

GOVP 12016372

660.62

73737

BSFG1370-2000051-3

광학활성 의약품 중간체 (R)- β -acetylmercapto-
isobutyric acid의 생물학적 생산공정 개발

Biological production of chiral compound

(R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid for the Optically
Active Pharmaceuticals

생명공학연구소

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “광학활성 의약품 중간체 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적
생산공정 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2000. 10. 27.

주관연구기관명 : 생명공학연구소

주관연구책임자 : 김 철 호

연 구 원 : 이 상 기

“ : 송 기 방

“ : 정 봉 현

“ : 이 제 혁

협·공동연구기관명 : INDIAN INSTITUTE
OF TECHNOLOGY

협·공동연구책임자 : Tapobrata Panda

연 구 원 : Gokul Boyapaty

요 약 문

I. 제 목

광학활성 의약품 중간체 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산공정 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구 목적은 미생물과 그 유래의 효소를 이용하여 고혈압 치료제의 중간체인 광학활성 의약품 중간체 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산공정을 개발하는데 있다.

국내의 제약원료산업을 부흥시키기 위하여 전문화, 계열화, 고부가가치, 다품종 소량 생산을 위한 연구의 전환이 필요하다. 이를 위해 선진국들도 연구개발을 서두르고 있는 광학활성 물질의 제조기술 개발이 절실하며, 의약품의 제조 생산에 있어, 입체이성체 의약품의 화학, 약리학, 독성학 및 임상학적 양상에 관한 강화된 규정에 따라, 제약산업의 활성화하려는 우리나라에 있어서 광학활성의약품 제조공정의 개발은 선진 신약의 개발에 필수불가결한 과제이다. 국내에서 거의 전무한 생물학적 광학활성 의약품 중간체인 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 개발공정을 확보하여 타 광학활성의약품 중간체 또는 광학활성의약품 완제품의 제조에 축적된 기술을 활용하여 고부가가치의 광학활성의약품 제조 생산 기술의 발전을 가속화하는 계기가 마련되리라 생각된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

광학활성 의약품 중간체 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산공정을 개발하기 위하여 자연계에서 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생산 균주를 분리 동정한다. (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생산 효소를 산업적으로 이용하기 위하여 DNA 조작을 통하여 재조합 효소를 개발한다. 개발된 재조합 효소의 산업적 대량 생산을 위하여 최적 발효 조건과 효소 생산 조건을 조사 설정한다. 대량 생산된 효소를 이용하여 기질로부터 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물전환 최적 공정과 조건을 조사한다. 반응액으로부터 생성된 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid를 효과적으로 분리하기 위한 분리 정제공정을 개발 확보한다.

IV. 연구개발결과

(R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid는 고혈압 치료제 등으로 사용되는 captopril과 analapril과 같은 angiotensin converting enzyme (ACE) 저해제 등의 광학활성의약품의 제조에 사용되는 중간체이다. RAM의 생산에 있어 (R,S)-ester의 화학적 가수분해방법은 RAM의 에스터 결합 뿐만 아니라 티오에스터 결합도 비선택적으로 가수분해하여 RAM의 수율이 낮고, 생산된 RAM의 광학적 순도가 떨어지는 단점이 있다. 따라서, 고효율과 고순도의 RAM을 생산하기 위하여 토양으로부터 광학 활성형의 RAM 생산 균주를 선별하여, RAM의 생산성을 기존의 보고에 의해 알려진 균주와 비교한 결과, 분리한 균주의 RAM의 생성능이 월등한 것으로 조사되었다. 또한, 생화학적 기질 이용능, 온도내성, DNA의 분자계통학적 조사에 의하여 *Pseudomonas aeruginosa*인 것으로 동정되었다. 국내 특허등록 (10-1999-0047927)을 위하여 본 균주를 KCTC에 KCTC8953P로 기탁하였고, US patent를 신청중에 있다.

*P. aeruginosa*에 의한 (R,S)-ester의 가수분해물의 광학적 입체이성질성을 조사하기 위하여, 가수분해된 acetylmercaptoisobutyric acid로 다이아스테레오머를 제조하여 분석한 결과, (R)-form의 형태를 가지는 것으로 확인하였다. 또한, 본 효소는 37°C에서 최적의 활성을 가지며, 70°C 이상의 온도에서도 열안정성을 가지는 것으로 조사되었다.

RAM을 생산하는 *P. aeruginosa* 유래의 *estA* 유전자를 분리하여 분석한 결과, 948개의 염기서열과 316개의 아미노산 배열을 지니고 있고, BLAST search를 통하여 triacylglycerol lipase와 carboxyl esterase와 상동성이 있어, GenBank에 accession number AF170828로 등록하였다. RAM 생성하는 esterase는 pH 6.4의 등전점을 지니고, 약 34,836 Da의 분자량을 갖는 것으로 확인되었다. 본 esterase의 아미노산 배열중 Gly-Asn-Ser-Met-Gly과 His-Gly은 serine esterase와 serine lipase에 공통적으로 존재하는 consensus 배열과 동일하여 serine계 esterase의 일종인 것으로 조사되었다.

본 esterase의 과발현을 위하여 His-tag을 사용한 pET 발현체계와 MBP-fusion protein을 이용하는 pMAL 발현체계를 이용한 결과, pMAL계 발현체계에 의하여 esterase의 대량발현이 가능하여 pMAL 발현체계를 이용하여 esterase를 대량발현시켰다. 그러나, 효소적 활성이 적은 수용성의 aggregate로 생산되어, 희석과 계면활성제의 첨가 등으로 활성을 증대시켰다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 얻은 특허는 생명공학연구소 미생물공정연구실을 주축으로 창업한 벤처기업인 (주)바이오홀딩스와 기술실시계약을 체결하여 산업화를 추진 할 계획이며 본 연구에서 개발된 재조합 효소 및 RAM 생산기술은 인도에 이전하여 인도에서 RAM 생산을 시도할 계획에 있다.

S U M M A R Y

The purpose of this research are the construction of overexpression vector system overproduction, and purification for production of optical active pharmaceuticals.

(R)- β -Acetylmercaptoisobutyric acid (RAM), one of the β -alkylcarboxylic acids, is an important intermediate for the synthesis of various optically active compounds, especially angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor such as Captopril and Alacepril which are used for the treatment of hypertension and congestive heart failure. Regarding the production of RAM, the chemical hydrolysis of (R,S)-ester decreases the optical purity of RAM resulting in poor yield, because the ester and the thioester bonding of the RAM are hydrolyzed during the reaction.

Therefore for the production of RAM with high purity and high efficiency, we have tried to screen microorganisms having esterase specific for the production of optically active RAM only, and a strain were isolated from soil. The amount of RAM produced by the strain were superior than those of microorganisms with β -alkylcarboxylic acid and alkyl ester-hydrolyzing enzyme. From the chemical taxonomic analysis, the temperature tolerance, and the molecular systematic analysis, two strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* was deposited in Korean Collection for Type Cultures (KCTC) with the accession number KCTC8953P to apply for a Korean Patent (10-1999-0047927), and US Patent is ongoing.

To determine the confirmation of hydrolyzed product from (R,S)-ester by the whole cells of *P. aeruginosa*. the diastereomer of acetylmercaptoisobutyric acid hydrolyzed from (R,S)-ester was confirmed as (R)-form, which means that the enzyme in the whole cells of *P. aeruginosa* catalyzes asymmetric hydrolysis of the ester bond of (R)-form of (R,S)-ester and converted it into RAM. And the enzyme showed the maximal activity at 37°C, and was fairly stable up to 80°C.

The gene encoding the enzyme producing RAM from the strain was cloned. The nucleotide sequence (948-bp) of gene in clone from *Pseudomonas aeruginosa* genomic DNA has been deposited in the GenBank, where it has been assigned the accession number AF170828. The gene encoding esterase has 316 amino acids. The isoelectric point and the molecular weight were found to be pH 6.4 and 34,836 Daltons, respectively.

Amino acid sequence homologous to the *estA* gene product has been done using BLAST database search. The best overall alignment was observed with the triacylglycerol lipase and carboxyl esterases. It was observed that amino acid sequences of *estA* have high homologies with esterases and lipases.

Amino acid sequences of the *estA* gene product has consensus sequences, Gly-Asn-Ser-Met-Gly containing active serine residue and His-Gly. This consensus pentapeptide sequence exists commonly in the active site of esterases, lipases, and serine

proteases. Also at the 70-100 amino acids upstream from the consensus sequences, another consensus sequences, H-G, dipeptide, exist and this motif does the role to support the pentapeptide consensus sequences as a hydrophobic wing. Hence it is concluded that this enzyme to be novel esterase producing RAM and one of serine esterases in *P. aeruginosa*.

The overexpression vector of *estA* was constructed and transferred to *E. coli* BL21, and the recombinant *E. coli* was named to *E. coli* BL21 PES, deposited in KCTC with the accession number KCTC8952P.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	13
Section 1. Purpose of research	13
Section 2. Necessity of research	13
1. Economic, social, and technical necessity of research	13
1). Aspect of economy and industry	13
2). Aspect of society and culture	14
3). Aspect of technology	15
Section 3. Range of research	16
1. Purpose of research	16
2. Necessity of research	16
3. Range of research	16
Chapter 2. The present condition of the internal and external research	18
Section 1. The present condition of the internal and external research ..	18
1. The present condition of the internal research	18
2. The present condition of the external research	20
Section 2. Situation on the the internal and external research condition ..	27
1. Situation on the the internal research condition	27
2. Situation on the the external research condition	27
Chapter 3. Results	28
Section 1. Materials and method	28
1. Preparation of (R,S)- β -Acetylmercaptoisobutyrate	28
2. Media and buffer solution	28
3. Restriction enzyme and reagents	29
4. <i>E.coli</i> strains and plasmids	29
5. Isolation and the identification of strain producing (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid	32
6. Comparison of RAM-producing ability among several strains ..	33

7. Recombinant DNA and transformation into <i>E.coli</i>	33
8. Preparation DNA ladder for the nucleotide sequencing	34
9. Analysis of nucleotide sequences and amino acid sequence ..	35
10. Construction of expression vector system	35
11. Induction	36
12. Fermentation	36
13. Fed-batch culture	38
14. PCR	38
15. Preparation of RAM by the resolution of (R,S)-ester	40
16. Determination of the activity of enzyme	40
17. Determination of (R)- β -Acetylmercaptoisobutyric acid	41
18. SDS-PAGE	42
19. Analysis of optical active form of β -Acetylmercaptoisobutyric acid	42
Section 2. Results and discussion	43
1. DNA cloning of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
1). Screening of strain producing-RAM	43
2). Identification of strain	46
3). Physico-chemical properties of enzyme from <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> 1001	53
4). Optical active form and the resolution of the hydrolyzed (R,S)-ester by the enzyme from <i>P. aeruginosa</i> 1001 ..	57
5) Production of RAM from (R,S)-ester	61
6). Cloning of <i>estA</i> gene from <i>P. aeruginosa</i> 1001	63
7). Unidirectional deletion of insert DNA	66
8). Analysis of the nucleotide sequence of pTBL73 plasmid	66
9). Homology of other enzymes	72
10). Expression of <i>estA</i> in <i>E.coli</i>	77
11). His-tag residue	80

12). MBP-esterase fusion protein	82
(1) MBP-fusion protein	82
(2) Construction of the expression vector for overproduction of esterase	82
(3) Expression of <i>estA</i> gene-harvured pMAL	87
(4) MBP-esterase fusion protein of the supernatant and the pellet of cell disruption	90
(5) Isolation of MBP-esterase fusion protein	92
(6) Improvement of the activity if MBP-esterase fusion protein by the dilution	95
(7) Cleavage of MBP-esterase fusion protein by Factor Xa.....	97
(8) 'In vitro' activation of MBP-esterase fusion protein ..	99
(9) Expression of <i>estA</i> gene in overexpression vector system lacked- <i>malE</i> gene	101
13). Results of Indian part	105

Chapter 4. Achievement of research purpose and the contribution to the relative technology	144
Section 1. Achievement of research purpose	144
Section 2. The contribution to the relative technology	144
Chapter 5. Application plan of results	145
Section 1. Necessity of additional research	145
Section 2. Application to other research	145
Section 3. Commercialize plan	146
Chapter 6. References	147

목 차

제 1 장 서 론	13
제 1 절 연구개발의 목적	13
제 2 절 연구개발의 필요성	13
1. 연구개발의 경제적 사회적 기술적 필요성	13
가. 경제, 산업적 측면	13
나. 사회, 문화적 측면	14
다 . 기술적 측면	15
제 3절 연구개발의 범위	16
1. 연구의 목적	16
2. 연구의 필요성	16
3. 연구의 범위	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 1절 국내·외 기술 개발현황	18
1. 국내 기술 개발 현황	18
2. 국외 기술개발현황	20
제 2절 국내·외 기술 개발현황에서 차지하는 위치	27
1. 국내 기술개발 현황에서 차지하는 위치	27
2. 국외 기술개발 현황에서 차지하는 위치	27
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
제 1절 실험재료 및 방법	28
1. (R,S)- β -Acetylmercaptoisobutyrate의 합성	28
2. 사용 배지 및 완충용액	28
3. 제한 효소 및 시약	29
4. 대장균 균주 및 플라스미드	29
5. (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생산 균주 분리 동정	32
6. 기존의 RAM 생산 균주와의 생산능비교	33
7. DNA 재조합 및 대장균의 형질 전환	33

8. 염기서열분석을 위한 DNA ladder의 제조	34
9. DNA와 단백질 서열 분석	35
10. 발현 벡터의 제조	35
11. Induction	36
12. 발효조	36
13. Fed-batch culture	38
14. PCR	38
15. (R,S)-ester의 resolution에 의한 RAM의 제조	40
16. 효소 활성 측정	40
17. (R)- β -Acetylmercaptoisobutyric acid의 분석	41
18. SDS-PAGE	42
19. β -Acetylmercaptoisobutyric acid의 광학활성 분석	42
제 2절 연구 결과 및 고찰	43
1. DNA cloning of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
가. RAM 생성 균주의 선발	43
나. 균주의 동정	46
다. <i>Pseudomonas areuginosa</i> 1001의 enzyme의 물리화학적 특성	53
라. <i>Pseudomonas areuginosa</i> 1001의 효소에 의한 (R,S)-ester의 가수분해 산물의 광학활성과 (R,S)-ester의 분리능.....	57
마. (R,S)-ester로부터 RAM의 생산	61
바. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001의 <i>estA</i> 유전자의 클로닝 ..	63
사. DNA 단편의 단일방향 제거	66
아. pTBL73 플라스미드의 염기서열 분석	66
자. 다른 효소들과의 상동성 연구	72
차. 대장균에서 <i>estA</i> 의 발현	77
카. His-tag residue	80
타. MBP-esterase fusion protein	82
(1) MBP-fusion protein	82

(2) Esterase를 overexpression하는 pMAL vector의 제조	82
(3) pMAL vector내의 <i>estA</i> 의 발현	87
(4) 세포파쇄액의 상층액과 pellet의 MBP-esterase fusion protein	90
(5) MBP-esterase fusion protein의 분리	92
(6) MBP-esterase fusion protein의 회석에 의한 효소 활성의 증가	95
(7) MBP-esterase fusion protein의 Factor Xa에 의한 절단	97
(8) 'in vitro' MBP-esterase fusion protein의 활성화	99
(9) <i>malE</i> 유전자가 결여된 overexpression vector system에서의 esterase의 발현	101
파. 인도측 연구 결과	105
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	144
제 1 절 연구개발 목표의 달성도	144
제 2 절 관련분야 기술발전에의 기여도	144
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	145
제 1 절 추가연구의 필요성	145
제 2 절 타 연구에의 응용	145
제 3 절 기업화 추진방안	146
제 6 장 참고문헌	147

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

광학활성형 의약품생산의 추세가 단일 광학활성 의약품을 생산하는데 있으며, 여기에 부응하여 우리나라에서 연구기반과 생산기반이 취약한 단일 광학활성을 가지는 의약품의 생산기술의 확보하는데 본 연구의 목적이 있다.

본 연구에서는 세계의 의약품 시장에서 중요한 위치를 차지하고 있는 ACE계 저해제 (Angiotensin-Converting Enzyme inhibitor)인 Enalapril, Captopril, Diltiazem의 주요 중간체인 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산기술 개발하는데 그 구체적 목적이 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 경제적 사회적 기술적 필요성

가. 경제, 산업적 측면

1980년대 중반까지는 합성 의약품 중에서 racemate drug이 single enantiomer drug보다 압도적으로 많았다 (Non-chiral drug 60%, Racemate 35.2%, Single isomer 4.8%). 반면에 자연계에서 분리한 반합성 의약품의 경우에는 97% 이상이 single enantiomer drug으로 racemate drug보다 압도적으로 많았다 (Single isomer 97%, Non-chiral drug 1.3%, racemate

1.7%). 이러한 추세로 가면 합성 키랄 의약품 중에서 racemate drug의 비중은 점차 줄고 single enantiomer 가 80% 이상을 차지할 것으로 예상되고 있다. 광학활성 의약품의 생산을 위해 사용되고 있는 대표적인 광학활성 원료 물질로는 amino acids, alkaloids, carbohydrate, epoxides, hydroxy acids, terpenes 등이 있다. 이들은 주로 광학활성 의약품, 농약 등의 생산에서 직접 원료물질로 사용되거나 chiral source로써 사용되며, terpene류나 alkaloid류에서와 같이 resolving agent로 사용되기도 한다. 이러한 광학활성 물질은 위와 같이 single enantiomer로써의 각종 정밀화학 제품의 생산이 증가함에 따라 그 수요가 급증하고 있다. 예로써 페니실린계 및 세파계 항생제와 ACE 계 저해제인 captopril 과 enalapril을 포함한 10대 광학활성 의약품의 매출액만 고려해 보아도 이미 연간 165억 달러를 상회하고 있다. 이 중에서 ACE계 저해제 (Angiotensin-Converting Enzyme inhibitor)인 Enalapril, Captopril, Diltiazem의 시장규모가 54억 달러로 전체의 30% 정도를 차지하고 있어 세계 의약품 시장에서 가장 중요한 위치를 차지하고 있다. 따라서 이들의 주요 중간체인 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산기술 개발이 시급한 실정이다.

나. 사회, 문화적 측면

1992년에 FDA가 발표한 입체 이성체 의약품의 화학, 약리학, 독성학 및 임상학적 양상에 관한 규정인 'Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drug'에 따르면 앞으로 신규 키랄 의약품을 개발하여 FDA의 허가를 얻기 위해서는 왜 single enantiomer이어야 하는가를 잘 나타내 주고 있다. 즉 racemate 형태로 생산할 경우에는 racemate 자체로 사용할 때 뿐만 아니라 각각의 이성체를 따로 사용했을 경우에 대해서도 각각 동물과 사람에 대하여 안전하다는 것을 증명하도록 규정하고 있어 racemate의 생산을 간접적이지만 거의 원천적으로 규제하는 효과를 나타내고 있다. 따라서 광학활성 의약품 생산에 유용한 키랄화합물들의 생산연구는 의약산업의 경쟁력 확보와 국민건강 증진 차원에서 필수 불가결한 연구과제로 대두되고 있다.

다 . 기술적 측면

최근 미국의 FDA는 신약 개발시 single enantiomer만을 사용한 광학활성 의약품의 생산을 권장하고 있다. 이와 같이 광학적으로 순수한 화합물만을 사용하도록 규정하고 있는 주요 원인은 첫째가 대개의 경우 특정한 약리학적, 생물학적 활성에 한 enantiomer만이 관련을 가지고 있기 때문이며, 둘째로는 두 enantiomer중 하나는 유용한 반면 다른 하나는 해로운 특성을 나타내는 것처럼 두 enantiomer가 서로 전혀 다른 활성을 가지고 있기 때문이고, 셋째로는 광학적으로 순수한 화합물이 racemate보다 거의 두 배 이상의 활성을 나타내기 때문이다. 이외에도 해로운 enantiomer가 의약품과 농약 등을 통하여 불필요하게 인체와 자연계에 축적되는 것을 방지하기 위해서도 유용 enantiomer만을 생산하도록 규제할 당위성이 인정되며, 생산 공정을 고려해 보아도 유용한 한 enantiomer만을 생산하면 racemate를 생산할 때 보다 생산능력을 두배로 향상시킬 수 있는 장점도 가지고 있다. 이와 같은 요인들로 인하여 최근에 이르러 생체촉매를 이용한 광학활성 물질 생산 연구가 각광을 받고 있다. 이는 화학 합성법을 사용할 경우 제품이 racemic mixture 형태로 생산되기 때문에 수율이 낮을 뿐만 아니라 (최대 50%) 이로부터 유용한 single enantiomer 만을 분리하는 데에도 많은 비용이 들기 때문이다.

최근 광학활성 중간체의 합성방법 연구에 있어서도 새로운 경향이 나타나고 있는데 racemate를 적당한 esterase를 사용하여 resolution시키는 새로운 공정의 개발이 각광을 받고 있다. 따라서 본 연구에서는 mercaptoacetic acid 와 methacrylic acid 또는 methyl methacrylic acid를 기질로 사용하여 직접 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid를 생산하는 신효소 공정을 개발하고자 하며, 이러한 새로운 esterase와 lipase의 탐색, 생산 및 이들을 이용한 효소 전환 공정 및 resolution 공정의 개발은 여러 가지 유용한 키랄화합물들의 생산공정 개발을 위한 기반 기술로써 파급효과가 지대할 것이다.

제 3절 연구개발의 범위

1. 연구의 목적

본 연구는 미생물과 그 유래의 효소를 이용하여 고혈압 치료제의 중간체인 광학활성 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산공정을 개발하는데 있다.

2. 연구의 필요성

우리나라 제약산업은 사양화일보직전의 상태에 와 있으며, 그 이유는 국내의 급격한 인건비 상승으로 인한 연구개발에의 투자미흡으로 인해 인건비가 낮은 개발도상국, 인도, 중국등에 계도 가격경쟁면에서 뒤져 국제 경쟁력을 잃는 결과를 낳았다. 국내의 제약원료산업을 부흥시키기 위하여 전문화, 계열화, 고부가가치, 다품종 소량 생산을 위한 연구의 전환이 필요하다. 이를 위해 선진국들도 연구개발을 서두르고 있는 광학활성물질의 제조기술 개발이 절실하다. 또한, 의약품의 제조 생산에 있어, 1992년에 미국 FDA가 발표한 입체이성체 의약품의 화학, 약리학, 독성학 및 임상학적 양상에 관한 규정인 "Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drug"에 따라, 제약산업의 활성화하려는 우리나라에 있어서 광학활성의약품 제조공정의 개발은 선진 신약의 개발에 필수불가결한 과제이다.

국내에서 거의 전무한 생물학적 광학활성 의약품 중간체인 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 개발공정을 확보하여, 타 광학활성의약품 중간체 또는 광학활성의약품 완제품의 제조에 축적된 기술을 활용하여 고부가가치의 광학활성의약품 제조 생산 기술의 발전을 가속화하는 계기가 마련되리라 생각된다.

3. 연구의 범위

광학활성 의약품 중간체 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산공정을 개발하기 위하여 자연계에서 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생산 균주를 분리 동정한다. (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생산 효소를 산업적으로 이용하기 위하여 DNA 조작을 통하여 재조합 효소를 개발한다. 개발된 재조합 효소의 산업적 대량 생산을 위하여 최적 발효 조건과 효소 생산 조건을 조사 설정한다. 대량 생산된 효소를 이용하여 기질로부터 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물전환 최적 공정과 조건을 조사한다. 반응액으로부터 생성된 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid를 효과적으로 분리하기 위한 분리 정제공정을 개발 확보한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내·외 기술 개발현황

1. 국내 기술 개발 현황

세계적으로는 80년대 초반부터 미생물이나 효소를 이용하여 생물학적으로 광학활성체를 생산하기 위한 기본연구가 시작된 이래 이미 β -blockers의 합성에 주요한 광학활성 glycidyl 유도체 등과 같은 C3 synthons의 산업화가 성공적으로 이루어 졌으며 이 외에도 L-aspartate, L-phenylalanine, L-DOPA, L-malate, L-carnitine, (R)-phenylacetyl-carbinol, (R)-cynohydrins 등도 상업적으로 생산되고 있으며 기타 새로운 chiral building blocks의 생물학적생산에 관한 연구들이 광범위하게 이루어 지고 있다. 특히 대표적인 ACE 계 저해제인 captopril의 중간체인 D-(+)- β -hydroxyisobutyric acid (D-HIBA)의 생물학적 생산방법은 일본의 Kanegafuchi사에 이어 본 연구팀에서도 개발에 성공한 바 있다. 이에 비하여 국내에서는 D-amino acids 와 L-DOPA 및 D-HIBA의 생산에 관한 연구보고 외에는 광학활성 중간 원료물질의 생산에 관한 기본연구 자체가 미약한 상태이며 산업화는 전무한 상태로, 이러한 상황이 계속된다면 광학활성 의약품 및 원료 의약품 시장의 예측화를 피할 수 없을 것이다.

광학활성 신약개발에 관한 FDA 규정이 강화됨에 따라 광학활성 중간체의 개발 경쟁이 갈수록 치열해질 것으로 예상되며 이는 다원화된 품목 개발전략으로 여러 많은 연구팀에서 다양한 유용 중간체들을 개발하여야 할 것이다.

광학활성 의약품의 생산원가는 중간체의 생산단가 및 이의 특성에 좌우되기 때문에 광학활성 중간원료의 수입은 곧 완제품의 수입과도 비교될 수 있으며, 이의 생산 기술 또한 부가가치가 높아 기술이전을 기피할 뿐만 아니라 경우에 따라서는 광학활성 중간체 자체의 수출도 기피하는 경우도 있어 이의 기술도입은 거의 난망한 상태이다.

특정 광학활성 중간체를 생산하고자 할 때 resolution 수율이 낮거나 비경제적일 경우 생물학적 생산 공정이 화학적 공정에 비하여 월등한 장점을 가지고 있는 것은 분명하다. 그러나 생물공정으로 생산된 중간체에서 최종 제품으로 가는 중간과정이 여러 단계로 이루어져 있을 경우 이는 최선의 중간체라고는 할 수 없다. 따라서 가능한 최종 제품에 근접한 광학활성 중간체를 얻는것이 최선의 방법이 될 수 있으며 이를 통한 공정개선 연구들이 시도되고 있다. 이와 같은 관점에서 유용 광학활성 중간체인 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산공정 개발은 최종제품의 생산공정을 획기적으로 개선하는 데에 크게 기여할 것이다.

지금까지 국내에서 연구·생산된 광학활성의약품 또는 광학활성 제조기술로 제조·생산된 제품을 살펴보면, 페니실린계 항생제 및 세팔로스포린계 항생제인 광학활성물인 중간체 Penicillin G(또는 6-APA)나 Cephalosporin C(7-ACA)를 원료로 아실화 방법에 의해 Ampicillin과 Amoxicillin의 베타락탐계 항생제를 상품화하였다. 또한, 6-APA를 원료로한 반합성 페니실린계 항생제로 Cloxacillin, Dicloxacillin, Bacampicillin, Piperacillin, Cyclacillin, Mezlocillin 등이 개발되어 생산 중에 있다. 또한, 페니실린의 환팽창 반응에 의해 얻어지는 7-ADCA를 이용하여 7-ADCA 계열 세파계 항생제인 Cephalexin, Cephadrine, Cefadroxil 등이 개발 생산되고 있다. 모노 박탐계 화합물로 카바페넴계 항생제의 중간물질인 4-acetoxyazetidinone과 모노박탐계 항생제인 Carumonam은 그 합성과정이 광학활성제조기술로 되어 있어 국내 광학활성원료의약품 산업의 시초로도 볼 수 있다.

이밖에도 광학활성 테트라사이클린계 항생제인 Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline, Minocycline이 생산되고 있으며, 결핵치료제인 Rifampicin, 아미노글리코사이드계 항생제인 Amikacine이 반합성 방법에 의해 합성되었다. 특히 항암제·중 광학화합물인 Doxorubicin과 탁솔이 개발 생산되고 있다.

