



D-β-Acetylthioisobutyric acid 생산을 위한 내열성 광학선택적 esterase 활성 *Klebsiella pneumoniae*의 분리

정용준* 

전주대학교 의과대학학 바이오기능성식품학과

A newly isolated *Klebsiella pneumoniae* producing a thermostable stereo-selective esterase for production of D-β-acetylthioisobutyric acid

Yong-Joon Chung* 

Department of Functional Food and Biotechnology, School of Medical Science, Jeonju University, Jeonju 55069, Republic of Korea

(Received May 23, 2019; Revised June 3, 2019; Accepted June 4, 2019)

The synthesis of captopril as an important chiral drug in commerce needs expensive resolution process of racemic mixture. Microorganisms, producing a thermostable esterase that catalyzes the stereo-selective hydrolysis of methyl DL-β-acetylthioisobutyrate (DL-ester) to D-β-acetylthioisobutyric acid (DAT) were screened from soils. Among the strains tested, strain No CJ-317 and strain No CJ-187 with highest activity were selected as the best DAT producer. The newly isolated microorganisms were identified respectively, as *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas putida*. The cell activity of esterase from *K. pneumoniae* CJ-317 and *P. putida* CJ-187 were showed an optimal reaction activity at 75°C and 60°C, respectively. Also the cell activity of *K. pneumoniae* CJ-317 was stable up to 80°C for 1 h, while that of *P. putida* CJ-187 was not over 60°C. By varying the concentration of DAT in the reaction mixture, the cell activity of *P. putida* CJ-187 showed about 55% and 80% of product inhibition in the presence of 2.5% (w/v) and 5.0% of DAT respectively. *K. pneumoniae* CJ-317 had less product inhibition than *P. putida* CJ-187 by about 35% and 44% at the same concentrations respectively. The esterase of newly isolated *K. pneumoniae* CJ-317 could be useful for the stereo-selective hydrolysis of DL-ester to DAT.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, D-β-acetylthioisobutyric acid (DAT), esterase, stereo-selective, thermostable

현재 50% 이상의 의약품이 광학 활성을 지닌 키랄 화합물(chiral compounds)로 알려져 있으며 화학합성에 의해 제조된 합성물은 두 가지 enantiomer 형태가 혼합된 라세믹체(racemic mixture)로 존재하고 그 중 하나의 enantiomer만이 활성을 가지는 경우가 많다(Cushman *et al.*, 1977; Shimazaki *et al.*, 1982). 따라서 광학 순수 이성체인 중간체를 제조 원료로 사용하는 제조기술개발이 필요하며 이를 통해 고수율로 광학활성을 지닌 의약품 제조가 가능하게 된다. 제조과정의 중간체로서 광학활성 카복신(optically active α-alkylcarboxylic acids)이 다양한 약물합성의 출발물질로 많이 사용되고 있다(Cohen *et al.*, 1976; Shimazaki *et al.*, 1982; Chirumamilla *et al.*, 2001). 대표적인 예로 angiotensin converting enzyme (ACE) 저해제로 작용하는 captopril은 고혈압, 울혈성심부전, 신장에 환자, 당뇨병성 신증 등에 사용하는 약물로 알려져 있는데(Ondetti, 1977; Ondetti and Cushman, 1981) 광학 순수이성체 captopril 중간체로는 D-β-acetylthioisobutyric acid (DAT)와 D-β-hydroxyisobutyric acid (D-HIBA)가 있는데 제조방법으로는 isobutyric acid (IBA) 또는 methacrylic acid (MA)를 기질로 미생물발효를 통해 광

