

최 종
연구보고서

β -galactosidase의 생산효율화 및 내열성
증진에 의한 한국인의 유당소화장애해결 전략

A Strategy to Solve Lactose Intolerance by Thermostable β -galactosidase

연구기관
한국방송통신대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 " β -galactosidase의 생산효율화 및 내열성 증진에 의한 한국인의 유당소화장애해결 전략에 관한 연구" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 10 월 일

주관연구기관명 : 한국방송통신대학교

총괄연구책임자 : 안 종 건

연 구 원 : 조 광 근

연 구 원 : 남 은 숙

연 구 원 : 최 종 우

연 구 원 : 정 현 정

연 구 원 : 강 상 기

연 구 원 : 이 은 정

연 구 원 : 임 정 현

연 구 원 : 황 성 규

요 약 문

I. 제 목

β -galactosidase의 생산효율화 및 내열성 증진에 의한 한국인 유당소화장애 해결 전략

II. 연구개발의 목적 및 필요성

한국낙농산업기반의 유지는 낙농가 뿐만 아니라 한국인 건강을 확보하기 위하여 중요하다. 국내 시유시장 확보는 무역이 자유화되어 있는 시기의 한국낙농산업기반을 최소한으로 유지할 수 있는 분야이며 한국인의 시유소비를 증대하기 위해서는 성인의 유당소화장애를 해결하는 것이 관건이다. 유당소화장애는 유당분해우유에 의해 근본적으로 해결될 수 있으며 내열성 유당분해효소를 사용하면 저렴하고 위생적인 품질을 가지는 유당분해시유를 생산할 수 있다. 본 연구는 우유살균온도에서 사용하므로써 유당분해를 위해 부가적인 시설과 과정이 필요하지 않으므로써 저렴하고 위생적인 유당분해우유를 제조할 수 있는 내열성 유당분해효소를 생산하기 위해 실시하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 내열성 유당분해효소 생산 미생물의 확보

ATCC가 소장하고 있는 고온성 미생물 중 유당분해효소를 생산하는 미생물을 확보하고, 일본과 뉴질랜드 온천지역의 시료로부터 이용성이 있을 것으로 예측되는 유당분해효소를 생산하는 미생물을 분리, 확보, 동정하였다.

2. 내열성 유당분해효소 유전자 분리

확보한 고온성 미생물의 유당분해효소 유전자를 PCR법 혹은 Chromosomal DNA

부분 분해 방법에 의해 분리하고 유전자 구조를 규명하였다.

3. β -galactosidase 유전자의 *Pichia pastoris*에 전이 및 발현

일부 β -galactosidase 유전자를 *Pichia pastoris*에 전이하여 chromosomal DNA에 삽입 시키므로써 β -galactosidase가 안정하게 생산될 수 있는 체제를 확보하고 β -galactosidase 생산최적조건을 확립하였다.

4. 내열성 유당분해효소 특성 조사

Pichia pastoris 혹은 *E. Coli*에서 발현, 생산된 β -galactosidase와 β -glycosidase를 정제 혹은 부분정제 후 실제 이용이 필수적인 적정온도, 적정 pH, 내열성을 조사하였다.

5. 유당분해효소 특성개선을 위한 돌연변이

KNOUC112 β -gal의 유전자 활성자리 부위의 구조를 변화하여 특성개선을 시도하였다.

6. 유당분해효소의 우유유당분해

유당분해효소들의 우유의 유당분해 능력과 유당용액 유당분해양태를 우유살균온도에서 조사하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

유당분해효소를 생산하는 고온성 미생물을 ATCC로부터 구입한 10개의 균주, 일본 및 뉴질랜드의 화산지역에서 채취한 mud 및 물 시료로부터 분리하였다.

ATCC균주중 *Thermus sp.* IB-57 (ATCC4314), *Thermus sp.* IB21(ATCC43815), *Thermus aquaticus* AT-62(ATCC33923), *Thermus aquaticus* YT-1, *Thermus aquaticus* HB8, *Thermus filiformis wai* 33A1 등 6종을 선발하였다.

일본 및 뉴질랜드의 화산지역에서 채취한 시료로부터 유당분해효소를 생산하는 것으로 인정되는 colony를 29개 분리하였고 이들이 생산하는 조효소의 pH와 온도가 활성에 미치는 영향과 내열성에 근거하여 KNOUC104, KNOUC105, KNOUC110, KNOUC111, KNOUC112, KNOUC114, KNOUC202, KNOUC209 등 8균주를 선발하였다. KNOUC105는 *Geobacillus*로 동정되었고 그 외의 균주들은 모두 *Thermus*로서 생화학적 특성이 다른 상이한 미생물이었다. 이들을 *Thermus sp.* KNOUC104, *Thermus sp.* KNOUC105, *Thermus sp.* KNOUC110, *Thermus sp.* KNOUC111, *Thermus sp.* KNOUC112, *Thermus sp.* KNOUC114, *Thermus sp.* KNOUC202, *Geobacillus sp.* KNOUC105로 명명하였다.

선발된 균주의 chromosome을 분리하여 PCR과 chromosomal DNA의 부분분해 방법에 의해 유당분해효소 유전자를 분리하였다.

PCR법에 의해 *Thermus sp.* KNOUC112, *Thermus sp.* KNOUC114로부터 β -galactosidase 유전자 (KNOUC112 β -gal, KNOUC114 β -gal)를 분리하였으며 각기 deoxyribonucleotide 1938쌍으로 구성되고 이들의 β -galactosidase는 645개의 아미노산으로 구성되고 분자량은 각기 72,896 dalton, 72784 dalton이다.

Chromosomal DNA의 부분분해에 의해 *Geobacillus* KNOUC105, *Thermus sp.* IB-21 (ATCC43815)로부터 β -galactosidase 유전자 KNOUC105 β -gal, tib5 β -gal을 분리하였고 이들을 각기 2,019쌍의 deoxyribonucleotide, 1,938쌍의 deoxyribonucleotide로 구성되어 있으며 이들의 β -galactosidase는 각기 672개, 645개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 78,048 dalton, 72,710 dalton이다.

Chromosomal DNA의 부분분해에 의해 *Thermus sp.* KNOUC202, *Thermus filiformis wai*. 33A1(ATCC43280), *Thermus sp.* AT-62(ATCC33923), *Thermus sp.* IB-21(ATCC43815)로부터 β -glycosidase 유전자 KNOUC202 β -gly, tfi β -gly, tat β -gly, tib2 β -gly를 분리하

였다. KNOUC202 β -gly는 1,176쌍의 deoxyribonucleotide로 구성되어 있으며 이유전자의 β -glycosidase는 391개의 아미노산으로 구성되고 분자량은 41,880 dalton이다. tfi β -gly는 1296쌍의 deoxyribonucleotide 1296쌍으로 구성되어 있고 이유전자의 β -glycosidase는 아미노산 431개로 구성되고 분자량은 48,679 dalton이다. tib2 β -gly는 deoxyribonucleotide 1311쌍으로 구성되어 있으며 이유전자의 β -glycosidase는 분자량이 49,065 dalton이고, 436개의 아미노산으로 구성되어 있다.

분리한 유전자를 *Pichia pastoris* 혹은 *E. Coli*에 전이, 발현하여 유당분해효소를 생산하고 부분정제 혹은 정제후 온도 및 pH가 활성에 미치는 영향과 내열성을 조사하였다. KNOUC112 β -gal은 *Pichia pastoris*에, tib5 β -gal, tfi β -gly, tat β -gly 및 tib2 β -gly는 *E. Coli*에 전이, 발현 후 정제하였고, KNOUC114 β -gal, KNOUC105 β -gal 및 KNOUC202 β -gly는 *E. Coli*에 전이, 발현 후 부분정제하여 특성을 조사하였다. 이들 4종의 β -galactosidase와 4종의 β -glycosidase의 적정pH는 5.0~7.0으로서 우유의 pH에서 모두 70%이상의 상당수준의 활성을 가지고 있으며, 적정온도는 70~80 $^{\circ}$ C이고, 60 $^{\circ}$ C 이상의 온도에서 매우 우수한 내열성을 가지고 있다.

KNOUC112 β -gal의 활성자리 부근 11곳의 구조를 변화시켜 돌연변이 β -galactosidase를 제조하여 특성의 개선을 시도했으나 성과가 없었다.

원유에 유당분해효소들을 ONPG활성으로 표준화된 양을 첨가하고 우유의 살균온도인 63 $^{\circ}$ C와 73 $^{\circ}$ C에서 반응하여 원유유당분해정도를 조사하여 유당분해우유생산 실용성을 조사하였다. tfi β -gly β -glycosidase, tib2 β -gly β -glycosidase, tat β -gly β -glycosidase의 우유유당분해력이 KNOUC112 β -gal β -galactosidase, KNOUC114 β -gal β -galactosidase, KNOUC105 β -gal β -galactosidase, tib5 β -gal β -galactosidase, KNOUC202 β -gly β -glycosidase들보다 매우 우수하였고 실용성이 있는 것으로 판단된다.

본 연구는 내열성 β -galactosidase를 목표로 하였으나 실험과정 중에 내열성 β -glycosidase도 함께 분리, 생산하였고 β -glycosidase의 우유유당분해력이 획득한 β -galactosidase보다 더 우수하였다.

2. 활용에 대한 건의

유당분해우유를 제조함에 있어 위생적 품질의 확보와 분해되지 않은 유당이 상당량 존재토록 하는 것에 유념해야 한다.

본 연구에서 획득한 tfi β -gly β -glycosidase, tib2 β -gly β -glycosidase, tat β -gly β -glycosidase 3종의 β -glycosidase의 원유유당 분해력이 우수하여 실용성이 있다. 이들

효소를 우유의 저온장시간 살균 (LTLT, 63℃ 30분)과정에서 반응시켜 원유유당의 40~60%를 분해한 유당분해우유를 생산할 수 있다. 살균과 동시에 유당을 분해하기 때문에 처리공정이 단순하고 별도의 효소처리과정중에 야기되는 위생적 품질이 저하할 염려가 없으며, 우유의 유당을 부분적으로 분해함으로써 유당소화장애를 해결하여 우유소비를 배가하면서 분해되지 않은 유당에 의한 Ca흡수촉진 및 대장건강증진효과를 유지할 수 있을 것이다.

효소를 지지체에 고정화하므로써 효소를 장기간 반복사용하여 경비를 더욱 절감할 수 있으므로 유가공장에서 실용화할 때 고정하여 이용할 것을 권고한다. 유전자를 *Pichia pastoris*에 전이하므로써 좀 더 안정한 효소생산체계를 확보할 수 있을 것이다.

상기 3종의 β -glycosidase 유전자는 특허출원 중에 있다.

Summary

This study was performed to find thermostable enzymes hydrolysing lactose in milk during pasteurization to solve lactose intolerance. By hydrolysing lactose in milk during the process of pasteurization, lactose hydrolyzed milk of highly hygienic quality can be produced, and production cost can be cut down because additional process for lactose hydrolysis is not needed. We selected thermophilic microorganisms producing lactose hydrolyzing enzyme, isolated gene of those enzymes, cloned and expressed in *Escherichia Coli* or *Pichia pastoris*, purified those enzymes and characterized properties of those enzymes, tried to improve properties of a enzyme by site directed mutation of gene, and investigated hydrolysability of lactose in raw milk at pasteurization temperature of market milk.

We chose Thermophilic microorganisms as the source of thermostable lactose hydrolysing enzyme. Based on crude lactose hydrolyzing enzyme's properties on pH and temperature, eight thermophilic microorganisms were selected from water and mud sampled from volcanic regions of Japan and New Zealand, and 6 strains of *Thermus sp.* from ATCC to isolate the gene of lactose hydrolyzing enzyme. Seven microorganisms from volcanic region were identified as *Thermus sp.* and one as *Geobacillus sp.*

Genes of lactose hydrolyzing enzyme were isolated from those selected 14 microorganisms by PCR method and partial hydrolysis of chromosomal DNA, and could get four β -galactosidase genes and four β -glycosidase genes. Those genes of β -galactosidase were named as KNOUC112 β -gal(isolated from *Thermus sp.* KNOUC112), KNOUC114 β -gal(isolated from *Thermus sp.* KNOUC114), KNOUC105 β -gal(from *Geobacillus sp.* KNOUC105) and tib5 β -gal(isolated from *Thermus sp.* IB-21, ATCC43815). Those genes of β -glycosidases were named as tfi β -gly(isolated from *Thermus filiformis wai* 33A1, ATCC 43280), tat β -gly(isolated from *Thermus flavus* AT-62, ATCC 33923), tib2 β -gly(isolated from *Thermus sp.* IB-21, ATCC 43815) and KNOUC202 β -gly(isolated from *Thermus sp.* KNOUC202).

KNOUC112 β -gal is composed of 1938bp coding 645 amino acids and Mw of it's β -galactosidase is 72,896 dalton. KNOUC114 β -gal is composed of 1938bp and Mw of its β -galactosidase composed by 645 amino acids is 72,784 dalton. The base pair's number

of KNOUC105 β -gal is 2016 coding 672 amino acids, and Mw of its β -galactosidase is 78,048 dalton. tib5 β -gal is composed of 1938 bp coding 645 amino acids and Mw of its β -galactosidase is 72,710. tfi β -gly is composed of 1296 bp coding 431 amino acids and its β -glycosidase has Mw of 48,630 dalton. 1296 bp is composing tat β -gly coding 431 amino acids of β -glycosidase, and Mw of its β -glycosidase is 48,679. tib2 β -gly is composed of 1311 bp coding 436 amino acids and its β -glycosidase has Mw of 49,065 dalton. KNOUC202 β -gly is made of 1176 bp coding 391 amino acids and Mw of its β -glycosidase is 41880 dalton.

Those β -galactosidase genes and β -glycosidase genes were introduced into *Esherichia coli* or *Pichia pastoris* cloned and expressed. Two β -galactosidases and three β -glycosidases were purified, and 2 β -galactosidases and one β -glycosidase were partially purified. They showed optimum pH of 5.0 - 7.0, and at the pH of raw milk they have good activity. Their optimum temperature were 70 - 80 °C, and at pasteurization temperature of 63°C and 73°C they showed good activity. They were stable at those two pasteurization temperatures.

KNOUC112 β -gal was site directed mutated at eleven position around active site to improve optimum pH, optimum temperature and thermostability, but we could not find any change on those properties.

Those enzymes' hydrolysability of lactose in raw milk at 63°C and 73°C were investigated. β -glycosidases of tfi β -gly, tib2 β -gly and tat β -gly hydrolyzed lactose well, especially at 63°C they showed practicality by hydrolyzing 40 - 60 % of lactose in raw milk for 30 min. There have to be certain amount of unhydrolyzed lactose in lactose hydrolyzed milk because lactose enhances the absorbtion of Ca and the health of large intestine.

It is recommended to produce lactose hydrolyzed milk by hydrolyzing 40 - 60 % of lactose in raw milk by β -glycosidase of tfi β -gly, tib2 β -gly or tat β -gly during pasteurization of LTLT. The lactose hysrolyzed milk will have good hygienic quality, will let lactose intolerant persons drink much more milk without lactose intolerant symptom, will still keep the value of lactose enhancing absorbtion of Ca and health of large intestine, and there is no additional facility and time for hydrolysis of lactose.