상기한 여러 광학활성 의약품은 전적으로 화학반응에 기초하거나, 생물학적 공정이 포함되었다하더라도 발효액을 원료로 쓰는 정도이 그치고 있다. 미생물을 이용한 광학활성 의약품 중간체 생산에 관한 국내 연구는, 본 연구팀에서 D-hydroxyisobutyric acid (D-HIBA)의 생물

학적 생산에 관한 연구 논문의 발표 외에 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생산에 관한 연구는 전무한 상태이다.

2. 국외 기술개발현황

일찍이 L-(+)- β -hydroxycarboxylic acid 및 그의 유도체들은 vitamins, flavour components, antibiotics, pheromone 등의 합성에 전구물질로 유용하게 사용되어 왔다. 예로서 L-(+)- β -hydroxyisobutyric acid를 출발물질로한 α -tocopherol, lasalocid A, calcimycin과 (R)- 및 (S)-muscone의 생산공정이 알려졌으며, D-(-)- β -hydroxyisobutyric acid (D-HIBA)는 고혈압 치료제 captopril의 생산에 유용한 전구체로 사용되고 있다. 종래의 captopril 생산공정은 반응 중간체 및 거의 모든 공정에서 화학반응공정을 주로한 공정으로 이루어져 있다 (Fig. 1). β -Hydroxycarboxylic acid의 생물학적 생산방법은 발효에 의한 방법, aliphatic glycols의 산화에 의한 방법, carboxylic acid의 β -hydroxylation에 의한 방법 및 β -ketocarboxylic acid의 hydrogenation에 의한 생산방법으로 분류할 수 있다. 이 외에도 *Candida rugosa*를 사용한 D-(-)- β - 및 L-(+)- β -hydroxyvaleric acid와 (-)- α -hydroxymethylbutyric acid, β -hydroxpropionic acid의 생산방법과 *Trichosporon fermentans*에 의한 (+)- α -hydroxy methylbutyric acid의 생산, *Endomyces reessii*에 의한 β -hydroxyisovaleric acid 및 β -hydroxyisocaproic acid의 생산방법 등이 알려져 있다.

최근에는 captopril 생산을 위한 광학활성 중간체의 합성방법 연구에 있어서도 새로운 경향이 나타나고 있는데 D-HIBA에서 한 걸음 더 나아가 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid를 중간체로 사용하여 합성공정을 보다 단순화 시키고자 하고 있다. 예로써 일본의 Mitsubishi 연구원들은 racemate 상태의 β -acetylmercaptoisobutyric acid methyl ester를 적당한 esterase를 사용하여 resolution 시키는 새로운 공정을 개발하였다 (Fig. 2). 이보다 더 획기적인 공정으로는 mercaptoacetic acid 와 methacrylic acid를 결합시켜 (R)- β

-acetylmercaptoisobutyric acid로 전환하는 효소를 찾는 공정이 제안되었고 (Fig. 3), 생산된 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid으로부터 captopril을 생산하는 공정을 Fig. 4에 나타내었다.

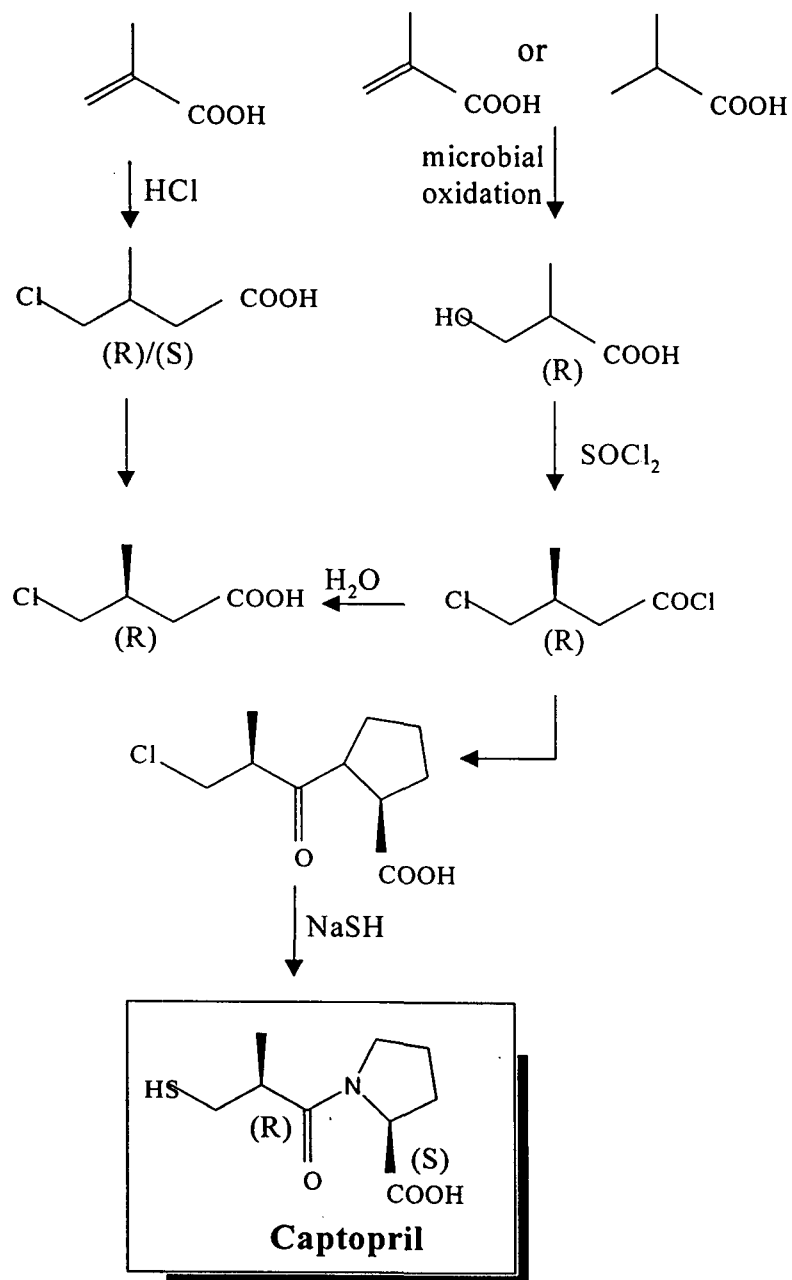


Fig. 1. Alternative routes to Captopril.

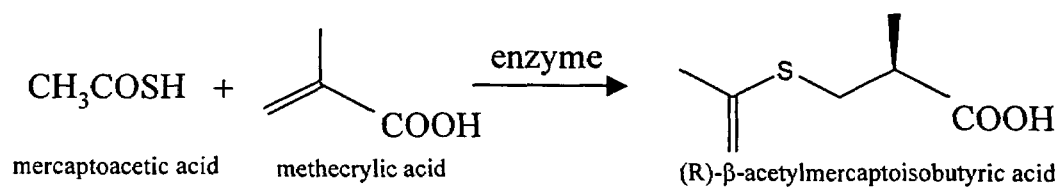


Fig. 2. Resolution of (R,S)- β -acetylmercaptoisobutyric acid methyl ester to (R)- β acetyl mercaptoisobutyric acid by esterase.

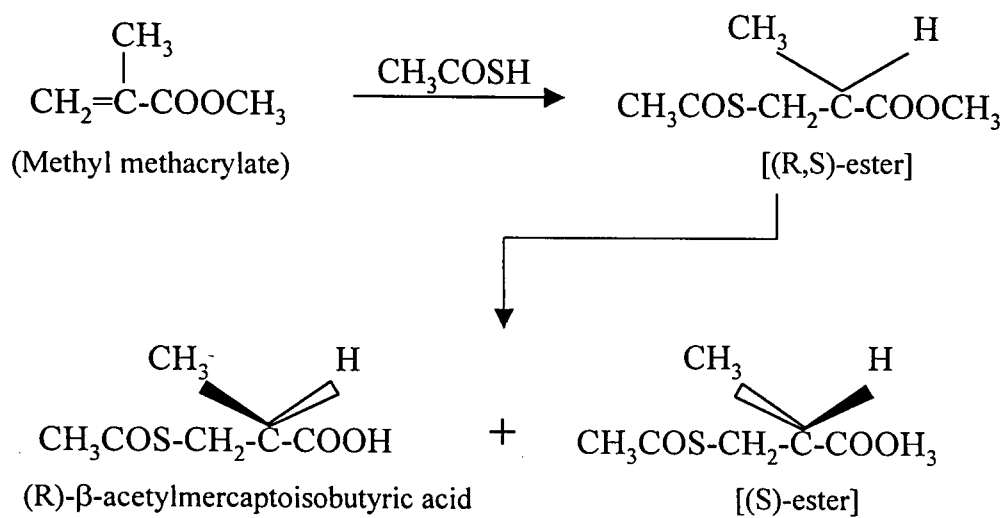


Fig. 3. Production of (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid by chiral enzyme

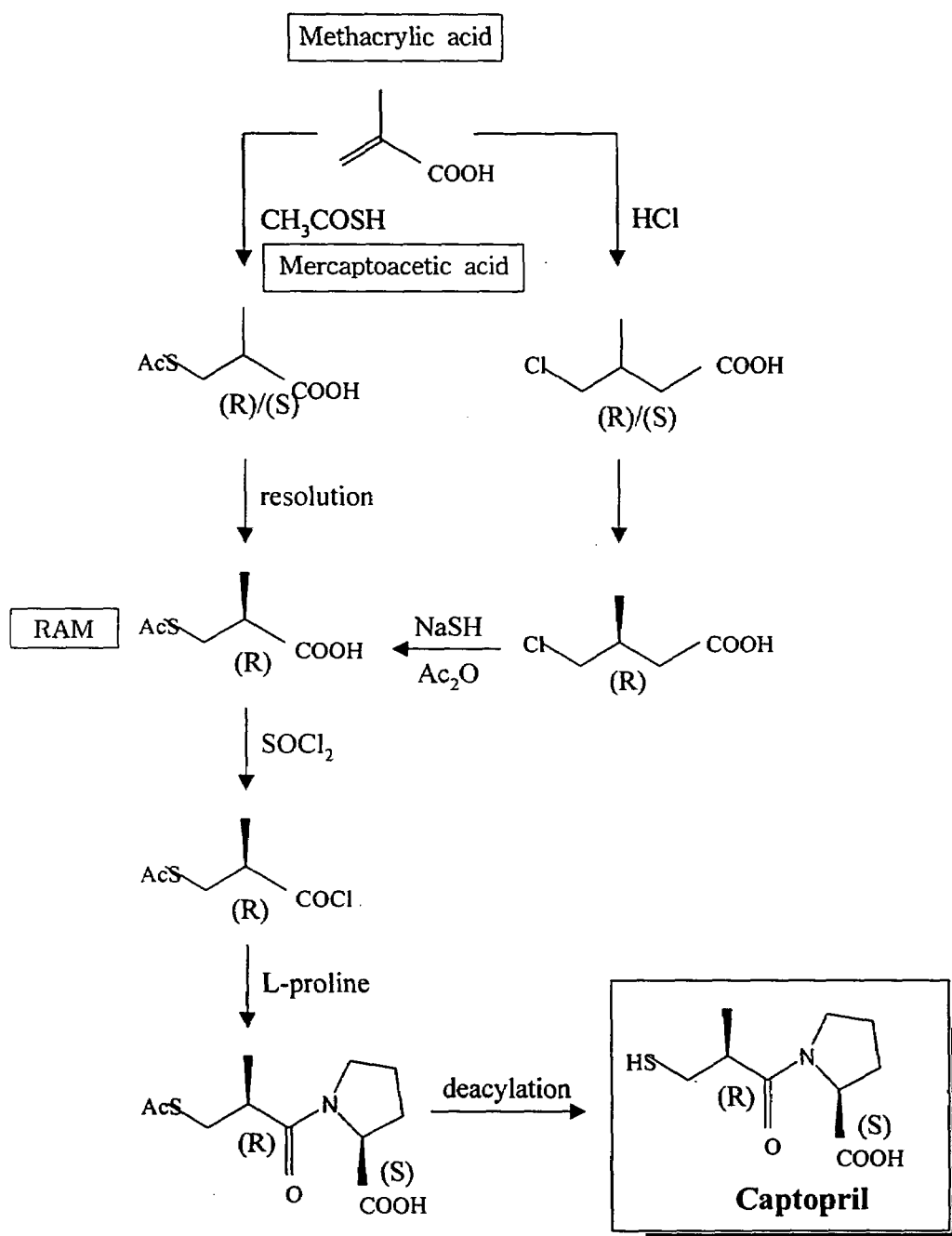


Fig. 4. Alternative route via RAM to Captopril.

광학활성의약품을 생산하기 위한 기술 선진국의 기술 개발동향을 살펴보면, 크게 비대칭 촉매 개발과 키랄 시약 및 키랄풀을 이용한 화학적 생산 공정과 효소나 미생물을 이용한 생물학적 생산공정으로 나눌수 있다. 라세미 혼합물의 분할에 가수분해 효소를 사용하는 연구에 주로 사용되는 효소는 lipase이다. Lipase는 에스테르 화합물의 가수분해 효소로서 enantiomer 합성에 가장 많이 사용되며 유기용매 존재하에서도 활성을 나타내는 장점이 있다. 소염제인 (S)-naproxen을 *Candida cylindracea* 유래의 lipase를 사용하여 98%이상의 광학순도로 합성하였고, Sepraco社의 lipase를 사용하여 소염진통제인 (S)-ibuprofen의 분할과 Sepracor社는 multiphase membrane 반응기내에서 ibuprofen ester의 (S)-특이적인 가수분해 반응을 성공하였다. Lipase뿐 만 아니라, 광학활성의약품의 분할에 사용되는 효소로는 nitrilic hydratase를 이용한 라세미 니트릴의 분할, acylase, aminopeptidase, hydantoinase, dehalogenase등이 있다.

또한, 효소를 이용한 광학선택성의 C-C 결합 반응은 oxynitrilase를 사용한 cyanohydrin의 합성과 aldolase를 이용한 비대칭 aldol의 축합반응을 통한 단일 이성질체를 합성하였다.

효소를 이용한 C-N 결합반응으로는 reductive amination을 이용한 아미노산의 제조, 암모니아 첨가를 이용한 L-amino acid의 제조가 가능하며, transamination을 이용한 L-phenylalanine의 제조, transamination을 이용한 chiral amines의 합성 등이 있다. 의약품 중간체 및 의약품으로 이용되는 생리활성 peptide도 역시 효소를 사용하여 제조 생산이 가능하다. Aspartame 합성을 위한 DSM-Toyo Soda 제법은 L-phenylalanine methyl ester와 보호된 L-aspartic acid와 이성질 특이성 커플링 반응에 촉매로 thermolysin을 사용하여 이루어진다. 또한 trypsin 촉매를 이용하여 산업적으로 돼지 인슐린으로부터 인간 인슐린의 전이 펩티드반응을 일으키고 있다.

광학활성물질 생성 산화반응에 사용되는 효소인 glucose, alcohol, cholesterol oxidase는 biosensor 등에도 사용되어진다. Tanabe社는 fumaric acid를 fumarase를 이용하여 hydration 하여 (S)-malic acid와 (S)-citramalic acid를 제조하는 공정을 개발하였다. 반대로 TBADH를 이용하여 환원반응을 이용한 천식치료제인 (S)-broxatherol의 합성이 가능하다.

제 2절 국내·외 기술 개발현황에서 차지하는 위치

1. 국내 기술개발 현황에서 차지하는 위치

우리나라 제약산업은 사양화일보직전의 상태에 와있으며, 국내의 제약원료산업을 부흥시키기 위하여 전문화, 계열화, 고부가가치, 다품종 소량 생산을 위한 연구의 전환이 필요하다. 이를 위해 선진국들도 연구개발을 서두르고 있는 광학활성물질의 제조기술 개발이 절실하며, 광학활성 물질의 생산에 있어서는 외국의 기술 수준에 비하여 국내 연구 기반이 너무 취약하므로 이에 대한 방안이 시급히 요구되고 있다.

현재까지 재조합 효소를 사용한 광학활성의약품 중간체의 제조에 관한 연구는 전무한 상태이며, (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 생물학적 생산 기술을 확보함으로써 타 광학활성물질의 생물학적 생산에 기여할 것으로 기대된다.

2. 국외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

(R)- β -Acetylmercaptoisobutyric acid 생산 관련 기술도입은 없으며 특허문제는 새로운 미생물 및 효소의 분리로 해결 가능하다.

국내외 생물공학기술 수준을 비교해 보면, 균주 분리와 개량 기술은 세계수준의 약 90% 정도, 효소 생산 및 발효기술은 세계 최고의 수준이며, 광학활성체의 분리 및 정제기술과 광학활성의약품 생산기술은 약 60-70%정도로서, 미생물을 이용한 광학활성의약품 중간체 생산공정 개발에 관한 연구가 수행되어 상대적으로 세계수준에 열세인 광학활성의약품제조에 관한 기술 수준을 한층 높이는 계기가 될 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 실험재료 및 방법

1. (R,S)- β -acetylmercaptoisobutyrate의 합성

Methyl (R,S)- β -acetylmercaptoisobutyrate에서 미생물 유래 효소에 의한 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid로의 생물전환 반응의 기질인 methyl (R,S)- β -acetylmercaptoisobutyrate는 상업적으로 시판되지 않아, 본 연구실에서 합성 제조하여 사용하였다.

Methyl (R,S)- β -acetylmercaptoisobutyrate의 합성은 Sakimae *et al.* (1)의 방법을 따랐다. 먼저 0.2% (w/v) hydroquinone이 함유된 1.0 mole의 methyl methacrylate (MMA, 100.12g)에 121.8g (1.6 mole)의 thioacetic acid (TA)를 첨가하여 70°C에서 2시간동안 일정속도로 교반하면서 반응시켰다. 반응액을 최대수율의 methyl (R,S)- β -acetylmercaptoisobutyrate를 얻기 위하여 80°C에서 4시간동안 재반응하였다. 잔존하는 thioacetic acid (boiling point: 93°C, ATM)와 methyl methacrylate (bp : 98-100°C, ATM)는 evaporator를 사용하여 감압하에서 증류하여 먼저 제거하였다. 그후 (R,S)-ester (bp: 72-74°C, 2mmHg)는 감압하에서 증류하여 정제되었다. 노란색의 합성 정제된 (R,S)-ester는 gas chromatography (HP 5890)를 사용하여 순도를 확인하였다.

2. 사용 배지 및 완충용액

도양에서 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid를 합성하는 균주를 분리하기 위하여

bacto beef extract 3.0 g/l, bacto peptone 5.0 g/l, and bacto agar 15.0 g/l가 함유된 nutrient agar (DIFCO 0001-17-0, pH 6.8)가 사용되었다. Bacto tryptone 17.0 g/l, bacto soytone 3.0 g/l, bacto dextrose 2.5 g/l, sodium chloride 5.0 g/l, dipotassium phosphate 2.5 g/l가 함유된 tryptic soy broth (TSB, DIFCO 0370-17-3, pH 7.3)는 분리된 미생물의 배양에 사용되었다.

효소활성의 최적 pH와 pH에 대한 저항성은 조사하기 위하여 pH 4-7 범위의 0.05 M Sodium citrate-NaOH buffer, pH 7-9 범위의 0.05 M Tris-Cl buffer (2)와 pH 8-11 범위의 0.05 M Glycine-NaOH buffer를 사용하였다.

3. 제한 효소 및 시약

Methyl methacrylate와 thioacetic acid는 Aldrich Co. (USA)에서 구입하여 사용하였고, 다른 모든 배지 조성분들은 DIFCO laboratories (Detroit, MI, USA)와 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. 분석을 위한 모든 시약은 HPLC grade를 사용하였고, diastereomer의 분석을 위한 시약도 Sigma-Aldrich Co. (USA)에서 구입하였다.

제한효소, DNA ligase, ExoIII, Klenow polymerase등은 New England Bio-labs (Beverly, MA, USA)와 Takara (Kyoto, Japan)에서 구입하였고, ligation step에는 Takara社 (Japan)의 ligation kit를 사용하였다.

4. 대장균 균주 및 플라스미드

(R)- β -Acetylmercaptobutyric acid의 생산 균주는 토양에서 분리하여 사용하였고, 재조합 효소의 생산을 위한 클로닝과 발현 벡터의 제조에는 host strain으로 *E.coli* DH5 α 와 *E.coli* BL21 (DE3), *E.coli* TB1이 사용되었으며, 이에 사용된 DNA 벡터로는

pBluescript®IIKS+ (Stratagene, USA), pUC119 (Stratagene, USA), pT7Blue (Novagen, USA), pET3D (Novagen, USA), pET22b (Novagen, USA), pMAL-p2x, pMAL-c2x 등이 사용되었고, Table 1에 나타내었다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
DH5	<i>supE44 lacU169(80 lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Stratagene
BL21(DE3)	<i>hsdS gal(cIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene1)</i>	Invitrogen
TB1	<i>ara Δ(lac proAB) rpsL(φ80 lacZΔM15) hsdR</i>	NEB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001	An isolated strain having esterase producing RAM from (R,S)-ester	This work
Plasmids		
pBluescript®KSII+ (pKS+)	<i>E. coli</i> cloning vector, Apr	Stratagene
pUC119	<i>E. coli</i> cloning and sequencing vector, Apr	Stratagene
pTBL7	pKS+ carrying a 4.5-kb <i>Sau3A</i> chromosomal fragment of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001, Apr	This work
pTBL71	pKS+ with a 1.9-kb <i>KpnI-BamHI</i> insert of pTBL7, Apr	This work
pTBL72	pKS+ with a 2.6-kb <i>KpnI-KpnI</i> insert of pTBL7, Apr	This work
pTBL73	pUC119 with a 2.5-kb <i>BamHI-KpnI</i> insert of pTBL7, Apr	This work
pTBL74	pUC119 with a 1.6-kb <i>BamHI-NruI</i> insert of pTBL7, Apr	This work
pTBL75	pUC119 with a 0.9-kb <i>NruI-KpnI</i> insert of pTBL7, Apr	This work
pTBL76	pUC119 with a 1.1-kb <i>NheI-NruI</i> insert of pTBL7, Apr	This work
pTBL77	pUC119 with a 0.5-kb <i>BamHI-NheI</i> insert of pTBL7, Apr	This work
PT7Blue	PCR product cloning vector, linearized, Apr	Novagen
pET22b	Expression vector, T7lac promoter, Apr	Novagen
pT7ES	pT7Blue with 1-kb PCR amplificate of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001 <i>estA</i> gene, Apr	This work
pES22B	pET22b with 1-kb <i>NcoI</i> (digested partailly)- <i>BamHI</i> (digested completely) PCR amplificate of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001 <i>estA</i> gene, Apr	This work
pMAL-p2x	MBP-fusion protein expression vector, P _{lac} promoter, Ap _r , with signal peptide	NEB
pMAL-c2x	MBP-fusion protein expression vector, P _{lac} promoter, Ap _r	NEB
pMAL-pes	pMAL-p2x with <i>estA</i> gene <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001 <i>estA</i> gene, Ap _r	This work
pMAL-ces	pMAL-p2x with <i>estA</i> gene <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001 <i>estA</i> gene, Ap _r	This work

재조합 *E.coli*는 37°C에서 Luria-Bertani (LB) medium (2)을 사용하여 배양하였다. 재조합 *E.coli*의 선발에는 ampicillin (0.01g/100ml)과 Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.001M), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal)를 사용하였다. 세포의 성장은 spectrophotometer로 600nm에서 흡광도로 측정하였다. 또한 LB 배지에 tributyrin (1%, v/v)을 첨가한 tributyrin agar (TBA)를 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생산 효소를 코우딩하는 유전자의 유무 확인을 위해 사용하였다.

5. (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생산 균주 분리 동정

한국과 인도의 유지공장 근처의 토양으로부터 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생물 전환 균주를 분리하였다. 먼저 토양 시료 1.0g을 증류수 (9.0ml)에 현탁하여 nutrient agar plate에 도말 배양하여 단일 콜로니의 균주들을 분리하였다. Agar plate에서 성장한 균주를 소량 채취하여 (R,S)-ester 1%(v/v)과 pH 지시약으로서 0.1% (w/v)의 bromocresol purple을 함유한 water 0.2ml에 첨가하여 30°C에서 4시간동안 반응시켰다. (R,S)-ester를 가수분해하는 균주들은 그 산물로서 carboxylic acid를 생산하는데, 이것이 반응액내의 pH를 저하시키게 되어 이를 pH 지시약으로 검출하게 된다. 이 원리를 이용하여 일차적으로 (R,S)-ester를 가수분해 균주를 선별하였다 (3). 그러나, 대부분의 균주들은 (R,S)-ester내의 ester bonding 뿐만 아니라 thioester bonding도 절단하여 여러 가수분해 산물을 생산하게 된다.

이중에서 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생산하는 균주만을 분리하기 위하여 지시약의 색 변화로 미리 선별된 균주들을 TSB 액체 배지에 30°C에서 24시간동안 배양시킨후, 배양액 1ml를 원심분리하여 균체를 획득하였다. 여기에 200 μ l의 (R,S)-ester 현탁액 [2%(v/v) 0.5 M potassium phosphate buffer, pH 7.0]을 첨가하여 1시간동안 37°C에서 (R,S)-ester를 가수분해하였다. 그후 가수분해 산물을 gas chromatography와 HPLC로 분석하여 (R)- β

-acetylmercaptoisobutyric acid 생산하는 균주를 최종적으로 분리하여 본 연구에 사용하였다.

(R)- β -Acetylmercaptoisobutyric acid 생산 균주의 동정은 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에 의뢰하여 이루어졌다. Cellular fatty acid 조성을 microbial identification system (MIS) (Suzuki and Komagata 1983)에 연결된 gas chromatography (Hewlett-Packard 5890, USA)로 분석하였고, 분리된 균주의 16S rRNA gene의 염기서열을 ABI-Autosequencer (Perkin-Elmer, USA) (Rainey et al. 1992; Rabus and Widdel 1995)로 분석하여 각종 균주의 염기서열 데이터베이스와의 상동성을 조사하여 분리된 균주를 동정하였다.

6. 기존의 RAM 생산 균주와의 생산능비교

지금까지 문헌상에 일부 보고된 RAM 생성 균주와의 비교실험을 위하여 *Pseudomonas putida* (NRRL B-955, KCTC 1644, KCTC 2401, KCTC 2408, NRRL B-28, KCTC 2349), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525, ATCC 6972, KCTC 1645), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 7700, ATCC 19154, KCTC 1750), *Pseudomonas fragi* (ATCC 13221), *Pseudomonas ovalis* (KCTC 1133), *Acinetobacter* (KCTC 2702)를 American Type Culture Collection (ATCC), Korean Collection for Type Cultures (KCTC), NRRL Culture Collection (ARS collection in United State Department of Agriculture)에서 구입하여 사용하였다.

7. DNA 재조합 및 대장균의 형질 전환

재조합 대장균의 plasmid DNA의 분리는 Holmes와 Quigley (4)의 방법과 plasmid isolation kit (Qiagen Inc., USA)를 이용하여 이루어졌다.

플라스미드와 제한효소로 절단된 DNA 단편들을 분석을 위하여 0.8%-1.0%의 아가로오스 겔을 사용하여 Tris-acetate (TAE) buffer (0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0)내에

서 전기영동을 실시하였다. 대장균에로의 플라스미드 DNA의 형질전환은 Sambrook *et al.*과 Cohen *et al.* (2, 5)의 방법으로 이루어졌다. 전기영동후 원하는 DNA 단편은 agarose gel로부터 QIAEX II gel extraction kit (Qiagen Inc., USA)와 GeneCleanIII kit (Bio101, Inc., CA)를 사용하여 분리 정제되었다.