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

학선택적으로 β -hydroxylation하여 제조할 수가 있다(Hasegawa *et al.*, 1981; Sakimae *et al.*, 1993a). DAT제조방법으로는 첫째, 합성에 의해 racemic mixture인 methyl DL- β -acetylthioisobutyrate (DL-ester)를 제조한 후 광학분할제를 사용하여 분할하는 방법과 둘째, 발효에 의해 제조된 D-HIBA를 원료로 화학합성방법으로 DAT를 제조하는 방법, 그리고 셋째, 라세믹체인 DL-ester를 미생물의 특수한 esterase로 광학선택적으로 탈에스터화하여 제조하는 방법 등이 있다(Hasegawa *et al.*, 1981; Sakimae *et al.*, 1993a, 1993b; Romano *et al.*, 2015). 첫째 방법은 고가의 광학분할제가 다량 소요되며 수율이 낮아 비경제적이고 둘째 방법도 D-HIBA에서 화학 합성하는 단계가 길고 환경오염을 유발하는 고가의 원료가 소요되어 비경제적이다. 따라서 합성에 의해 DL-ester를 만든 후 미생물의 esterase로 광학선택적으로 D-형의 ester만을 가수분해하여 DAT를 만들고 미반응된 L-ester는 화학적으로 racemization하여 다시 DL-ester로 만든 후 DAT의 제조 원료로 사용하는 셋째 방법이 효율적이다 (Fig. 1). 이와 같은 DL-ester의 광학선택적 esterase 분해활성을 가지는 미생물로는 주로 *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* 등의 *Pseudomonas*속과 *Acinetobacter calcoaceticus* 등이 현재까지 보고되었으며(Sakimae *et al.*, 1992a, 1992b; Gokul *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2006) 아직까지 이외의 다른 속의 미생물에서는 보고된 바가 없다. 또한 이들 중 몇몇 esterase 유전자는 cloning되어 염기서열이 밝혀졌고(Ozaki *et al.*, 1994, 1995; Lee *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2006) 특히 미쓰비시 레이온사의 Sakimae 등이 분리한 *P. putida* MR-2068의 경우, esterase 활성이 *Escherichia coli*에서 고발현된 재조합체의 제조에 이미 성공한 바 있다(Ozaki *et al.*, 1994, 1995). 산업적인 측면에서 일반적으로 효소의 높은 열안정성은 반응시간을 연장시켜 효소의 성능을 극대화할 수 있으며 고온생산조건에서도 효율적으로 작용하도록 하여 반응속도의 증가뿐만 아니라 고온환경에서 다른 미생물에 의한 오염을 감소시킬 수 있으므로 경제성과 효율성을 증대시킬 수 있다.

따라서 본 연구에서는 captopril 합성의 중간체인 DAT를 효율적으로 제조하기 위한 목적으로 내열성이 우수한 광학선

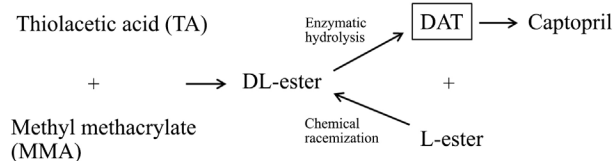


Fig. 1. Enzymatic resolution of D- β -acetylthioisobutyric acid (DAT) from DL- β -acetylthioisobutyrate (DL-ester) for synthesis of captopril.

택적 esterase 활성을 갖는 우수한 신규 미생물을 탐색하고 효소 활성적 특성을 연구하였다.

효소활성의 기질로 사용할 DL-ester를 제조하기 위해 400 g의 methylmethacrylate (MMA, Mitsubishi Rayon Co., Ltd.)에 286 g의 thiolacetic acid (TA, Toyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)를 가하고 8시간 동안 환류 반응한 후 감압 증류(85~89°C/2 mmHg)하여 535.71 g의 순수한 DL-ester를 얻었다(Hasegawa *et al.*, 1981). 기체크로마토그래피(Gas Chromatography, Perkin-Elmer Sigma 3B) 분석을 통해 면적백분율로 99%의 DL-ester를 얻었으며, 비선광도는 $[\alpha]_D^{25} = -0.09$ ($c = 2$, CHCl_3)이었다. 비선광도의 측정에는 digital polarimeter (JASCO DIP-370)가 사용되었으며 기체크로마토그래피의 분석 조건은 다음과 같다. Oven의 온도는 190°C isotherm, injector의 온도는 200°C이었으며 사용한 flow gas는 N_2 , 50 ml/min, 검출기는 Flame Ionization Detector (FID)를 사용하였으며 column은 FAL-M 12%/ Shimalite (AW-DMCS) / 80~100 mesh, 2 mm \times 180 cm을 사용하였다.