At the beginning of this research we aimed to get thermostable β -galactosidase good for practical use, but we obtained β -glycosidases better than β -galactosidase.

Contents

Abstract	ii
Summary	vii
Chapter 1. Introduction	1
Section 1. Object	1
Section 2. Need of Research	1
Chapter 2. The Present Technical State	4
Chapter 3. Results of Research	5
Section 1. Selection of Microorganisms Producing Thermostable β -galactosidase	5
1. Introduction	5
2. Materials and Methods	5
1) Collection of Microorganisms	5
2) Identification of Microorganisms	8
3) Investigation of β -galactosidase properties	8
3. Results and Discussion	9
1) Selection of Microorganisms	9
2) Identification of Microorganisms	16
Section 2. Isolation of Thermostable Lactose Hydrolyzing Enzyme's Genes	25
1. Introduction	25
2. Materials and Methods	25
1) Isolation of gene	25
2) DNA sequencing	28
3. Results and Discussion	28
1) β -galactosidase	28
2) β -glycosidase	36
Section 3. Transformation of <i>Pichia pastoris</i> with β -Galactosidase Gene and Expression	49

1. Introduction	49
2. Materials and Methods	49
1) Transformation of <i>Pichia pastoris</i> and Expression of gene	49
2) Optimizing Conditions for the Production of β -Galactosidase	50
3. Results and Discussion	50
1) Transformation <i>Pichia pastoris</i> with β -galactosidase Gene	50
2) Expression of β -galactosidase gene in <i>Pichia pastoris</i>	52
3) Optimizing Conditions for the Production of β -galactosidase in <i>Pichia pastoris</i> X-33	52
Section 4. Characteristics of Thermostable Lactose Hydrolyzing Enzymes	59
1. Introduction	59
2. Materials and Methods	59
1) Purification	59
2) Investigation of Properties	61
3. Results and Discussion	61
1) β -galactosidase	61
2) β -glycosidase	71
Section 5. Mutation of β -galactosidase	81
1. Introduction	81
2. Materials and Methods	81
1) Site of Mutation	81
2) Production of Mutant Gene	81
3) Expression of Mutant Gene	82
4) Investigating Properties of Mutant β -galactosidase	84
3. Results and Discussion	84
Section 6. Hydrolysis of Lactose in Raw Milk by Lactose Hydrolyzing Enzymes	89
1. Introduction	89
2. Materials and Methods	89
1) Lactose hydrolyzing enzymes	89
2) Investigation of Lactose Hydrolyzing Ability	90
3. Results and Discussion	90

1) β -galactosidase	90
2) β -glycosidase	96
Section 7. Lactose Hydrolyzed Milk Production System	101
1. Selection of Lactose Hydrolyzing Enzymes	101
2. Production of Lactose Hydrolyzing Enzymes	102
3. Lactose Hydrolyzed Milk Production System	102
Chapter 4. Object Achievement and Contribution to Related Field	105
Section 1. Object Achievement	105
Section 2. Contribution to Related Field	110
Chapter 5. Applications	111
Section 1. Utilization of Results	111
Section 2. Future Study	111
Chapter 6. Technical Information of Foreign Countries	112
Chapter 7. References	113

목 차

요약문	ii
Summary	vii
제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 목적	1
제 2 절 연구개발의 필요성	1
제 2 장 관련기술의 현황과 문제점	4
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	5
제 1 절 내열성 유당분해효소 생산 미생물의 선발	5
1. 서론	5
2. 재료 및 방법	5
1) 미생물의 확보	5
2) 미생물 동정	8
3) β -galactosidase 특성조사	8
3. 결과 및 고찰	9
1) 미생물 선발	9
2) 선발미생물 동정	16
제 2 절 내열성 유당분해효소 유전자의 분리	25
1. 서론	25
2. 재료 및 방법	25
1) 유전자의 분리	25
2) 유전자의 DNA sequencing	28
3. 결과 및 고찰	28
1) β -galactosidase	28
2) β -glycosidase	36
제 3 절 β -galactosidase 유전자의 <i>Pichia pastoris</i> 에 전이 및 발현	49
1. 서론	49

2. 재료 및 방법	49
1) <i>Pichia pastoris</i> 전이 및 발현	49
2) β -galactosidase 생산최적화	50
3. 결과 및 고찰	50
1) β -galactosidase 유전자의 <i>Pichia pastoris</i> 로 전이	50
2) β -galactosidase 유전자의 <i>Pichia pastoris</i> 에서의 발현	52
3) <i>Pichia pastoris</i> X-33에서의 β -galactosidsase 생산 적정화	52
제 4 절 내열성 유당분해효소 특성	59
1. 서론	59
2. 재료 및 방법	59
1) 정제	59
2) 특성조사	61
3. 결과 및 고찰	61
1) β -galactosidase	61
2) β -glycosidase	71
제 5 절 β -galactosidase 돌연변이	81
1. 서론	81
2. 재료 및 방법	81
1) 돌연변이 위치	81
2) 돌연변이 유전자 제조	81
3) 돌연변이 유전자의 발현	82
4) 돌연변이 β -galactosidase 특성조사	84
3. 결과 및 고찰	84
제 6 절 유당분해효소에 의한 우유 유당분해	89
1. 서론	89
2. 재료 및 방법	89
1) 유당분해효소	89
2) 유당분해력 조사	90
3. 결과 및 고찰	90
1) β -galactosidase	90
2) β -glycosidase	96
제 7 절 유당분해시유 생산체계	101
1. 유당분해효소의 선발	101

2. 유당분해효소의 생산	102
3. 유당분해시유 생산체계	102
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여	105
제 1 절 연도별 연구목표 및 달성도	105
제 2 절 관련분야에의 기여도	110
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	111
제 1 절 활용계획	111
제 2 절 추가연구의 필요성	111
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	112
제 7 장 참고문헌	113

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 목적

저렴한 내열성 β -galactosidase 혹은 β -glycosidase 생산체계를 확립하여 위생적으로 우수한 품종을 가지고 있고 저렴한 유당분해우유를 생산하므로써 유당분해능력이 낮은 대다수 한국인이 유당분해시유를 많이 섭취하게 하여 한국의 낙농가와 유가공업을 포함하는 낙농산업의 안정 및 발전을 기하고 국민건강을 증진시키고자 하는데 목적이 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 경제적 필요성

β -galactosidase는 우유의 lactose를 glucose와 galactose로 분해하므로써 우유를 섭취할 때 야기되는 유당소화장애 (lactose intolerance)를 해결할 수 있으며 β -glycosidase도 동일한 기능을 가지고 있다.

유당소화장애 현상은 세계적으로 많은 인종에서 나타나며 진정한 lactose tolerance group은 북유럽의 Caucasian과 아프리카의 일부 유목민족에 불과하다(Shukla, 1975; Simmons, 1973). 아시아인은 β -galactosidase의 결핍이 제일 심한 인종인데(Davis와 Bolin, 1967; Flatz 등, 1969; Gilat 등, 1971), 일본을 포함한 극동지역의 거의 모든 사람이 유당소화장애인으로 분류되고 있으며(Dahlquist, 1983) 50 g의 유당섭취 1~3시간에 혈당량이 20~50 mg/l이 증가하고 복통, 설사 등의 현상이 없을 때 lactose tolerance group으로 분류한다 (McGill, 1983). 유당 50 g은 우유 1 l에 포함하고 있는 양으로써 우리나라 성인중 1 l를 한꺼번에 음용할 수 있는 사람은 극히 드물어 한국인 성인은 거의 유당소화장애인일 것으로 추측되며 김(1994)은 70~80%일 것으로 보고하였다.

따라서, β -galactosidase와 β -glycosidase를 대량으로 생산하고 내열성 및 안전성을 증진시켜 저렴한 비용으로 우유의 유당을 분해하여 저렴한 유당분해우유를 생산하므

로써 우리나라 사람의 유당소화장애를 해결하여 한국낙농산업의 기반을 유지할 수 있을 뿐만아니라 더욱 확대하고 국민건강도 증진시킬 수 있을 것이다.

한국인의 우유소비량은 1970년부터 1980년대까지의 급속히 성장하던 속도가 둔화되어 최근에는 거의 정체상태에 있고 현재 소비량이 60 kg/인·년으로 서구의 1인당 소비량 300-600kg에 훨씬 못 미치고 있다. 그동안 우리나라의 우유소비증가 원인은 주로 어린이의 우유음용증가에 있었으며 성인의 우유소비량 증가는 크게 기여하지 못하는 것으로 판단된다. 이는 유당소화장애가 어린이에게 있어서는 심하지 않아 우유를 어느 정도 음용하지만 청소년기에 접어들면서 장내 β -galactosidase가 급감하여 유당소화장애현상이 나타나기 때문인 것이다.

근래 유제품수입이 자유화되면서 유제품의 수입이 급증하여 한국낙농업의 기반유지에 많은 우려가 제기되었다. 이에 당국에서는 한국의 낙농기반을 지키는 방안으로 수입이 용이하지 않은 시유 시장을 확보하는 것으로 결론을 내리고 우수한 품질의 시유를 제조하기 위한 근본대책인 원유품질 개선에 주력하고 있다.

그러나, 훌륭한 품질의 시유를 생산하므로써 시유시장을 수입자유화로부터 지켜 국내 낙농생산기반을 안정시키는 것도 매우 중요하나 한국인의 시유음용량이 증가하지 않고서는 국내 낙농업을 확대발전시키기 어려운 것이 현실이다. 장차 시유외의 유제품수입이 급증할 경우 시유가 전체유제품소비에서 차지하는 상대적 비율이 점차 낮아질 수 있으며 이는 국민의 유제품 소비패턴을 시유에서 수입이 용이한 타 유제품으로 전환시킬 수도 있으며 이는 한국의 낙농업이 축소될 수 있음을 시사한다.

우리나라 사람들의 유제품소비량 중 시유가 차지하는 비율이 감소하고 있기는 하나 아직도 시유가 60%이상을 차지하고 있어 한국인은 유제품 중에서 시유를 가장 선호하고 있는 것으로 판단된다. 한국인 성인의 시유소비가 매우 적고 어린이들은 비교적 많이 소비하고 있어 한국인의 시유소비증가 여지는 성인에 있다. 즉, 성인의 시유소비를 증가시킬 수 있다면 한국의 낙농업은 현재보다도 훨씬 큰 규모로 유지될 수 있을 것이다. 이는 한국인 성인에게서 대부분에 해당하고 있는 유당소화장애현상을 해결하므로써 가능하며 유당을 β -galactosidase로 분해한 유당분해우유가 그 해결책인 것이다.

2. 기술적 필요성

유당분해우유를 생산하기 위한 기술적인 문제는 위생적 품질의 확보와 유당분해 효소를 저렴하게 생산하는 것이다.

현재 β -galactosidase가 개발되어 이용되고 있기는 하나 30~40°C가 반응적이기 때문에 유당을 분해하는 과정에서 오염미생물의 번식우려가 있어 유당분해우유의 위생적 품질을 확보하기 어려운 문제가 있다. 고온에서 활성이 높고 내열성이 좋은 유당분해효소를 이용하여 우유의 살균온도에서 살균과 동시에 유당을 분해할 수 있다면 효소반응과정에서 야기될 수 있는 오염미생물의 번식을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 효소처리를 위한 추가공정을 생략할 수 있어 비용을 절감하므로써 저렴한 유당분해우유를 공급할 수 있다.

유당분해효소를 저렴하게 생산하기 위해서는 생산량을 증가하고 정제과정을 단순화하는 것이 중요하다. 고온에서 활성이 높고 내열성이 높은 효소는 고온성미생물에서 생산되는데 일반적으로 고온성 미생물은 영양요구가 까다로울 뿐만 아니라 효소생산효율이 나쁘다. 그러므로 유전공학적 방법에 의해 유전자를 생산효율이 높은 *E. coli*와 *Pichia pastoris* 등의 미생물로 전이하므로써 생산량을 증가시켜야 한다. 유당분해효소를 생산한 후에 이물질을 정제하는 과정이 복잡할 경우 생산비율이 매우 증가하기 때문에 단순한 방법을 강구해야 한다. *Pichia pastoris*는 효소를 생산한 후에 세포외로 분비하기 때문에 세포내 물질을 제거하는 번거로움이 없이 비교적 간단한 방법으로 정제할 수 있으며, 세포내에서 생산된 효소 affinity chromatography 방법을 확립하므로써 정제과정을 단순화할 수 있다.

제 2 장 관련기술의 현황과 문제점

반응적정온도와 내열성이 높은 β -galactosidase를 생산코자하는 연구는 1970년대부터 시작되었다. *Aspergillus oryzae* (Park 등, 1979), *Aspergillus niger* (Widner와 Leuba, 1979), *Mucor pusillus* (Sorenson과 Crisan, 1974), *Alternaria alternaria* (Macris, 1982) 등의 곰팡이, *Bacillus stearothermophilus* (Goodman과 Pederson, 1976), *Bacillus coagulans* (안과 김, 1981), *Streptococcus thermophilus* (Greenberg와 Mahoney, 1981; Ramana Rao와 Dutta, 1981), *Thermus aquaticus* (Ulrich 등, 1972) 등의 세균에서 적정온도와 내열성이 비교적 높은 β -galactosidase가 생산되었다. 이들중 *Alternaria alternaria*의 β -galactosidase는 60~70°C이었고 (Macris, 1982), *Thermus aquaticus*의 β -galactosidase는 적정온도가 80°C이고 70°C에서 30분간 90%이상을 활력을 유지하였다 (Ulrich, 1972).

근래 내열성효소에 대한 관심이 증가하면서 내열성 β -galactosidase와 β -glycosidase의 특성, 유전자 분리 및 cloning 결과가 보고되었다.

Thermus sp. A4 (Ohtsu 등, 1998), *Pyrococcus woesei* (Dabrowski 등, 2000)로부터 생산된 β -galactosidase의 특성과 유전자가 보고되었다. *Thermus sp.* A4의 β -galactosidase는 적정 pH가 6.5이고 80°C이상에서 높은 활성을 가지고 있으며 80°C에서 2시간동안 75%의 활성을 유지한다 (Ohtsu 등, 1998). *Pyrococcus woesei* β -galactosidase는 적정 pH가 5~7, 적정온도가 100°C인 초고온성 β -galactosidase이고 85°C에서 4시간후에 11%의 활성을 소실하였다 (Dabrowski 등, 2000). *Thermus thermophilus* (Dion 등, 1999), *Thermus caldophilus* GK24 (Yoo 등, 2000), *Thermus nonproteolyticus* HG102 (Xiangyuan 등, 2001)의 β -glycosidase의 특성과 유전자가 보고되었다. *Thermus thermophilus* β -glycosidase는 적정온도가 88°C, 적정 pH는 6.5~7.0이고, 90°C에서 10분후 50%의 활성을 유지하였다 (Dion 등, 1999), *Thermus caldophilus* GK24 β -glycosidase는 적정온도 85~90°C, 적정 pH5.5~6.5이고 80°C에서 7시간 후에 50%의 활성을 유지하였다 (Yoo 등, 2000). *Thermus nonproteolyticus* HG102의 β -glycosidase는 적정 pH가 5.6, 적정온도가 90°C이며, 90°C에서 2.5시간후에 활성의 50%로 감소하였다 (Xiangyuan 등, 2001). 이들 근래에 보고된 내열성 유당분해효소연구에서는 모두 유전자를 고온성 미생물로부터 *E. Coli*로 전이발현하여 생산성을 증진시키긴 했으나 우유의 유당을 분해하여 유당분해우유를 제조코자하는 시도는 없었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 내열성 유당분해효소 생산 미생물의 선발

1. 서론

고온에서 활성이 높고 내열성이 큰 고온성효소는 고온에서 잘 생육하는 미생물이 생산하며 이러한 고온성 미생물은 이미 분리되어 미생물관리기관에 보관되어 있는 것이 있으며 해저 열수 혹은 고온의 온천에서 새로이 분리할 수 있다. 본 연구에서는 ATCC가 소장하고 있는 고온성 미생물 중 유당분해효소를 생산할 것으로 예측되는 미생물을 구입하여 생산원으로 사용하였고 일본과 뉴질랜드 온천지역에서 시료를 채취하여 유당분해효소를 생산하는 미생물을 분리하였다.