RAM 생성 유전자를 분리하기 위하여 분리 균주의 chromosomal DNA를 G-NOME isolation kit (Bio 101, La Jolla, Calif., USA)를 사용하여 분리하였다. Chromosomal DNA를 제한효소 *Sau3A*로 부분 절단하여 DNA library를 제조한다음, 미리 제한효소 *Bam*HI로 완전히 절단하여 Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)처리한 pBluescript®IIKS+ vector에 삽입하여, 대장균 DH5 α 에 형질전환하였다.

RAM 생성 유전자를 함유한 클론의 선발을 위하여 tributyrin plate (1%, v/v)에 toothpicking하여 37°C에서 24시간동안 배양하여 colony 주위에 투명한 환이 생기는 균주를 우선 선발하였다. 선발된 대조합 대장균들을 (R,S)-ester와 bromocresol purple이 함유된 배지에 접종 배양하여 다시 선발한후, RAM의 생성을 GC와 HPCL로 분석하여 최종적으로 RAM 생성 유전자가 도입된 대장균 균주를 선발하였다.

8. 염기서열분석을 위한 DNA ladder의 제조

RAM 생성 유전자의 염기서열 분석을 위하여 exonuclease III와 mung bean nuclease (2)를 사용하여 overlapping unidirectional deletion을 실시하였다. 우선 RAM 생성 효소 코딩 DNA 단편(pTBL73)을 pUC119 벡터로 이동시킨 다음, 3' single strand overhang을 만드는 *Xba*I과 blunt end 또는 5' overhang을 만드는 *Sph*I의 두 제한효소로 절단하여 100 μ l exonuclease III buffer (2 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM HgCl₂)와 1 μ l (about 180 units) exonuclease III를 첨가하여 37°C에서 반응액 10 μ l씩 1분 간격으로 100 μ l Mung Bean nuclease buffer (10 300mM NaOAc (pH 5.0), 500mM NaCl, 10mM ZnCl₂, 50% (v/v) glycerol)에 옮겨 10분동안 반응시킨후, 65°C에서 5분간 반응으로 절단반응을 종결하였다. 다시

mung bean nuclease ($2\mu\text{l}$, 50 units)를 첨가하여 37°C 에서 1시간동안 반응시키고, 페놀로 추출하여 $50\mu\text{l}$ 의 Klenow buffer와 $1\mu\text{l}$ (2 units)의 Klenow fragment를 첨가하여 37°C 에서 15분간 반응하였다. 그후 ligation을 수행하여 대장균에 형질전환하였다. 형질전환된 plasmid DNA는 *EcoRI*과 *HindIII*로 절단하여 agarose gel (0.8%)로 분석하였고, 약 300-bp 간격으로 선발된 insert DNA는 염기서열 분석에 이용되었다.

9. DNA와 단백질 서열 분석

ABI PRISM 377 autosequencer (Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 pTBL73의 2.5-kb *BamHI*-*KpnI* fragment의 염기서열을 분석하였다. Sequence editing 프로그램으로 LAGERGENE software package (DNASTAR Inc., Madison, Wis.)를 사용하였으며, BLAST program (31)을 사용하여 NCBI sequence database (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)내의 효소들의 아미노산 서열들과의 상동성을 조사하였다. Multiple alignment에는 MegAlign Program, version 4.00 (DNASTAR)와 GeneDoc Program, version 2.3.00를 사용하였다.

10. 발현 벡터의 제조

원하는 DNA단편을 PCR을 사용하여 증폭한 후, PCR 증폭 산물을 pT7Blue (Novagen, USA)에 접합하여 *E. coli* DH5a에 형질전환하였다. *estA* 유전자가 함유된 pT7ES vector를 함유하는 *E. coli* DH5a로부터 DNA를 추출하여 *NcoI*로 부분적으로 절단하여, *BamHI*으로 절단하였다. *NcoI*과 *BamHI*으로 절단된 pET22b에 삽입하여 esterase의 발현을 위하여 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환하였다.

pMAL-p2x와 pMAL-c2x를 사용한 발현벡터의 제조에는 발현 벡터의 polylinkage site

에 존재하는 제한효소부위를 PCR을 이용하여 *estA* 유전자의 5'말단과 3'말단에 위치하도록 제조하여 미리 같은 제한효소로 절단된 벡터에 삽입시켜 발현벡터를 제조하였다.

11. Induction

본 연구에 사용된 induction system으로는 IPTG에 의한 induction system인 발현벡터 pET3D, pET22b, pMAL-c2x, pMAL-p2x를 사용하였다.

Induction은 대장균을 O.D가 약 0.5에 이를때까지 배양하여 IPTG를 약 0.3mM의 농도로 첨가하여 실시하였다.

12. 발효조

RAM 생성을 위해 분리된 균주의 발효조 배양에는 5 L jar fermentor (Bioflo III, New Brunswick Scientific Inc., USA)를 사용하였다 (Fig. 5). Seed culture에는 5 g/l meat extract, 7.5 g/l peptone, 5 g/l glucose, 1.5 g/l yeast extract, 1.5 g/l malt extract, 2.5 g/l NaCl의 조성의 배지를 사용하였다. 발효조 배양 부피의 10% seed culture를 production medium의 발효조내에 접종하여 배양하였다. Production medium은 여러 가지 배지조성 조건은 조사 실험한 결과, 20 g/l yeast extract, 5 g/l casamino acids, 10 g/l ammonium sulfate, 40 g/l glucose, 10 g/l potassium phosphate로, 배양후 색도의 생성이 적은 배지조성을 선택하였으며, 0.5%의 glycine은 세포외로 효소의 분비를 위해 첨가되었다.

발효조 운전 조건은 agitation speed를 500 rpm, aeration rate는 4 vvm, 온도 30℃로 유지하면서 배양을 실시하였다.

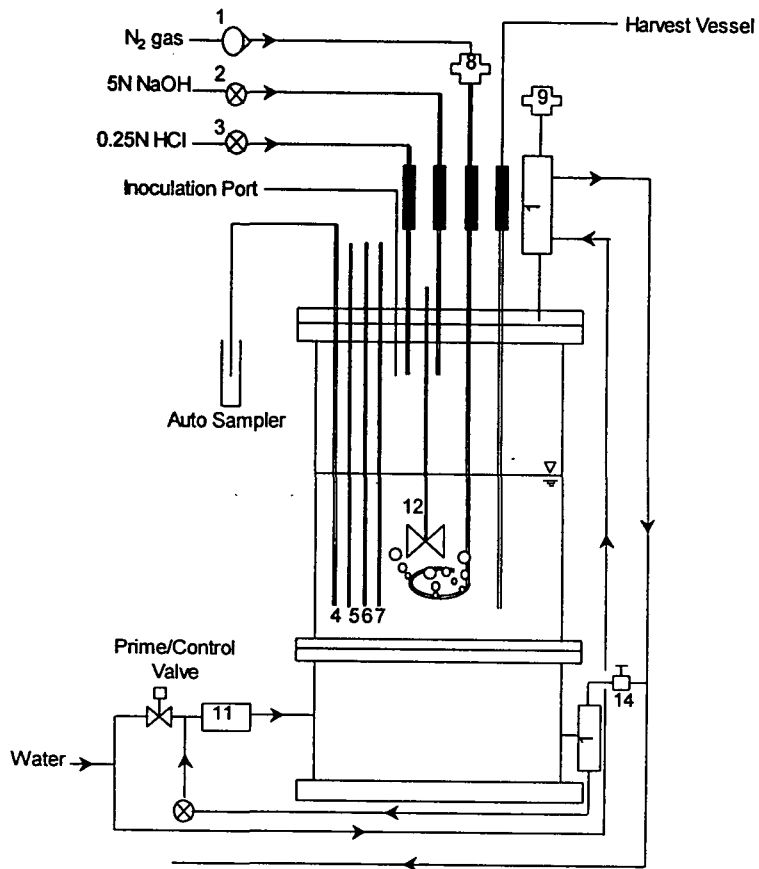


Fig 5. Figure of fermentor ,5L (NBS Inc., USA)

- 1. Flow meter; 2, 3. Peristaltic pump; 4. Sampling tube;
- 5. pH electrode; 6. Temperature sensor; 7. DO electrode
- 8. Sparge filter; 9. Exhaust filter;

13. Fed-batch culture

발현 pMAL-c2x vector에 *estA* 유전자를 삽입하여 균체과 효소를 대량 생산하기 위하여 glucose를 주기적으로 feeding하였다. 기타의 fermentor 운전조건은 상기의 경우와 같다.

14. PCR

estA DNA 단편의 복제를 위한 PCR은 Taq DNA polymerase-premix kit (AccuPower™ PCR Premix, BIONEER, Korea)를 사용하여 Perkin-Elmer Cetus thermal cyclor (GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer Cetus, USA)로 이루어졌다. pET 22b를 이용한 발현벡터의 제조를 위하여, N-terminal primer는 *NcoI* site를 코딩하도록 5'-GCCATGGGATTCCTCCTCGGTCTGGT-3'를 사용하였으며, C-terminal primer는 His-tag 잔기 (6×histidine)와 *BamHI* site를 코딩하도록 5'-CGGATCCTGATGGT-GATGGTATGGTGGCGACCGGCCACCTGGG-3'로 설계하여 사용하였다.

pMAL 벡터로의 *estA* 유전자의 삽입을 위하여 설계된 primer는 Fig. 23에서 설명된 바와 같다.

각 primer는 100 pmol, template DNA는 5 pmol을 사용하여 95°C에서 30초간 denaturation, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 35회 반복하여 DNA의 복제를 수행하였다 (Fig 6).

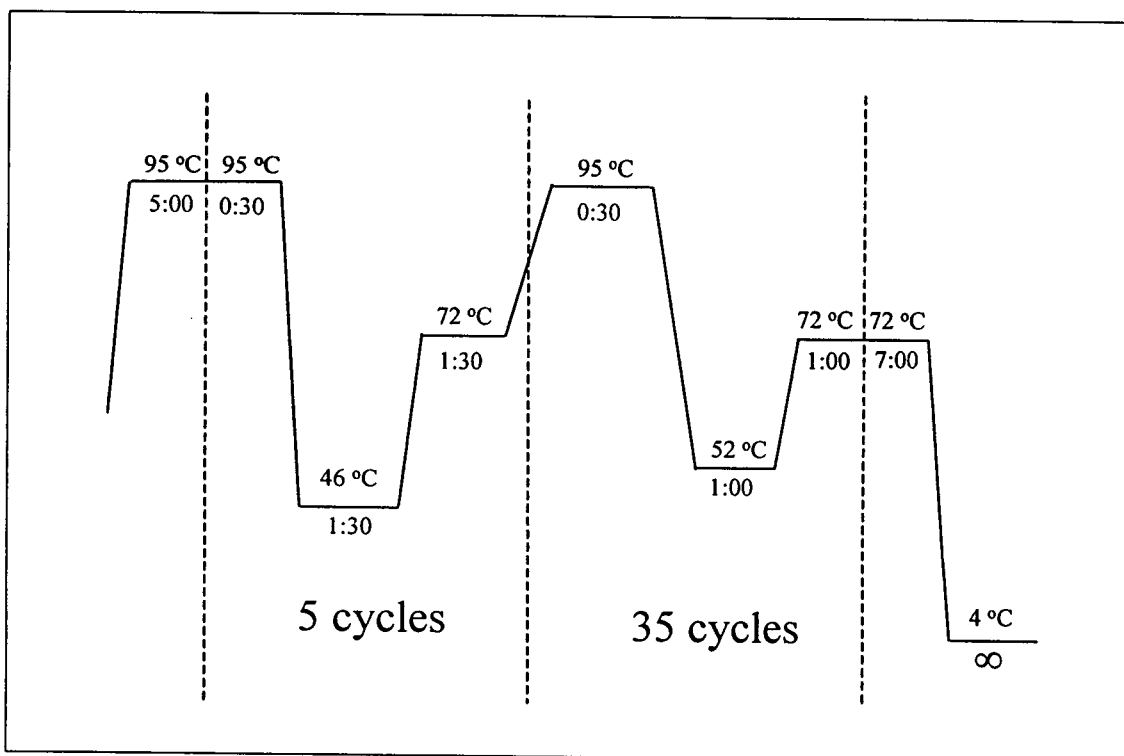


Fig 6. Temperature profile of PCR.

15. (R,S)-ester의 resolution에 의한 RAM의 제조

RAM 생성 균주를 TSB 배지에서 37°C에서 24 시간동안 200 rpm으로 교반하면서 배양한 후, 세포를 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 분리하여 약 1.5g (wet weight)의 세포를 10 ml의 10% (w/w) (R,S)-ester가 함유된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 분산시켰다. (R,S)-ester의 가수분해 반응은 37°C에서 1시간동안 수행한후, 세포를 원심분리로 제거한 후 상층액내의 미반응 (R,S)-ester는 ethyl acetate로 추출하였다. 반응물 액층의 pH를 희석된 황산으로 2.0으로 조정한 후, 다시 ethyl acetate로 추출하여 RAM을 얻었고, 감압하에서 증류하여 순수 RAM을 제조하였다.

16. 효소 활성 측정

효소활성은 효소반응에 의해 생성된 RAM의 양을 측정하여 이루어졌다. 효소반응은 1%의 (R,S)-ester가 함유된 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 200 μ l와 배양액 1ml 에서 얻은 세포와 37°C에서 1시간동안 반응하여 측정하였다.

생성된 RAM과 가수분해 산물의 양은 ethyl acetate로 추출하여 HPCL로 분석하였다. 효소활성은 단위시간당 단위 부피의 배양액에 의해 생성된 RAM의 양으로 정의하였다.

세포 파쇄액과 그 pellet에 의한 효소 활성은 다음과 같은 방법으로 행하였다.

활성은 효소반응에 의해 생성된 RAM의 양으로 측정하였고, 1 U는 37°C에서 단위 부피의 효소액을 사용하여 단위시간에 1mM의 RAM을 생성하는 효소량으로 정의하였다. 또한, specific activity는 1mg 효소당 효소활성(U)으로 나타내었다. 단백질의 정량은 표준물질로 Sigma 社의 Bovine Serum Albumin (BSA)를 사용하여 Bio-Rad 시약으로 측정하였다.

적절한 플라스미드로 형질전환된 재조합 대장균을 ampicillin을 함유한 LB 배지에 24시간 동안 배양하여 4℃에서 10분간 12,000 ×g로 원심분리하여 세포를 수확한 후, 1/5 부피의 차가운 sonication buffer (50mM Na-phosphate buffer pH 7.8, 300mM NaCl, Qiagen, USA)로 재현탁하였다. 세포 현탁액을 얼음으로 냉각시키면서 초음파쇄기로 세포를 파쇄한 후, 4℃에서 10분간 12,000 ×g로 원심분리하여, 효소활성 측정을 위하여 상층액과 pellet을 분리하였다.

효소 반응은 효소액 200 μ l에 효소반응의 기질인 10g/l의 (R,S)- β -acetylmercaptoisobutyrate (in 0.05M citrate-phosphate buffer, pH 5.0) 200 μ l을 첨가하여 37℃에서 1시간동안 반응하여 생성된 RAM의 양을 HPLC로 측정하여 이루어졌다.

17. (R)- β -Acetylmercaptoisobutyric acid의 분석

배양액내의 세포의 성장은 UV-visible spectrophotometer (Pharmacia LKB-Biochrom 4060)를 사용하여 600nm에서 흡광도로 측정하였다.

RAM은 CHIREX(R) NGL & DNB column, 250×4.6 mm (Phenomenex Co., USA)를 사용하여 HPLC로 분석하였다. 용매로는 20mM의 ammonium acetate가 함유된 메탄올을 1.0 ml/min의 속도로 흘려주었으며, detector로는 245nm의 UV absorbance로 측정하였다.

Carboxylic acid등과 같은 그 외의 가수분해산물은 SUPELCOWAX-10 capillary column, 30 m×0.53 mm, 0.5 μ m film (Supelco Co., USA)과 flame ionization detector (FID)를 사용한 gas chromatography (HEWLETT PACKARD 5890)로 분석하였다. Column의 온도는 초기에 100℃에서 1분간 그대로 유지시킨 후에 200℃로 20℃/min의 속도로 증가시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 170℃와 180℃였으며, carrier gas로는 20 m³/min 유속의 질소가스를 사용하였고, n-butanol을 internal standard로 사용하였다.

(R,S)-ester의 가수분해산물의 diastereomer의 GC분석 조건은 column 온도가 215℃이고 그밖의 GC 분석조건은 상기한 바와 같다.

생성물의 optical rotation은 polarimeter (POLARTRONIC, Schmidt + Haensch, Int. Co. USA)를 사용하여 측정하였다.

18. SDS-PAGE

단백질 전기영동키트는 Bio-rad사의 Mini-PROTEAN III를 사용하여 10% polyacrylamide gel (Tris-glycine buffer system) (6)로 단백질의 발현 패턴을 조사하였다. 젤은 Coomassie blue (2)으로 염색하였고, molecular size marker로는 GIBCO BRL (LIFE TECHNOLOGIES Inc., Gaithersburg, USA)의 high marker와 Novagen社의 Perfect marker를 사용하였다.

19. β -Acetylmercaptoisobutyric acid의 광학활성 분석

재조합 대장균에 의해 생산된 β -acetylmercaptoisobutyric acid의 광학입체 활성을 조사하기 위하여 diastereomer를 제조하여 GC로 분석하였다.

먼저 1ml의 (R,S)-ester 가수분해 혼합물 중의 용매를 제거한 다음, 0.01%의 dimethylformamide와 10% thionyl chloride가 함유된 *n*-hexane 1ml 첨가하여 격렬히 교반하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 50°C 질소하에서 용매를 증발시킨다. 그후 0.3ml의 *d*-2-octanol을 첨가하여 교반한 다음, heating block으로 60°C에서 30분간 반응시킨다. 이어 50°C의 질소하에서 용매를 증발시키고, 0.5ml의 methylene chloride (7)를 넣어 GC로 광학활성체를 분석한다.

제 2절 연구 결과 및 고찰

1. DNA cloning of *Pseudomonas aeruginosa*

가. RAM 생성 균주의 선발

토양으로부터 240여개의 균주를 nutrient agar plate를 사용하여 분리하였다. 그중 23개의 균주가 기질로서 (R,S)-ester와 pH indicator인 bromocresol purple이 함유된 반응액의 색을 푸른색에서 노란색으로 변화시켰다. 이것은 이 균주들이 (R,S)-ester의 ester 결합이나 thioester 결합을 가수분해 할 수 있는 능력이 있음을 의미한다. 최종적으로 GC와 HPLC를 사용하여 RAM의 형성능을 측정하여 RAM 생산능을 가장 좋은 균주로 한 균주를 선발하여 IS1001이라고 명명하였다. Fig. 7에 IS1001 균주에 의해 생성된 RAM 및 (R,S)-ester, ethyl acetate 등의 GC 분석 결과를 나타내었다.

α -Alkylcarboxylic acid and alkyl ester-hydrolyzing enzyme를 가진 strain들 (8, 9)과 선발된 IS 1001과의 RAM 생성능을 Table 2에 비교하였다. IS 1001 strain은 (R,S)-ester로부터 약 0.14% (w/v)의 RAM을 생성한 반면, 대조군으로 사용된 *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter*는 아주 적은 양의 RAM을 생산하였거나, 또는 거의 생산하지 못하였다. 미생물 유래의 효소를 이용하여 α -alkylcarboxylic acid alkyl ester의 asymmetric hydrolysis는 Patel *et al.*(10)에 의하여 보고되었고, α -alkylcarboxylic acid alkyl ester인 (R,S)-ester의 asymmetric hydrolysis에 대하여는 Sakimae *et al.* (11)에 의해 보고되었다.

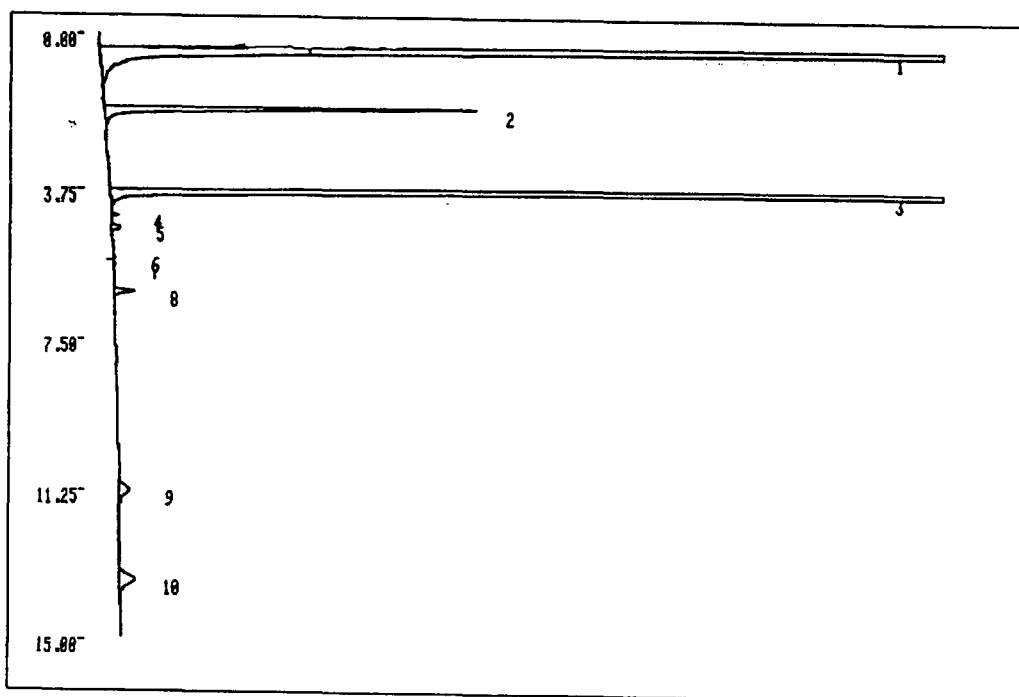


Fig. 7. GC chromatogram of RAM.

Peak 1 : ethyl acetate; Peak 3 : (R,S)-ester ; Peak 10 : RAM,
Capillary column, injector temp.170°C; detector temp. 180°C:
Oven temp. 100°C → 180°C, FID

Table 2. Comparison of RAM production ability of various strains

Strain	RAM (%) ^a
IS1001 (this work)	0.14
<i>Pseudomonas putida</i> (NRRL B-955)	0.0035
<i>Pseudomonas fragi</i> (ATCC 13221)	0.0211
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525)	0.0173
<i>Pseudomonas putida</i> (KCTC 1644)	0.0268
<i>Pseudomonas putida</i> (KCTC 2401)	0.0097
<i>Pseudomonas putida</i> (KCTC 2408)	0.0048
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 7700)	- ^b
<i>Pseudomonas putida</i> (NRRL B-28)	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 6972)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 19154)	-
<i>Pseudomonas ovalis</i> (KCTC 1133)	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (KCTC 1645)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KCTC 1750)	-
<i>Pseudomonas putida</i> (KCTC 2349)	-
<i>Acinetobacter</i> (KCTC 2702)	-

^a RAM (%) : RAM-production (% w/v) in the reaction mixture.

^b - : no RAM production

나. 균주의 동정

최적의 RAM 생산 균주로 선발된 IS 1001은 간균 (rod form)으로 그램음성균이었다. Table 3에서와 같은 생화학적 특성과 영양소 이용능 등을 조사한 결과, *Pseudomonas* sp.와 유사한 결과를 얻었고, 균주 세포벽의 조성(특히 quinone과 지방산이 중요 인자로 작용한다)을 분석하는 화학적 계통분류방법에 의해, IS 1001 균주는 세포벽 성분으로 ubiquinone-9가 함유되어 있었고, 지방산으로는 C_{18:1}의 oleic acid와 C_{16:0}의 palmitic acid가 주요 성분으로 존재하였다. 또한, 특이적으로 3-hydroxy C_{10:0}의 capric acid와 C_{12:0}의 lauric acid가 존재하였다.

상기한 결과와 같이 IS 1001 균주는 전형적인 *Pseudomonas* sp의 특징을 보이며, MIS를 사용하여 각 미생물등의 세포벽을 지방산 조성의 데이터베이스의 대조균주와 비교하여 볼 때, 특히 *Pseudomonas aeruginosa*와 약 61%의 상동성을 보였다. 또한, *Pseudomonas* sp.중에서 *Pseudomonas aeruginosa*와 다른 속들간의 구분에 중요한 인자로 작용하는 41℃와 4℃의 온도의 생육조건 (Table 4)에 의하면 IS 1001 균주는 *Pseudomonas aeruginosa*와 생육조건이 일치하여 *Pseudomonas*속의 다른 균주들과 구분되는 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었다.

Table 3. Biochemical test for the identification of IS1001

Test	IS 1001	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Oxidase test	+	+
Gelatine liquefaction	+	+
Starch hydrolysis	-	-
Lipase(tween 80)	+	+
Arginine dihydrolase	+	+
Usage of		
D-Ribose	+	+
Manitol	+	+
D-Xylose	-	-
L-Arabinose	-	-
L-Rhamnose	-	-
Glucose	+	+
Sucrose	-	-
Butyrate	+	+
Isobutyrate	+	+
Polypylene glycol	+	+
Maltose	+	-
Starch	-	-
Inulin	-	-
Lactate	+	+
Glycerol	+	+

Table 4. Growth of IS1001 and several *Pseudomonas* sp. strains at 4°C and 41°C

Strain	Growth	
	4°C	41°C
IS 1001	-	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+++
<i>Pseudomonas fluorescence</i> biovar I	+++	-
<i>Pseudomonas fluorescence</i> biovar II	+++	-
<i>Pseudomonas fluorescence</i> biovar III	+++	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	+++	-
<i>Pseudomonas aereofaciens</i>	+++	-
<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	+++	-
<i>Pseudomonas putida</i> biovar B	+++	-

IS 1001 균주의 분자 계통분류를 위하여 IS 1001의 16S rDNA 분석을 행하였다. IS 1001의 16S rDNA은 1491개의 부분 염기배열 (Fig. 8)을 가지고 있는 것이 확인되었다. BLAST search를 통하여 IS 1001의 16S rDNA의 염기서열을 상동성을 가진 균주를 조사한 결과(the request ID : 942041086-12306-22307), *Pseudomonas aeruginosa* 유래의 16S rDNA (the accession number : AJ249451 , AF031152, Z76651, GenBank)와 거의 100% 일치되는 것으로 조사되었다.

IS 1001 균주의 16S rDNA의 유전자는 Table 5에 나타낸 바와 같이 *Proteobacteria*의 γ -subclass를 가진 *Pseudomonas* cluster와 상동성을 보이는 것으로 조사되었다. 상동성 조사에 사용된 모든 균주들과 81.1%에서 99.9%의 상동성을 보였고, 특히 *Pseudomonas* cluster내의 균주들과는 93.6%에서 99.9%의 상동성을 보였다.

IS 1001 균주의 16S rDNA의 염기배열의 일차분석 결과를 phylogenic tree로 나타내어 보면(Fig. 9), *Pseudomonas aeruginosa*와 유사함을 볼 수 있다.

상기와 같은 결과로부터 선발된 IS1001 균주는 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었고, *Pseudomonas aeruginosa* 1001로 명명하여 사용하였다. 특허출원을 위하여 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에 KCTC8953P로 기탁하였다.

Table 2에 나타낸 바와 같이, *Pseudomonas aeruginosa* 1001은 0.14 (w/v)%의 RAM 생산이 가능하였으나, *Pseudomonas aeruginosa* 1001과 같은 속에 속하는 세균주인 ATCC 7700, ATCC 19154, KCTC 1750을 분양받아 RAM생물전환의 비교실험을 하였으나, 상기 세균주는 모두 RAM의 생성을 보이지 않았다.