활성 균주를 분리하기 위해 전국의 토양으로부터 채취한 시료를 0.85% (w/v) 생리식염수로 현탁·희석한 후 평판희석배양법에 의하여 nutrient agar 배지(0.3% beef extract, 0.5% bacto peptone, 1.5% agar)에 도말하고 30°C에서 24~48시간 배양하여 형태, 색깔 등 외관상 상이한 단일 균락을 분리하였다. 분리 균주는 nutrient agar 사면배지에 보관하면서 시험하고자 하는 분리 균주를 10 ml의 0.05 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 0.01 g bromocresol purple과 각각 D-ester와 L-ester를 0.01 g씩 넣은 D-ester 용액과 L-ester 용액 각각의 0.2 ml에 한 백금이씩 접종하고 30°C, 2시간 동안 진탕하였다. D-ester 반응액은 노란색으로 L-ester 반응액은 푸른색 그대로 있는 균주를 선별하였다. 반응하고 난 D-ester 반응액과 L-ester 반응액을 각각 산성화한 후 ethyl acetate로 추출하고 GC 분석을 통해 D-ester 반응액에서만 DAT를 생성한 균주를 선별하였다. 200여 주의 토양 균주를 탐색한 결과, 그 중 효소활성이 가장 높은 CJ-317과 CJ-187 두 균주를 최종 활성 균주로 선발하였다. 두 균주의 형태학적 특징과 API 20E kit (bioMérieux)를 사용하여 생리적 및 생화학적 특성을 분석하고 동정한 결과(Table 1), CJ-317균주와 CJ-187균주는 각각 *Klebsiella pneumoniae*와 *Pseudomonas putida*로 동정되었으며 CJ-317균주의 16S rRNA 염기서열을 비교 분석한 결과, 계통분류학적으로 *Klebsiella pneumoniae*와 매우 높은 유사성을 나타내었다(Fig. 2).

활성 균주의 효소활성과 내열성을 조사하기 위해 효소활성 측정은 nutrient배지(pH 7.2) 100 ml에 균주를 접종하여 30°C에서 1일간 진탕배양한 배양액을 원심 분리하여 균체를 진탕

Table 1. Morphological and physiological characteristics of isolates

Characteristics	Strain CJ-317	Strain CJ-187
Morphological character		
Shape	straight rod	coccobacilli
Gram stain	-	-
Motility	-	+
Physiological character		
β-Galactosidase	+	-
Arginine dihydrolase	-	+
Lysine decarboxylase	+	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Citrate utilization	+	+
H ₂ S production	-	-
Urease	+	-
Tryptophan deaminase	-	-
Indole production	-	-
Acetoin production	+	-
Gelatinase	-	-
Cytochrome-oxidase	-	+
Fermentation/oxidation		
Glucose	+	+
Mannitol	+	-
Inositol	+	-
Sorbitol	+	-
Rhamnose	+	-
Sucrose	+	-
Melibiose	+	+
Amygdalin	+	-
Arabinose	+	-

회수한 후 95 ml의 0.05 M 인산완충액(pH 7.0)에 현탁하고 5 g DL-ester을 가하여 전체용액이 100 ml가 되도록 한 후, 30°C 1시간동안 반응하며 0.1 N NaOH로 pH 7.0을 유지하도록 자동 조절하여 반응 후 소모된 0.1 N-NaOH양을 측정하였다. 이때 효소활성 unit (1U)는 생성된 DAT를 중화하기 위하여 30°C, pH 7.0에서 1시간 동안에 1/162.21 mmol의 NaOH가 소모되는 단위로 정의하였다(Sakimae *et al.*, 1993b). 분리 균주가 생산하는 광학 선택적 esterase의 내열성을 측정하기 위해서는 0.05 M 인산완충액에 균체를 현탁하고 각 온도에서 1시간 반응시킨 후 잔존 활성을 측정하였다. 최종산물인 DAT의 제조 조건과 DL-ester의 가수분해율을 검토하기 위해 100 ml 배양액을 원심 분리하여 균체를 전량 회수한 후 190 ml의 0.05 M 인산완충액(pH 7.0)에 현탁한 후 10 g의 DL-ester를 가하여 최종 200 ml로 만든 후 30°C에서 24시간 반응을 진행하였다. 이때 0.511 N NaOH의 첨가로 pH 7.0을 유지하는데 소모된 0.511 N NaOH용액의 양을 측정하여 가수분해율을 결정하였다. 반응액은 한외여과장치(Amicon TCF-10, YM-10 membrane)를 사용하여 한외여과를 실시하였으며 그 결과 얻어진 여액을 용매인 ethyl acetate로 추출하여 미반응된 DL-ester를 얻었다. 남은 수층을 10 N 황산으로 pH 2.0으로 조절하여 다시 ethyl acetate로 추출한 후 미생물의 탈에스터 작용으로 생성된 DAT를 얻었다. Ethyl acetate 추출액을 무수황산 나트륨으로 건조한 후 용매를 감압 하에서 증류 제거하여 DAT 및 L-ester를 각각 제조하였으며 이때 가수분해율은 50% 이었고 DAT와 L-ester의 비선광도 $[\alpha]_D^{25}$ 는 각각 -56.58 (c = 2.1578, CHCl₃)와 +55.26 (c = 2.0628, CHCl₃)로 광학활성 카본산 및 그 거울상 이성체 에스테르가 생성됨을 확인하였다.