2. 재료 및 방법

1) 미생물의 확보

(1) 미생물 구입

미생물은 ATCC로부터 구입한 10종 및 뉴질랜드와 일본의 화산지역의 시료로부터 분리한 29종을 사용하였다.

ATCC에서 구입한 10종의 미생물의 명칭 및 특성은 table 1-1과 같다.

(2) 미생물 분리

일본 및 뉴질랜드 화산지역에서 채취한 39종의 시료를 *Thermus enhanced medium* No. 1598 액체배지에 1% (w/v)첨가후 70℃에서 진탕배양후 X-gal을 포함하는 고체배지에 도포하여 β -galactosidase를 생산하는 colony를 채취하여 분리하였다.

(3) 미생물 배양

미생물은 *Thermus enhanced medium* No. 1598, 70℃에서 150 rpm으로 진탕배양하였다. 고체배지의 경우 agar를 2%첨가하였다. 액체배지에서의 미생물체량은 600nm에서의 흡광도로 측정하였다.

Thermus enhanced medium No. 1598의 성분은 table 1-2와 같다.

Table 1-1. Microorganism purchased from ATCC

Microorganism	ATCC No.	ATCC medium No.	Optimal Temp. (°C)	Medium pH	Remarks
<i>Thermus aquaticus HB8</i>	27634	697	75	7.5	
<i>Thermus filiformis wai 33 A1</i>	43280	461	70	7.6	
<i>Thermus sp. X-1</i>	27978	697	64	7.5	
<i>Thermus sp. IB-57</i>	43814	1598	70	7.2	
<i>Thermus sp. IB-21</i>	43815	1598	70	7.2	
<i>Thermus aquaticus YT-1</i>	25104	461	70	7.6	Taq.
<i>Thermus aquaticus Y-VII-51B</i>	25105	461	70	7.6	
<i>Thermus aquaticus 104</i>	31558	1086	65	7.0	US. patent(control)
<i>Thermus aquaticus AT-62</i>	33923	1260	70	7.0	<i>T. flavus</i>
<i>Thermomicrobium roseum P-2</i>	27502	655	70	8.5	non <i>Thermus</i> 균주

Table 1-2. Ingredient of *Thermus* enhanced medium No. 1598

ATCC Culture Medium 1598 <i>Thermus</i> ENHANCED MEDIUM		
Yeast extract, 2.5 g	Tryptone, 2.5 g	Agar, 28.0 g
Nitrilotriacetic acid, 100.0 mg		CaSO ₄ · 2H ₂ O, 40.0 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O, 200.0 mg		0.01 M Fe citrate, 0.5 ml
Trace Element Solution (see below), 0.5 ml		
Phosphate Buffer (see below), 100.0 ml		
Distilled water, 900.0 ml		
Adjust pH to 7.2 with NaOH. Autoclave at 121 °C for 15 minutes.		
Autoclave the phosphate buffer separately and then add to the medium.		
Phosphate Buffer:		
KH ₂ PO ₄ , 5.44 g		Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O, 43.0 g
Distilled water, 1.0 L		
Adjust pH to 7.2.		
Trace Element Solution:		
Nitrilotriacetic acid, 12.8 g		FeCl ₂ · 4H ₂ O, 1.0 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O, 0.5 g		CoCl ₂ · 6H ₂ O, 0.3 g
CuCl ₂ · 2H ₂ O, 50.0 mg		Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O, 50.0 mg
H ₃ BO ₃ , 20.0 mg		NiCl ₂ · 6H ₂ O, 20.0 mg
Distilled water, 1.0 L		

(4) 미생물의 β -galactosidase 생산확인

X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside)이 첨가된 *Thermus* enhanced medium No. 1598 고체배지에서 생장, 형성된 colony의 청색여부로 판단하였다. X-gal을 분해하면 청색colony를 형성하기 때문에 청색 colony를 β -galactosidase를 생산하는 것으로 인정하였다.

X-gal은 dimethylformamide에 용해하여 배지에 첨가하였으며 배지의 X-gal은 0.02%(w/v), dimethylformamide는 0.5%(v/v)가 적정량이었다.

2) 미생물 동정

선발 미생물의 형태학적인 특성으로는 colony morphology, cell morphology, Gram staining, spore staining, motility test를 조사하였으며, agar plate medium, slant medium과 liquid medium에서의 성장을 조사하였다.

사용된 미생물의 생리, 생화학적인 특성은 ATCC medium 1598에 streaking하여 7 0℃에서 48시간 배양한 young culture를 사용하였으며, tests로는 VP test, indole formation, hydrogen sulfide formation, citric acid utilization, urease test, catalase test, oxidase test, O-F test, gelatin hydrolysis, ONPG utilization, nitrate reduction test와 arginine, lysine, ornithine, tryptophane이용성과 anaerobe jar를 이용하여 oxygen requirement등을 조사하였다. 또한 탄소이용능은 ATCC medium 1598을 변형하여 질소 원으로 yeast extract와 tryptone대신에 (NH₄)₂SO₄ 사용하였으며, 사용된 substrate로는 glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, sucrose, mellibiose, amygdalin, arabinose, galatose, saccharose, trehalose, lactose, fructose, xylose, maltose등을 이용하여 조사하였다.

3) β -galactosidase 특성 조사

(1) β -galactosidase 활성 측정

미생물을 *Thermus* enhanced medium No. 1598에서 배양하여 대수생장기 후기의 미생물체를 원심분리(3,000rpm, 20min, 4℃)하여 회수하였다. 미생물 회수후 상등액은 세포체외분비 β -galactosidase활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다. 회수한 미생물을 citric acid-Na₂HPO₄ buffer(0.00443M, pH 6.8)으로 2회 세척후 동일 buffer에 suspension시켜 30초간 5회 초음파처리하여 세포를 파괴하여 β -galactosidase활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다.

ONPG를 0.0004M 농도로 pH 6.8 citric acid- Na_2HPO_4 buffer(0.04M)에 용해하여 β -galactosidase활성 측정을 위한 기질 용액으로 사용하였다.

조효소액의 β -galactosidase활성은 ONPG용액 2.5ml에 조효소액 0.5ml를 첨가하여 70°C의 water bath에서 10분간 반응후 icewater에서 냉각하여 Na_2CO_3 수용액(0.5M)을 3 ml 첨가한 후 420nm에서의 흡광도로서 측정하였다.

β -galactosidase 활성은 $A_{600}=10$ 의 세포현탁액 1ml로부터 생산된 조효소액이 1분간 ONPG로부터 1 μ mole의 ONP를 생산하는 것을 1unit으로 하였다.

(2) 온도가 활성에 미치는 영향

50-90°C에서 활성을 측정하여 온도가 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

(3) pH가 활성에 미치는 영향

pH 3.0-7.6의 citric acid- Na_2HPO_4 buffer(0.04M), 70°C에서 활성을 측정하여 pH가 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

(4) 내열성

citric acid- Na_2HPO_4 buffer(0.00443M), 70°C에서 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 동안에 잔존활성을 측정하여 내열성을 조사하였다.

(5) 냉동·해동이 활성에 미치는 영향

조효소액을 -20°C에서 냉동후 4°C에서 해동하여 잔존활성을 측정하므로써 냉동 및 해동이 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 미생물 선발

(1) 구입미생물 선발

ATCC로부터 구입한 10종의 균주중 6종이 X-gal과 ONPG를 분해하여 유당분해효소를 생산하는 것으로 확인되었고 이들은 table 1-3과 같다.

Table 1-3. Microorganism producing β -galactosidase purchased from ATCC

ATCC No.	균 주 명
43814	<i>Thermus sp. IB-57</i>
43815	<i>Thermus sp. IB-21</i>
33923	<i>Thermus aquaticus AT-62</i>
25104	<i>Thermus aquaticus YT-1</i>
27634	<i>Thermus aquaticus HB8</i>
43280	<i>Thermus filiformis wai 33 A1</i>

(2) 화산지역 분리 미생물 선발

가. Colony 분리

X-gal을 포함하는 고체배지에서 유당분해효소를 생산할 것으로 예측되는 푸른 colony를 29개 분리하였다. Colony의 명칭 및 colony분리를 위해 사용했던 시료의 조건이 table 1-4에 제시되어 있다.

나. 유당분해효소의 생산

분리한 colony들의 유당분해효소 생산능력을 효소의 활성으로서 조사하였으며 그 결과를 figure 1-1에 제시하였다.

화산지역 시료에서 분리한 미생물을 액체배지에서 배양후 대수기말기에 미생물체를 회수하여 β -galactosidase의 활성을 ONPG를 기질로 하여 pH 6.8, 70°C에서 조사하였다.

KNOUC114, 110, 111, 112, 109, 113, 202, 209, 103, 104, 105가 pH 6.8, 70°C에서 뚜렷한 활성을 나타내었다. 이들은 모두 세포내 효소이었다. 그외의 미생물의 β -galactosidase 활성은 X-gal배지에서는 뚜렷했으나 ONPG를 기질로 했을 경우 pH 6.8, 70°C에서 매우 미약하였다.

다. 유당분해효소 특성

① 온도가 활성에 미치는 영향

50~90°C에서의 활성을 조사하였으며 그 결과는 figure 1-2와 같다. KNOU 110, 111, 112, 114, 209는 온도가 90°C로 증가할 때까지 활성이 계속 증가하였으며 KNOUC 123, 104, 105는 70°C에서, KNOUC 202는 80°C에서 활성이 높았다. 그 외의 경우는 활성적온이 50°C이하이거나 활성이 매우 낮아 분별이 어려웠다.

② pH가 활성에 미치는 영향

pH 3.0~7.6에서 활성을 조사하였으며 그 결과는 figure 1-3과 같다. KNOUC 103, 104, 105, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 202, 209들이 pH 4~7사이에서 높은 활성을 나타내었고 그 외에는 활성이 낮았다. KNOUC 103, 104, 105, 202, 209의 경우는 pH 4.0~5.6, pH 6.8의 두 pH에서 활성이 높게 나타났다. 이는 두가지 종류의 유당분해효소가 존재하고 있을 가능성을 시사한다.

Table 1-4. Microorganisms from volcanic samples in New Zealand and Japan

No.	Collection No.	Condition of place where samples were collected	
		Temperature(°C)	pH
1	KNOUC114	60-70	5.0
2	KNOUC115	60-70	5.0
3	KNOUC110	75-80	10.0
4	KNOUC111	70-75	7.0
5	KNOUC112	70-75	7.0
6	KNOUC109	70-85	8.0
7	KNOUC113	75-80	7.0
8	KNOUC201	92	8.0
9	KNOUC202	72-90	8.5
10	KNOUC207	75-80	7.5
11	KNOUC208	45-80	7.5
12	KNOUC209	60	7.5
13	KNOUC210	90	8.0
14	KNOUC211	90	8.0
15	KNOUC212	78	8.0
16	KNOUC203	72-90	8.5
17	KNOUC204	72-90	8.5
18	KNOUC205	72-78	8.0
19	KNOUC206	72-78	8.0
20	KNOUC101	80	7.0
21	KNOUC102	80	7.0
22	KNOUC103	85	7.0
23	KNOUC104	85	7.0
24	KNOUC105	85	7.0
25	KNOUC106	85	7.0
26	KNOUC107	85	7.0
27	KNOUC108	85	7.0
28	KNOUC116	75	7.0
29	KNOUC117	75	7.0

