-317 esterase가 이미 보고된 바와 같이 *P. putida* MR-2068의 esterase에 비해 내열성이 보다 더 우수하여 고온 생산 조건에서도 더 효율적이며 최종 산물인 DAT 제조 시 광학활성 및 저해도 등과 같은 반응 특성에 있어서도 동일하게 우수한 것으로 판단되므로 산업적 측면에서 captopril 합성의 중간체인 DAT 제조 기술 개발에 더욱 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 *K. pneumoniae* CJ-317의 esterase가 지금까지 보고된 다른 균주에 비해서 더 우수한 내열성과 잠재적 효율성을 가지고 있음을 확인하였지만 그럼에도 불구하고 잠재적인 병원성 균주로 분류되는 *K. pneumoniae*의 특성상, 산업적 이용에 있어서 야기되는 문제점도 이러한 고발현 대장균 재조합주의 개발을 통해 가능해질 것으로 판단된다.

이로써 본 연구 결과를 통해 고발현 대장균 재조합주를 활용함으로써 captopril 합성의 중간체인 순수 광학이성체인 DAT의 고효율 제조 및 생산 가능성을 타진하였으며 미생물 촉매를 활용한 효율적인 생물 변환 기술을 기반으로 한 의약품 산업에서의 유용한 광학활성 의약품 제조 기술 개발에 효과적으로 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 적 요

고혈압 치료제로 알려진 captopril의 합성 과정에서 중간물질인 순수 광학이성체인 D-β-Acetylthioisobutyric acid (DAT)를 효율적으로 제조하기 위해 이미 보고된 *Klebsiella pneumoniae* CJ-317가 생산하는 내열성 광학선택적 esterase 효소의 유전자를 대장균(*Escherichia coli*)에 클로닝(cloning)하였고 고발현 재조합주를 제조하였다. 발현된 대장균 재조합주는 esterase 유전자가 함유된 1.6 kb의 *Bam*HI-*Eco*RI 단편이 삽입되었고 esterase 활성을 측정한 결과, 원균주인 *K. pneumoniae* CJ-317에 비해 800배 이상 고발현되는 것으로 확인하였다. 1.6 kb 단편의 염기 서열을 분석한 결과, 837 bp로 이루어진 open reading frame (ORF)이 발견되었고 278 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 것으로 추정되었다. 아미노산 서열의 상동성을 분석한 결과, α/β hydrolase superfamily에 속하는 효소 단백질로 추정되며, *Pseudomonas putida* MR-2068의 esterase 서열과 71%의 가장 높은 상동성을 보여주었다. 본 연구를 통해 제조한 고발현 대장균 재조합주를 활용함으로써 captopril 합성의 중간체로서 순수 광학이성체인 DAT의 고효율 제조기술개발 가능성을 연구하였다.

## References

**Chirumamilla RR, Marchant R, and Nigam P.** 2001. Captopril and its synthesis from chiral intermediates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 123–127.

**Choi KD, Jeohn GH, Rhee JS, and Yoo OJ.** 1990. Cloning and nucleotide sequence of an esterase gene from *Pseudomonas fluorescens* and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2039–2045.

**Chung YJ.** 2019. A newly isolated *Klebsiella pneumoniae* producing a thermostable stereo-selective esterase for production of D-β-acetylthioisobutyric acid. *Korean J. Microbiol.* **55**, 143–148.

**Cohen N, Eichel WF, Lopresti RJ, Neucom C, and Saucy G.** 1976. Synthetic studies on (2R, 4'R, 8'R)-α-tocopherol, an approach utilizing side chain synthons of microbiological origin. *J. Org. Chem.* **41**, 3505–3511.

**Gokul B, Lee JH, Song KB, Panda T, Rhee SK, and Kim CH.** 2000. Screening of microorganisms producing esterase for the production of (R)-β-Acetylmercaptoisobutyric acid from methyl (R, S)-β-acetylmercaptoisobutyrate. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 57.

**Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.

**Hasegawa J, Ogura M, Hamaguchi S, Shimazaki M, Kawaharada H, and Watanabe K.** 1981. Stereoselective conversion of isobutyric acid to *β*-hydroxyisobutyric acid by microorganism. *J. Ferment. Technol*. **59**, 203–208.

**Honda K, Kataoka M, and Shimizu S.** 2002. Enzymatic preparation of D-β-Acetylthioisobutyric acid and cetraxate hydrochloride using a stereo- and/or regioselective hydrolase, 3,4-dihydrocoumarin hydrolase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **60**, 288–292.

**Ondetti MA, Rubin B, and Cushman DW.** 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* **196**, 441–444.

**Ozaki E, Sakimae A, and Numazawa R.** 1994. Cloning and expression of *Pseudomonas putida* gene in *Escherichia coli* and its use in enzymatic production of D-*β*-acetylthioisobutyric acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **58**, 1745–1776.

**Ozaki E, Sakimae A, and Numazawa R.** 1995. Nucleotide sequence of the gene for a thermostable esterase from *Pseudomonas putida* MR-2068. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **59**, 1204–1207.

**Romano D, Bonomi F, de Mattos MC, de Sousa Fonseca T, de Oliveira MCF, and Molinari F.** 2015. Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnol. Adv.* **33**, 547–565.

**Sakimae A, Hosoi A, Kobayashi YH, Ohsuga N, Numazawa R, Watanabe I, and Ohnishi H.** 1992. Screening of microorganisms producing D-β-acetylthioisobutyric acid from methyl DL-β-acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1252–1256.

**Sakimae A, Kobayashi Y, Ohsuga N, Numazawa R, and Ohnishi H.** 1993. Chemical racemization of methyl L-*β*-acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 17–19.

**Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.

**Sanger FS, Nicklen S, and Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.

**Shaw SY, Chen YJ, Ou JJ, and Ho L.** 2006. Enzymatic resolution of methyl DL-β-acetylthioisobutyrate and DL-β-acetylthioisobutyramide using a stereoselective esterase from *Pseudomonas putida* IFO12996. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **38**, 163–170.

**Shimazaki M, Hasegawa J, Kan K, Nomura K, Nose Y, Kondo H, Ohashi T, and Watanabe K.** 1982. Synthesis of captopril starting from an optically active β-hydroxy acid. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 3139–3146.