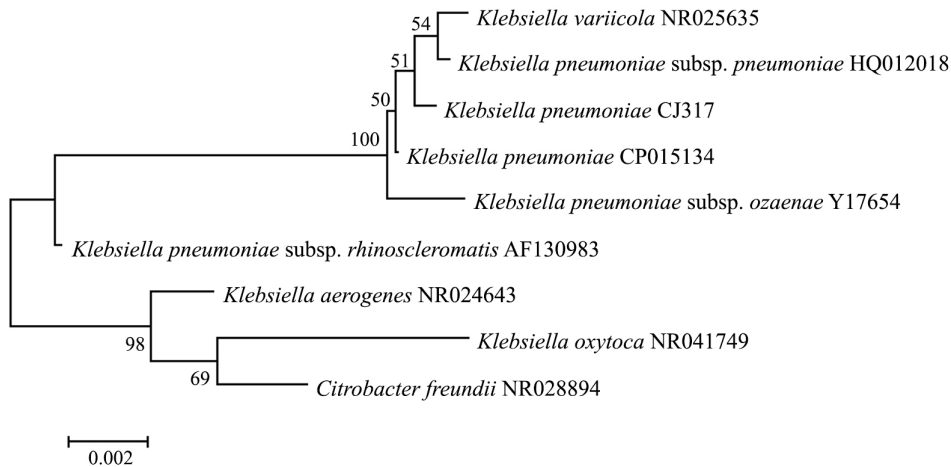


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of *Klebsiella pneumoniae* CJ-317. The tree was constructed using the neighbor-joining analysis of a distance matrix obtained from a multiple-sequence alignment. Bootstrap values (expressed as percentages of the value for 1,000 replications) are shown at branch points.

분리 균주가 생산하는 esterase의 열 안정성은 Fig. 3과 같이 *P. putida* CJ-187는 70°C까지 활성을 유지하는 반면, *K. pneumoniae* CJ-317의 탈에스테르 활성은 80°C에서도 90% 이상의 잔존활성을 유지하는 내열성효소임을 확인할 수 있었다. 또한 반응의 최적 온도를 측정하기 위해 온도를 달리하며 역가를 측정 한 결과, *P. putida* CJ-187는 60°C에서 최적 활성을 보였으나 *K. pneumoniae* CJ-317은 70~80°C에서 반응의 최적 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이미 Sakimae 등(1993b)이 보고한 *P. putida* MR-2068의 경우, 70°C에서 반응 최적활성과 60°C까지 비교적 우수한 내열성을 보여주었고 Gokul 등(2000)이 보고한 *P. aeruginosa*의 경우, 70°C까지 열안정성을 유지한다고 보고되었는데 이에 비하여 *K. pneumoniae* CJ-317의 esterase는 *P. putida* MR-2068에 비해 보다 내열성이 우수하였고 따라서 더 효과적인 광학선택적 탈에스테르 촉매반응에 적합한 내열성 효소로 판단되었다. 분리한 두 균주가 각각 *Klebsiella*속과

*Pseudomonas*속에 속하는 것으로 동정되어 동일 속에 속하는 다양한 종의 균주들의 esterase 활성과 내열성을 비교해 보았다. *Klebsiella*속으로서 *K. oxytoca* ATCC8724와 *K. planticola* ATCC15050의 보존된 표준 균주와 *Pseudomonas*속으로서 Sakimae 등(1992b)에 의해 이미 보고된 *P. fluorescens* IFO3081와 본 연구에서 분리한 *K. pneumoniae* CJ-317과 *P. putida* CJ-187의 esterase 내열성을 각각 비교 측정하였다. 그 결과, Table 2와 같이 *Pseudomonas*속에 속한 미생물들은 상대적으로 *Klebsiella*속보다 내열성이 낮았다. 특히 *P. fluorescens* IFO3081은 매우 열 안정성이 낮았고 본 연구에서 분리한 *P. putida* CJ-187도 60°C까지 잔존활성을 보였으나 *K. planticola* ATCC15050를 제외한 다른 *Klebsiella*속 균주에 비해서는 상대적으로 낮았다. 동일한 *Klebsiella*속에 속하는 *K. oxytoca* ATCC8724의 경우, 분리 균주 *K. pneumoniae* CJ-317에 비해 DAT 제조 활성은 상대적으로 낮았으나 분리 균주와 효소의