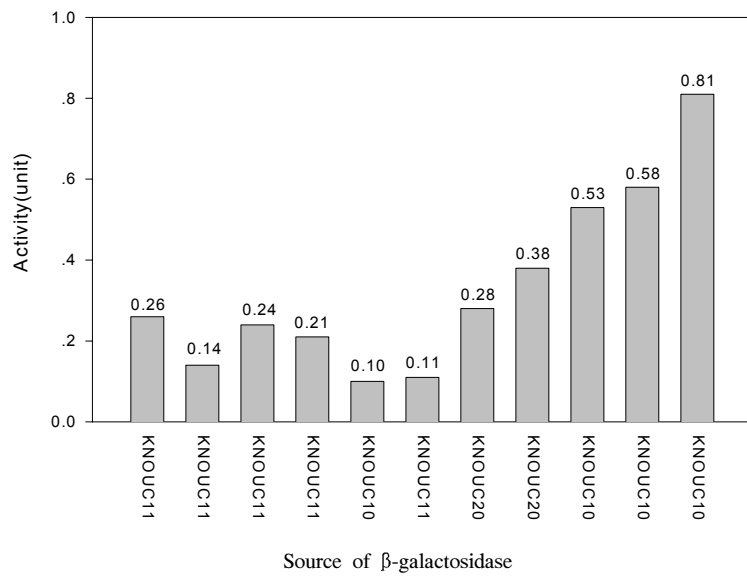
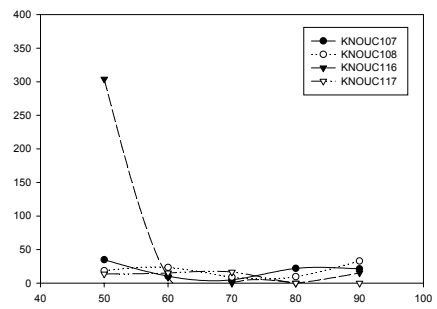
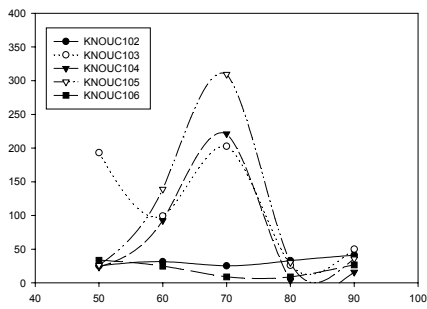
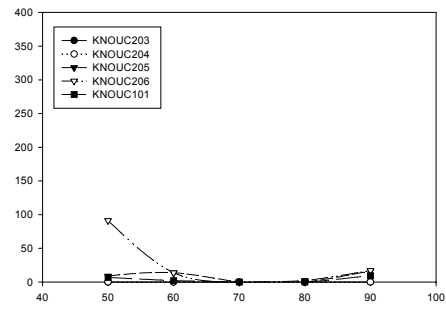
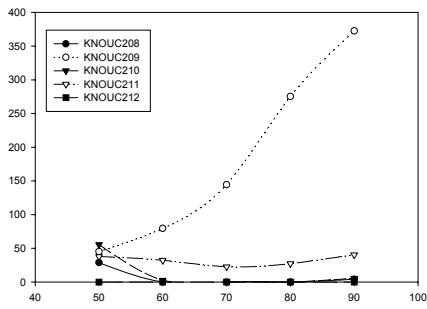
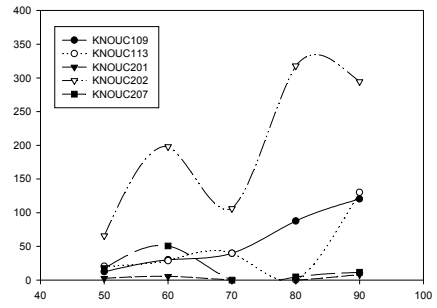
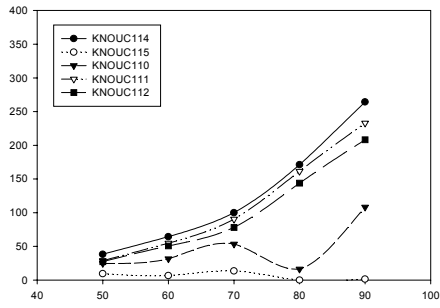
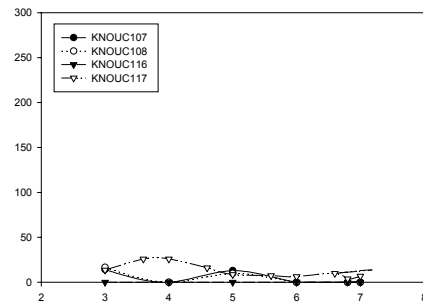
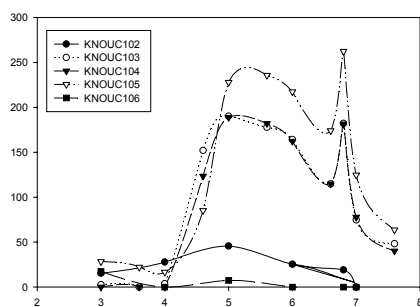
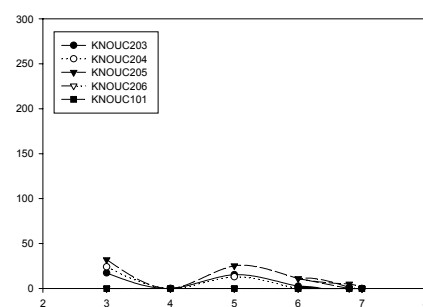
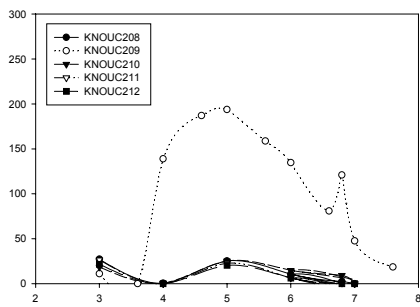
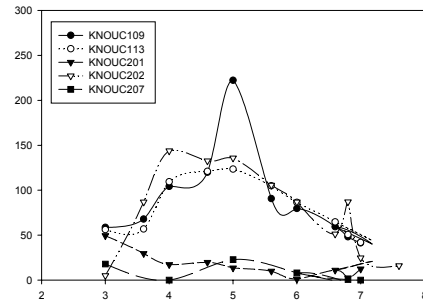
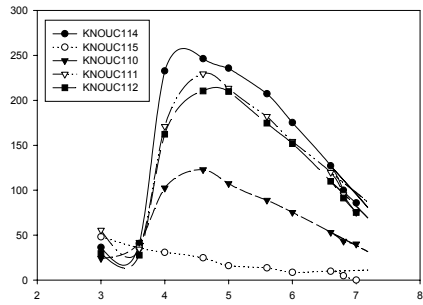


Figure 1-1. β -galactosidase activity of crude cell free extract



Temperature(°C)

Figure 1-2. β -galactosidase activity at different temperatures(pH 6.8, 10min)



pH

Figure 1-3. β -galactosidase activity at different pH(70 °C)

③ 고온, 냉동 및 해동에 대한 안정성

70℃ 이상의 고온과 pH 4~7사이에서 높은 활성을 가지고 있어 이용성이 좋은 것으로 예측되는 KNOUC 103, 104, 105, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 202, 209의 70℃에서의 내열성과 냉동 및 해동 후 안정성을 조사하였으며 그 결과를 figure 1-4와 figure 1-5에 제시하였다.

70℃에서 0~3시간 동안 정치하면서 잔존하는 활성의 변화로서 열안정성을 조사하였다. 조사한 조효소중 KNOUC202, 209, 117은 비교적 3시간 동안 높은 활성을 유지하였다. 특히 KNOUC114, 110, 111, 202의 경우 내열성이 상당히 강한 것으로 예측하였다.

조효소액을 -20℃에서 냉동시킨 후 4℃에서 해동하여 잔존활성을 측정하므로써 냉동 및 해동에 대한 안정성을 조사하였다.

조사한 조효소액중 KNOUC103과 105의 경우를 제외하고는 해동 후 70%이상의 활성을 유지하였다. KNOUC 101, 109, 202의 경우 90% 이상의 활성을 유지하였고, 특히 KNOUC 202는 거의 모든 활성이 유지되었다.

라. 미생물의 선발

화산지역에서 분리한 미생물의 경우 pH6.8 및 70℃에서의 뚜렷한 활성, 70℃에서의 내열성, 냉동 및 해동시의 안정성을 고려하여 KNOUC114, 110, 111, 112, 105, 202, 209, 104를 유전자 분리 우선대상으로 선정하였다.

2) 선발미생물 동정

일본 및 뉴질랜드 화산지역에서 채취한 시료를 *Thermus enhanced medium* No. 1598에 배양하여 29균주를 분리하였으며 그 중에서 유전자 분리대상으로 선발된 균주 8개를 동정하였다.

(1) 형태학적 특성조사

선발된 8균주는 모두 그람음성, 단간균 또는 장간균을 형성하는 것도 있으므로 형태적 다양성을 갖고 있으며, 고체배지에서의 colony는 pale yellow, yellow와 orange 등의 색을 갖고 있으며, 모양은 원형 또는 부정형의 형태로 나타났다. 액체배지에서 모두 잘 자랐으며 배양액 밑에 침전하였다. 또한 KNOUC105를 제외하고는 spore를 형성하지 않고, 운동성이 없으며 모두 70℃에서 모두 잘 자랐다. 선발균주의 형태 및 그람 염색성이 figure 1-6에 제시되어 있다.

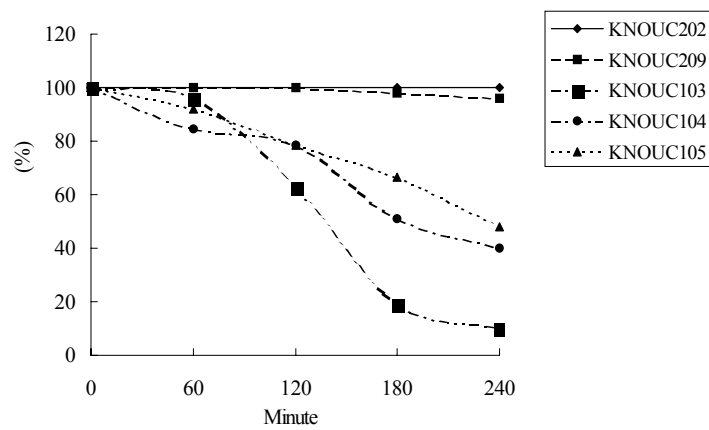
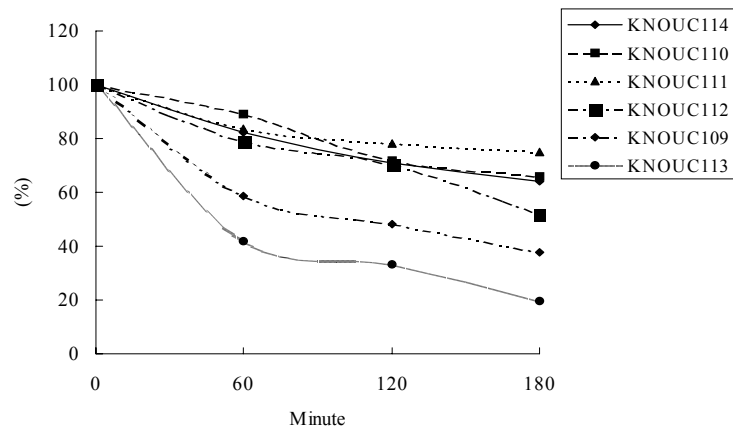


Figure 1-4. Stability of β -galactosidase at 70°C
(in citric acid- Na_2HPO_4 buffer, 0.00443M, pH 6.8)

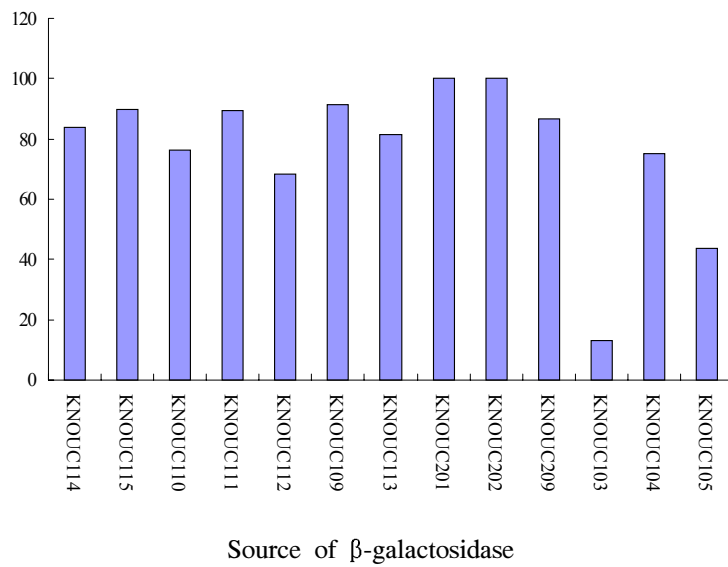


Figure 1-5. Effect of freezing and thawing on β -galactosidase activity (freezing at -20°C , thawing at 4°C)



KNOUC104



KNOUC105



KNOUC110



KNOUC111



KNOUC112



KNOU114



KNOUC202



KNOUC209

Figure 1-6. Morphology and Gram reaction of selected microorganisms ($\times 1000$)

(2) 생리, 생화학적 특성 조사

선발된 균주는 모두 catalase 음성, oxidase음성, urease 양성으로 나타났으며, 산소요구성은 모두 aerobic bacteria로 판정되었다. 선발된 미생물의 생리, 생화학적 특성은 다음 table 1-5, 1-6과 같다.

여러가지 형태적, 생리 생화학적 특성으로 보아 분리된 균들은 KNOUC 105를 제외하고는 *Thermus* sp.로 추정된다. KNOUC105는 *Geobacillus* sp.로 추정된다.

Table 1-5. Physiological and biochemical properties of selected microorganism (KNOUC114, 110, 112, 202)

Isolated strains	KNOUC114	KNOUC110	KNOUC111	KNOUC112	KNOUC202
Tests					
<u>1. Morphological properties</u>					
Shape	rod	rod	rod	rod	rod
Motility	-	-	-	-	-
Gram's stain	-	-	-	-	-
Flagellum	-	-	-	-	-
Spore	-	-	-	-	-
<u>2. Growth on media</u>					
Agar plate medium	Circular Yellow	Irregularly circular Orange	Irregular,ly circular Orange	Circular, Yellow	Circular, Orange
Agar slant medium	Yellow	Orange	Orange	Yellow	Orange
Liquid medium	Grown well mass precipitation	Grown well mass precipitation	Grown well mass precipitation	Grown well mass precipitation	Grown well mass precipitation
<u>3. Biochemical properties</u>					
Nitrate reduction	-	-	-	-	-
VP test	+	+	+	+	+
Indole formation	-	-	-	-	-
Hydrogen sulfide formation	-	-	-	-	-
Citric acid utilization	-	-	-	-	-
Coloring matter formation	Yellow	Orange	Orange	Yellow	Yellow
Urease test,	+	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	+	+
Oxidase test,	+	+	+	+	+
O-F test	O	O	O	O	O
Gelatin liquiefaction	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+
Oxygen requiremen	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+
Ornithine	+	+	+	+	+
Tryptophane	+	+	+	+	+

Table 1-5 -continued

I s o l a t e d strains tests	KNOUC114	KNOUC110	KNOUC111	KNOUC112	KNOUC202
	4. Assimilation of sugar				
Glucose	+	+	-	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Galatose	+	+	+	+	+
Saccharose,	-	-	-	-	-
Trehalose,	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+
Fructose	-	+	+	+	-
Xylose	+	+	+	+	+
Identification	<i>Thermus</i> sp.	<i>Thermus</i> sp.	<i>Thermus</i> sp.	<i>Thermus</i> sp.	<i>Thermus</i> sp.

Table 1-6. Physiological and biochemical properties of selected of microorganism (KNOUC 209, 104, 105)

Isolated strains	KNOUC209	KNOUC104	KNOUC105
Tests			
<u>1. Morphological properties</u>			
Shape	rod	rod	rod
Motility	-	-	-
Gram's stain	-	-	-
Flagellum	-	-	-
Spore	-	-	+
<u>2. Growth on media</u>			
Agar plate medium	Irregularly circular Yellow	Irregularly circular Yellow	Irregularly circular Yellow
Agar slant medium	Yellow	Yellow	Yellow
Liquid medium	Grown well mass precipitation	Grown well mass precipitation	Grown well mass precipitation
<u>3. Biochemical properties</u>			
Nitrate reduction	-	+	+
VP test	+	+	+
Indole formation	-	-	-
Hydrogen sulfide formation	-	-	-
Citric acid utilization	-	-	-
Coloring matter formation	Yellow	Yellow	Yellow
Urease test,	+	+	+
Catalase test	+	+	+
Oxidase test,	+	+	+
O-F test	O	O	O
Gelatin liquefaction	+	+	+
Hydrolysis of ONPG	+	+	+
Oxygen requiremen	+	+	+
Arginine	+	+	+
Lysine	+	+	+
Ornithine	+	+	+
Tryptophane	+	+	+

Table 1-6. -continued

Isolated strains	KNOUC209	KNOUC104	KNOUC105
Tests			
<u>4. Assimilation of sugar</u>			
Glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Rhamnose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Melibiose	+	+	+
Amygdalin	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Galatose	+	+	+
Saccharose,	-	-	+
Trehalose,	-	-	+
Lactose	+	+	+
Fructose	-	-	+
Xylose	+	-	+
Identification	<i>Thermus sp.</i>	<i>Thermus sp.</i>	<i>Geobacillus sp.</i>

제 2 절 내열성 유당분해효소 유전자의 분리

1. 서론

내열성 유당분해효소의 유전자를 분리하여 구조를 규명하는 것을 효소의 특성을 예측하고 개선할 수 있는 근거가 될 뿐만 아니라, 내열성 유당분해효소는 70℃ 이상의 고온에서 잘 성장하는 고온성 미생물로부터 분리되며, 그러한 고온성미생물은 생장이 나쁠 뿐만 아니라 효소 생산효율도 대단히 낮다. 본 연구에서 확보, 분리한 미생물 들은 모두 고온성미생물이며 고온성 유당분해효소의 생산능력이 높지 않다. 그러므로 유전자를 분리하여 번식이 용이하고 생산효율이 높은 미생물에 전이해야 한다. 내열성 유당분해효소 생산 미생물로 확보, 분리한 미생물로부터 유전자를 분리하여 대장균에 전이하였고, nucleotide배열순서를 규명하였다.