Pseudomonas aeruginosa 1001은 우수한 (R,S)-ester 생산 균주로 알려진 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas fluorescence* (3, 9, 12)보다 가수분해 능력이 우수한 것으로 조사되어, 아직까지 RAM 생산 균주로 보고되지 않은 새로운 균주인 것으로 사료된다.

```

attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtogagc ggatgaaggg agcttgctcc 60
tggattcagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaatct gcctggtagt gggggataac 120
gtocggaaac gggcgctaata accgcatacg tcctgaggga gaaagtgggg gatcttcgga 180
cctcacgcta tcagatgagc ctaggtcgga ttagctagtt ggtggggtaa aggcctacca 240
aggcgacgat cgttaactgg tctgagagga tgatcagtca cactggaact gagacacggt 300
ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa gcctgatcca 360
gccatgccgc gtgtgtgaag aaggctctcg gattgtaaag cactttaagt tgggaggaag 420
ggcagtaagt taataccttg ctgttttgac gttaccaaca gaataagcac cggctaactt 480
cgtgccagca gcccgcgtaa tacgaagggt gcaagcgtta atcggaatta ctgggcgtaa 540
agcgcgcgta ggtggttcag caagttggat gtgaaatccc cgggctcaac ctgggaactg 600
catccaaaac tactgagcta gagtacggta gaggggtggg gaatttctctg tntagcggtg 660
aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcgaaaggcg accacctgga ctgatactga 720
cactgagggtg cgaaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt 780
aaacgatgtc gactagccgt tgggatoctt gagatcttag tggcgcagct aacgcgataa 840
gtcgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga cgggggcccg 900
cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta cctggccttg 960
acatgctgag aactttccag agatggattg gtgccttcgg gaactcagac acaggtgctg 1020
catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgtaac gagcgcaacc 1080
cttgtcctta gttaccagca cctcgggttg gcaactaag gagactgccg gtgacaaaac 1140
ggaggaaggt ggggatgacg tcaagtcac atggccotta cggccagggc tacacacgtg 1200
ctacaatggt cgggtacaaag ggttgccaag ccgagagggt gagctaatac cataaaaccg 1260
atcgtagtcc ggatcgcagt ctgcaactcg actgcgtgaa gtoggaatcg ctagtaatcg 1320
tgaatcagaa tgtcacgggt aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca 1380
tgggagtggg ttgctccaga agtagctagt ctaaccgcaa gggggacggt taccacggag 1440
tgattcatga ctggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgta ggggaacctg c 1491

```

Fig. 8. 16S rDNA nucleotide sequence

Table 5 Levels of 16S rRNA similarity for IS1001 strain, some *Pseudomonas* species and representative of the γ -subclass of the *Proteobacteria*

	% similarity in																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. Strain IS1001																		
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.9																	
3. <i>Pseudomonas mendocina</i>	96.8	96.7																
4. <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	97.7	97.7	97.2															
5. <i>Pseudomonas fragi</i>	97.0	97.0	97.0	97.5														
6. <i>Pseudomonas resinovorans</i>	97.0	96.9	95.2	96.6	95.7													
7. <i>Pseudomonas stutzeri</i>	97.3	97.2	97.4	97.7	99.7	95.9												
8. <i>Pseudomonas balearica</i>	95.9	95.9	95.4	95.7	97.3	96.2	97.6											
9. <i>Pseudomonas citronellolis</i>	96.8	96.8	95.3	96.6	96.0	95.6	96.3	95.4										
10. <i>Pseudomonas putida</i>	95.3	95.2	97.6	96.5	96.7	94.1	97.0	95.2	95.0									
11. <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	94.7	94.6	96.0	95.0	95.3	94.6	95.5	95.8	94.1	97.2								
12. <i>Pseudomonas viridiflava</i>	93.9	93.8	95.5	94.4	95.0	93.3	95.2	94.7	94.2	97.0	97.4							
13. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	94.3	94.2	95.4	94.8	94.8	93.6	94.9	94.6	93.7	96.7	97.4	97.5						
14. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	87.9	87.9	88.3	87.7	87.8	86.9	88.0	87.5	87.0	88.0	88.6	87.9	88.4					
15. <i>Oceanospirillum linum</i>	88.9	88.9	89.2	88.2	89.0	87.7	89.0	89.6	88.4	89.3	89.3	89.0	89.4	87.6				
16. <i>Escherichia coli</i>	85.4	85.4	86.0	85.4	86.1	84.9	85.9	86.2	85.7	86.2	86.2	86.6	86.9	85.9	85.9			
17. <i>Chromatium tepidum</i>	85.0	85.0	84.4	84.0	84.7	84.1	84.5	85.5	84.6	84.4	85.0	85.1	85.0	83.5	83.6	83.7		
18. <i>Legionella pneumophila</i>	86.9	86.9	86.8	86.7	87.1	85.9	86.9	87.5	86.4	87.3	88.0	87.2	87.8	85.9	87.4	83.9	85.0	
19. <i>Coccomonas terrigena</i>	82.6	82.6	82.0	82.3	82.7	82.0	82.3	83.4	83.4	81.9	82.7	82.4	82.5	80.6	81.4	82.0	82.4	81.1

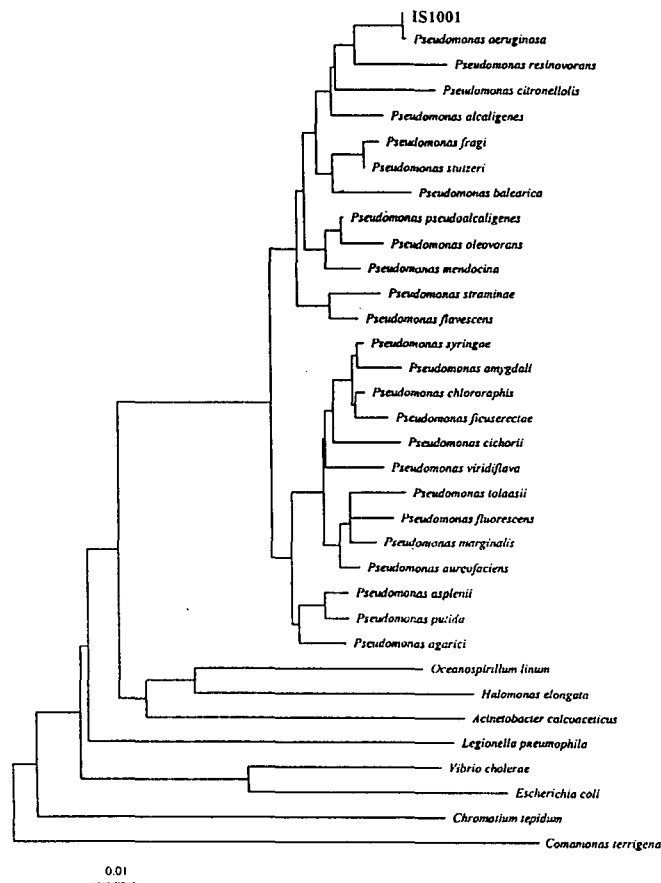


Fig. 9. Phylogenetic tree showing the positions of strain IS 1001, some *Pseudomonas* species and representatives of the γ -subclass of the *Proteobacteria*. The dendrogram is based on 16S rRNA gene sequences and was derived from pairwise evolutionary distances by the least-squares method. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

다. *Pseudomonas aeruginosa* 1001의 enzyme의 물리화학적 특성

(R,S)-ester를 기질로 사용하여 *Pseudomonas aeruginosa* 1001 enzyme에 미치는 pH의 영향에 대하여 조사하였다. Fig. 10에 나타낸 바와 같이, 효소는 pH 9.0에서 최대 활성을 보였다. 효소의 pH에 대한 안정성의 경우도 0.05 M Sodium citrate-NaOH buffer, Tris·Cl buffer, Glycine-NaOH buffer로 조성된 pH 5-10의 조건에서 약 97%의 잔존 효소 활성이 조사되어, 알칼리 범위의 pH 조건에서도 높은 활성을 유지하는 것으로 확인되었다.

온도에 대한 영향은 Fig. 11에 나타낸 바와 같이 20℃에서 60℃의 범위에 조사한 결과, whole cell내의 효소는 37℃에서 최적 활성을 보이는 것으로 조사되었다. 효소의 온도에 대한 내성은 30℃에서 80℃의 온도 범위에서 1시간동안 설정온도로 유지시킨 후 잔존 효소 활성을 조사하여 이루어졌다. *Pseudomonas aeruginosa* 1001의 효소는 70℃이상의 온도에서도 안정하며, 활성이 유지되는 것으로 확인되었다. 70℃의 농도에서 약 95%의 효소활성이 유지되었으며, 80℃에서는 28%로 잔존 효소활성이 감소되었다.

본 효소는 50℃ 이상의 온도와 알칼리 범위의 pH 조건에서도 높은 활성을 유지하는 것으로 확인되었다.

Ozaki *et al.* (13)이 보고한 (R,S)-ester를 가수분해하는 esterase의 열안정성과 비교하여 보면, *Pseudomonas aeruginosa* 1001의 효소와 70℃에서 비슷한 열안정성을 보였다. 그러나, 여러 pH 조건에서 효소의 활성과 안정성을 조사한 결과, 본 연구의 *P. aeruginosa* 1001 유래 효소는 pH 5-10의 범위에서 안정하였고, pH 9에서 최대의 효소활성을 보인데 반해, *Pseudomonas putida* (Ozaki *et al.* 1994b)는 pH 6-8범위에서 안정하고, 최적 pH 조건이 7인 것으로 조사되어 *Pseudomonas putida*의 esterase보다 pH에 대한 안정성이 높은 것으로 사료된다.

상기와 같은 결과를 종합하여 볼 때, *Pseudomonas aeruginosa* 1001 내의 (R,S)-ester 가수분해 효소는 기존(3, 13, 14)에 보고된 esterase보다 온도와 pH의 안정성면에서 우수한 것으로

로 평가된다.

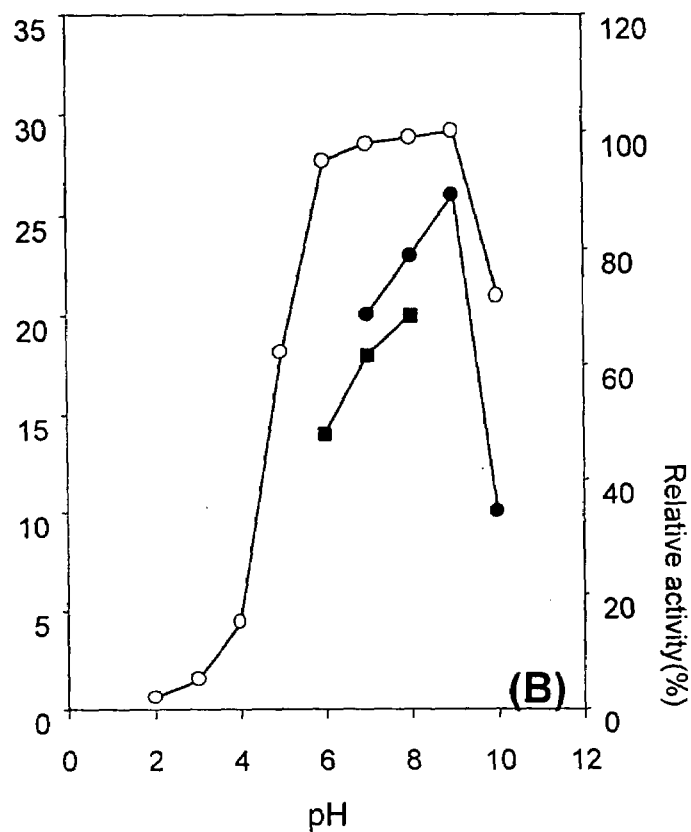


Fig. 10. Effect of pH on the enzyme activity and stability in the whole cell ; For the optimal conditions of enzyme, the whole cell was assayed at various pH values [(MES), ■; (Tris-Cl), ●]. For the stability test, the whole cell was assayed after incubation of the reaction mixture at various pH values (○) for 1 hr.

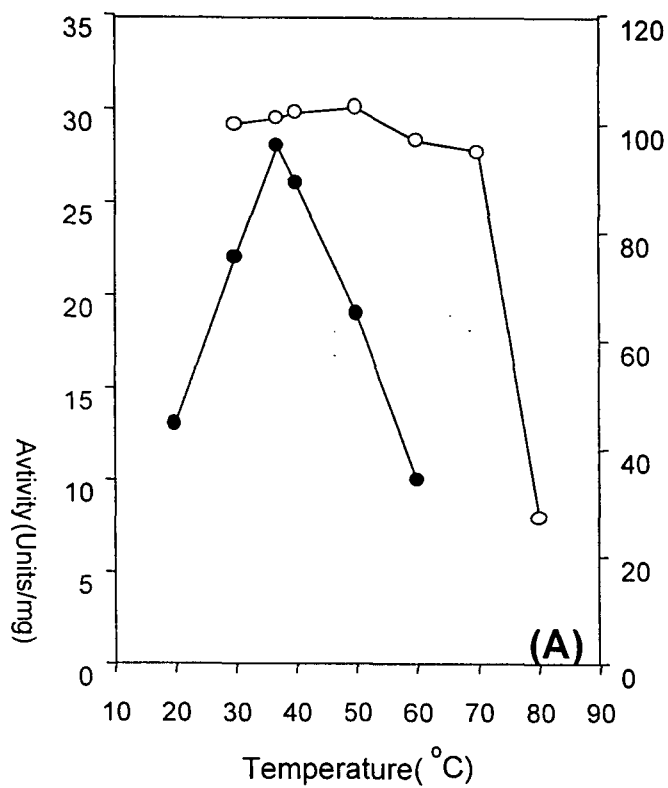


Fig. 11. Effect of temperature on the enzyme activity and stability in the whole cell ;
 For the optimal conditions of enzyme, the whole cell was assayed at various
 temperatures (●). For the stability test, the whole cell was assayed after
 incubation of the reaction mixture at various temperature (○) for 1 hr.

라. *Pseudomonas aeruginosa* 1001의 효소에 의한 (R,S)-ester의 가수분해 산물의 광학활성과 (R,S)-ester의 분리능

Pseudomonas aeruginosa 1001의 whole cell에 의한 (R,S)-ester의 가수분해 산물의 광학 특성은 GC를 이용하여 분석되었다. *Pseudomonas aeruginosa* 1001의 효소는 (R,S)-ester의 (R)-form의 ester 결합의 asymmetric hydrolysis를 촉매하고 RAM으로 전환시킨다 (Fig. 3).

표준물질의 RAM과 SAM의 diastereomer는 28.1 min과 23.9 min의 retention time으로 GC를 사용하여 분리되었다. *Pseudomonas aeruginosa* 1001에 의해서 가수분해된 (R,S)-ester의 산물인 acetylmercaptoisobutyric acid의 diastereomer는 같은 GC 분석 조건에서 28.0min의 retention time에서 검출되어, (R)-form의 acetylmercaptoisobutyric acid인 것으로 확인되었다 (Fig. 12). 이와같은 결과로, *Pseudomonas aeruginosa* 1001의 whole cell내의 효소는 (R,S)-ester의 (R)-form만을 비대칭적으로 가수분해하여 RAM으로 생물전환한다는 것이 밝혀졌다.

(R,S)-ester의 가수분해 산물의 광학활성을 조사한 결과, *Pseudomonas aeruginosa* 1001의 효소는 (R,S)-ester의 (R)-form을 비대칭적으로 가수분해하고, thioester 결합에는 작용하지 않는 것으로 확인되었다. 효소와 미생물에 의한 α -alkylcarboxylic acid alkyl ester의 비대칭 가수분해는 Iriuchijima와 Keiyu (9)에 의해 보고되었으며, α -alkylcarboxylic acid alkyl ester인 (R,S)-ester의 비대칭 가수분해에 관해서는 Akihiro 등 (12)에 의해 보고되었다.

Pseudomonas aeruginosa 1001에 의해 생성된 RAM의 optical rotation의 분석결과는 Table 6에 나타내었다. *Pseudomonas aeruginosa* 1001에 의해 생성된 RAM의 optical rotation은 -44.4였고, 색도는 배지 잔유물의 영향으로 옅은 갈색을 띄었다. 미국의 ICN Biomedicals, Inc.로부터 구입한 RAM의 optical rotation은 -56.0으로 조사되었고, 문헌에 보고된 *Pseudomonas putida*로부터 생산된 RAM은 -57.5 (1, 13)와 -58.1 (14)였다.

(R,S)-ester로부터 RAM으로 생물전환 공정중에 많은 양의 methyl (S)- β -acetylmercaptoisobutyrate (S-ester)가 Fig, 3에 나타낸바와 같이 동시에 생산되어, 순수하게 정제되지 않은 RAM내의 (S)-ester의 ester 결합이 RAM의 optical purity를 감소시키는 것으로 사료된다.

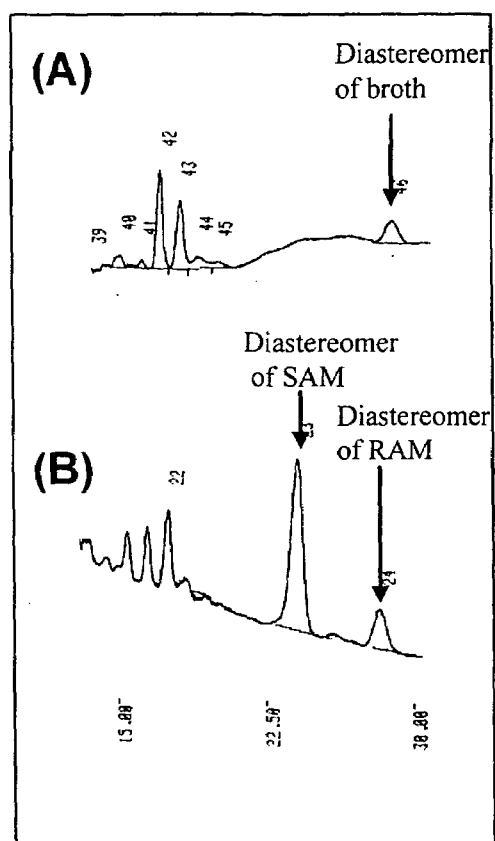


Fig. 12 Gas chromatogram showing the hydrolyzed products of (R,S)-ester.

(A) : diastereomer of RAM produced by *Pseudomonas aeruginosa* 1001, (B) : Diastereomers of the authentic standards of SAM and RAM.

Table 6 . Optical rotation of RAM produced by *Pseudomonas aeruginosa* 1001

RAM	Color	Optical rotation ^a
RAM (produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001)	Colorless	-44.4
RAM (authentic)	Colorless	-56
RAM (literature)	Colorless	-57.5

^a[α]_D²⁵(C=2, CHCl₃)

마. (R,S)-ester로부터 RAM의 생산

Pseudomonas aeruginosa 1001은 배양시작후 14시간에서 16시간 사이에 최대의 효소활성을 보이는 것으로 Fig. 13에 조사되었다. Fermentor를 사용하여 20시간 배양후 배양액을 원심 분리하여 수확된 cell내의 효소활성을 조사하였다. 배양 시작 12시간후에 0.5% glycine을 첨가하였고, 그 결과 세포내의 효소활성이 증진되었으나, 20시간 후부터는 서서히 감소하였다. 배양액 1ml로부터 수확된 세포의 효소활성은 약 540 U으로 조사되었다.

그람 음성균의 경우, 단백질은 두 개의 소수성 막인 cytoplasmic membrane과 outer membrane으로 구성된 세포막의 통과를 해야 세포외로의 분비가 가능하다. 하나는 세포막을 통하여 cytoplasm에서 세포외의 배지로 직접 이동하는 단일 step의 경로이고, 다른 하나는 GEP (general export pathway) 로 불리는 inner membrane과 outer membrane의 두 step으로 구성된 경로이다.

그람음성균인 *Pseudomonas aeruginosa*는 단백질의 general secretory pathway (GSP)를 가진다고 보고된 바 있다 (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

그러나, 이번 연구에서는 *Pseudomonas aeruginosa* 1001에 의해 생성된 (R,S)-ester의 가수분해 활성을 가진 효소는 세포외로 분비되지 않은 것으로 밝혀졌다. 그러나, 배지에 glycine을 첨가할 경우, 세포외로 효소의 분비가 일부 일어난다. 이것은 세포막 상에 위치하는 효소가 배지내 고농도의 glycine으로 인한 삼투압의 증가로 소량의 효소가 분비되는 것으로 사료된다 (22, 23, 24, 25, 26).

이것은 (R,S)-ester로부터 RAM으로 생물전환의 경우, 이러한 효소의 분비양상에 관한 최초의 보고이다.

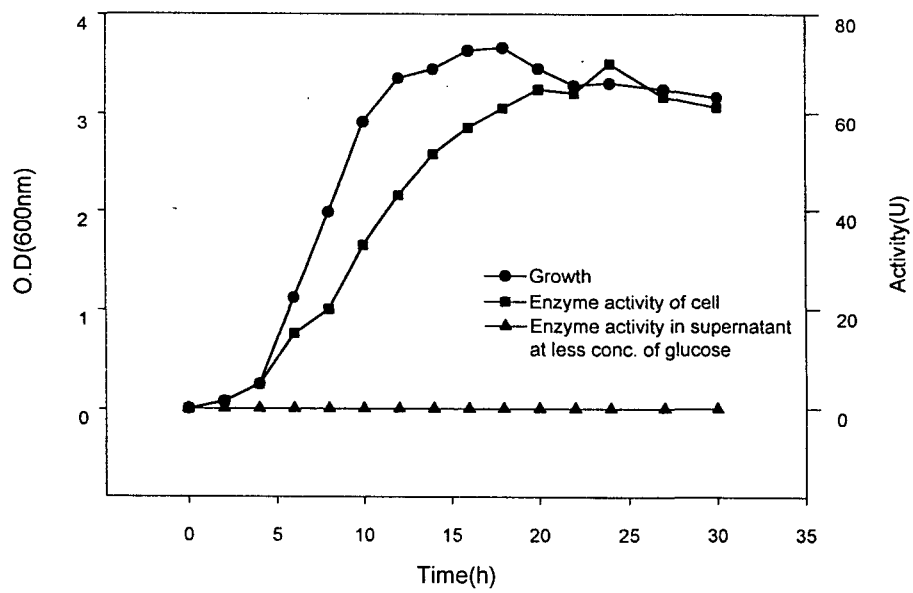


Fig. 13. Enzyme activity and growth curve of *Pseudomonas aeruginosa* 1001

바. *Pseudomonas aeruginosa* 1001의 *estA* 유전자의 클로닝

Pseudomonas aeruginosa 1001의 genomic DNA를 GENOME-ISOLATION KIT (Bio101社, USA)를 이용하여 분리하였다. 분리된 genomic DNA를 제한효소 *Sau3A*으로 부분절단하고, *Bam*HI으로 절단된 pBluescript@IIS+ vector에 삽입하였다.

삽입된 plasmid는 *E.coli* DH5 α 에 형질전환하여, 약 10,600개의 형질전환체를 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)과 ampicillin이 포함된 LB 배지를 사용하여 얻었다. 그 중에서 *estA* 유전자가 함유된 형질전환체를 선별하기 위하여 (R,S)-ester와 trybutyrin이 함유된 plate에 접종하여 배양하였다. 형질전환체의 효소의 활성은 GC와 HPLC를 사용하여 RAM 생성량을 측정하여 이루어졌다.

형질전환체중 (R,S)-ester로부터 RAM을 생성하는 활성을 지닌 효소를 코우드하는 *estA* 유전자를 함유하는 플라스미드 pTBL7 (약 4.5-kb)를 함유하는 형질전환체가 분리되었다 (Fig. 14). pTBL7의 4.5-kb의 gene 중에서 *estA*의 위치를 조사하기 위하여 서브클로닝을 수행하여 pTBL71, pTBL72, pTBL73, pTBL74, pTBL75, pTBL76, and pTBL77 (Fig. 15)을 얻었다. 각 프라스미드의 RAM 생산 활성을 조사하기 위하여 각 플라스미드를 함유한 재조합 대장균을 배양하여 균체를 수확한 후 초음파로 세포를 파쇄, 원심분리하여 그 상층액의 효소활성을 측정 조사하였다 (Fig. 15).

서브클로닝의 결과, *estA* 유전자는 pTBL76 (약 1.1-kb)의 *Nhe*I-*Nru*I의 분위에 위치하는 것으로 조사되었다.

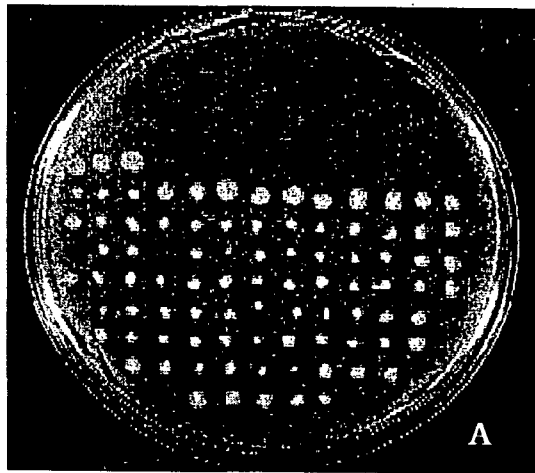


Fig 14. Clone showing trybutyrin-degradating activity

A; Clone harvoring pTBL7 plasmid.

<u>Plasmid</u>		<u>RAM-producing</u> <u>Activity</u>	<u>Size</u>
pTBL7		+	4.5-kb
pTBL71		-	1.9-kb
pTBL72		+	2.6-kb
pTBL73		+	2.5-kb
pTBL74		+	1.6-kb
pTBL75		-	0.9-kb
pTBL76		+	1.1-kb
pTBL77		-	0.5-kb

Fig 15. Restriction map of pTBL7 and the localization of *estA* gene

사. DNA 단편의 단일방향 제거

estA 유전자의 염기서열분석을 위하여 클로닝 벡터를 pBluescript®KSII+에서 pUC119로 바꾸어 삽입하였다. Deletion kit (Takara 社, Japan)를 사용하여, 약 2.5-kb의 pTBL73을 아가로오스 겔 (0.8%)을 사용한 전기영동으로 약 300 bp간격으로 9개의 DNA 단편(Fig. 16)을 분리하여 염기서열분석에 사용하였다.

아. pTBL73 플라스미드의 염기서열 분석

염기서열분석결과 pTBL73은 2455-bp의 염기서열로 이루어졌음이 확인되었다. DNASIS program (MacDNASIS Pro V3.5, Hitachi Software Engineering Co., LTD.)과 Editseq program (DNASTAR program package)을 사용하여 open reading frame (ORF)를 조사한 결과, 3개의 정방향 ORF와 1개의 역방향 ORF를 포함한 4개의 주요한 ORF가 존재하는 것으로 확인되었다 (Fig. 17).

그중 ORF1은 108개의 아미노산배열과 분자량 11,865 Da을 가지며, *Rhodobacter capsulatus* 유래의 precorrin-3 methylase와 52%, *Pseudomonas denitrificans* 유래의 precorrin-4 C11-methyltransferase와 52%, *Rhodococcus erythropolia* 유래 S-adenosylmethionine-dependent methylase와 52%의 상동성을 가지는 것으로 확인되었다.

ORF2는 315개의 아미노산과 34,836 Da의 분자량을 가지며, NCBI blast search를 통하여 상동성을 조사한 결과, *Psychrobacter immobilis* 유래의 triacylglycerol lipase precursor와 38%, *Pseudomonas putida* 유래의 dihydrolipoamide acetyltransferase와 29%, *Acetobacter pasteurianus* 유래 esterase2와 28%의 상동성을 보이는 것으로 확인되었다.

ORF3의 경우는, 역방향의 ORF이며, 완전하지 않은 ORF이다. 이 ORF는 315개의 아미노산과 34,882 Da의 분자량을 가지고, *Drosophila melanogaster* 유래의 CG15896 gene product

와 22%, *Caenorhabditis elegans* 유래의 hypothetical protein F01E11과 27%의 상동성을 가진다. 가장 짧고 불완전한 ORF4는 63개의 아미노산, 6,431 Da의 분자량을 가지고 있다.