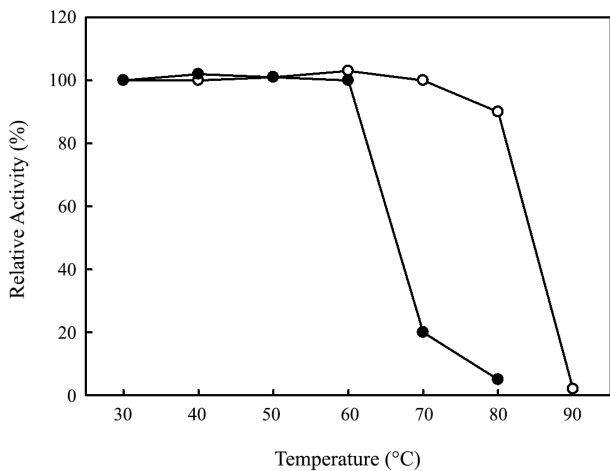


Fig. 3. Residual esterase activity of the *K. pneumoniae* CJ-317 (○) and *P. putida* CJ-187 (●). The reactions were pre-incubated at the indicated temperature for 1 h and then carried out at 30°C under the standard assay condition.

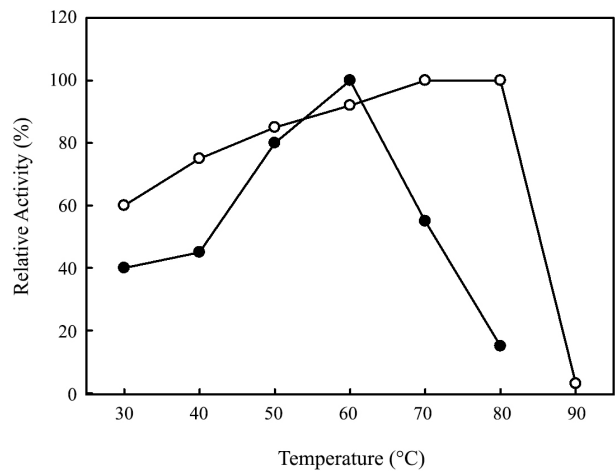


Fig. 4. Effects of reaction temperature on the esterase activity of *K. pneumoniae* CJ-317 (○) and *P. putida* CJ-187 (●). The reactions were carried out at the indicated temperature for 1 h under the standard assay condition.

Table 2. Thermostability of esterases by various strains

Temperature (°C)	Residual esterase activity (%)				
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CJ-317 ^a	<i>Pseudomonas putida</i> CJ-187 ^a	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC8724 ^b	<i>Klebsiella planticola</i> ATCC15050 ^b	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO3081 ^c
30	100	100	100	100	100
40	100	100	100	100	100
50	100	100	100	82	90
60	100	100	100	55	47
70	100	23	100	5	10
80	90	5	89	0	0

Sourced by ^athis study, ^bAmerican Type Culture Collection and ^cInstitute for Fermentation (Sakimae *et al.*, 1992b).

내열성 면에서는 유사한 안정성을 가진 것으로 나타났다.

효소 반응 후 최종 산물로 생성되는 DAT에 의한 산물저해 (product inhibition) 현상을 조사하기 위해 DAT의 농도가 esterase 활성의 저해에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 배양된 균주를 95 ml의 0.05 M 인산완충액(pH 7.0)에 현탁한 후, 기질 DL-ester를 5%되게 첨가한 후 그 반응액에 추가로 최종 산물인 DAT를 0에서 5%까지 농도 별로 첨가하여 각각의 활성을 측정함으로써 산물에 의한 효소반응의 저해 정도를 측정하였다. 그 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 *K. pneumoniae* CJ-317의 효소의 경우, 효소의 활성이 최종산물인 DAT 농도의 증가에 따라 서서히 저해되었으나 2.5%의 DAT 농도에서 35% 정도의 저해활성을 보였고 5%의 DAT 농도에서도 44% 정도의 저해활성을 보였다. 이에 반해 *P. putida* CJ-187의 경우, DAT 농도의 증가에 따라 급격한 활성의 저해를 보였으며 2.5%의 DAT가 존재하였을 때 55% 그리고 5%의 경우, 거의 80%의 저해 정도를 나타내었다. 이는 2.5%의 DAT의 농도에서 50%의 저해현상을 보인 Sakimae 등(1993b)의 이미 보고된 *P. putida* MR-2068 esterase의 결과와도 매우 유사한 결과이다. 따라서 *K. pneumoniae* CJ-317의 효소는 내열성이며 최종 산물인 DAT 농도증가에 대한 저해도도 비교적 낮아 우수한 장점을 가진 광학선택적 esterase임을 확인할 수 있었다.