2. 재료 및 방법

1) 유전자의 분리

(1) PCR에 의한 유전자분리

가. Primer

Thermus sp. A4 (Ohtsu, 1998)와 *Thermus sp.* T2 (Vian 등, 1998)의 β -galactosidase 유전자를 비교하여 다음과 같은 redundancy primer를 제조하였다.

Forward primer : 5'atgYtSggcgtttgYtaYtacc3'

Reverse primer : 5'tcatgYctcctcccaSacg3'

나. PCR

다음과 같은 touch down PCR을 실시하였다. Chromosomal DNA를 94℃에서 3분 denaturation 후 denaturation (94℃, 25sec), annealing (66-55℃, 30 sec, increment 5 sec/cycle), elongation (72℃, 2min)의 cycle을 10회 실시하고 denaturation (94℃, 25 sec), annealing (55℃, 30 sec, increment 5 sec/cycle), elongation (72℃, 2 min)의 cycle을 25회 실시한 후 72℃에서 7분 처리하였다. DNA polymerase는 Taq DNA polymerase를 사용하였다.

다. DNA단편 분리

1% agarose에서 전기영동한 후 GeneClean법 (Biol01, 1999)으로 분리하였다.

라. Cloning

분리한 PCR단편을 insertion site의 3'말단에 thymidin 염기접착말단을 가지는 pGEM-T vector (promega, 1998)의 ECoRV site에 삽입하여 *E. Coli* JM109에 전이, cloning하였다.

pGEM-T Easy에 삽입된 유전자를 분리하여 발현 vector인 pET-5b의 ECoR I site에 삽입후 *E. Coli* JM109 (DE3)에 전이하였다. LB agar (Amp+)에서 colony를 형성한 형질 전환 *E. Coli*를 유전자발현 시험에 사용하였다.

(2) Chromosomal DNA의 부분분해에 의한 유전자의 분리

① Chromosomal DNA분리

미생물을 *Thermus* enhanced medium No. 1598 (100 ml)에서 A600 1.2-1.3이 되도록 배양한 후 원심분리 (4000 rpm, 10 min)로 미생물체를 회수하여 DW로 3회 세척하였다.

Tris-HCl (10 mM, pH8.0) 용액에 미생물체를 resuspension한 후 냉동과 해동을 3회 반복하여 cell wall을 물리적으로 약화시키고 lysozyme, Rnase첨가 후 37°C에서 한시간 동안 incubation하였다.

EDTA, SDS, proteinase K처리 후 서서히 교반하면서 37°C에서 overnight하여 세포체를 분해하였다.

Phenol처리와 PCI (phenol:chloroform:isoamyl alcohol = 25:24:1) 처리후 원심분리하여 단백질과 세포과편을 침전시키고 aqueous phase의 DNA를 취하였다.

Ethanol precipitation (3M, pH5.2 sodium acetate + 2 volume의 cold ethanol) 후 glass rod로 DNA hooking up 후 70%, 90%, 100% ethanol에 차례로 세척 후 clean banch에서 건조하였다.

멸균증류수 1.5~2.0 ml를 첨가하여 DNA를 용해한 후 DNA 농도를 260 nm와 280 nm에서 OD를 측정하여 OD260/OD280로 purity를 계산하였다. 분리한 chromosomal DNA는 -20°C에서 보관하였다.

나. Chromosomal DNA의 부분분해

Chromosomal DNA 25 μ g이 존재하는 200 μ l에 Sau3A1 2 unit를 첨가한 후 30 $^{\circ}$ C에서 반응하여 부분분해하였다. KNOUC114와 202, 110, 112의 경우는 Sau3A1을 1 unit 첨가하였다. 분해는 chromosomal DNA가 분해되어 agarose 전기영동상에서 나타나지 않고 DNA가 크기별로 골고루 분포될 때까지 진행하였다.

다. 3-9 kb DNA절편분리

부분분해한 chromosomal DNA분해물 200 μ l를 sucrose 11.5-38.5%의 density gradient 38 ml상에서 26,000 rpm (17시간, 20 $^{\circ}$ C)으로 초원심분리하여 3-9 kb DNA절편을 분리, 회수하였다. 초원심분리후 tube하단으로부터 250-500 μ l씩 분획을 분리하고 각 분획의 DNA단편크기를 agarose 전기영동상에서 확인하여 3-9 kb 분획을 취하였다.

부분분해한 chromosomal DNA분해물을 agarose에서 전기영동후 geneeclean법 (Bio101, 1999)으로 분리하는 것을 병행하였다.

라. Cloning

3~9 kb DNA 절편을 pUC118에 ligation 후 LacZ gene의 ω -fragment를 소실케 한 *E. Coli* TOP10F, *E. Coli* XL1-Blue 또는 *E. Coli* JM109 (DE3)에 삽입하였다. *E. Coli*의 형질전환은 CaCl₂법 또는 electroporation법에 의하여 실시하였다. LB agar (Amp⁺)에서 colony를 형성한 형질전환 *E. Coli*를 유전자발현시험에 사용하였다.

(3) 유전자의 발현

LB agar (Amp⁺)에서 colony를 형성한 형질전환 *E. Coli*를 Dion 등 (1999)의 방법을 변형하여 유전자가 발현되는 colony를 분별하였다. 형성된 colony를 70 $^{\circ}$ C에서 2시간 가열하여 *E. Coli*의 β -galactosidase를 불활성화시켰다. 그 위에 X-gal이 1.4 mg/ml 포함된 z-buffer (500 ml 조성 : Na₂HPO₄ · 7H₂O - 8.05 g, NaH₂PO₄ · H₂O - 2.75 g, KCl - 0.325 g, MgSO₄ · H₂O - 0.123 g, β -mercaptoethanol- 1.35 ml, pH7.0)를 가하고 70 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응 후 X-gal분해 후 나타나는 청색으로 유전자의 발현을 확인하여 고온성 유당 분해효소 유전자를 가지는 colony를 분리하였다. 분리된 *E. Coli*의 crude cell extract를 polyacrylamide 농도 7.5%의 SDS PAGE를 실시하여 (Laemmli, 1970) Coomassie brilliant blue 염색과 ONPG 분해능을 가지는 band로서 확인하였다.

분리한 colony로부터 plasmid를 분리, 제조한 후 subcloning, DNA sequencing을 거쳐 유전자를 분리하였다.

2) 유전자의 DNA sequencing

Big Dye Automatic sequencer (ABI 377)과 PE9600 Thermocycler (Perkin Elmer)를 사용하여 유전자의 nucleotide의 sequence를 결정하였다. 유전자의 homology 분석은 NCBI의 자료를 Blast2.1 program으로 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

1) β -galactosidase

Thermus sp. KNOUC112, *Thermus sp.* KNOUC114로부터 PCR에 의해 β -galactosidase 유전자를 분리하였으며 유전자들을 각각 KNOUC112 β -gal, KNOUC114 β -gal라고 명명하였다. *Geobacillus sp.* KNOUC 105와 *Thermus sp.* IB-21 (ATCC 43815)로부터 chromosomal DNA를 부분 분해하여 β -galactosidase 유전자를 분리하였으며 이 유전자들을 각각 KNOUC105 β -gal, tib5 β -gal이라 명명하였다. 이들의 deoxyribonucleotide 및 아미노산 구성은 figure 2-1, 2-2, 2-3, 2-4에 제시되어 있는 바와 같다.

KNOUC112 β -gal, KNOUC114 β -gal 모두 deoxyribonucleotide 1938쌍으로 구성되어 있으며, 두 유전자로부터 생산되는 β -galactosidase는 모두 645개의 아미노산으로 구성되고 분자량은 각각 72,896 dalton, 72,784 dalton으로 추정된다.

KNOUC112 β -gal의 *Thermus sp.* A4 β -galactosidase (Ohtsu 등, 1998) 유전자와의 homology는 99%이고 아미노산은 2개만이 상이하며, *Thermus sp.* T2 β -galactosidase 유전자 (Vian 등, 1998)와의 homology는 83%이었다.

KNOUC114 β -gal은 *Thermus sp.* A4 β -galactosidase 유전자와 homology가 99%이고 *Thermus sp.* IB-21의 β -galactosidase 유전자와 homology는 92%이고 *Thermus sp.* T2의 β -galactosidase 유전자 (tib β -gal)와의 homology는 86%이었다. Lac-KNOUC112와는 deoxyribonucleotide가 7쌍 다르고 아미노산은 4개가 다르다.

KNOUC105 β -gal은 deoxyribonucleotide 2016개쌍으로 구성되어 있고 이 유전자로부터 상관되는 β -galactosidase는 672개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 78,048 da으로 추정된다. 이 유전자는 *Bacillus Stearotherophilus*의 β -galactosidase 유전자 (Hirata, 1986)와 homology가 99%이었고 *Thermus sp.* A4의 β -galactosidase 유전자 (Ohtsu, 1998)와는 homology가 32%이다.

tib5 β -gal은 *Thermus sp.* A4 β -galactosidase 유전자 및 *Thermus sp.* T2 β -galactosidase 유전자와 homology가 각각 92%, 86%이다.

ATGCTCGGCGTTTGTATTACCCCGAACACTGGCCCAAGGAGCGCTGGAAGGAGGACGCCCGGCATGCGGGAAGCGGGCTTTCCCATGTACGTATAGGGAGTTGCGCTGGGCGCTTA
 M L G V C Y Y P E H W P K E R W K E D A R R M R E A G L S H V R I G E F A W A L

TTGGAACCGGACCTGGAAGGCTGAGTGGGTTGGTTGGACGAGGCCATGCCACCCCTGGCCGCCGAGGGCTTAAGTGGTCTGGGCACGCCACGGCACGCCCGCAAGTGCTC
 L E P E P G R L E W G W L D E A I A T L A A E G L K V V L G T P T A T P P K W L

GTAGACCGTTATCCGAGATCCTCCCGTGGACCGGGAAGGGCGGAGCGCGGTTGGGGGCGCGGCACTACTGCTTTTCCAGCCCGGTTACCGGGAAGAGGCCCGGCATCGTG
 V D R Y P E I L P V D R E G R R R R F G G R R H Y C F S S P V Y R E E A R R I V

ACGCTACTGCCGAGCGCTACGGGGCCCTGAGGCCGTGACGGGCTCCAGACCGACAACGAGTACGGCTGCCACGACCGTGCCTGCTACTGCCCGGCTGCCAAGAGGCTTCCGG
 T L L A E R Y G G L E A V T G F Q T D N E Y G C H D T V R C Y C P R C Q E A F R

GGGTGGCTGAGGCCCGTACGGCACCATTGAAGCCCTGAACGAGGCCCTGGGGACGGCTTCTGGAGCCAGCGTTATCGGAGCTTTCCGAGGTGGAGCTCCCCACCTCACCGTGGCC
 G W L E A R Y G T I E A L N E A W G T A F W S Q R Y R S F A E V E L P H L T V A

GAGCCTAACCCGAGCCACTCTGGACTACTCGCTTCGCCTCGGACAGGTGAGGGCTTTAACCGCTCCAGGTGGAGATCCTGAGGGCCATGCCCGGGAAAGTTCGTACCCAC
 E P N P S H L L D Y Y R F A S D Q V R A F N R L Q V E I L R A H A P G K F V T H

AACTCATGGGCTTCTCACCGACTTGGACGCTTTCGCCTTGGCCAGGACCTGGACTTCGCCAGCTGGACAGCTACCCCTCGGGCTTCCAGCCTCATGCCCTACCTCCGGAGGAG
 N F M G F F T D L D A F A L A Q D L D F A S W D S Y P L G F T D L M P L P P E E

AAGTCCGCTACGCCCGCACCGGCCACCCCGACGTGGCCGCTTCCACCACGACCTTACCAGGGGGTGGGACGGGGAGGTTTGGGTGATGGAGCAACAGCCGGGCGCTGTGAACCTGG
 K L R Y A R T G H P D V A A F H H D L Y R G V G R G R F W V M E Q Q P G P V N W

GCCCTCACAAACCGAGCCCGCTCCCGGATGGTGGCGCTTGGACCTGGGACCCCTGGCCACCGTGGGAGGTGGTTTCTACTTCCGCTGGCGCCAGGCCCTTTTCCCGAGGAG
 A P H N P S P A P G M V R L W T W E A L A H G A E V V S Y F R W R Q A P F A Q E

CAGATGCACGCCGGGTCCACCGACCGGATTCTGCCCGGACCAAGGCTTCTTTGAGGGAAGCGCTGCCGAGGAGCTGCCCGCCTGGCCCTGCCCTCCCGTGGCCAGGCCCTGTG
 Q M H A G V H R P D S A P D Q G F F E A K R V P E E L A A L A L P P V A Q A P V

GCCCTGGTTTTTACTACGAGGGCGCTGGATTACGAGGTCCAGGCCCAAGGGCAGAGTGGAGCTATCTGGGCTCGTCTATCTCTTTTACAGCGCCCTCCGGCGGCTGGGACTGGAT
 A L V F D Y E A A W I Y E V Q P Q G A E W S Y L G L V Y L F Y S A L R R L G L D

GTGGATGTGTTCCCGGGGGCTTCTTAAGGGCTACGCCTTCGCCGTGGTCCCGAGCCTCCCATCGTGGGGAGGAGGCTTGAAGCCTTCCGGGAAGCCGAGGGGCGCTGTCCCTC
 V D V V P P G A S L R G Y A F A V V P S L P I V R E E A L E A F R E A E G P V L

TTCGGTCCCGCTCGGGAGCAAGACGAAACTTTTTCAGATTCCCAAGGAGCTTCTCCCGCCCTCCAGGCCCTCCTTCCCGTTAAGTGGTTGGGTGGAAAGCCTTCCCGGGT
 F G P R S G S K T E T F Q I P K E L P P G P L Q A L L P L K V V R V E S L P P G

CTTCTAGAGGTGGCGAGGGGGCGCTCGGCCGCTTCCCTCTGGGTCTGTGGCGGAATGGGTGGAGGCTCCCTAAAGCCCTCCTTACCTTCCAGGACGGGAAGGGAGCCCTTACCGG
 L L E V A E G A L G R F P L G L W R E W V E A P L K P L L T F Q D G K G A L Y R

GAGGGGATACCTTACCTTGGGCGCTGGCCCTCGCCGAACCTCGCGGGAGGCTCCTCTCGCTCTCGCCCGAGGGCGGCTAAAGTCCCTTCCCTGCCGAGGGGCTAAGGCTC
 E G R Y L Y L A A W P S P E L A G R L L S A L A A E A G L K V L S L P E G L R L