*estA*의 플라스미드내의 위치는 pTBL76의 1.1-kb *NheI-NruI* DNA 단편에 위치하는 것으로 RAM의 분석결과 확인되었다 (Fig. 15). *estA* 유전자인 ORF2의 개시코돈인 ATG의 42-bp 위쪽에 *NheI* site가 위치하고, 종결코돈인 TGA의 46-bp 후에 *NruI* site가 존재하는 것으로 확인되어, 이 결과는 ORF2의 상동성 분석결과와도 일치하였다.

ORF2는 시작코돈인 ATG와 종결코돈인 948번째의 TGA를 가지고 있으며, 염기서열과 아미노산 서열을 Fig. 18에 나타내었다. *estA* 유전자는 DNASTAR program (Madison, Wis.)을 사용하여 948개의 염기서열과 316개의 아미노산서열을 가지는 것으로 조사되었다. 또한, *estA* 유전자는 A+T조성이 32.59%, C+G 조성이 67.41%를 가지며, isoelectric point가 6.4이었다. ORF2의 분자량은 SDS-PAGE (Fig. 19)에 의해 나타낸 바와 같이 35-kD의 부위에서 나타난 단백질 밴드의 결과와도 일치하였다.

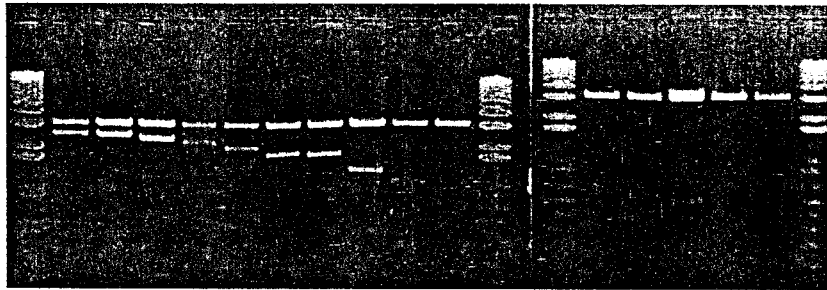


Fig. 16. DNA ladder for the nucleotides sequencing of pTBL73

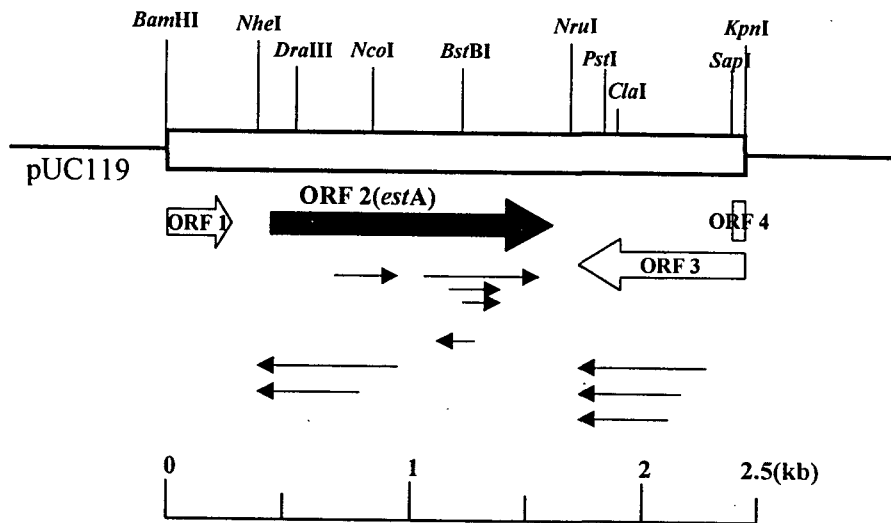


Fig. 17. ORFs located in pTBL73 insert.

```

gttcgcgcca ccctcggcga catcctgccc aaggtcgcgc ccaggaattt ccgccgcacc 60
gcgctgatcc tggctggcga ggtgctggcc gccgaaggct tcgccgactc ttgctgtac 120
cgcccgagc atcgacatct ctatcgacc gccgaatgaa ccgccgtcct taggttcggc 180
gccgaccacc ggcagcacgc ctgactcgt cacaaggctt gcgacagcgg gccggcacgg 240
ctagcgttca gcgctggccc ctttttctc gaagccttcg gacaccc atg aaa cga 296
Met Lys Arg
1

ttc ctc ctc ggt ctg gtt ctg ctg ctg gcg gtc gcc gcc ggc gtc ctc 344
Phe Leu Leu Gly Leu Val Leu Leu Leu Ala Val Ala Ala Gly Val Leu
5 10 15
tac ttc gtc ccg gct acc ctc ctc gcc agc gta cgc acc gtc gag cgc 392
Tyr Phe Val Pro Ala Thr Leu Leu Ala Ser Val Arg Thr Val Glu Arg
20 25 30 35
ggc ctc gcc ggt ctc agc gag cac agc gtg cag gtc gac aac ctg gag 440
Gly Leu Ala Gly Leu Ser Glu His Ser Val Gln Val Asp Asn Leu Glu
40 45 50
atc gcc tac ctg gaa ggc ggc tcg gaa aag aac ccg acc ctg ttg ctg 488
Ile Ala Thr Leu Gly Gly Ser Glu Lys Asn Pro Thr Leu Leu
55 60 65
atc cac ggc ttc ggc gcc gac aag gac aac tgg ctg cgc ttc gcc cgg 536
Ile His Gly Phe Gly Ala Asp Lys Asp Asn Trp Leu Arg Phe Ala Arg
70 75 80
ccg ctg acc gag cgc tac cat gtg gtc gcc ctc gac ctg ccc ggc ttc 584
Phe Leu Thr Glu Arg Tyr His Val Val Ala Leu Asp Leu Pro Gly Phe
85 90 95
ggc gac agc agc aag ccg caa cag gcc agc tac gac gtc ggc acc cag 632
Gly Asp Ser Ser Lys Pro Gln Gln Ala Ser Tyr Asp Val Gly Thr Gln
100 105 110 115
gcc gag cga gtc gcc aat ttc gcc gcc gcc atc ggc gtg cgc cgc ctg 680
Ala Glu Arg Val Ala Asn Phe Ala Ala Ala Ile Gly Val Arg Arg Leu
120 125 130
cac ctg gcc ggc aac tcc atg ggc ggc cac atc gcc gcg ctc tac gcg 728
His Leu Ala Gly Asn Ser Met Gly Gly His Ile Ala Ala Leu Tyr Ala
135 140 145
gcg cgc cat ccg gaa cag gtg cta tcg ctg gcg ctg atc gac aac gcc 776
Ala Arg His Pro Glu Gln Val Leu Ser Leu Ala Leu Ile Asp Asn Ala
150 155 160
ggg gta atg ccg gcg cgc aag agc gaa ctg ttc gag gac ctg gag cgc 824
Gly Val Met Pro Ala Arg Lys Ser Glu Leu Phe Glu Asp Leu Glu Arg
165 170 175
ggc gag aat ccc ctg gtg gtg cgc cag ccg gaa gac ttc cag aag ctg 872
Gly Glu Asn Pro Leu Val Val Arg Gln Pro Glu Asp Phe Gln Lys Leu
180 185 190 195
ctc gac ttc gtg ttc gtc cag caa ccg ccg ctg ccg gcg ccg ctc aag 920
Leu Asp Phe Val Phe Val Gln Gln Pro Pro Leu Pro Ala Pro Leu Lys
200 205 210
cgc tac ctc ggc gaa cgc gcg gta gcc gcg tcg gcg ttc aac gcg cag 968
Arg Thr Leu Gly Glu Arg Ala Val Ala Ala Ser Ala Phe Asn Ala Gln
215 220 225
ata ttc gaa caa ctg cgc cag cgc tac atc ccg ctg gag ccg gaa ctg 1016
Ile Phe Glu Gln Leu Arg Gln Arg Tyr Ile Pro Leu Glu Pro Glu Leu
230 235 240
ccg aag atc gag gca ccg acc ctg ctg cta tgg ggc gac cgc gac cgc 1064
Pro Lys Ile Glu Ala Pro Thr Leu Leu Leu Trp Gly Asp Arg Asp Arg
245 250 255
gtg ctg gac gtc tcc agc atc gag gtg atg cgt ccg ctg ctg aag cgg 1112
Val Leu Asp Val Ser Ser Ile Glu Val Met Arg Pro Leu Leu Lys Arg
260 265 270 275
ccc agc gtg gtg atc atg gaa aac tgc gga cac gtg ccg atg gtc gaa 1160
Pro Ser Val Val Ile Met Glu Asn Cys Gly His Val Pro Met Val Glu
280 285 290
cgc ccg gag gaa acc gcg cag cac tac cag gcc ttc ctc gac ggt gta 1208
Arg Pro Glu Glu Thr Ala Gln His Tyr Gln Ala Phe Leu Asp Gly Val
295 300 305
cgg aac gcc cag gtg gcc ggt cgc tga aaacg cgaaccggcg cctggcgccc 1260
Arg Asn Ala Gln Val Ala Gly Arg ***
310 315
ggttcggggg agcgggagcc gtcgcgagga cggctcggat acaggcctca ggcctggatc 1320
aggttggcga tctgcacgtc cgggttgacg tcctgctcg tagtcgacccc agcgcacctg 1380
aaaccgaaca ggttgaggaa

```

1400

Fig 18. Nucleotide sequences and amino acid sequences of *estA* of *Pseudomonas aeruginosa* 1001

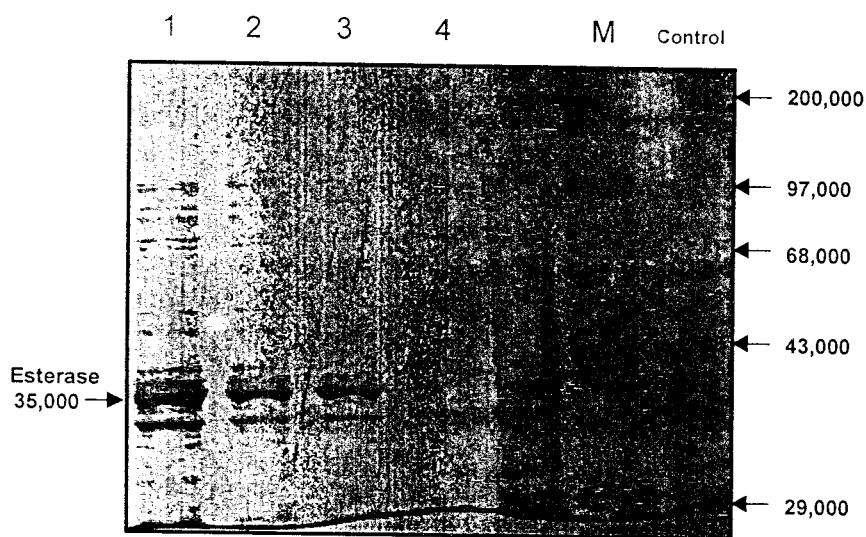


Fig. 19. SDS-PAGE (10%) analysis of the *estA* gene product expressed by *E. coli* BL21 transformants, stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, sonicated pellet of *E. coli* PES having pES22B vector of 4 h after induction of IPTG (Studier and Moffatt, 1986) as a inducer ; lane 2, sonicated pellet of *E. coli* PES having pES22B vector of 3 h after induction; lane 3, sonicated pellet of *E. coli* PES having pES22B vector of 2 h after induction; lane 4, sonicated pellet of *E. coli* PES having pES22B vector of 1 h after induction; lane M, molecular size markers (Myosin, 200-kDa ; Phosphorylase B, 97.4-kDa ; Bovine serum albumin, 68-kDa ; Ovalbumin, 43-kDa ; Carbonic anhydrase, 29-kDa); lane Control, sonicated pellet of *E. coli* BL21 having only pET.

자. 다른 효소들과의 상동성 연구

*estA*의 아미노산 배열과 다른 균주 유래의 esterase와 lipase의 아미노산배열을 비교하였다. NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) database search를 이용하여 아미노산 서열의 상동성을 조사한 결과, *Moraxella* sp과 *Psychrobacter immobilis* 유래의 triacylglycerol lipases, *Acinetobacter calcoaceticus* 유래의 carboxyl esterases와 유사성이 높은 것으로 조사되었다.

Pseudomonas aeruginosa 1001 *estA* gene products와 상동성이 있는 것으로 조사된 효소의 아미노산 배열간의 유사성을 Fig. 20에 나타내었다. 아미노산 서열간의 최대의 상동성을 얻기 위하여 서열사이에 부분적으로 간격을 두었다. Fig. 20에 나타낸 바와 같이 *Psychrobacter immobilis* 유래의 triacylglycerol lipase와 39%의 동일 아미노산과 59%의 유사 아미노산 서열을 가지는 것으로 조사되었다. *Moraxella* sp. 유래의 tryacylglycerol lipase와도 36%의 동일 아미노산 서열, *Psychrobacter immobilis* 유래의 다른 triacylglycerol lipase와 37%의 동일 아미노산 서열을 가지는 것으로 조사되었다.

또한, *Acinetobacter calcoaceticus* 유래의 carboxyl esterase와 17%의 동일 아미노산 서열을 가져, 상기한 결과들로 판단하여 볼 때, *estA*의 단백질 산물은 esterase와 lipase와 높은 상동성을 가지는 것으로 조사되었다.

상동성비교 결과(Fig. 20)중 consensus sequence는 검은색의 음영으로 표시하였고, 색이 짙을수록 상동성이 높음을 의미한다. 주요한 consensus sequence중 H-G와 G-X-S-X-G는 진핵세포와 원핵세포 유래의 많은 serine lipase와 esterase에서 공통적으로 존재하는 활성부위의 염기서열인 것으로 조사되어, *Pseudomonas aeruginosa* 1001 유래의 RAM 생성 효소가 serine esterase의 일종인 것으로 확인되었다.

*estA*의 아미노산 서열을 NNPREDICT 프로그램 (34)을 사용하여 이차구조를 분석한 결과, α -헬릭스 구조가 41.13%, β -쉬트구조가 6.33%를 가지고 있는 것으로 조사되었다. 이 방법은

여러 neural 네트워크의 조합에 기초한 절단 부위와 signal peptide/non-signal peptide의 예측에 의해 이루어진다.

*P. fluorescence*와 *P. putida* 유래의 esterase에 대한 많은 보고가 있는데 반하여 *P. aeruginosa* 유래의 esterase에 관하여 보고된 바는 거의 없다. 본 연구에서 사용된 효소 (*estA* 산물)는 활성 serine 잔기를 가지는 효소 group과 높은 유사성을 가지는 esterase와 lipase에 속하는 것으로 조사되었다. 아미노산 서열의 분석결과 활성 serine 잔기를 가지는 Gly-Asn-Ser-Met-Gly (Fig. 20)의 consensus sequence를 가지는 것으로 확인되었으며, 이 consensus sequence는 여러 serine계 esterase, lipase, protease에 공통적으로 존재하는 염기서열인 것으로 확인되었다 (27). 그러나, 전체적인 아미노산 서열의 상동성을 가진 것은 아니다. 그들의 촉매활성 경향은 serine hydrolase의 활성부위 구조에 관하여 보고된 바 (28, 29)와 같이 Ser, His과 Asp/Glu으로 구성되는 것으로 알려져 있다.

Table 7에 나타낸바와 같이, 여러 esterase와 lipase는 consensus sequence로서 H-G와 G-X₁-S-X₂-G (X : any amino acid) 를 가지며, 이 배열사이의 간격은 보통 65-70개의 아미노산 간격을 두고 있다. 이와 같은 사실은 본 연구에 사용된 *P. aeruginosa* 1001 유래의 *estA* 유전자의 산물의 consensus sequence와 일치하고 있다.

Triacylglycerol과 cholesterol ester의 가수분해와 지방산의 조직에로의 수송을 촉매하여 에너지 homeostasis에 관여하는 human hormone-sensitive lipase (HSL)와 가역적인 인산화반응 (phosphorylation)에 의해 조절되는 활성을 가진 triacylglycerol lipase도 역시 consensus sequence로서 pentapeptide인 촉매 serine 잔기를 가지는 G-X₁-S-X₂-G를 가지고 있다.

이 G-X₁-S-X₂-G의 70-100 아미노산 앞쪽에 또 다른 consensus sequence인 H-G가 위치하고 있고, 이 H-G의 기능은 G-X₁-S-X₂-G의 활성의 소수성 wing으로서 보조하는 역할을 한다. 이와 같은 serine 잔기를 가지는 효소로는 미생물, animal, human 유래의 acetylcholine esterases, thioesterases, lipases, serine protease (27)등이 있다. 이와같은 염기서열 상동성 결과로부터 *P. aeruginosa* 1001 유래의 RAM 생성 효소는 활성 serine 잔기를 가지는 esterase인 것으로 확인되었다.

이 consensus sequence는 *P. putida*과 *Pseudomonas* CF600 (30) 유래의 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HPDA) hydrolase (31), tropinesterase, 2-hydroxymuconic semialdehyde (HMC) hydrolase (32)에서 발견된다.

이와같은 사실로 RAM 생성 esterase는 serine esterase이며 137번째 서열의 serine기가 효소활성의 중심이라는 것이 간접확인되었다 (33).

estA 중에는 3개의 염기서열로 구성된 shine-dalgarno (SD) 배열이 시작 코돈의 methionine의 6 염기서열 위쪽에 존재한다 (34). *Pseudomonas* (35)의 SD 배열은 AGGAGA이며 GGAGG인 *E. coli* (36) SD 배열과 부분적인 상동성을 가지고 있다. *P. aeruginosa* 1001 esterase의 SD 배열은 Ozaki *et al.* (14)가 보고한 SD 배열 (AGGAGA)와 다른 염기서열을 가지고 있고, 효소활성 부위의 serine을 코우드하는 염기서열인 TCC 코돈(28)을 가지고 있어, 대부분의 esterase가 활성 serine의 코돈을 TCG 코돈(14)을 가지는 것과 다른 양상을 보이고 있다.

또한 *P. aeruginosa*내의 consensus pentapeptide인 G-X₁-S-X₂-G의 염기서열을 MedLine 과 PubMed에서 검색하였으나, 이에 관한 보고를 찾지 못하였다. 이와 같은 결과로, 본 연구에서 사용된 효소는 *P. aeruginosa* 유래의 새로운 RAM 생성 균주이며, serine esterase의 일종인 것으로 판단된다.

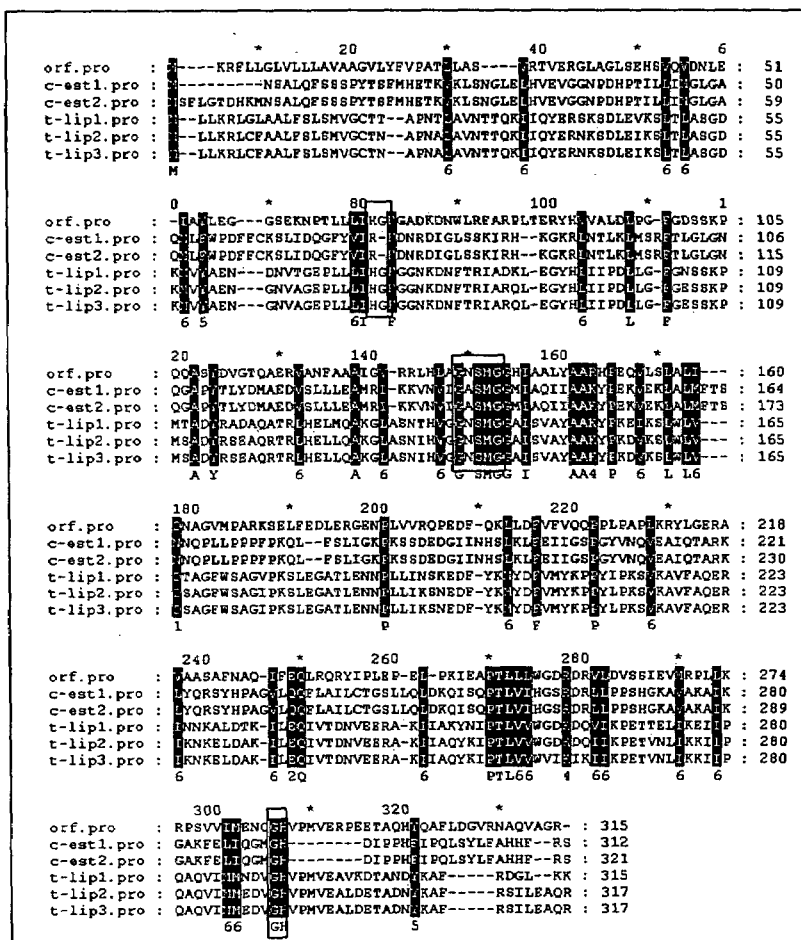


Fig. 20. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of the *estA* (ORF2) gene product (this study) with sequences of the homologs from *Acinetobacter calcoaceticus* (*c-est1*, GenBank accession no. CAA61351; *c-est2*, GenBank accession no. S57530), *Moraxella* sp. (*t-lip1*, GenBank accession no. P24640), and *Psychrobacter immobilis* (*t-lip2*, GenBank accession no. Q02104 ; *t-lip3*, GenBank accession no. S28225). *c-est* and *t-lip* are carboxyl esterase and triacylglycerol lipase, respectively. Boxes indicate the consensus sequences for the catalytic triad. The position has been skipped as indicated with dots that are unique for individual enzymes in order to obtain a comprehensive alignment picture of the consensus sequence.

Table 7. Consensus dipeptide and pentapeptide in esterases and lipases from various sources. ([§]HG sequence not determined)

Strain and enzyme	Consensus pentapeptide
<i>Moraxella</i> TA144 lipase 2(46)	HG---70a.a ¹ ---G-D-S-A-G
<i>E.coli</i> lipase-like enzyme(46)	HG---70a.a--- G-D-S-A-G
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> N-acetyl hydrolase(46)	HG---66a.a--- G-D-S-A-G
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> N-acetyl hydrolase(46)	HG---66a.a--- G-D-S-A-G
<i>Bacillus acidocaldarius</i> hypothetical protein(46)	HG---70a.a--- G-D-S-A-G
Human hormone-sensitive lipase(46)	HG---70a.a--- G-D-S-A-G
Cholesterol esterase(47)	HG---75a.a--- G-E-S-A-G
Acetylcholine esterase(47)	HG---75a.a--- G-E-S-A-G
<i>Acinetobacter lwoffii</i> esterase(48)	HG---66a.a--- G-D-S-C-G
<i>P.fragi</i> lipase(49)	HG---64a.a--- G-H-S-Q-G
[§] Porcine pancreatic lipase(49)	G-H-S-L-G
[§] Rat lingual lipase(49)	G-H-S-Q-G
[§] <i>Staphylococcus hyicus</i> lipase(49)	G-H-S-M-G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1001 esterase*	HG---65a.a--- G-N-S-M-G

*This work.

¹a.a. = amino acids.

차. 대장균에서 *estA*의 발현

대장균에서 *estA*의 발현을 위하여 PCR을 수행하여 *estA*를 증폭하였다. PCR 수행후 산물은 아가로오스 겔 전기영동으로 분석하여 증폭된 DNA의 크기를 확인하였다 (약 1-kb). 개략적인 esterase의 과발현을 위한 발현 벡터의 제조에 사용된 procedure를 Fig. 21에 나타내었다.

pET22b 벡터로부터 제조된 발현 벡터를 Fig. 22에 나타내었다. pET22b는 IPTG에 의한 induction system을 가지고 있으며, *estA* 유전자가 삽입된 pET22b 발현벡터를 pES22B로 명명하였고, *E.coli* BL21 (DE3)에 형질전환하였다.

Induction후, control보다 높은 RAM 생성활성을 가지는 pES22B 발현벡터는 SDS-PAGE 분석 결과, 약 3.5-kD의 단백질 밴드가 특이적으로 다량으로 발현됨이 조사되어, *estA*의 유전자 산물의 분자량 (Fig. 19)과 동일함이 확인되었다.

재조합 대장균 BL21 (pES22B)의 induction 전에는 적은 양의 효소활성만이 검출되었으나, IPTG induction 4시간후에 가장 높은 효소활성 (4275 U/ml)을 보였다. 또한, *P. aeruginosa* 1001 배양, 세포를 수확한 후 초음파파쇄기로 세포를 파쇄하여 원심분리후 상층액을 회수하여 cell pellet을 분리한 후에도 cell pellet에 효소 활성이 남아있음이 확인되었다. 이와 같은 현상은 단백질을 재조합 대장균내에서 이종의 단백질을 과발현하면 과발현된 단백질이 효소활성등의 활성이 없는 inclusion body로 생산되는데 비하여 본 연구의 효소의 경우는 cell pellet내의 효소도 SDS-PAGE에서 존재하고 있음이 확인되었고, 또한 효소활성도 관찰되어 효소의 과발현으로 인하여 효소가 inclusion body로 생산되고 있지 않음이 밝혀졌다. 이와같은 단백질 발현 양상은 효소가 활성형태로 aggregate-form으로 되어 있거나, 세포막에 강력하게 결합하고 있는 경우에 관찰된다고 보고 (37)된 바 있다.