따라서 *Klebsiella*속으로서 DAT 제조활성을 가진 esterase는 아직까지 보고된 바가 없으므로 본 연구를 통하여 새롭게 분리된 *K. pneumoniae* CJ-317 균주는 신규 활성 균주로 판단되고 지금까지 보고된 몇몇 *Pseudomonas*속과 *Acinetobacter*

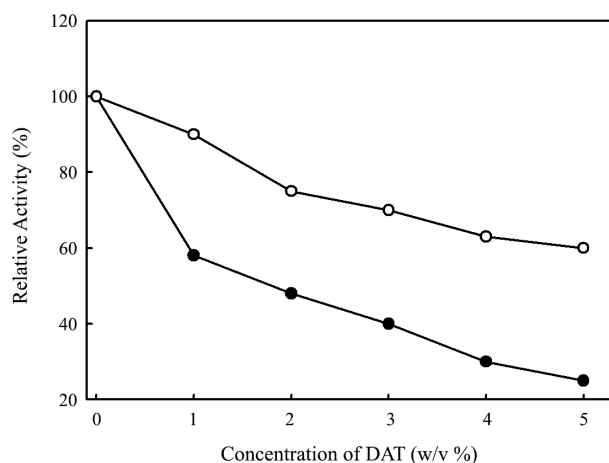


Fig. 5. Effects of the concentration of D-β-acetylthioisobutyric acid (DAT) on the esterase activity of *K. pneumoniae* CJ-317 (○) and *P. putida* CJ-187 (●). The reactions were carried out at 30°C for 1 h under the standard assay condition by varying the concentration of DAT in the reaction mixture.

속의 esterase보다도 내열성과 효율성에서 우수한 장점을 지닌 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 본 연구는 captopril의 중간체로 사용할 수 있는 순수광학이성체인 DAT 제조기술의 토대로 활용될 수 있으며 특별히 *K. pneumoniae*의 산업적 이용에 있어서도 잠재적 병원성 균주로 분류됨에도 불구하고 균주 자체의 우수한 특성을 이용한 연구로서 기초가 되어 앞으로 고발현 대장균 재조합 균주의 제조 등의 방법을 통한 잠재적 문제들을 해결함으로써 최근 제약 산업에서 관심의 초점이 되는 광학 순수 이성체 의약품 개발에 필요한 발효 및 생물전환기술을 통한 광학활성물질개발 및 기술발전이 크게 기여할 것으로 기대된다.

적 요

라세믹체 형태의 전구물질 methyl DL-β-acetylthioisobutyrate (DL-ester)로부터 captopril 합성과정의 중간물질로 알려져 있는 D-β-acetylthioisobutyric acid (DAT)를 효율적으로 제조하기 위해 광학선택적 esterase활성을 가진 신규 미생물을 탐색하였고 활성이 우수한 균주 CJ-317과 균주 CJ-187을 선별하고 동정한 결과, 각각 *Klebsiella pneumoniae*와 *Pseudomonas putida*로 동정하였다. 두 균주가 생산하는 esterase의 최적 반응온도와 내열성을 조사한 결과, *P. putida* CJ-187와 *K. pneumoniae* CJ-317의 최적활성은 각각 60°C와 75°C이었으며 또한 *P. putida* CJ-187의 경우, 60°C까지 안정한 반면 *K. pneumoniae* CJ-317은 80°C에서도 1시간 동안 안정된 내열성 효소의 특성을 보였다. DAT에 의한 최종 산물의 활성 저해도에 있어서도 *P. putida* CJ-187은 2.5%와 5%의 DAT에 대해 각각 55%와 80%의 저해활성을 보인 반면 *K. pneumoniae* CJ-317은 각각 35%와 44%의 낮은 저해활성을 보임으로서 *K. pneumoniae* CJ-317은 captopril 합성의 중간체인 DAT 제조과정에 유용하게 활용할 수 있는 우수한 내열성 광학선택적 esterase 활성을 가지는 신규 균주임을 확인하였다.