AGGCGCGGGGACCTGGTCTTTGCCCTCAACTACGGGCCGAGGCGGTGGAGGCCCGCCCTCAGAGGGGGCCGGTTCTCTGGGAGTAGGCGGGTGGGCCCTTATGACCTCGCC
 R R R G T W V F A F N Y G P E A V E A P A S E G A R F L L G S R R V G P Y D L A

GTCTGGGAGGACATGA
 V W E E T Z

Figure 2-1. Lac-KNOUC112 of the β -galactosidase gene (KNOUC112 β -gal) of *Thermus sp.* KNOUC112 and deduced amino acid sequence

ATGCTCGGCGTTTGTACTACCCGAACTGACCCCAAGGAGCGCTGGAAGGGGACGCGCGCGCATGCGGGAAGCGGGCTTTCCCATGTACGTATAGGGAGTTGCGCTGGGCTTA
 M L G V C Y Y P E H W P K E R W K G D G R R M R E A G L S H V R I G E F A W A L

 TTGGAACCGAGCCCTGGAAGGCTGGAGTGGGGTTGGTTGGACGAGGCCATCGCCACCTTGGCCGCGGAGGGCTTAAGGTGGTCTTGGGACGCGCCACGCGCACGCGCCCAAGTGGCTC
 L E P E P G R L E W G W L D E A I A T L A A E G L K V V L G T P T A T P P K W L

 GTAGACCGTTATCCGAGATCTCCCGGTGGACCGGGAAGGGCGGAGCGCGGCTTGGGGGGCGCGGCACTACTGCTTTTCCAGCCCCGTTTACCGGGAAGAGGCCCGCGCATCGTG
 V D R Y P E I L P V D R E G R R R R F G G R R H Y C F S S P V Y R E E A R R I V

 ACGCTACTCGCCGAGCGCTACGGGGGCTCGAGGCGGTGGCGGGCTTCCAGACCGACAAGGTAAGGCTGCGCCAGACACCGGTGCGCTGCTACTGCCCCGCTGCCAAGAGGCTTCCGG
 T L L A E R Y G G L E A V A G F Q T D N E Y G C H D T V R C Y C P R C Q E A F R

 GGTTGGCTCGAGGCGCGTACGGCAACITGAAGCGCTGAACGAGGCTTGGGGGACGGCTTCTGGAGCCAGCGTTATCGGAGCTTTGGCGAGGTGGAACTCCCGCCACTCACCGTGGGC
 G W L E A R Y G T I E A L N E A W G T A F W S Q R Y R S F A E V E L P H L T V G

 GAGCCTAACCGAGCCACTCTGGACTACTACCGCTTCGCTCGAACCAGTGAAGGCGCTTAAACCGCTCCAGGTGGAGATCTGAGGGCCCATGCCCCGGGAAGTTGTCACCCAC
 E P N P S H L L D Y Y R F A S D Q V R A F N R L Q V E I L R A H A P G K F V T H

 AACTCATGGGCTTCTTCCGACTTGGACGCTTTCGCTTGGCCAGGACCTGGACTTGGCCAGCTGGGACAGCTACCCCTTGGGCTTAAACCGCTTAAAGCGCTTACCTCCCGAGGAG
 N F M G F F T D L D A F A L A K D L D F A S W D S Y P L G L T D L M P L P P E E

 AAGCTCCCTACGCGCGCACCGGCGCCACCGGACCTGGCCGCTTCCACCAGCCTTACCAGGGGGTGGGACGGGGGAGGTTTGGGTGATGGAGCAACAGCGCGGCGCTGTGAACCTG
 K L R Y A R T G H P D V A A F H H D L Y R G V G R G R F W V M E Q Q P G P V N W

 GCGCTCACACCGCGAGCGCGCTCCCGGGATGGTGGCGCTTGGACCTGGGAGCGCTTGGCCACCGGTGGGAGGTTTCTTACTTCCGCTGGCGCCAGCGCGCTTTTGGCGAGG
 A P H N P S P A P G M V R L W T W E A L A H G A E V V S Y F R W R Q A P F A Q E

 CAGATGACGCGCGGGTCCACCGACCGGATCTGCCCCGACCGAAGGTTCTTTGAGGCGCAAGCGCGTGGCCAGGAGTTGCGCGCGCTGGCCCTGCGCTCCCGTGGCCAGGCGCGCTG
 Q M H A G V H R P D S A P D R R F F E A K R V A Q E F A A L A L P P V A Q A P V

 GCGCTGGTTTGTACTACGAGCGCGCTGGATTGAGGTTCCAGCGCGCAAGGGGAGAGTGGAGCTATCTGGGCTCGTCTATCTCTTTTACAGCGCGCTCCCGCGCTGGACTGGAT
 A L V F D Y E P A W I Y E V Q P Q G A E W S Y L G L V Y L F Y S A L R R L G L N

 GTGAATGGTTCCTCCCGGGGCTTCTTTAAGGGGCTACGCGCTTGGCGGTGGTCCCGAGCGCTCCCATCGTGGCGGAGGAGCGCTTGGAAAGCTTCCCGGGAAGCGGAGCGCGCTGCTC
 V N V V P P G A S L R G Y A F A V V P S L P I V R E E A L E A F R E A E G P V L

 TTGCTTCCCGCTCGGGAGCAAGACCGAACTTTTCAGATTCCCAAGGAGCTTCCCTCCCGCGCGCTCCAGGCGCTTCCCTCCCGTTAAGGTGGTTCGCGTGGAAAGCGCTTCCCGCGGT
 F G P R S G S K T E T F Q I P K E L P P G P L Q A L L P L K V V R V E S L P P G

 CTTCTAGAGGTGGCGAGGGGGCGCTCGGCGCGCTTCCCTCTGGGTCGTGGCGCGAATGGGTGGAGGCTCCCGTAAAGCGCGCTTCTTACCTTCCAGGACCGGGAAGGGAGCGCTTACCGG
 L L E V A E G A L G R F P L G L W P E W V E A P L K P L L T F Q D G K G A L Y R

 GAGGGCGATACTCTTACCTTGGCGCTGGGCGCTCGCGCGAAGCTCGCGGGGAGGCTCTCCGCTCTCGCGCGGAGCGCGCGCTAAAGGTCTTTCCCTCGCGGAGGCGCTTAAAGGCTC
 E G R Y L Y L A A W P S P E L A G R L L S A L A A E A G L K V L S L P E G L R L

 AGCCGCGGGGAGCTGGGCTTTTGGCTTCAACTACCGGCGCGGAGGCGGTGGAGGCGCGCGCGCTCAGAGGGGGCGCGGTTCTTCTGGGGAGTAGGCGGGTGGGCGCTTATGACTCGCC
 S R R G T W V F A F N Y G P E A V E A P A S E G A Q F L L G S R R V G P Y D L A

 GTCTGGGAGGAGACATGA

 V W E E T Z

Figure 2-2. Deoxyribonucleotide and deduced amino acid sequence of the β -galactosidase gene (KNOUC114 β -gal) of *Thermus sp.* KNOUC114

1 GATCACCCGCGTTTTTCGACATTTTGTGAAAGCTGCTCAGGAGCGGAGGGCGT 60
 61 TGACCCGGGGATTCTCTATTATATGCGCAACATGGACGAGCGACAACACTGACGCCAT 120
 121 CTCGCGCTGAAAATCCAGTACGCGCACAGTCTCGTTTACCCAGTGAGCGCCATGGCGC 180
 181 CCAGTCTCGGCGGTGCCGAACCACCAAGTCCGGCGGGTGACATCGTCAAGATGCGCG 240
 241 CCATGTCGCGATGTCAGGCAACTTCGGCTATGAGCTCGATATCAAGAAATGACGGAAAC 300
 301 AGAAAACAAATCATCAAGGAACAAGTCCGTTTTACAGGACGTGCGCCCTCGTCCA 360
 361 GTTCGGTACGTCTATCGGTGTTAAGCCATTGAGGGCAATGAGCAGCATGGATGTT 420
 421 CGTCTCTGCGACCGCTCGGAAGCGCTCGTCCCTACTCCCGTTCGCGCGAAGCGAA 480
 481 CGCGCGCTGTCTACAGTGGCGCTTAAAAGTCTTGAACCGAATCAAGACTATGAAATCGA 540
 541 AGGCTTGGCGTCTACGCGCGGACGAGCTGATGTATGCCGGAGTGGCGGTGCGCACCG 600
 601 CTCGGCGATTTTATCAGCATGATGTGGCGATTGAAAGCGCTTCGATGATAGGGGAATG 660
 661 ATGCGCGCTGAGCTGAGGCATCAGCGGAAACAAAGAAATCGAACCGCATGTTAGATG 720
 721 CCGGTTCAAACGTGTTGAGCTTCTCGATGATGCGCGCTTCGATAAAGCATCTCCCG 780
 781 GTTTCGGCGATGCTTCATATAACGATTTGTTAACAAGCGAACCGAAATGACCGCGATG 840
 841 ATCGGTACCGCTTGAAACAGCTTTTCCATCCGTATGGTCCGCGAACGTCATCACT 900
 901 TCCCGCAGCTTGCAGTTGGAAGACGCGCCCGCGTTCATGGGAGAGCGAAGT 960
 960 TGTCGCAAAATCGCTTTTTCGCGAGATGTCCCGCGCGCAAACTGCAAGCATTTGAGC 1020
 1021 ACAAACACGCGCTCCCTTTTTTCTCGGGTCATATCGGTACAGATGGCGATCTCTTGC 1080
 1081 AGCGTTTTCAGCGCTAAGCGGAGAGCGCGGAATGTCCACCGCAGCGTCAGCGCCCG 1140
 1141 CCCATTCCAGTCCGCGCCCTTGCAGCTGGCGGAATGTGACGCGGCATCGATCAACTCG 1200
 1201 TCGCAAAACGCGATCCATCGTCCAGCGGCAAGTGGCGCACTTCGCGCAACGAGCATAG 1260
 1261 CCAAGCTTGTCCAATACCTTCCCTCATTCAACAGTATTGCCCGCGCTTTGAATATAG 1320
 1321 CTGCCAACTCATCAAGCAGCTGCCCGAGTTTTCGATGGATGATTTGGGGTCAGTTTA 1380
 1381 TCGAGCACTGAAACGCGCAAGCGCGGAGCTTTTCCAAAACCATAGTCTTTTTGGGAG 1440
 1441 TGTCCAGTCCGATGGTTGAAGTCTGTTTGTGATGTTACTGTATCCTTCATA 1500
 1501 AAATGTCCTCGACCATGTTGAATCACTGTCTTAGGTTGAGGATTAGGCAAGTCTT 1560
 1561 TTATACGCGTTTTAAGTAAGAGGGCTTAATGAAGTCAAGGGTTATACTAATACTAGAT 1620
 1621 ACACCAATTCCCGATATTCGACAGAAAATATTTTATCCTGCCGAAAGACGAAATTT 1680
 1681 TCCATTGCGAGGGCCATATATGTTGTTCTAATTAATAATATATTTATTTAGT 1740