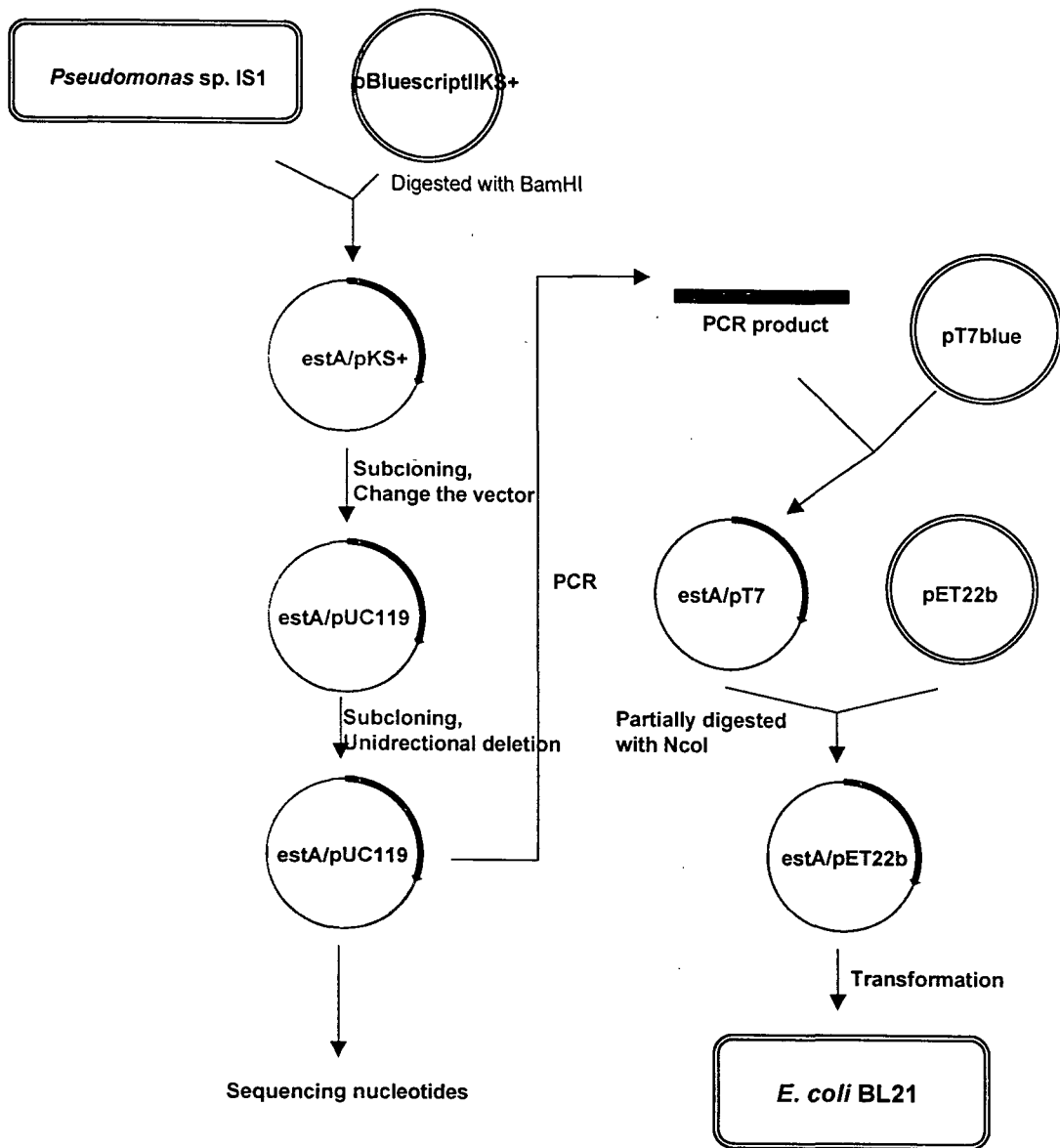


Fig. 21. Schemes of cloning for the overexpression of esterase in *E. coli*

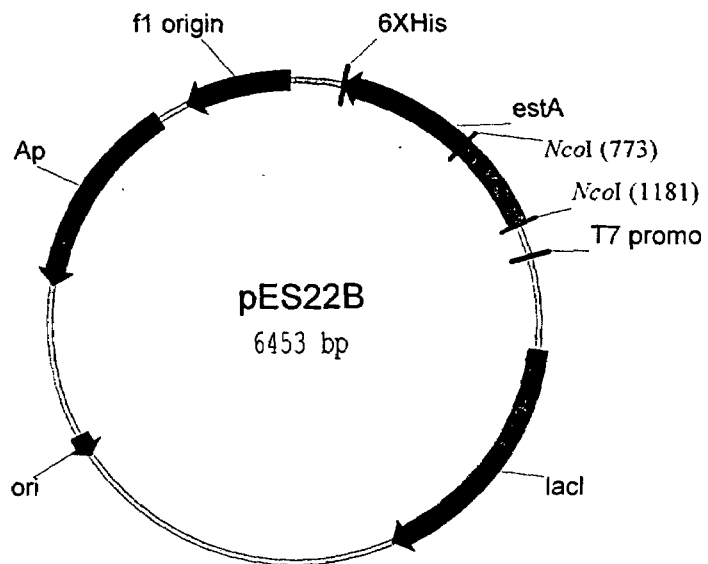


Fig. 22. Expression vector harboring *estA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* 1001

카. His-tag residue

Esterase의 대량 발현과 정제를 쉽게 하기 위하여 PCR을 사용하여 His-tag (6× histidine)기를 *estA* 유전자의 3' 말단에 위치하도록 설계하여 제작하였다 (Fig. 23, a). 상기의 유전자를 발현 벡터인 pET22b에 삽입하여 *E.coli* BL21에 형질전환하여 IPTG induction을 한 결과, esterase의 과발현이 일어났으나, histidine-binding resin인 'NTI resin (Qiagen Inc., USA)에 의해 esterase의 정제가 이루어지지 않았다. 따라서, His-tag기를 *estA* 유전자의 5' 말단에 위치하도록 다시 설계 (Fig. 23. b)하여 발현과 정제의 유무를 조사하였다. 그러나, His-tag 잔기를 5'말단에 위치하도록 위치한 유전자의 경우, esterase의 발현이 거의 보이지 않았다.

따라서, 발현 수율과 정제가 용이한 다른 발현 벡터의 사용이 요구되었다.

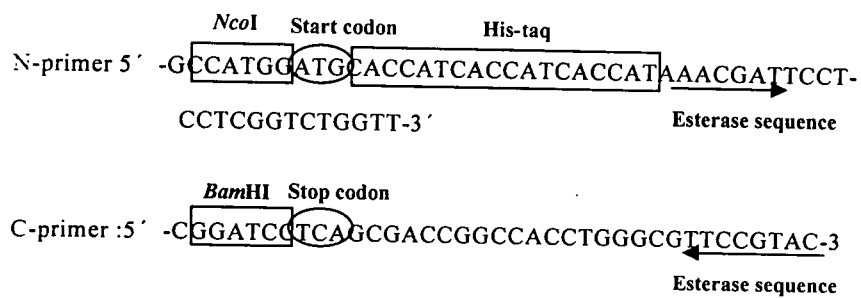
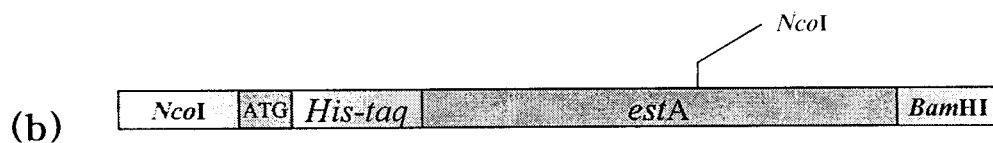
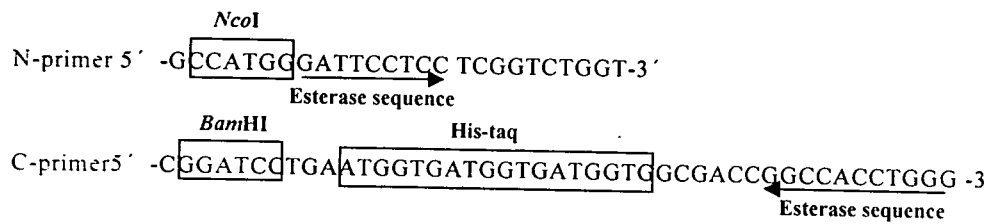
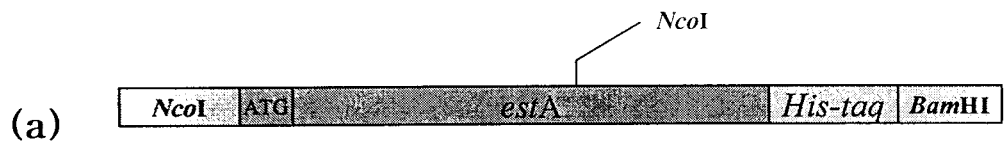


Fig. 23. Primer sets containing His-tag residue.

(a) His-tag : 3'-terminal

(b) His-tag : 5'-terminal

타. MBP-esterase fusion protein

(1) MBP-fusion protein

Fusion protein expression이란 이종의 단백질을 서로 결합하게 하여 동시에 발현하게 하는 기술이다. 이 방법을 쓰는 이유는 대장균을 숙주로 하여 원하는 단백질 (효소)만을 overexpression 할 때, 대부분의 경우 비수용성의 비활성 단백질 응집체인 inclusion body (봉입체)로 발현되어 원하는 단백질을 얻을 수 없기 때문이다.

그러나, fusion protein expression 기술을 사용할 경우, 단일 단백질 발현의 경우보다 fusion시키는 단백질의 solubility에 의해서 수용성의 활성을 지닌 형태로 발현되는 비율이 높다. 또 하나의 장점으로 fusion시키는 단백질의 affinity 등의 성질을 이용하여 발현 후 정제를 용이하게 할 수 있다는 점이다.

그 중 maltose-binding protein (MBP) fusion은 발현 후 maltose-binding resin (amylose resin)을 이용하여 정제가 용이하다. 이 expression system (pMAL vector)은 maltose-binding protein을 코우딩하는 *malE* 유전자와 그 앞쪽에 강력한 '*tac*' promoter를 가지고 있다. 또한 *tac* promoter 뒤에 signal peptide가 위치 할 수 있어, signal peptide의 유무에 따라서 각각 cytoplasmic expression과 periplasmic expression을 유도할 수 있다.

따라서, His-tag기에 의해 overexpression과 정제가 어려운 esterase의 생산을 위하여 MBP-fusion expression vector를 이용하였다.

(2) Esterase를 overexpression하는 pMAL vector의 제조

Signal peptide가 있는 vector를 pMAL-p2x, 없는 vector를 pMAL-c2x이며, signal peptide 이외의 sequence는 두 발현 벡터에서 동일하다 (Fig. 24). 이 vector의 polylinker

site에 삽입하기 위하여 *estA* 유전자의 5' 말단에 *EcoRI* site와 3' 말단에 *HindIII* site를 가지도록 PCR primer를 설계하여 insert를 제조하였다.

Fig. 25에 나타낸 바와 같이 상기한 polylinker site에 *estA* 유전자를 삽입하여 pMAL-c2x와 pMAL-p2x 유래의 발현 벡터 (Fig. 26)를 제조하였다.

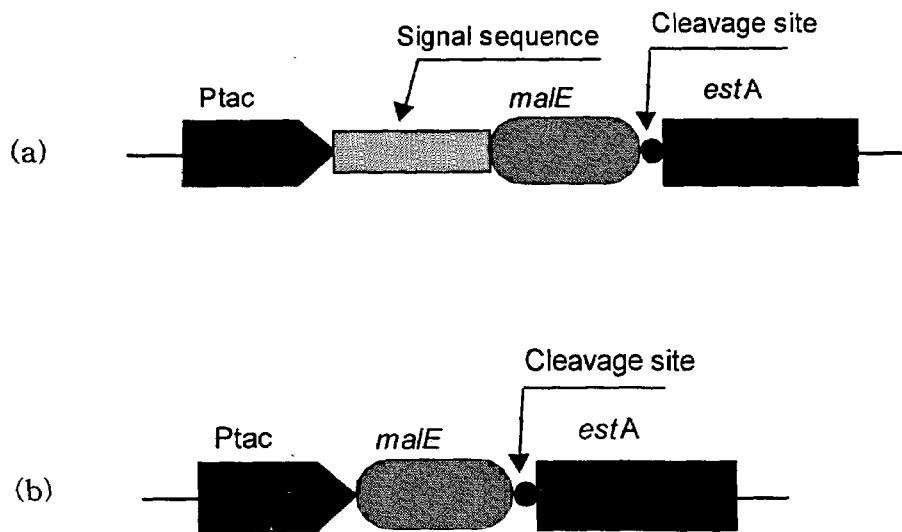


Fig. 24. Design for the overexpression system of MBP-*estA* fusion gene

(a) pMAL-p2x harboring *estA* gene

(b) pMAL-c2x harboring *estA* gene

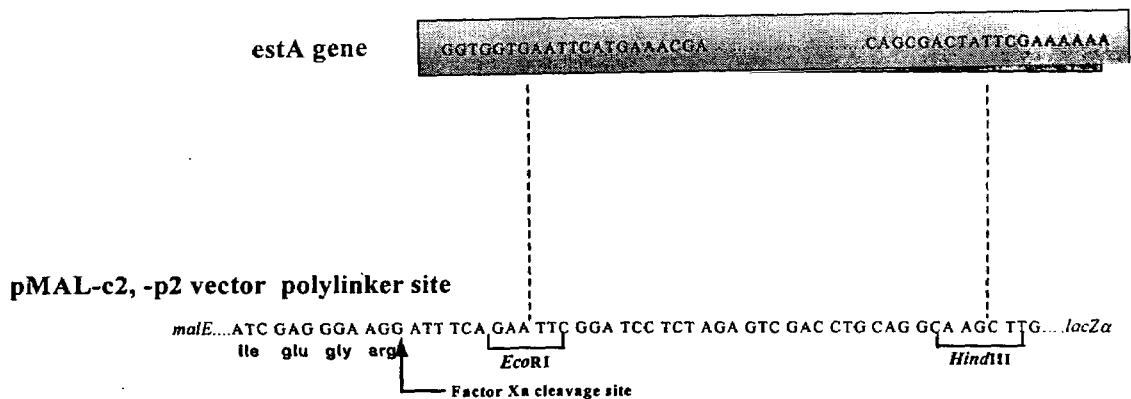


Fig. 25. Strategy for ligation of truncated esterase PCR product into pMAL-c2x and pMAL-p2x vectors for protein expression. The 5' and 3' ends of coding strand of the esterase PCR product are illustrated, showing amino terminal sequence (DEA·) through the termination codon (***). The product is blunt ligated into the *Stu*I site of the vector polylinker region. At the 3' end of the coding sequence, the product is ligated into the *Eco*RI site of the pMAL-c2x and -p2x polylinker region. Factor Xa protease cleaves the expressed fusion protein immediately following the codon for Arg of the tetrapeptide sequence Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR).

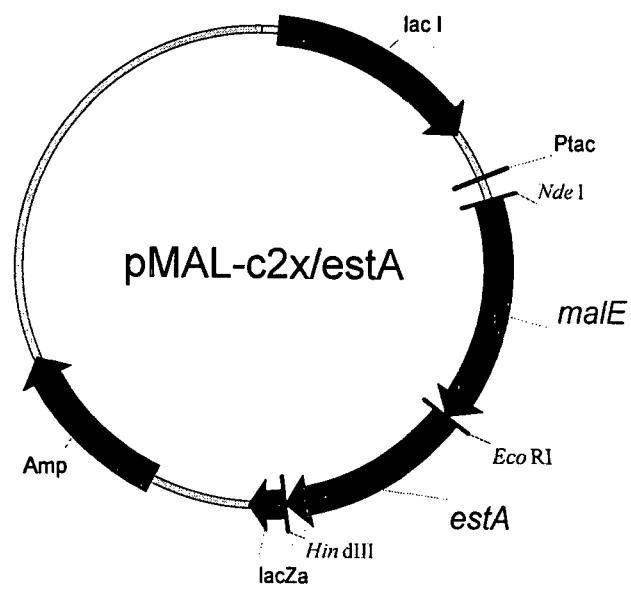


Fig. 26. Construction of expression vector coding maltose-binding protein esterase fusion protein.

(3) pMAL vector내의 *estA*의 발현

Fig. 26에 *estA* 유전자가 함유된 vector를 형질전환한 재조합 대장균 TB1을 배양 후, OD를 약 0.5 까지 배양 한 후, IPTG induction을 실시하였다. Induction 후 2시간 후에 배양액을 50 μ l과 50 μ l의 sample buffer을 혼합하여 5분간 boiling하였다. 10%의 SDS-PAGE을 사용하여 분석하여 IPTG induction에 의하여 단백질이 overexpression의 유무를 확인하였다.

Fig.27의 lane 1과 2는 pMAL-p2x를 사용하여 induction한 결과이다. Lane 1은 induction 전의 시료이고, lane 2는 induction 후 2시간의 시료이다. 이 두 lane의 단백질 band를 비교한 결과 induction 후의 시료에서 특별히 과발현된 단백질 밴드를 확인할 수 없었다. Lane 3과 4는 pMAL-c3x의 결과인데, 4의 IPTG induction후의 시료에서 induction으로 인한 단백질의 thick 밴드를 확인할 수 있었고, 그 크기도 maltose-binding protein이 약 42,698 Da이고, esterase가 약 34,836 Da으로, MBP-esterase fusion protein은 약 77,000 Da정도의 크기로 예상되는데 lane 4에 약 77,000부위에서 진한 단백질 밴드가 확인되어, pMAL-c2x에 삽입한 *estA* 유전자가 효과적으로 IPTG induction으로 과발현되었음을 확인하였다. 또한, pMAL vector의 signal peptide에 의한 periplasmic expression이 일어나지 않고, 오히려 signal peptide에 의해 *estA*의 발현이 저해됨을 확인하였다.

따라서, pMAL vector를 사용한 esterase의 대량 발현에 signal peptide가 없는 c type의 vector를 사용하였다.

IPTG induction후 시간에 따른 발현정도를 Fig. 28에 나타내었다. Induction후 시간별로 채취한 배양액 시료의 SDS-PAGE 전기영동 결과는, 시간에 따라 발현정도가 증가하였으나 induction 후 4시간이후에는 발현정도의 증가가 거의 없는 것으로 조사되었다. 또한 Fig. 27에서는 여러 단백질 밴드가 나타나 발현 단백질의 정확한 크기를 알 수 없었지만, Fig. 28의 SDS-PAGE에서는 overexpression된 MBP-esterase fusion protein의 정확한 크기가 잘 나타나 있다 (약 77,000 Da).

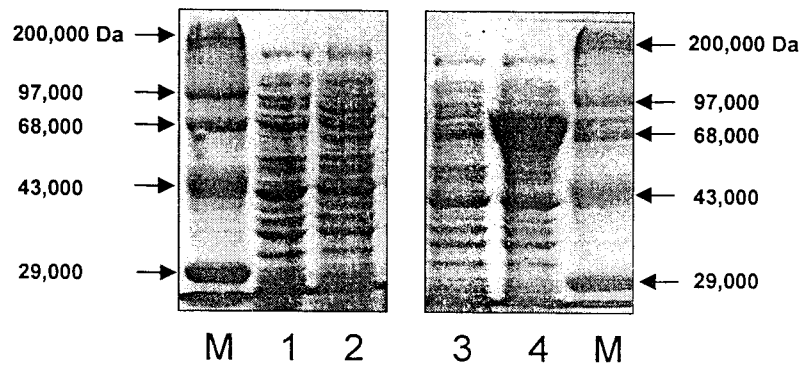


Fig. 27. SDS-PAGE of the *estA* gene product expressed by *E. coli* TB1 transformants, subjected to SDS-PAGE on a 10% gel, and stained with Coomassie brilliant blue. Lane M, molecular size markers (Myosin, 200-kDa ; Phosphorylase B, 97.4-kDa ; Bovine serum albumin, 68-kDa ; Ovalbumin, 43-kDa ; Carbonic anhydrase, 29-kDa); lane 1, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-p2x vector before IPTG induction ; lane 2, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-p2x vector at 2 h after IPTG induction; lane 3, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector before IPTG induction ; lane 4, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector at 2 h after IPTG induction.

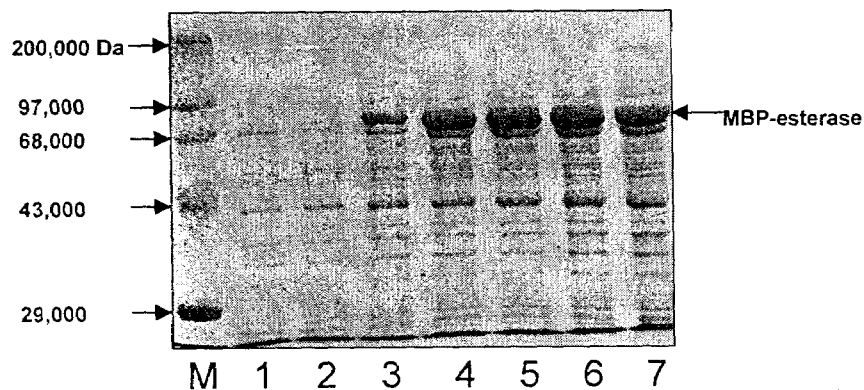


Fig. 28. SDS-PAGE of the *estA* gene product expressed by *E. coli* TBI transformants, subjected to SDS-PAGE on a 10% gel, and stained with Coomassie brilliant blue. Lane M, molecular size markers (Myosin, 200-kDa ; Phosphorylase B, 97.4-kDa ; Bovine serum albumin, 68-kDa ; Ovalbumin, 43-kDa ; Carbonic anhydrase, 29-kDa); lane 1, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector before IPTG induction ; lane 2, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector at 0 h after IPTG induction; lane 3, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector at 1 h after IPTG induction; lane 4, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector at 2 h after IPTG induction; lane 5, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector at 3 h after IPTG induction; lane 6, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector at 4 h after IPTG induction; lane 7, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector at 5 h after IPTG induction. The arrow indicates MBP-esterase.

(4) 세포파쇄액의 상층액과 pellet의 MBP-esterase fusion protein

Induction 후 4시간후에 세포를 수확하고, 초음파 파쇄기를 사용하여 세포를 파쇄, 원심분리 후 상층액과 pellet을 SDS-PAGE를 사용하여 단백질 패턴을 조사하였다 (Fig. 29). Lane 3은 세포파쇄, 원심분리후 상층액의 단백질 패턴이고, lane 4는 pellet내의 단백질 패턴이다. Lane 2에서 overexpression 된 fusion protein이 세포파쇄후 상층액에 약 40%, pellet에 약 60% 존재하였다. 또한 amylose resin에의 결합도 상층액과 pellet에서 모두 이루어져 amylose affinity에 의한 효소의 분리정제가 가능한 것으로 판단되었다.

또한 모든 단백질 시료의 SDS-PAGE 분석에서 공통적으로 나오는 약 40,000 Da의 단백질 밴드는 lane 7의 MBP (약 42,698 Da)인 것으로 확인되었고, MBP-esterase fusion protein도 positive control로 사용된 lane 8의 MBP2-paramyosin Δ Sal (MW. 70,216 Da)이 70,000 Da부위에 위치하는 것과 비교할 때, 그 크기가 75,000 Da과 비슷한 것으로 확인되었다.

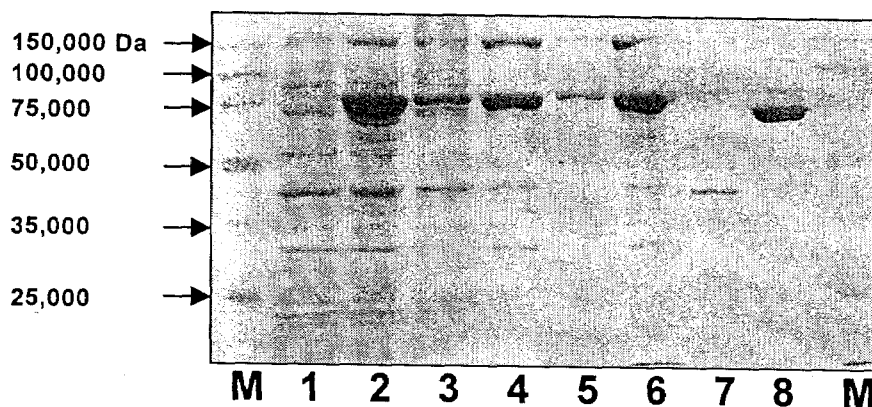


Fig. 29. SDS-PAGE of the *estA* gene product expressed by *E. coli* TB1 transformants, subjected to SDS-PAGE on a 10% gel, and stained with Coomassie brilliant blue. Lane M, molecular size markers; lane 1, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector before IPTG induction ; lane 2, crude extract of *E. coli* harboring pMAL-c2x vector at 2 h after IPTG induction; lane 3, supernatant after sonication; lane 4, pellet after sonication; lane 5, the amylose resin-binded protein of lane 3; lane 6, the amylose resin-binded protein of lane 4; lane 7, maltose binding protein (M.W.: 42,698 Daltons); lane 8, MBP2-paramyosin Sal (fusion protein used as a positive control, M.W.: 70,216 Daltons).

(5) MBP-esterase fusion protein의 분리

MBP-esterase fusion protein의 분리 정제는 Fig. 30에서와 같이 amylose resin과의 affinity를 이용하여 이루어졌다. 먼저 *estA* 유전자가 삽입된 pMAL-c2x가 형질전환된 재조합 대장균 TB1을 배양, IPTG induction하여 세포를 수확하여 세포를 파쇄, 원심분리한 후 그 상층액을 amylose resin으로 충전된 column에 가하여 amylose resin에 MBP-esterase fusion protein을 결합시켜 다른 세포단백질과 분리하였다. 그후 10mM의 maltose가 함유된 column 완충용액을 사용하여 MBP-esterase fusion protein을 용출하였다. Fusion protein의 MBP와 esterase 사이에 존재하는 절단 부위에 특이적으로 작용하는 protease인 factor Xa를 첨가하여 MBP와 esterase를 절단하였다. 그리고, DEAE-Sepharose ion chromatography를 이용하여 esterase를 분리하는 공정을 사용하였다.

Maltose가 함유된 column 완충용액으로 용출시켜 약 3ml의 부피로 20개의 분획을 얻었다. 20개로 분획된 시료내의 단백질 농도, 효소 활성, SDS-PAGE의 단백질 패턴 등을 조사한 결과를 Fig. 31에 나타내었다.

Lane 1에서 lane 7의 요출 시작후 7개의 분획의 결과를 나타내었고, 그 이후의 분획에는 거의 단백질이 용출되지 않았다. Lane 2와 3에서 가장 많은 양의 단백질이 포함되어 있었고, 분자량 약 77,000 Da의 fusion protein 뿐만 아니라 분자량 약 45,000 Da의 MBP도 생성 분리되고 있음을 볼 수 있었다. 그러나, 효소활성을 측정한 결과는 효소의 양과 비례하지 않은 것으로 확인되었다. Lane 2와 3은 각각 단백질 정량결과 1.4 mg/ml와 1.5 mg/ml로 높게 조사되었으나, 효소활성은 단백질량이 0.31 mg/ml인 lane 4의 시료의 효소활성인 454 U의 절반도 안되는 235 U과 157 U를 나타내는 것으로 조사되었다.

Lane 2와 3의 시료의 경우, 세포 파쇄후 상층액에 용해된 단백질을 사용하여 분획하여 soluble한 형태의 fusion protein인 생성되어, 비용해성으로 침전되는 inclusion body와는 단백질 양상이 다르다. 또 lane 2, 3의 fusion protein은 효소활성이 나타나지 않는 것이 아니고, 효소활성이 적게 나타나 효소활성을 보이지 않는 inclusion body와는 단백질의 발현 양상이 다른 것으로 확인되었다. 따라서 단백질의 양에 따른 효소활성을 회복하기 위한 연구를 수행하였다.