References

- Chirumamilla RR, Marchant R, and Nigam P. 2001. Captopril and its synthesis from chiral intermediates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 123-127.
- Cohen N, Eichel WF, Lopresti RJ, Neucom C, and Saucy G. 1976. Synthetic studies on (2R, 4'R, 8'R)-α-tocopherol, an approach utilizing side chain synthons of microbiological origin. *J. Org. Chem.* 41, 3505-3511.

- Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, and Ondetti MA.** 1977. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme: carboxy alkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acid. *Biochemistry* **16**, 5484–5491.
- Gokul B, Lee JH, Song KB, Panda T, Rhee SK, and Kim CH.** 2000. Screening of microorganisms producing esterase for the production of (R)- β -Acetylmercaptoisobutyric acid from methyl (R,S)- β -acetylmercaptoisobutyrate. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 57–60.
- Hasegawa J, Ogura M, Kanema H, Kawaharada H, and Watanabe K.** 1981. Stereoselective conversion of isobutyric acid to β -hydroxyisobutyric acid by microorganism. *J. Ferment. Technol.* **59**, 203–208.
- Honda K, Kataoka M, and Shimizu S.** 2002. Enzymatic preparation of D- β -acetylthioisobutyric acid and cetraxate hydrochloride using a stereo- and/or regioselective hydrolase, 3,4-dihydrocoumarin hydrolase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 288–292.
- Lee JH, Gokul B, Song KB, Rhee SK, and Kim CH.** 2000. Cloning and sequence analysis of the *estA* gene encoding enzyme for producing (R)- β -acetylmercaptoisobutyric acid from *Pseudomonas aeruginosa* 1001. *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 684–687.
- Ondetti MA and Cushman J.** 1981. Inhibition of renin-angiotensin system. A new approach to the theory of hypertension. *J. Med. Chem.* **24**, 355–361.
- Ondetti MA, Rubin B, and Cushman DW.** 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* **196**, 441–444.
- Ozaki E, Sakimae A, and Numazawa R.** 1994. Cloning and expression of *Pseudomonas putida* gene in *Escherichia coli* and its use in enzymatic production of D- β -acetylthioisobutyric acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1745–1776.
- Ozaki E, Sakimae A, and Numazawa R.** 1995. Nucleotide sequence of the gene for a thermostable esterase from *Pseudomonas putida* MR-2068. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1204–1207.
- Romano D, Bonomi F, Mattos MC, Fonseca TS, Oliveira MCF, and Molinari F.** 2015. Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnol. Adv.* **33**, 547–565.
- Sakimae A, Hosoi A, Kobayashi YH, Ousuga N, Numazawa R, Watanabe I, and Ohnishi H.** 1992a. Screening of microorganisms producing D- β -acetylthioisobutyric acid from methyl D,L- β -acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1252–1256.
- Sakimae A, Kobayashi Y, Ousuga N, Numazawa R, and Ohnishi H.** 1993a. Chemical racemization of methyl L- β -acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 17–19.
- Sakimae A, Numazawa R, and Ohnishi H.** 1992b. A newly isolated microorganism producing D- β -acetylthioisobutyric acid from methyl D,L- β -acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1341.
- Sakimae A, Ozaki E, Toyama H, Ousuga N, Numazawa R, Muraoka I, Hamada E, and Ohnishi H.** 1993b. Process conditions for production of D- β -acetylthioisobutyric acid from methyl D,L- β -acetylthioisobutyrate with the cells of *Pseudomonas putida* MR-2068. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 782–786.
- Shimazaki M, Hasegawa J, Kan K, Nomura K, Nose Y, Kondo H, Ohashi T, and Watanabe K.** 1982. Synthesis of captopril starting from an optically active β -hydroxy acid. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 3139–3146.
- Shaw SY, Chen YJ, Ou JJ, and Ho L.** 2006. Enzymatic resolution of methyl DL- β -acetylthioisobutyrate and DL- β -acetylthioisobutyramide using a stereoselective esterase from *Pseudomonas putida* IFO12996. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **38**, 163–170.