Thymin-Adenosin Rich Region

1741 AAAATCTGTGTTGACAAATACTAAATTTAACTTAATTTATAATTAACAAAAATTAA 1800
 -35 -10 mRNA

1801 CTAGGGGAATAATTATGAATGTTTATCCTCAATTTGTACGAGGAGATTATAACCCA 1860
 RBS M N V L S S I C Y G G D Y N P

1861 GAGCAATGGCCAGAGAAAATTTGATGAAGATGCTAAGTTGATGCAAAAAGCGGGGTTG 1920
 E Q W P E E I W Y E D A K L M Q K A G V

1921 AATTTAGTATCTTTAGGGATTTTCAGTTGGAGCAAGATTGAACCGTCTGATGGTGTTC 1980
 N L V S L G I F S W S K I E P S D G V F

1981 GACTTTGAATGGCTAGACAGGTTATAGATATACTATATGACCGGTTTATATTAAC 2040
 D F E W L D K V I D I L Y D H G V Y I N

2041 TTGGGACCGCGACTGCAACTACTCCAGCTTGGTTTGTAAAAAGTATCCAGATICTTGG 2100
 L G T A T A T T P A W F V K K Y P D S L

2101 CGATCGATGAAAGCGGTGTCAITCTCTCGTTTGGCAGTAGACAACATTATTGTCTAAT 2160

P I D E S G V I L S F G S R Q H Y C P N

2161 CATCCTCAATTAATTAC9CACATAAAGAGACTTGTAAAGGCTATAGCAGAAGCGTATAAA 2220

H P Q L I T H I K R L V R A I A E R Y K

2221 AATCATCCGCACTCAAAATGTGGCATGTTAATAATGAGTATGCATGTCAAGTTTCCAAG 2280

N H P A L K M W H V N N E Y A C H V S K

2281 TGTITTTGCGAGAATTGTGCTGTGCGTTTAGGAAGTGGCTAAAGGAAAGATATAAACA 2340

C F C E N C A V A F R K W L K E R Y K T

2341 ATCGATGAATTAATGAACGTTGGGGTACAACTTTTGGGACGCGATACAATCATTGG 2400

I D E L N E R W G T N F W G Q R Y N H W

2401 GATGAAATTAATCCTCTAGAAAAGCAACCACTTTTATTAAATCCATCCCAAGAAGTTGAT 2460

D E I N P P R K A P T F I N P S Q E L D

2461 TACTACCGTTTATGAATGACTCAATCTCAAGTGTITTTAACAGAAAAGAAAATTTTA 2520

Y Y R F M N D S I L K L F L T E K K I L

2521 CGTGAATTAACACCAGATAITCCAGTATCAACTAATTCATGGGTTGTTCAAAACGTTA 2580

R E L T P D I P V S T N F M G S F K P L

2581 AACTATTTTCAATGGGCTCAACATGTGGATATTGTGACATGGGACTCATATCCTGATCCC 2640

N Y F Q W A Q H V D I V T W D S Y P D P

2641 AGAGAGGGCTTGCCAATTCAGCACGCCATGATGAATGACCTTATGCGTAGTTTAAGAAA 2700

R E G L P I Q H A M M N D L M R S L R K

2701 GGTCAACCATTATTTTGTATGGAGCAGGTAACCTCACATGTTAACTGGCGGATATTAA 2760

G Q P F I L M E Q V T S H V N W R D I N

2761 GTTCCAAAACCGCCAGGTGTAATGCGTCTATGGAGTTATGCAACTATTGCCCGTGGTCCA 2820

V P K P P G V M R L W S Y A T I A R G A

2821 GATGGTATTATGTTTTTCAAGTGGCGTCAAAGTAGAGCAGGAGCTGAAAAATCCACGGT 2880

D G I M F F Q W R Q S R A G A E K F H G

2881 GCAATGTTCCACACTTTTGAACGAGAATAATAGAATTTATAGGGAAGTTACACAGTTG 2940

A M V P H F L N E N N R I Y R E V T Q L

2941 GGGCAAGAGCTGAAAAAGTTAGATTGTTTGGTGGATCTAGAATCAAGGCAGAGGTCGCG 3000

G Q E L K K L D C L V G S R I K A E V A

3001 ATCATTITTTGATTGGGAAAACGTTGGGCTGTGCAACTAAGTTCCAAACACATAATAA 3060

I I F D W E N W W A V E L S S K P H N K

3061 CTAAGATATATCCTATAGTTGAAGCTTATTATAAGGAATTATATAAACCAATATTCCT 3120

L R Y I P I V E A Y Y K E L Y K R N I A

3121 GTCGATTTGTAAGGCCATCTGAGGATCTAACAAAATACAAAGTATTATGCTCCAATG 3180

V D F V R P S E D L T K Y K V V I A P M

3181 TTATATATGGTTAAAGAGGGAGAAGATGAAAACCTACGGCAATTTGTGCTAACGGTGGC 3240
L Y M V K E G E D E N L R Q F V A N G G

3241 ACTTTGATTGTTCAGTTTCTTCAGTGGCATTGTAGATGAAAATGACCGTGTGCATCTAGGC 3300
T L I V S F F S G I V D E N D R V H L G

3301 GGATATCCTGGTCTCTGCGAGATAATTTGGGTATTTTGTGTGAGGAATTTGTACCATAC 3360
G Y P G P L R D I L G I F V E E F V P Y

3361 CCAGAAACAAAGGTAACAAAATATATAGTAACGATGGGAATATGATTGTACGACGTGG 3420
P E T K V N K I Y S N D G E Y D C T T W

3421 GCGACATAATCCGATTAGAAGGGGACAGACCTCTAGCAACATTTAAGGGGATTGGTAT 3480
A D I I R L E G A E P L A T F K G D W Y

3481 GCAGGACTTCCGGCCGTTACACGTAACCTCTACGGTAAAGGAGAGGGGATTTACGTGGC 3540
A G L P A V T R N C Y G K G E G I Y V G

3541 ACTTATCCAGATAGTAATTAATTTAGCGAGGCTTTTAGAACAGGTTTTCGCTAACATCAT 3600
T Y P D S N Y L G R L L E Q V F A K H H

3601 ATTAATCCCATTTCTTGAAGTAGCTGAAAATGTAGAGGTACAACAAAGAGAGACTGATGAA 3660
I N P I L E V A E N V E V Q Q R E T D E

3661 TGAAGTATTTAATTATTATCAATCATAATGATTACGAAGTGACACTGTCACTGCCAGAA 3720
W K Y L I I I N H N D Y E V T L S L P E

3721 GATAAGATATACCAGAATATGATTGATGGGAAATGTTTTCCAGGAGGTGAATTGAGGATT 3780
D K I Y Q N M I D G K C F R G G E L R I

3781 CAAGGGTTGATGTAGCAGTGTAAAGAGCATGATGAAGCCGGGAGGTTTAGAGAAGT 3840
Q G V D V A V L R E H D E A G K V -

3841 CTCGTTCCGACAGTTGGCAACATAATATGCATAAGATACAATGCTATAAACTGGATCT 3900

3901 TATGCACTTAGTAAAAAGACTCATTTCATTAAGACAACAACCTGAAAGACAACAACCTGAAA 3960

3961 AATTTATGTTTTTGGCTGTATATTCCTCTTTTCCACAAAAGTTCATAAGAATTAAGAG 4020

4021 TAGGAGGATTTCTTTGAAAAGATTTGACACTATTTTATAGTAAGTATTCCTCTATTA 4080

4081 ACTGCTTGTCTTCAGAAACGAAAACCGGTGGAGCTACAGATGGCGCAAAAAGTACGAAT 4140

4141 GAAATAACAGTGTGGACATGGGATC 4165

Figure 2-3. Deoxyribonucleotide and deduced amino acid sequences of the β -galactosidase gene (KNOUC105 β -gal) of *Geobacillus* KNOUC105

1 ATCATGGTGGGTTGCGTGTCTATGACGGCTCCCTTCGTGGCGCTTTTTCCTCTTCTGCAA 60
RBS *tibf-gal*→
61 CGCTACTTTCGTGGCGGGCATCACGGCGGGGGCCGTGAAGGAGTGAGCCATGCTTTGGCGTC 120
M L G V
121 TGCTACTACCCCGAACACTGGGCCAAGGCGCGCTGGAAAGGAGGACGCCCGGCATGGCG 180
C Y Y P E H W P K A R W K E D A R R M R
181 GAGGCGGGACTTTCTACGTGCGCGTGGGGGAGTTTCGCTGGGCCCTTATTGGAAACCGGAG 240
E A G L S Y V R V G E F A W A L L E P E
241 CCTGGAAGGCTGGAGTGGGGTTGGCTGGACGAAGCCCTCGCCACCCCTGGCCCGGAGGGG 300
P G R L E W G W L D E A L A T L A A E G
301 CTTAAGGTGGTCTGGGCACGCCACGCCACCCCAAGTGGCTCGTGGACCGCTAT 360
L K V V L G T P T A T P P K W L V D R Y
361 CCGGAGGTCTCCCGGTGGACCGGGAGGGGAGGCGCGGTTTGGGGGAGGCGGCAC 420
P E V L P V D R E G R R R R F G G R R H
421 TACTGCTTTTCCAGCCCGGCTACCGGGAGGAGCCCGCGCATCGTGAACCTCCTCGCC 480
Y C F S S P A Y R E E A R R I V T L L A
481 GAGCGCTACCGGGGCTCGAGGCCGTGGCGGGCTTCCAGACCGACAAOGAGTACGGCTGC 540
E R Y G G L E A V A G F Q T D N E Y G C
541 CACGGCACCGTGGCTGCTACTGCCCCCGCTGCCAGGAGGCCCTCCGGGGGTGGCTTAAG 600
H G T V R C Y C P R C Q E A F R G W L K
601 GCCCGGTACCGCACCATTTAGGGCCCTGAACGAGGCCCTGGGGCACGGCCCTTCGGAGCCAA 660
A R Y G T I E A L N E A W G T A F W S Q
661 CGTTATCGGAACTTTACCGAGGTGGAGCTCCCCACCTCACCGTGGCCGAGCCCAACCCG 720
R Y R N F T E V E L P H L T V A E P N P
721 AGCCACCTCCTGGACTACTACCGCTTGGCCCTGGACGAGGTGAGGGCCCTTAAACCGCCTC 780
S H L L D Y Y R F A S D Q V R A F N R L
781 CAGGTGGAGATCCTAAGGGCCCATGCCCCGGGGAAGTTTCATCACCCCAACTTCATGGGC 840
Q V E I L R A H A P G K F I T H N F M G
841 TTCTTACCGACTTGGACGCTTTTGGCTTGGCCAGGACCTGGACTTCGCGACGTGGGAC 900
F F T D L D A F A L A Q D L D F A S W D
901 AGCTACCCCTGGGCTTACCGACCTCATGCCCCTACCCCGGAGGAGAGCTCCGCTAC 960
S Y P L G F T D L M P L P P E E K L R Y
961 GCCCGCACCGGCCACCCCGAGGTGGCCGCTTCCACACGACCTCTACCGAGGGGTGGGG 1020
A R T G H P D V A A F H H D L Y R G V G
1021 CGGGGGAGGTTTCTGGGTGATGGAGCAGCAGCCCGGGCCCGTAAACTGGGCCCGCCACAAC 1080
R G R F W V M E Q Q P G P V N W A P H N

1081 CCGAGCCCCACCCCGGGATGGTGGCGCTTTGGACCTGGGAGGCCCTGGCCACGGCGCG 1140
P S P T P G M V R L W T W E A L A H G A

1141 GAGGTGGTCTCCTACTTCCGCTGGCGCCAGGCGCCTTTTGGCCAGGAGCAGATGCACGCC 1200
E V V S Y F R W R Q A P F A Q E Q M H A

1201 GGGCTCCACCGACCGGATTCCGCCCCGGACCAAGGCTTCTTTGAGGCAAAAGCAGGTGGCC 1260
G L H R P D S A P D Q G F F E A K Q V A

1261 GAGGAGCTCGCCGCGCTGGCCCTGCTCCCGTGGCCCAAGCCCCGCGTGGCCCTGGTCTTT 1320
E E L A A L A L P P V A Q A P V A L V F

1321 GACTACGAGGCGCCCTGGGTTTACGAGGTCCAGCCCCAGGGGGCGGAGTGGAGCTACCTG 1380
D Y E A A W V Y E V Q P Q G A E W S Y L

1381 GGCTCATCTACCTCTTTTACAGCGCCCTCCGCGGCTTGGGCTGGAGCTGGAGCTGGTG 1440
G L I Y L F Y S A L R R L G L D V D V V

1441 CCCCCGGGGGCTTCCTTAAGGGGCTACGCCCTAACCGTGGTCCCAAGCCTCCCCATCGTC 1500
P P G A S L R G Y A L T V V P S L P I V

1501 CGGGGGAGGCCCTAAAGGCCCTCCAGGAGGCCGAGGGAATCGTCTTCCGCTCCCCGC 1560
R G E A L K A F Q E A E G I V L F G P R

1561 TCGGAAGCAAGACCGAGACCTCCAGATCCCCAGGGAGCTCCCCCGGGCCCCCTACAG 1620
S G S K T E T F Q I P R E L P P G P L Q

1621 GCGCTCCCTCCCTTAAAGTGGTGGCGGTTGAAAGCCTTCCCCCGGGCCTCCTGGAGGTG 1680
A L L P L K V V R V E S L P P G L L E V

1681 GCGGAGGGGCTATGGGCGCTTCTCCCTGGGGCTTTGGCGGAGTGGGTGGAAAGCCCC 1740
A E G P M G R F S L G L W R E W V E S P

1741 CTTAGGCCCTGGTTGGCTTTGGCGATGGGGGCGGGGCCCTTTACCGGAGGGGCGGTAC 1800
L R P W L A F A D G G G A L Y R E G R Y

1801 CTGTACCTCGCCGCTGGCCCTCCCGGAGCTTTTGGGGTCTCCTGGCTGGCTTGGCC 1860
L Y L A A W P S P E L L G V L L A G L A

1861 CAGGAGGCGGGTGGGTCCCGTCTTTTCTGGCGGAGGCCCTAAGGCTCAGGCGCCCGGGG 1920
Q E A G L R P V F L P E G L R L R R R G

1921 CCCGGGTCTTCGCTTCAACTACGGCCCCGAGGCGGTGGAGGCCCTGCTCCGGAAGGG 1980
P W V F A F N Y G P E A V E A P A P E G
RBS

1981 GCCCGGTTCCCTGGGGGGTAAGCGGGTAGGCCCTTATGACCTCGCCGCTGGGAGGAG 2040
A R F L L G G K R V G P Y D L A V W E E
tib-gal→
2041 GCATG
A

Figure 2-4. Deoxyribonucleotide and deduced amino acid sequence of the β -galactosidase gene (*tib5 β -gal*) of *Thermus sp.* IB21 (ATCC43815)

2) β -glycosidase

Thermus sp. KNOUC202, *Thermus filiformis wai* 33A1 (ATCC43280), *Thermus flavus* AT-62 (ATCC33923), *Thermus thermophilus* HB8 (ATCC27634)에서 각기 한종의 β -glycosidase 유전자를 분리하였으며 각기 KNOUC202 β -gly, tfi β -gly, tat β -gly, thb β -gly라 명명하였다. *Thermus sp.* IB-21 (ATCC43815)로부터는 2종의 β -glycosidase 유전자를 분리하였으며 tib2 β -gly, tib10 β -gly이라 명명하였다. 이들의 deoxyribonucleotide 및 아미노산구성은 figure 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10에 제시되어 있다.

KNOUC202 β -gly는 deoxyribonucleotide 1,176쌍으로 구성되어 있으며, 이 유전자의 β -glycosidase는 391개의 아미노산으로 구성되고 분자량은 41,880 dalton으로 추정된다. *Thermus thermophilus* HB8의 β -glycosidase 유전자와 98%의 homology를 가지고 있다.

tfi β -gly, tat β -gly, thb β -gly는 모두 deoxyribonucleotide 1296쌍으로 구성되어 있고, 이들의 β -glycosidase는 431개의 아미노산으로 구성되며 분자량을 각기 48630, 48679, 48638 dalton이다. tfi β -gly는 *Thermus nonproteolyticus* HG102의 β -glycosidase 유전자 (tno β -gly), *Thermus thermophilus* TH125의 β -glycosidase 유전자 (bglT), *Thermus thermophilus* HB27의 β -glycosidase 유전자 (tth β -gly)와 homology가 각각 97%, 95%, 95%이다. tat β -gly는 *Thermus thermophilus* HB27 β -galactosidase 유전자 (tth β -gly)와 homology가 98%이다. thb β -gly는 *Thermus* TH125의 β -glycosidase 유전자 (bglT)와 *Thermus thermophilus* HB27의 β -glycosidase 유전자 (tth β -gly)와 homology가 99%이며 β -glycosidase는 bglT β -glycosidase와 아미노산 한 개가 상이하나, tth β -gly β -glycosidase와는 아미노산배열이 동일하였다. tib2 β -gly는 deoxyribonucleotide 1311쌍으로 구성되며, β -glycosidase는 436개의 아미노산으로 구성되고 분자량은 49,065 dalton이다. *Thermus nonproteolyticus* HG102의 β -glycosidase 유전자 (tno β -gly)와 homology가 96%이다.

tib10 β -gly는 tat β -gly와 deoxyribonucleotide 2개가 다르고 아미노산 구성은 동일하다.