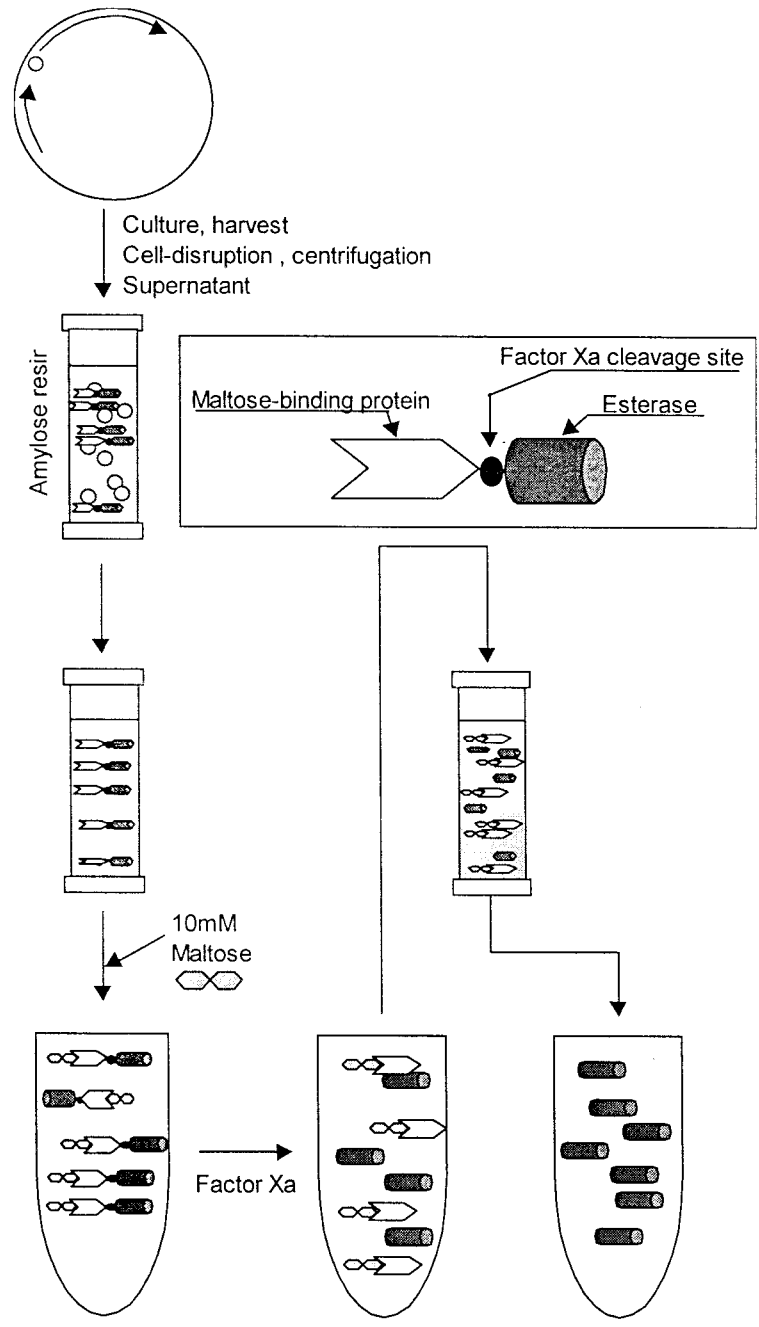


Fig. 30. Procedure of the purification of esterase from MBP-esterase fusion protein

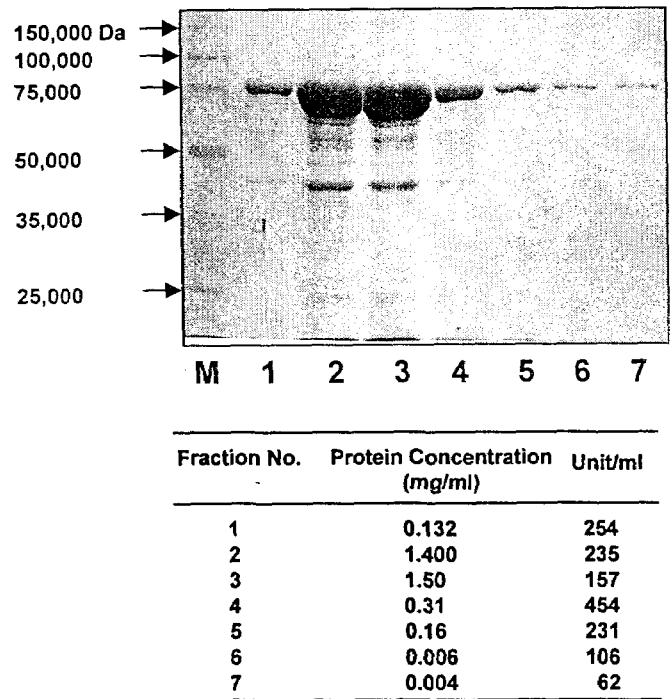


Fig. 31. SDS-PAGE (10%) analysis of amylose resin purification of fusion protein overexpressed by *E. coli* TB1 transformants and stained with Coomassie brilliant blue. Lane M, molecular size markers; lane 1, fraction no.1; lane 2, fraction no.2; lane 3, fraction no.3; lane 4, fraction no.4; lane 5, fraction no.5; lane 6, fraction no.6; lane 7, fraction no.7.

(6) MBP-esterase fusion protein의 희석에 의한 효소 활성의 증가

Fig. 31에 나타낸 바와 같이 효소의 농도와 효소 활성 사이에 비례적 관계가 성립되지 않아 그 이유를 고찰하였다.

먼저 많은 양의 효소가 적은 부피에 용해되어 효소의 활성부위에 효소 활성의 기질의 접근이 방해되어 효소의 활성이 효소의 양이 많을수록 적어진다는 가정으로 효소액을 희석하여 효소농도와 효소활성과의 관계를 조사하였다.

Fig. 32에 나타낸 바와 같이 단백질의 농도를 약 4.8 mg/ml에서 0.004 mg/ml까지 농도를 희석시키면서 효소활성을 조사한 결과, 효소의 농도가 약 2.17 mg/ml 까지 효소활성을 보이지 않았으며, 효소의 농도가 낮을수록 점차 효소활성이 높아져 효소의 농도가 0.3 mg/ml의 시료가 효소활성이 142 U/ml로서 가장 높았다. 이 실험의 시료들은 모두 가장 효소의 농도가 높은 시료인 4.8 mg/ml의 시료로부터 제조되었으며, 이 시료는 효소활성을 보이지 않았다. 따라서, 가장 효소활성이 높은 시료의 결과로부터 산출할 경우, 4.8 mg/ml의 시료는 2228 U/ml의 효소활성을 보여야 하며, 이 농도의 효소액을 희석하여 사용할 경우도 약 2228 U/ml 정도의 효소활성을 보일것으로 예상된다.

효소학적인 면에서 일반적으로 효소의 농도에 따른 효소활성의 관계를 살펴보면 효소의 농도의 증가에 따라 효소활성이 증가하다가 어느 정도의 효소농도에 다다르면 효소의 농도가 증가하여도 효소활성은 지속적으로 유지되는 양상을 보여주고 있다. 그런데, 본 연구에 사용된 MBP-esterase fusion protein의 효소액은 효소의 농도가 0.3 mg/ml에서 최대의 효소활성을 보이다 그 이상의 효소농도에서 그 활성이 급격히 낮아져 효소활성이 거의 보이지 않는 경향을 띄고 있다. 이러한 경향은 높아진 효소농도의 영향으로 효소의 활성부위가 차단되는데 기인한다고 생각되어지며, 효소의 상태는 수용성이고 약간의 aggregate를 형성한다고 생각되어진다. 이러한 양상을 보이는 효소에 대한 보고는 거의 없으며 새로운 효소활성의 양상인 것으로 판단된다.

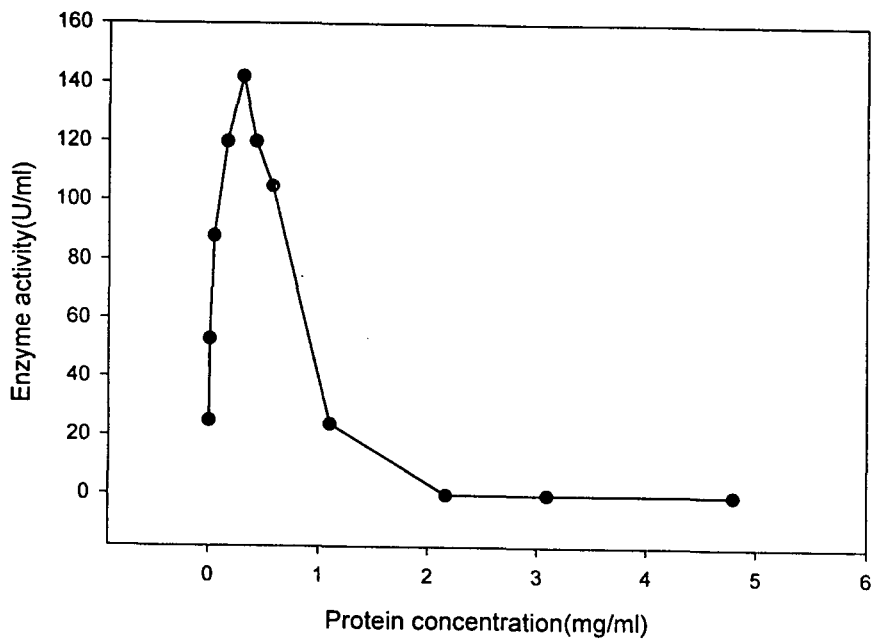
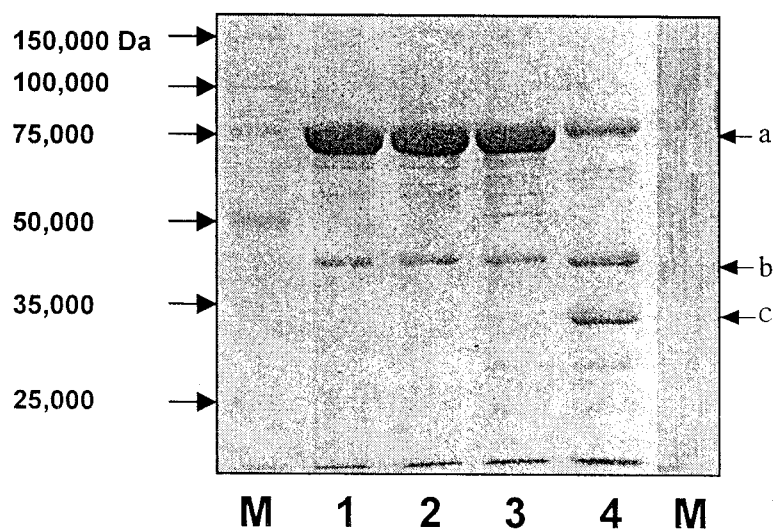


Fig. 32. Effect of protein concentration on the enzyme activity

(7) MBP-esterase fusion protein의 Factor Xa에 의한 절단

Esterase의 정제시 필요와 MBP-esterase fusion protein보다 MBP와 esterase의 절단 후 효소활성이 증가되지 않을까 하는 생각으로 protease Factor Xa에 의한 fusion protein의 절단후의 효소활성을 조사하였다. 그러나, Fig. 33에 나타낸 바와 같이 fusion protein에 Factor Xa의 첨가만으로 fusion protein의 절단이 관찰되지 않았고, 효소활성의 변화도 거의 관찰되지 않았다 (Lane 2). 이와 같은 이유는 상기한 Fig. 32의 경우와 마찬가지로 고농도의 효소액에서 MBP-esterase fusion protein의 중간에 위치하는 Factor Xa cleavage site에 Factor Xa의 접근이 차단되어 절단이 이루어지지 않은 것으로 사료된다. 따라서, detergent인 SDS를 소량 첨가하여 효소간의 엉킴(aggregate)를 풀어주고, Factor Xa를 첨가하였을 경우는 lane 4의 SDS-PAGE 분석결과와 같이 MBP와 esterase로 성공적으로 절단되었음을 보여주고 있다. 효소 활성의 증가는 Factor Xa 만을 첨가하여 아주 소량의 fusion protein이 절단되어 그에 따른 효소활성의 증가는 112.9 U/ml에서 120.15 u/ml로 적은량의 효소활성의 증가로 그쳤고, lane 3의 SDS만을 첨가한 경우, SDS에 의한 효소 엉킴의 풀림의 효과는 Factor Xa의 접근을 용이하게 하는 효과뿐만 아니라 효소의 기질의 esterase의 효소활성 부위로의 접근도 용이하게 하여 효소활성이 151.2 U/ml로 약 34%정도 증가하였다. SDS와 Factor Xa를 같이 첨가하였을 경우는 효소 엉킴의 풀림과 함께 fusion protein의 절단이 일어나, 155 u/ml로 효소활성이 증가하였다. 그러나, Factor Xa에 의한 효소 활성 변화는 증가효과가 있지만 그 효소활성 증가정도는 미미한 것으로 확인되었다. Lane 4의 SDS와 Factor Xa에 의해 절단된 SDS-PAGE상의 단백질 패턴은 a의 MBP-esterase fusion protein (M.W. 77,000 Da)과 b에 나타낸 MBP (M.W. 42,000 Da), c의 esterase (M.W. 35,000 Da)의 밴드를 보이고 있다.



	RAM (g/l)	Unit /ml
Control (Lane 1)	1.100	112.9
Factor Xa (Lane 2)	1.17	120.15
SDS (Lane 3)	1.47	151.2
SDS + Factor Xa (Lane 4)	1.51	155.95

Fig. 33. SDS-PAGE (10%) analysis of amylose resin purification of fusion protein overexpressed by *E. coli* TB1 transformants and stained with Coomassie brilliant blue. Lane M, molecular size markers; lane 1, control; lane 2, fusion protein added SDS (0.05%); lane 3, fusion protein added Factor Xa; lane 4, fusion protein added SDS (0.05%) and Factor Xa.

(8) 'in vitro' MBP-esterase fusion protein의 활성화

Fig. 33의 결과에서 나타난 바와 같이 MBP-esterase fusion protein에 detergent인 SDS의 첨가는 효소활성을 증가시키는 것으로 조사되어, 여러 종류의 detergent를 fusion protein액에 첨가하여 그 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. Inclusion body의 solubilizing agent로 사용하는 여러 detergent 및 시약을 농도별로 사용하였다. Fig. 34에 나타낸 바와 같이 대부분의 solubilizing agent는 fusion protein의 효소활성을 증가를 가져왔다. Fig. 34에서 fusion protein의 분리에 사용한 SDS의 경우, fusion protein 용액에 0.005% (v/v)을 첨가하였을 경우 약 8.5%의 활성의 증가를 보였으나, 0.01% (v/v) 이상의 농도에서는 효소활성이 감소하여 특히 0.05% (v/v)이상 농도의 SDS를 첨가 할 경우는 오히려 SDS에 의해 protein의 변성이 일어나 효소활성을 보이지 않았다. 사용된 solubilizing agent중 ammonium sulfate가 가장 좋은 효소활성의 증가를 보여 약 39%의 효소활성의 증가를 나타내었다.

Goto (38)와 Maeda (39), Eliana (40)의 보고에 의하면, ammonium sulfate는 immunoglobulin의 light chain과 egg-white lysozyme의 unfolding rate를 감소시키고, refolding rate를 증가시키는 등의 작용을 한다고 알려져 있다. Triton X-100을 fusion protein에 첨가했을 경우도 약 7.5 %의 활성의 증가를 보였다. 이러한 결과는 Sunitha (41)가 보고한 levansucrase의 inclusion body의 refolding에 의한 재활성화에서 Triton X-100 (2%, v/v)을 사용하여 활성을 얻었다는 결과와 유사하였다.

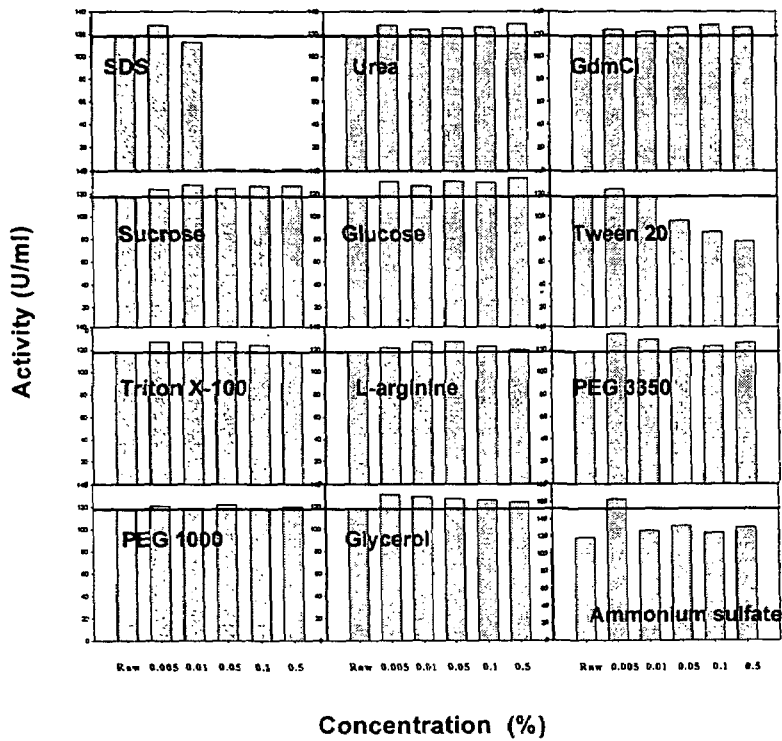


Fig. 34. Effect of several detergents on the activation of fusion protein

(9) *malE* 유전자가 결여된 overexpression vector system에서의 esterase의 발현

MBP-esterase fusion protein을 사용하여 발현을 할 경우, esterase의 이외에 이종의 단백질이 같이 발현되기 때문에 효소활성의 약간의 저하 및 esterase의 발현 후 MBP와의 분리 반응 및 정제공정이 필요하여 Fig. 24에 나타낸 expression system중 MBP를 코우딩하는 *malE* 유전자를 결여시킨 expression system (Fig. 35)을 제조하여 signal peptide의 유무에 따른 esterase의 overexpression 유무를 확인하였다.

Fig. 35의 (a)에 나타낸 것과 같이 signal peptide가 있는 경우 Fig. 36의 lane 1과 2의 결과와 같이 induction으로 인한 효소의 overproduction은 관찰되지 않았지만, esterase로 생각되는 protein 밴드가 32,000 Da 부위에서 induction에 관계없이 constitute하게 나타났다. Table 8의 효소활성을 살펴보면, induction 전과 후의 배양액의 효소활성 증가는 약간에 그쳤다. Fig. 35(b)의 signal peptide가 없는 경우도 역시 SDS-PAGE상의 단백질 패턴은 induction의 유무에 관계없이 일정하여 overexpression으로 판단하기는 힘들었다. 효소활성을 측정한 결과 (Table 8)도 induction후 세포 배양액의 RAM 생성 활성이 signal이 있는 경우보다는 10배 이상 증가가 있었지만, 발현되는 효소량이 적어 overexpression에 사용하기는 부적합하였다.

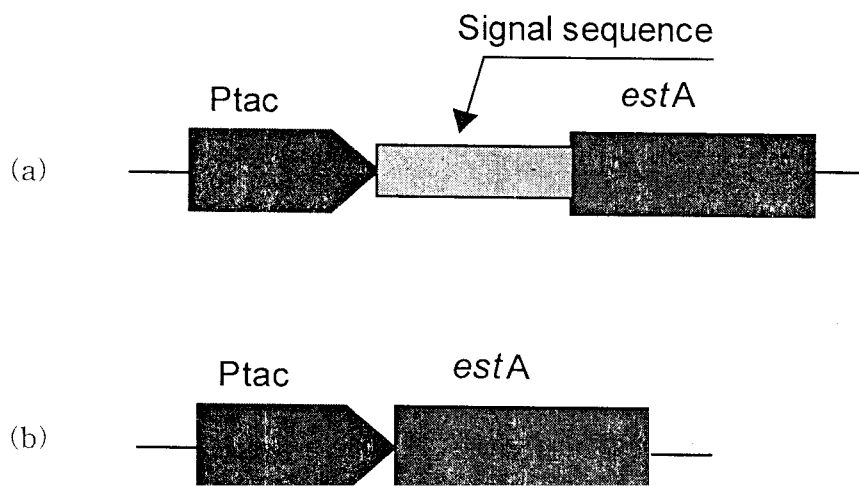


Fig. 35. Design for the deletion of *malE* gene from expression system

(a) *malE*-lacked *estA* gene cassette

(b) *malE* and signal sequence-lacked *estA* gene cassette

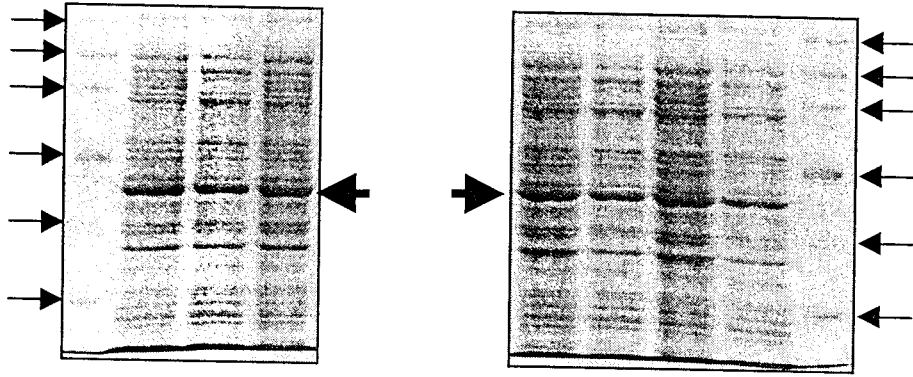


Fig. 36. SDS-PAGE analysis of MBP-free expression vector.

M, Molecular weight marker; 1, crude extract of signal-*estA*; 2, crude extract of signal-*estA* after IPTG induction; 3, crude extract of no signal-*estA* after IPTG induction ;4, crude extract of no signal-*estA*.

Table 8. Effect of signal sequence in *estA*-expression vector

	Enzyme activity (U/ml)			
	Signal- <i>estA</i>		No-signal- <i>estA</i>	
	Before induction	After induction	Before induction	After induction
Cell-free broth	5.3	30.8	6.2	29.7
Broth	5.2	27.7	6	298.8
Whole cell	4	7.1	8	136.6
Supernatant of disrupted cell	0.3	1.02	7.34	10.9
Pellet of disrupted cell	0.1	0.7	0.14	7.1

파. 인도측 연구 결과

인도측 연구자에 의해 연구된 결과를 다음과 같이 첨부합니다.

Title: Biological production of chiral compound for optically active pharmaceuticals

Indian Institute of Technology, Madras, India

Aim :

- Screening of organism that produces DAT
- Gene expression and cloning
- Optimization studies for the wild and recombinant strains

Total No. of organisms

isolated from soil brought from oil industries in India : 90

No. of organisms

screened from culture banks : 15

No. of organisms

that showed positive esterase production from culture banks: 06

No. of organisms

that showed positive esterase production from soil samples: 08

The different organisms that were screened belong to the genus *Brevibacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Cellulomonas* and *Agrobacterium*.

MATERIALS AND METHODS :

The soil samples were diluted to different concentrations and then they were plated on nutrient agar plates. Then small portions of cells that were grown are added to a solution containing 0.2 ml of water with 1% (w/v) of DL-ester and 0.1% (w/v) of bromocresol purple as indicator followed by incubation at 30°C for 4 hrs. Organisms that utilize the DL-ester turn the color of the reaction mixture from blue to yellow.

As the organisms morphology on view indicated to be bacterial strains the following medium is used :

Peptone bacteriological :	10 gm/l
Meat extract :	10 gm/l
Sodium chloride :	5 gm/l
	At pH 6.8

The fermentation of the soil samples has been carried out for two days and the production of D-Acetylthioisobutyric acid (DAT) has been considered as a factor for the screening of the organisms. The total amount of cells that were harvested from 100ml of broth and added to 2g of DL-ester and 100ml of 0.5 M Potassium phosphate buffer (pH 7.0) and incubated at 30°C for 24 hrs and the analysis is done on Gas Chromatography (Chiraldex GTA capillary column, supplied by Alltech, IL, USA Column Temp. 180 °C ; Injector Temp. 170 °C ; carrier gas N₂ ; at a flow rate of 20 cm³/min,).

DETERMINATION OF DAT :

The culture broth (100 ml) is centrifuged (3000 rpm for 30 minutes) and the pellet is washed once with water. Then a mixture of 1% DL-ester v/v and 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 is added (5ml). The reaction mixture is incubated at 30°C for 24 hrs in a glass tube. Now 10 ml of absolute ethanol is added and mixed well. One ml of the solution is taken and centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes. 450 micro litres of the solution is taken and to it 50 micro litres of Butanol and analysed by GC.

ESTERASE ACTIVITY DETERMINATION :

Cells from 100 ml of broth were collected and washed with distilled water and then the volume is made up to 9 ml with distilled water and 1gm of DL-ester and 10ml of 0.05 M Phosphate buffer (pH 7.0) are added to form the reaction mixture. Now at the desired temperature the pH is adjusted to 7.0 by addition of 0.1N NaOH and the reaction is started under constant agitation. The amount of NaOH added per hour is calculated and the activity is determined.

Activity is calculated as the micro moles of 0.1 N NaOH added per minute.

RESULTS AND DISCUSSION :

The following is the amount of DAT produced by different organisms (organisms with very less production of DAT are not included)

SOIL ISOLATES ;

% of DAT produced on first day

IS 1 : 0.14
IS 11 : 0.0202
IS 23 : 0.084

% of DAT produced on second day

IS 9 : 0.0953
IS 23 : 0.1648
IS 25 : 0.1557

% of DAT produced by organisms from culture banks

Pseudomonas putida NRRL B 955 : 0.0035
Pseudomonas putida NRRL B 727 : 0.0211
Pseudomonas fluorescens NRRL B 14678 : 0.0173

Pseudomonas putida KCTC 1644 : 0.0268
Pseudomonas putida KCTC 2401 : 0.0097
Pseudomonas putida KCTC 2408 : 0.048

As the results indicate the organism IS 1 shows good production of DAT it has been selected for further study. Though the strain IS 11 is producing little more amount of DAT than IS 1, the later has been selected for further studies as there is no considerable difference and also IS 1 gives the yield in the first day itself, which may be economically viable for the industry. At present Gene expression and Cloning is being carried out on IS 1.

Due the color problem different media have been screened and the following are the results of some media which is having appreciable amount of color.

The following is the composition of the media with acceptable color :

Medium I

Yeast Extract	1.0%
Casamino Acids	0.5%
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0%
Glucose	4.0%
Potassium Phosphate	0.5%

Medium II

Yeast Extract	2.0 %
Cassamino Acids	0.5 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 %
Glucose	4.0 %
Potassium Phosphate	1.0 %

Medium III

Corn Steep Powder	1.0 %
Yeast Extract	1.0 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 %
Glucose	4.0 %
Potassium Phosphate	0.5 %

Medium IV

Corn Steep Powder	1.0 %
Yeast Extract	1.5 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5 %
Glucose	4.0 %
Potassium Phosphate	1.0 %

Medium V

	per litre
Glucose	40 gm
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gm
(NH ₄) ₂ HPO ₄	13 gm
KH ₂ PO ₄	7 gm
MgSO ₄	160 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	18 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	10 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	10 mg
NaCl	200 mg
Yease extract	1 gm

Medium 6 and 7 consist of seed medium in which DL-ester has been added before sterilization and after sterilization respectively

Type of media	Esterase	% of DL-ester remaining	% of DAT
Medium I	Extracellular	40.0	32.0
	Intracellular	4.7	5.6
Medium II	Extracellular	60.0	33.0
	Intracellular	9.0	38.0
Medium III	Extracellular	66.0	33.0
	Intracellular	20.5	31.0
Medium IV	Extracellular	58.4	41.0
	Intracellular	13.6	37.0

The below mentioned results are from the reactor run

Time (hr)	DCW (g/L)	Esterase Activity (U/ml)
0.0000	0.0000	0.0000
2.0000	1.0000	0.0000
4.0000	2.0000	20.0000
6.0000	6.0000	33.0000
8.0000	8.0000	67.0000
10.0000	10.0000	80.0000
12.0000	11.0000	92.0000
14.0000	11.0000	108.0000
16.0000	11.0000	108.0000
18.0000	9.0000	94.0000
20.0000	6.0000	

ACTIVITY FOR SEED MEDIUM :

Activity tested for	Amount of NaOH consumed
Cell free broth	2.99 ml/hr
Cell	3.68 ml/hr

Activity for cell free broth : 226.52 U/gm dry cell wt.

Activity for cell : 278.79 U/gm dry cell wt.

TOTAL ACTIVITY : 505.30 U/gm dry cell wt

ACTIVITY FOR PRODUCTION MEDIUM :

Activity tested for	Amount of NaOH consumed
Cell free broth	5.334 ml/hr
Cell	4.014 ml/hr

Activity for cell free broth : 404.09 U/gm dry cell wt.

Activity for cell : 304.09 U/gm dry cell wt.

TOTAL ACTIVITY : 708.18 U/gm dry cell wt

PERCENTAGE YIELD OF DAT PRODUCED BY THE ORGANISM

Seed medium :

Cell free Broth : 19.67 % (Extracellular)

Cell : 25.83 % (Intracellular)

Production medium :

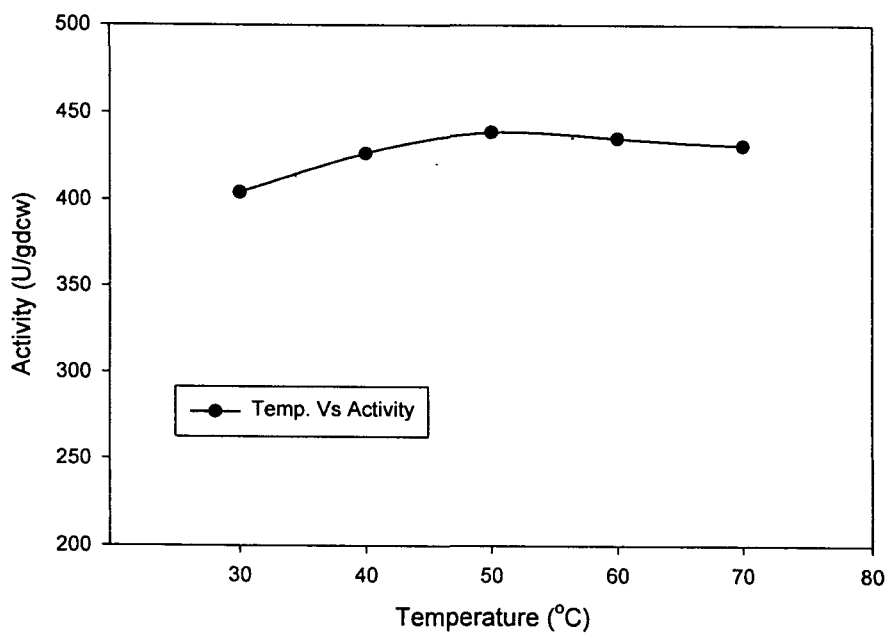
Cell free broth : 46.47 % (Extracellular)

Cell : 33.68 % (Intracellular)

		ACTIVITY (U/gm dry cell wt)	% of DAT
Seed Medium	Intracellular	278.78	25.83
	Extracellular	226.51	19.67
Production Medium	Intracellular	304.09	33.68
	Extracellulr	404.09	46.47

THERMAL STABILITY STUDIES ON ESTERASE

Temperature (°C)	ACTIVITY (U/gm dcw)
30	404.09
40	426.36
50	438.63
60	429.09
70	420.91



Effect of Temperature on Esterase Activity

Thermal stability study at 80°C has not been carried out as the pH probe cannot with stand the temperature of 80. °C for a period of 1 hr.

40 colonies were selected from the transformants. 10 recombinant strains of showing high activity were selected and shake flask studies were conducted. 1 strain (No. 13) was selected and plasmid stability and expression studies in a 5L reactor with a working volume of 3L was done.

Plasmid stability studies:

Plasmid stability was considered as the criteria for the age of the inoculum and 2% of seed medium was used for inoculation. The samples were diluted suitably with sterile distilled water. 50 l of sample has been plated on LB plate and incubated for 12 h. Later 100 colonies were randomly tooth picked and transferred to LB ampicillin (100 g/ml) agar plates. *E. coli* harboring the *estA* gene will grow on the LB ampicillin agar plate. The colonies were counted and the stability was determined. Table 5 gives the plasmid stability which was considered for the age of inoculum. Plasmid stability was always maintained above 95% until 9 h after induction with lactose. Plasmid was not stable in case of IPTG induction suggesting that IPTG is toxic to the *E. coli* harboring the *estA* gene. Plasmid stability has been done for seed medium, and reactor runs with IPTG and Lactose Induction for LB and M9ZB medium. M9ZB media is the optimized media for the high and proper expression of the protein which includes the plasmid stability was prescribed by Novagen, (Madison, WI, USA). The protein has been well expressed in this medium than the LB medium. Usually plasmid stability is the major and basic problem faced with the recombinant strains. The plasmid (vector and the gene of our interest) plays an important role in the protein expression. The plasmid was found to be more stable by lactose induction rather than the IPTG induction. This suggests that the proteins which were expressed by the IPTG induction proved to be toxic to the cell and thus the plasmid stability was decreased. In this case we can consider that the protein produced Est A was toxic to the cell.

Lysate is 1.5ml of culture broth was taken and centrifuged and the pellet was dissolved in a suitable buffer and sonicated. After the centrifugation, the supernatant is called Lysate and the Pellet is referred as Pellet here after.

Whole cells are the cells collected from 1ml of culture broth.

Total activity : The sum of the activity obtained from the lysate and the pellet.

Plasmid stability was taken as the criteria for the age of the inoculum

S. No	Time(h)	OD600	Stability (%)
1.	1	0.063	100
2.	2	0.065	100
3.	3	0.175	100
4.	4	0.82	100
6.	6	3.62	100
8.	8	4.53	98
10.	10	4.95	93
12.	12	4.02	90

The inoculum age was determined as 10 h and 2% of inoculum was added for the reactor runs. In all the reactor runs that were conducted 100mM Ampicillin was added every 4 h during cultivation.

Reactor run using LB medium and 2.5% glucose induction was done at 0.6 OD₆₀₀ with IPTG:

Expression of *estA* in *E. coli*

One of the recombinant strain showing high esterase activity was selected and initial shake flask studies were done with IPTG induction. The final concentration was fixed at 100 ng IPTG / ml of culture broth. The medium used was LB medium with 2.5% glucose as carbon source with 100 g/ml of ampicillin. Before conducting the reactor runs for the expression of the protein by lactose induction, various concentrations of lactose (0.5%, 1%, 1.5% and 2%) (Tables 1 to 4) have been tested for high activity. It was observed that 1 % lactose gave high esterase activity than the other. So further reactor runs were carried out using 1 % lactose concentration for induction.

Reactor Studies

Expression by IPTG induction:

Biosynthesis of esterase was carried out by batch fermentor by NBS Co., Bioflow III. The *E. coli* (BL21) harboring the *estA* gene was cultivated in a 5 L reactor with a working volume of 3 L. The medium used was LB and M9ZB media. Maximum activity was obtained after 4 h of induction in LB media. In M9ZB media maximum activity was obtained after 7h. Whole cells (Cells obtained from 1ml of culture broth) also showed high activity at 4 h postinduction time for IPTG induction and after 3h in case of M9ZB media. IPTG induction resulted in less plasmid stability which may be due the protein which was expressed was toxic to the cell and the plasmid stability decreased. Moreover in point of view of industrialization IPTG induction proves to be very expensive. Considering these factors we tried for an other mode of induction. We tried with lactose induction as it is a cheap source for the induction even in large scale. We have also tested the plasmid stability using the lactose induction. We obtained good results and so we carried on the further reactor studies with lactose induction.

Expression by lactose induction:

Biosynthesis of esterase was carried out by batch fermentor by NBS Co., Bioflow III. The *E. coli* (BL21) harboring the *estA* gene was cultivated in a 5 L reactor with a working volume of 3 L. The protein has been expressed in a 5 L reactor with a working volume of 3 L. The medium used was LB and M9ZB media. Interestingly it has been observed that the samples after sonicating both the pellet (insoluble) and the lysate (soluble) had activity. Maximum activity was obtained after 9 h of induction in LB media with 1 % lactose induction. In M9ZB media maximum activity was obtained after 9 h with 1 % lactose induction. Whole cells (Cells obtained from 1ml of culture broth) also showed maximum activity at 9 h postinduction time for lactose induction with LB media and after 5 h in case of M9ZB media with lactose induction. But the plasmid was very stable with lactose induction. Maximum The protein present in the pellet was found to be soluble in non-ionic detergent like Triton X100, which suggests that the enzyme is hydrophobic. 0.5 % Triton X100 was used and approximately 80% of the activity has been recovered from the pellet (insoluble).

Plasmid stability:

S. No	Time(h)	OD600	Stability (%)
1.	0.5	1.35	100
2.	1	1.72	98
3.	2	2.23	98
4.	3	3.22	97
5.	4	4.56	92
6.	5	6.55	88
7.	6	7.22	88
8.	7	8.10	78
9.	13	52.5	70

Activity Analysis:

Lysate			Pellet		
Time(h)	Area	U/ml	Time(h)	Area	U/ml
0	411.939	92.92706	0	42.622	9.862864
0.5	92.592	21.10177	0.5	554.558	125.0039
1	122.991	27.9389	1	855.402	192.6677
2	190.425	43.10568	2	1539.207	346.4643
3	680.379	153.3027	3	1637.382	368.5451
4	774.133	174.389	4	2707.947	609.329
		2			1
5	474.781	107.061	5	2451.666	551.6882
6	498.264	112.3427	6	2572.547	578.8759
7	401.653	90.6136	7	1720.449	387.228
13	451.013	101.7153	13	2076.313	467.2664

Whole cell			Total Activity	
Time(h)	Area	U/ml	Time(h)	U/ml
0	245.06	11.07876	0	102.7899
0.5	995.045	44.81504	0.5	146.1057
1	1138.838	51.28322	1	220.6065
2	1539.323	69.29808	2	389.57
3	1792.787	80.69954	3	521.8478
4	2269.773	102.155	4	783.718
		6		3
5	1845.95	83.09095	5	658.7492
6	1165.918	52.50135	6	578.8759
7	1037.046	46.70435	7	387.228
13	1053.582	47.44818	13	467.2664

Reactor run with M9ZB medium

Per liter:

10g tryptone

5g NaCl

Autoclave and cool

Add 100 ml 10X M9 salts

1 ml 1M MgSO₄, 10 ml 40% glucose

10XM9 salts

Per liter:

10g NH₄Cl

30g KH₂PO₄

60g Na₂HPO₄·7H₂O

Autoclave

M9ZB medium with IPTG induction

Plasmid stability:

S. No	Postinduction (h)	OD ₆₀₀	Plasmid stability (%)
1.	1	1.15	100
2.	3	2.25	97
3.	5	5.81	91
4.	7	7.27	87
5.	24	5.98	65

Pellet			Lysate		
Time	Area	U/ml	Time	Area	U/ml
0	100.028	22.77422	0	13.037	3.208813
1	657.775	148.2188	1	152.547	34.58643
3	1503.595	338.4547	3	640.458	144.324
5	1801.124	405.3728	5	907.362	204.3541
7	2554.127	574.733	7	1731.3	389.6685
24	1325	298.2863	24	652.315	146.9907

	Whole Cell	Total activity
Time	U/ml	U/ml
0	29.67479	25.98303
1	84.04971	182.8052
3	125.9037	482.7786
5	113.5434	609.727
7	83.17881	964.4015
24	47.04878	445.2771

The pellet was treated with 0.5% Tween 80 and TritonX100 and the following were the results:

Tween 80				TritonX 100			
Time	Area	U/ml	% Recovered	Time	Area	U/ml	% Recovered
3	55	12.646	3.73664	3	987.25	222.32	65.6879
		84	1			8	
5	260.7	58.925	14.5361	5	1106.0	249.04	61.4356
	63	61	5			57	
7	118.8	27.000	4.69785	7	1597.2	359.52	62.5557
	17	11	3			93	

200 μl of the culture broth was taken and the activity was tested for it. The culture supernatant showed no activity when tested:

Broth activity		
Time	Area	U/ml
0	160.564	36.38955
1	270.444	61.10299
3	393.703	88.82555
5	585.836	132.0388
7	1554.556	349.9165
24	2024.192	455.5437

Prior to the lactose induction to be done in the reactor a batch of shake flask studies were done using different concentrations of lactose in order to check the concentration of lactose to be used for the reactor study. 0.5 to 2 % lactose induction was used and the following are the results of the study:

Lactose Induction (0.5%)			Lactose Induction (1%)		
Time	Area	U/ml	Time	Area	U/ml
1	135.721	6.160408	1	80.955	3.69689
3	1098.696	49.47753	3	1617.064	72.7950
5	1743.872	78.49922	5	1809.755	81.462
7	1687.625	75.96908	7	1677.281	75.5037
9	1494.426	67.27849	9	1360.452	61.2519

Lactose Induction (1.5%)			Lactose Induction (2%)		
Time	Area	U/ml	Time	Area	U/ml
1	114.074	5.18667	1	133.094	6.04223
3	1676.981	75.49029	3	1708.392	76.9032
5	1746.568	78.62049	5	1732.808	78.0015
7	1619.079	72.88571	7	1782.807	80.2506
9	1266.986	57.04765	9	1344.943	60.5543

Maximum activity was obtained using 1% lactose. So 1% lactose was used for induction for further studies.

Reactor run using LB medium and 2.5% glucose with 1% lactose induction

Plasmid stability:

S. No	Time (h)	OD600	Plasmid stability
1.	1	1.4	100
2.	3	6.53	100
3.	5	8.15	100
4.	7	10.5	98
5.	9	8.56	92

Activity Analysis:

Pellet			Lysate		
Time	Area	U/ml	Time	Area	U/ml
0	18.568	4.45280 7	0	13.056	3.21308 7
1	24.211	5.72199 1	1	20.256	4.83246
3	113.577	25.8215 7	3	79.07	18.0604 9
5	831.936	187.389 8	5	655.079	147.612 4
7	1002.37 7	225.724 2	7	672.284	151.482
9	1614.88 6	363.485 5	9	1013.06 3	228.127 7

Total activity		Whole cell	
Time	U/ml	Area	U/ml
0	7.665894	98.562	4.4889
1	10.55445	170.031	7.703761
3	43.88206	519.378	23.4183
5	335.0022	2134.567	96.0737
7	377.2063	2276.238	102.4464
9	591.6131	2753.394	123.9101

Triton X 100			
Time	Area	U/ml	% Recovered
1	22.809	5.406663	94.48919
3	78.992	18.04295	69.87551
5	691.431	155.7884	83.13601
7	695.45	156.6924	69.41761
9	1136.212	255.8255	70.38121

Reactor run using M9ZB medium with 1% lactose induction:

Plasmid stability:

S. No	Time(h)	OD600	Plasmid stability (%)
1.	1	1.362	100
2.	3	5.035	100
3.	5	6.401	100
4.	7	8.696	99
5.	9	9.330	99

Activity Analysis:

Pellet			Lysate		
Time	Area	U/ml	Time	Area	U/ml
0	20.624	4.915228	0	27.295	6.415623
1	22.298	5.291733	1	19.677	4.702236
3	34.727	8.087176	3	24.079	5.692303
5	2302.694	518.1824	5	1527.535	343.8391
7	2647.74	595.7878	7	1856.246	417.7705
9	2794.033	628.691	9	2004.576	451.1318

Total activity		Whole cell	
Time	U/ml	Area	U/ml
0	11.33085	92.464	4.2145956
1	9.993968	93.121	4.2441492
3	13.77948	172.368	7.8088853
5	862.0215	2160.63	97.24608
7	1013.558	1616.438	72.766908
9	1079.823	1575.272	70.915155

Triton X 100			
Time	Area	U/ml	% Recovered
0	14.669	3.575871	72.75087
1	18.003	4.325731	81.74508
3	32.721	7.636001	94.4211
5	2010.372	452.4354	87.31199
7	1921.662	432.4834	72.59018
9	2230.037	501.8409	79.82315

Hydrophobic behaviour of the enzyme:

After cultivation of the *E. coli* harboring the *estA* gene the cell was sonicated. After sonication both the lysate (soluble form of the enzyme) and the pellet (insoluble form of the enzyme) was tested for activity. In general, in *E. coli* soluble form shows activity and the insoluble form doesnot show any activity. The whole cell without sonication also shows activity. But in this case of *estA* the insoluble form showed more activity than the soluble form which suggests us that the protein may be membrane bound or the protein is hydrophobic in nature. The whole cell also showed activity. Triton X100 a non-ionic detergent was used to solubilize the membrane bound proteins. 0.5 % Triton X100 was used and about 80 % of the protein has been recovered in this process which suggests us that the enzyme is hydrophobic. As discussed in the section 4.3.6 where we obtained the results by the method of EXPASY ProtScale program that the enzyme is hydrophobic the above mentioned discussion proves to be correct.

Prediction of secondary structure

The amino acid sequence of *estA* was analyzed for the secondary structure using NNPRELECT program (Kneller *et al.*, 1990). The contents α -helix and β -strand was 41.13 % and 6.33% respectively.

Prediction of Localization of the enzyme:

Esterase localization sites in the recombinant *E. coli* has been done using the program PSORT and the results are following.

bacterial periplasmic space --- Certainty = 0.943 (Affirmative)
bacterial outer membrane ----- Certainty = 0.365 (Affirmative)
bacterial inner membrane ----- Certainty = 0.000 (Not Clear)
bacterial cytoplasm ----- Certainty = 0.000 (Not Clear)

Hydrophobicity

Hydrophobicity profile of the total amino acids of *P. aeruginosa* 1001 esterase was generated according to the method of Kyte & Dolittle in EXPASY ProtScale program with a window size 9. The scale in the Figure 4.15 indicates the degree of hydrophobicity. This indicated that the enzyme is hydrophobic and it was proved correct which will be discussed in a later section.

The individual values for the 20 amino acids were given below.

Ala: 1.800 Arg: -4.500 Asn: -3.500 Asp: -3.500 Cys: 2.500 Gln: -3.500
Glu: -3.500 Gly: -0.400 His: -3.200 Ile: 4.500 Leu: 3.800 Lys: -3.900
Met: 1.900 Phe: 2.800 Pro: -1.600 Ser: -0.800 Thr: -0.700 Trp: -0.900
Tyr: -1.300 Val: 4.200 Asx: -3.500 Glx: -3.500 Xaa: -0.490

Prediction of the presence of signal peptides in *estA*:

The SignalP World Wide Web server predicts the presence and location of signal peptide cleavage sites in amino acid sequences. The method incorporates a prediction of cleavage sites and a signal peptide/non-signal peptide prediction based on a combination of several artificial neural networks. The extracellular secretion of the esterase is due to the so called general secretory pathway (GSP) found to be conserved in many gram-negative bacteria (Lory 1992, Pugsley, 1993, Salmond and Reeves 1993). Proteins that utilize the GSP are synthesized as precursors with an N-terminal extension called the leader peptide.

Translocation of proteins across the inner and outer membranes by the GSP occurs as two separate events, with transient accumulation of the protein in the periplasm. At each step of the GSP, successful membrane translocation depends on interactions between determinants of the secreted protein (intragenic factors) and components of the bacterial secretion machinery (extragenic factors). The final leg of the GSP (translocation across the outer membrane) appears to require specific interactions of intragenic factors within the mature protein with components of the outer membrane translocation machinery. One of the factor responsible may be the presence of the signal peptide. It has been predicted that most likely the cleavage site is present between 28 and 29 amino acids of *estA* gene (Serine and Valine) (Table 20).

Conclusions

- Lactose induction was observed to be the best mode of induction rather than IPTG induction suggesting that it is toxic to the cell.
- 1% lactose was observed to be optimum for induction
- The plasmid was observed to be very stable with lactose induction than the IPTG.
- Due to the toxicity of the IPTG less amount of soluble protein was obtained.
- Plasmid stability was always maintained above 95% uptill 9 h after induction with lactose.
- Maximum activity was detected in M9ZB medium after 9 h of induction.
- Whole cell activity decreased after 5 h of cultivation.
- The sonicated pellet (insoluble form) was supposed to have high activity than the lysate (soluble form)
- Even though the protein was in insoluble form higher activity was detected than the soluble form
- The protein was observed to be membrane bound and hydrophobic.
- Triton X100 a non-ionic detergent used to solubilize the membrane bound proteins was used successfully to solubilize them.

- 80% of the protein was solubilized by using Triton X100.
- It was observed from the SDS-PAGE that in the case of M9ZB medium a few other proteins were also expressed along with the protein of our interest.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

목 표	달성도 (%)	내 용
균주의 스크리닝 및 개량	100	1. 국내 및 인도의 토양에서 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 생물전환 균주 선발 2. 재조합 대장균의 개발
효소 생산	90	· Fusion protein expression 벡터를 이용한 효소의 대량 발현 시스템 개발
(R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid 의 효소 전환 공정 개발	100	· 대량 발현된 효소에 의한 (R,S)-ester의 최적 전환 조건 확립
Ciral 분리 공정 개발	90	· 생성된 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid의 분리 조건 확립

제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도

본 연구에서 개발된 (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid를 생산 재조합 효소 기술과 광학활성중간체의 분리기술을 응용하여 타 광학활성물질의 생산과 개발이 가능하며, 국내의 제약업체가 전적으로 수입에 의존하고 있는 광학활성물질의 제조에도 응용이 가능하다. Captopril 등의 ACE계 저해제를 생산하고 있는 국내 제약업체가 필요로하는 중간체의 수입대체가 가능하며, esterase 뿐만 아니라 lipase, chloroperoxidase 등의 선택적 광학활성형을 생산하는 효소를 생산 보유함으로써 국내 기초제약 산업의 경쟁력을 증대시킬 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

Pseudomonas sp. 유래의 광학활성체 생산 효소뿐만 아니라 *Bacillus* sp. 유래 유전자의 재조합 생산에 관한 연구가 행해져야 하며, 효소의 세포내 생산에는 한계가 있기 때문에 세포외로 효소를 생산 분비하는 발현시스템의 개발이 이루어져야 한다. 이를 위하여, 대장균을 숙주로 하는 발현시스템의 개발과 함께 효모 및 *Bacillus* sp. 균주를 숙주로 효소 발현후 분비시스템의 개발이 필요하다.

제 2 절 타 연구에의 응용

현재까지 국내에서 보고된 광학활성체와 관련된 효소에 관한 연구는 기존의 효소제를 사용하여 광학활성체의 분리에 사용하는데 중점이 되어 왔다. 이에 반하여 본 연구에서는 광학활성의약품 생산을 목적으로 미생물로부터 효소를 코우딩하는 유전자를 분리하여 재조합 효소를 생산하여 광학활성의약품을 생산하는 것을 목적으로 하고 있어, 광학활성물질의 생산 효소를 선발, 재조합, 생산하는 최초의 연구이다. 따라서, 본 연구 결과는 현재까지 연구된 다른 광학활성체 생산 효소의 생산에도 이용할 수 있고, 또한, 대장균을 이용한 재조합 효소생산기술을 더욱 정밀한 효소의 생산에도 응용할 수 있게 되었다.

제 3 절 기업화 추진방안

본 연구를 통하여 얻은 특허는 생명공학연구소 미생물공정연구실을 주축으로 창업한 벤처기업인 (주)바이오홀딩스와 기술실시계약을 체결하여 산업화를 추진 할 계획이며 본 연구에서 개발된 재조합 효소 및 RAM 생산기술은 인도에 이전하여 인도에서 RAM 생산을 시도할 계획에 있다.

제 6 장 참고문헌

1. Sakimae, A., Numazawa, R., and Ohnishi, H.: A newly isolated microorganism producing D--acetylthioisobutyric acid from methyl DL--acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1341-1341 (1992).
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.: *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989).
3. Sakimae, A., Hosoi, A., Kobayashi, E., Ohsuga, N., Numazawa, R., Watanabe, I., and Ohnishi, H.: Screening of microorganisms producing D--acetylthioisobutyric acid from methyl DL--acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1252-1256 (1992).
4. Holmes, D. S. and Quigley, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197 (1981).
5. Cohen, S.N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L.: *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria ; Genetic transformation of E. coli by R- factor DNA.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 9, 2110-2114 (1979).
6. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
7. Patel RN, Amit B, Laszlo JS (1995) Synthesis of four chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *JAOCS* 72: 1247-1264
8. Chen C-S, Fujimoto Y, Shi CJ (1981) Biofunctional chiral synthons via microbiological methods. 1. optically active 2,4-dimethylglutaric acid monomethyl esters. *J Am Chem Soc* 103: 3580-3582

9. Iriuchijima S, Keiyu A (1981) Asymmetric hydrolysis of (\pm)-substituted carboxylic acid esters with microorganisms. *Agric Biol Chem* 45: 1389-1392
10. Patel RN, Amit B, Laszlo JS (1996) *JAOCS* 73: 1363-1375
11. Akihiro S, Eiji O, Hiroko T, Naoto O, Ryozi N, Itsumi M, Eiichi H, Hisao O (1993) Process conditions for production of D--acetylthioisobutyric acid from methyl DL--acetylthioisobutyrate with the cells of *Pseudomonas putida* MR-2068. *Biosci Biotech Biochem* 57 : 782-786
12. Sakimae, A., Kobayashi, Y., Ohsuga, N., Numazawa, R., and Ohnishi, H.: Chemical racemization of methyl L--acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 17-19 (1993).
13. Ozaki, E., Sakimae, A., and Numazawa, R.: Cloning and expression of *Pseudomonas putida* esterase gene in *Escherichia coli* and its use in enzymatic production of D--acetylthioisobutyric acid. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1745-1746 (1994).
14. Ozaki, E., Sakimae, A., and Numazawa, R.: Nucleotide sequence of the gene for a thermostable esterases from *Pseudomonas putida* MR-2068. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1204-1207 (1995).
15. Lory S (1992) Determinants of extracellular protein excretion by gram-negative bacteria : *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *J Bacteriol* 156: 695-702
16. Pugsley A (1989) Protein targeting, Academic Press, San Diego.
17. Pugsley A (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57 : 50-108

18. Salmond GPC and Reeves PJ (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. *Trends in Biochem Sci* 18 : 7-12
19. Pugsley AP, dEnfert I, Reyss I, Kornacker MG (1990) Genetics of extracellular protein secretion by gram-negative bacteria. *Annu Rev Genet* 24 : 67-90
20. Catherine SM, Abdul NH (1995) Toxin A secretion in *Pseudomonas aeruginosa* : the role of the first 30 amino acids of the mature toxin. *Mol Gen Genet* 249 : 515-525
21. Alain F, Gérard M, Marc B (1998) GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria : the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews* 22 : 177-198
22. Ikura Y (1986) Effect of glycine and its derivatives on production and release of -galactosidase by *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem* 50 : 2747-2753
23. Zhang Q, Tsukagoshi N, Miyashiro S, Udaka S (1983) Increased production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine. *Appl Environ Microbiol* 46 : 293-295
24. Aristos AA, Peng Y, San KY (1993) Effects of glycine supplement of protein production and release in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Letters* 15: 331-336
25. Best GR, Britz ML (1986) Facilitated protoplasting in certain auxotrophic mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23 : 288-293
26. Wolf H, Pühler A, Neumann E (1989) Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 30 : 283-289

27. Sydney, B.: The molecular evolution of genes and proteins : a tale of two serine. *Nature* 334, 528-530 (1988).
28. Shimada, Y., Nagao, T., Sugihara, A., Iizumi, T., Yui, T., Nakamura, K., Fukase, T., and Tominaga, Y.: Cloning and sequence analysis of an esterase gene from *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1774, 79-82 (1993).
29. Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., and Menge, U.: A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, 767-770 (1990).
30. Nordlund, I. and Shingler, V.: Nucleotide sequences of the meta-cleavage pathway enzymes 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase and 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* CF600. *Biochim. Biophys. Acta*. 1049, 227-230 (1990).
31. Hayase, N., Taira, K., and Furukawa, K.: A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *J. Bacteriol.* 172, 1160-1164 (1990).
32. Horn, J. M., Harayama, S., and Timmis, K. N.: DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) xylGFJ genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism. *Mol. Microbiol.* 5, 2459-2474 (1991).
33. Kanaya, S., Koyanagi, T., and Kanaya, E.: An esterase from *Escherichia coli* with a sequence similarity to hormone-sensitive lipase. *Biochem. J.* 332, 75-80 (1998).
34. Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shneidling, S., Singer, B. S., and Stormo, G.:

- Translational initiation in prokaryotes. *Annual Review of Microbiology* 35, 365-403 (1981).
35. Deretic, V., Gill, J. F., and Chakrabarty, A. M.: Alginate biosynthesis : a model system for gene regulation and function in *Pseudomonas*. *Biotechnology* 5, 469-477 (1987).
 36. Stormo, G.D., Schneider, T. D., and Gold, L. M.: Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucl. Acids Res.* 10, 2971-2996 (1982).
 37. Khalameyzer, V., Fischer, I., Bornscheuer, U. T., and Altenbuchner, J.: Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 477-482 (1999).
 38. Goto Y, Ichimura N, Hamaguchi K (1988) Effects of ammonium sulfate on the unfolding and refolding of the variable and constant fragments of an immunoglobulin light chain. *Biochemistry* 27: 1670-1677.
 39. Maeda Y, Yamada H, Ueda T, Imoto T (1996) Effect of additives on the renaturation of reduced lysozyme in the presence of 4M urea. *Protein Eng.* 9: 461-465.
 40. Eliana De BC (1998) Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 157-163.
 41. Sunita K, Chung BH, Jang KH, Song KB, Kim CH, Rhee SK (2000) Refolding and purification of *Zymomonas mobilis* levansucrase produced as inclusion body in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr. Pur.* 18: 388-393.