1 ATGACCGAGAACGCGAAAAATTCCTTTGGGGGGTGGCCACGCGCTACCAGATTGAG 60
 M T E N A E K F L W G V A T S A Y Q I E

61 GGGGCCACCCAGGAGGACGCGCGGGGCTTCCATCTGGGACGCTTGGCCGCGCGCC 120
 G A T Q E D G R G P S I W D A F A R R P

121 GGGGCATCCGGGACGGGAGCACAGGGGAGCCCGCTGCGACCTACCGCGCTACGAG 180
 G A I R D G S T G E P A C D H Y R R Y E

181 GAGGACATCGCCGTGATGCAATCCCTCGGGGTGCGGGCTACCGCTTCTCGGTGGCTGG 240
 E D I A L M Q S L G V R A Y R F S V A W

241 CCCCAGATCCCTCCCGAGGGCCGGGACGGATCAACCCCAAGGGCTCGCCCTTCTACGAC 300
 P R I L P E G R G R I N P K G L A F Y D

301 CGCCTGGTGGACCGCTTCTCGCTTCCGGGATCACGCCCCCTTCTCACCCCTTACCCTGG 360
 R L V D R L L A S G I T P F L T L Y H W

361 GACCTGCCCTTTGGCCCTGGAGGAGCGGGAGGCTGGCGAGCCGGGAGACCGCTTGGCC 420
 D L P L A L E E R G G W R S R E T A F A

421 TTCGCCGAGTACGCGAGGGCGGTGGCCCGGGCCCTGCGCGACCGGGTGGCCCTTCTCGCC 480
 F A E Y A E A V A R A L A D R V P F F A

481 ACCCTGAACGAGCCCTGGTGTCTGGCCCTTCTCGGGCACTGGACGGGGGAACAGCCCCC 540
 T L N E P W C S A F L G H W T G E H A P

541 GGCCCTCAGGAACCTGGAAGCGGCCCTTGGCGCGCCACCACTCTCTGGGCCACGGC 600
 G L R N L E A A L R A A H H L L L G H G

601 CTCGCCCTGGAGGCTTGGAGGCGCGGGGGCGAGCGGGTGGGATCGTCTCAACTTT 660
 L A V E A L R A A G A R R V G I V L N F

661 CGCCCCGGCTACGGCGAGGACCCCGAGGGGTGGACGTGGCCGACCGCTTACCACAACC 720
 R P G L R R G P R G G G R G R P L T T T

721 GCTACTTCTTGGACCCCATCTGGCAAGGGGTATCCCGAAAAGCCCCCTCCGAGACCCCC 780
 A T S W T P S W Q G V S R K P L P R P P

781 GCCCCGTCCCATCTCTCCCGGACCTGGAGCTCGTGGCAAGGCCCTGGACTTCTGGG 840
 A R P H P L P R P G A R G K A P G L P G

841 GGTGAACACTACTACGCCCCCTCCGCTGGCCCCGGGGACGGGGACCTTGGCCGTGGCTA 900
 G E L L R P R P R G P G D G D L A R A L

901 CCTTCCCCCGAAGGGCCGGCCACGGCCATGGGGTGGGAGTCTACCCCGAGGGGCTTCA 960
 P S P G R A G H G H G V G G L P R G A S

961 CCACCTCTTGAAGCGCTCGGCGGGAGGTGGCCCTTACGTACGGAAGAACGG 1020
 P P L E A P R P G G A L A P L R H G K R

```
1021 GGCCTACCCGACCTCTGGACGGAGAGGCCGTGGTGGAGGACCCGAGCGGGTGGC 1080
    G R L P R P L D G R G R G G G P R A G G

1081 CTACCTCGAGGCCACGTTGGAGGCCGCCCTCCGGGCCCGGAAGAAGGGGTGGACCTCCG 1140
    L P R G P R G G R P P G P G R R G G P P

1141 GGGCTACTTGGTCTGGAGCCTCATGGACAAC TTGA 1176
    G L L R L E P H G Q L *
```

Figure 2-5. Deoxyribonucleotide and amino acid sequence of the β -glycosidase gene (KNOUC202 β -gly) of *Thermus sp.* KNOUC202

1 GATCCTG000CTG000CT000GG0CT0G7G00CAC000GTCTACATCTT0CTCAC00C 60
 61 CTGGGACGAGCT0CTT0G00CAGGT0CTCAC00CAG00CAC00C00CATT000GT 120
 121 GGGCAT00C9CAACTT0G7G00CAACTACCAGAAC00GCTACGACCTG0T0CATG00G00C 180
 181 CAC0G7G00CAC00CT0000GT00T0G70TCTTCTTCTT0G0G0G00C00CAT00CA 240
 RBS *tfiβ-gly* →
 241 AG00CTCAC00C00G000G00G7GAA000CTAG00GT00G0AGG0AA0000CAT000CGA 300
 M A
 301 GAAC00CGAAAAGTTTCTG7G00GGGTAG00CACAG00CTACCAGAT0GAG00000CAC 360
 E N A E K F L W G V A T S A Y Q I E G A
 361 CCAGGAGGAC0000000000CTTCCATCTGGGACACCTT0000000000000000CAT 420
 T Q E D G R G P S I W D T F A R R P G A
 421 CC00GAC0GAA0CACA0000000000CT00G0GACCTACC000CTACGAGGAGGACAT 480
 I R D G S T G E P A C D H Y H R Y E E D
 481 G000CTTAT0CAAT00CT000007G0000TCTAT00CTTCT00G7G00CTG000000GAT 540
 I A L M Q S L G V G V Y R F S V A W P R
 541 CCT0000GAG0000000000GATCA0000CA00000CT0000CTTITACGAC000CT0G7 600
 I L P E G R G R I N P K G L A F Y D R L
 601 GGAC0000CTTCT0000000000GATCAC000CTT0CTCAC00CTTACCACCTG0000CTG00 660
 V D R L L A A G I T P F L T L Y H W D L
 661 CCAG00CT0GAGGAC0000000000CTG000GAG0000000000CTT000CTT00000G 720
 P Q A L E D R G G W R S R E T A F A F A
 721 GTAC000GAG000000000000000CT0000GAC0000000000CTTCTT000CAC000GAA 780
 E Y A E A V A R A L A D R V P F F A T L
 781 CGAG00CT0G70CT0000CTT0CT0000CACTG0AC00000000000000000000CTCAG 840
N E P W C S A F L G H W T G E H A P G L
 841 GAACCTG0AG000 900
 R N L E A A L R A A H H L L L G H G L A
 901 GGAG00CTT0AG00 960
 V E A L R A A G A K R V G I V L N F A P
 961 GTAC00GAGGAC00 1020
 V Y G E D P E A V D V A D R Y H N R Y F
 1021 GGAC00CAT0CT0000CAG00 1080
 L D P I L G R G Y P E S P F Q D P P P T
 1081 CAACCTT0000GTACCT0GAGCT0G700CA000000000000000000000000000000 1140
 P N L S R D L E L V A R P L D F L G V N
 1141 CTAC000 1200

Y Y A P V R V A P G T G P L P V R Y L P
 1201 GGAAGGGCCCGTCAOCCATGGGGTGGGAGGTCTACCCGAGGGCTTTACCACTCTT 1260
 P E G P V T A M G W E V Y P E G L Y H L

 1261 GAAGCCCTCGGCCGGAGGTGCCCTGGCCCTTTACATCAOAAAAAGGGCCGCTA 1320
 L K R L G R E V P W P L Y I T E N G A A

 1321 CCCCACCTCTGGACGGAGAGGCCGTCGTGGAGGACCCCGAGCGGTGGCTACCTGA 1380
 Y P D L W T G E A V V E D P E R V A Y L

 1381 GGCCCACTGGAGGCCCGCCCTCCGGGCCGGGAGGAAGGGGTGGACCTCAGGGCTACTT 1440
 E A H V E A A L R A R E E G V D L R G Y

 1441 CGTCTGGAGCCTCATGGACAACCTTGAGTGGGCTTCGGCTACACCCGGGCTTCGGCT 1500
 F V W S L M D N F E W A F G Y T R R F G

 1501 CTACTACGTGGACTTCCCCAGCCAGAGGCGCATCCCTAAAAGGAGCGCCCTCGGTACCG 1560
 L Y Y V D F P S Q R R I P K R S A L W Y

 1561 GGAGCGGATCGCGGGGCCAGCTCTGAGCGTCCGCGCATTGATCCCGCCACTTAGGGCC 1620
 R E R I A R A Q L -

 1621 CCCGAACCGGGAGGGTGGACGGCGAGGACTCCAGAGGCTTACCCGCCCATANGGC 1680
 1681 CTCGAGGTCCCGGGAAGAGGCCCTAAAACCAAGAAAGGCCGGACGAAGCGTAGCC 1740

Fig. 2-6. Nucleotide and deduced amino acid sequence of β -glycosidase gene (tfi β -gly)
 of *Thermus filiformis* wai33A1(ATCC43280)

1501 CCGCCACACGGTGGCCACGCTGCCCCGCTCGCTCTTCTTCTTGGTGCAGCGCCAGC 1560
A A A T V A T L P V L V L F F F V Q R Q
RBS

1561 TCATCCAGGGCCCTACCCGCCGGGCGGTGAAGGGCTAGGGCTTGGGAGGAGAAACGCGTA 1620
L I Q G L T A G A V K G -
tatf-gly →

1621 TGGACGATCACGCCSAAAAGTTCCGTGGGGGGTGGCCACCAGCGCTACCAGATTGAGG 1680
M D D H A E K F L W G V A T S A Y Q I E

1681 GGGCCACCCAGGAGACGGCCGGGGGCTTCCATCTGGGACGCTTCGCCCGCCGCCCG 1740
G A T Q E D G R G P S I W D A F A R R P

1741 GGGCCATCCGGACGGGAGCACAGGGGAGCCCCGCTGGGACCACTACCGCCGCTACGAGG 1800
G A I R D G S T G E P A C D H Y R R Y E

1801 AGGACATCGCCCTGATGCAATCCCTCGGGGTGGCGGGCTACCGCTTCCCGTGGCTGGC 1860
E D I A L M Q S L G V R A Y R F S V A W

1861 CCCGATCCCTCCCGAGGGCCGGGACGGATCAACCCCAAGGGCTCGCCCTTCTACGACC 1920
P R I L P E G R G R I N P K G L A F Y D

1921 GCCTGGTGGACCGGCTTCTCGCTTCCGGGATCACGCCCTTCTCACCCCTACCACTGGG 1980
R L V D R L L A S G I T P F L T L Y H W

1981 ACCTGCCCTTGGCCCTGGAGGAGCGGGAGGCTGGCGGAGCCGGGAGACCGCCCTCGCC 2040
D L P L A L E E R G G W R S R E T A F A

2041 TCGCCGAGTACGCCGAGGCGGTGGCCCGGGCCCTCGCCGACCGGGTGGCTTCTTCGCCA 2100
F A E Y A E A V A R A L A D R V P F F A

2101 CCCGAAACGAGCCCTGGTGGCTCGGCCCTTCTCGGGCACTGGACGGGGAAACAGCCCCCG 2160
T L N E P W C S A F L G H W T G E H A P

2161 GCCTCAGGAACCTGGAAAGCGGCCCTCCGCGCCGCCACCCTCCTCCTGGGCCACGGCC 2220
G L R N L E A A L R A A H H L L L G H G

2221 TCGCCGTGGAGGCTTGGAGGCGCGGGGGCGAGGCGGGTGGGGATCGCTCAACTTCG 2280
L A V E A L R A A G A R R V G I V L N F

2281 CCCCAGCTACCGGAGGACCCCGAGGCGGTGGACGTGGCCGACCGCTACCACACCCGCT 2340
A P A Y G E D P E A V D V A D R Y H N R

2341 ACTTCTTGGACCCCATCTGGGCAAGGGGTATCCCGAAAGCCCTTCCGAGACCCCGCC 2400
Y F L D P I L G K G Y P E S P F R D P P

2401 CCGTCCCACCTCTCTCCCGGACCTGGAGCTCGTGGCAAGGCCCTGGACTTCTGGGGG 2460
P V P I L S R D L E L V A R P L D F L G

2461 TGAACACTACGCCCCCGTCCCGGTGGCCCCGGGACGGGACCTTGGCCGTGGCTACC 2520
V N Y Y A P V R V A P G T G T L P V R Y

2521 TTCCCCGGAAGGGCCCGCCACGGCCATGGGGTGGGAGTCTACCCCGAGGGCTTCACC 2580
 L P P E G P A T A M G W E V Y P E G L H

 2581 ACCCTTTGAAGCGCTCGCCCGGAGGTGCCCTGGCCCTTTACGTACCGAAAAAGGGG 2640
 H L L K R L G R E V P W P L Y V T E N G

 2641 CCGCCACCCCGACCTCTGGACGGGAGAGGCCGTGGTGGAGGACCCCGAGCGGGTGGCCT 2700
 A A Y P D L W T G E A V V E D P E R V A

 2701 ACCTCGAGGCCACGTGGAGGCCGCCCTCCGGGCCGGGAAGAAGGGGTGGACCTCCGGG 2760
 Y L E A H V E A A L R A R E E G V D L R

 2761 GCTACTTCGTCTGGAGCCTCATGGACAACCTTTGAGTGGGCCCTTCGGCTACACCCGGCGCT 2820
 G Y F V W S L M D N F E W A F G Y T R R

 2821 TCGCCCTCTACTACGTGGACTTCCCCAGCCAGAGGCCATCCCCAAAAGGAGCGCCCTCT 2880
 F G L Y Y V D F P S Q R R I P K R S A L

 2881 GGTACCGGAGCGGATCGCGCGGGCCAGACCTAAGTGCCTCCCGCCAGAGGGCGGGCCCT 2940
 W Y R E R I A R A Q T -

 2941 AAAACTCAAAGAAGGCCGGGACGAAGGTGTAGCCCTCCCTTCCCGCCGGATGTACCCGA 3000
 3001 CGCGGGGCCAGGGGAAGTGTAGGCGGTGATCAGGCTCCGCTCCCTCCGAGACCTTCTGGA 3060
 3061 AGAGGCGGGCCCGGGTCCGCACCACTGCCTTGTCCATGTCAAAGCCAGGTAGGCCCT 3120
 3121 GGGGAAAGCGGAGGAGAGGAGGTAGTGGCCCGCCCATCCCCAAAATGAAGAGCCTCT 3180
 3181 TTCCCTCGAGATGGCTCGAGGCTCATGTGCCCGGGGTGTGGCCGAAGGAGGCCACCG 3240
 3241 CCCCACCCCCGGGAGGATCTCCCTCCCGTCTCCACGGGCCGGATGCGCTCTTAGGG 3300
 3301 GCACGAGGGCCCTTTTGACCCCGGGCGAGGGGTTTGAAGCCAGAACTCCAGGTCCACCC 3360
 3361 GGCCCATGAGGTCTCCGCTTGGCGAAGACGGGCCCGCCCTCCCGCTCCACAGACCC 3420
 3421 CGATGTGTCTCGGGTGGCCGTGGGTGAGGAAGACGTGGGTGATGTCTCGGGAAGGTAGC 3480
 3481 CGCAAGCTCCAGGTGGCGAGGAGCCGCCCCCACTTCCCGCACCCCTCCCGTGTCCA 3540
 3541 CGAGGAGCCTGGCCTCCCGCAGGTCCAGGACACCGGGTTGAAGTTGTTCGGGTGGCCT 3600
 3601 CCGGGTCCAGGAAGTGTCTCCAGAGCGTCTGCGGAAGGCCCTCTGGAGCTCCGGTTCC 3660
 3661 CCCCCAGTTGGGAGGAGGGGGCTTGGAGGGGACTGGCCGTGCGAGAGGACCAACCGCT 3720
 3721 GGATCCCCCTACCCGGAAGCGTAAAAGCCGCCCGCTTCAACCCCTTGGGCGCGCGC 3780
 3781 CCTGGGCCCGGCCAAGGGAAGGCCCTCCCGCCCAAAAAAGCCCGCACCGGTGAGAA 3840
 3841 AACGCTTCCGCTCATGCCCCCTTACCTCCTTTGGGAGGATGCTAGGGCCGAAAGTCCCGC 3900
 3901 AGAATGTCTCCCCCTCACCCCTGGGTGTGCTCAGGCTACCTTGGCGGGAGGTTTATGTG 3960
 3961 GCCTGGCCCAITTTGACGGGACGGCCCTCCCTCTAGA 3997

Figure 2-7. Nucleotide and deduced amino acid sequence of β -glycosidase gene (*tat β -gly*) of *Thermus flavus* AT-62(ATCC33923)

1 GATCCCATCTACATCATGTACATCTACGTGCAGAACTGGGTCCGCTCCGCTTTGGGCT 60
61 CGAGGTGCGCCTCGTGGGCA@CTACGCGGGGCTCGTCTTCACCTACACCGCTTCTTCGT 120
121 CCCTCTGAGCATCTGGATCCTCAGGGGCTTCTTCGCTCCATTCCCAAGGAGCTGGAGGA 180
181 GGCGGCCATGGTGGACCGGGGCCACGCGCTTCCAGGCTTCCACCGGTTGATCCTGCCCC 240
241 GCGCCCTCCCGGGCTCGCGGCCACGCGCTTACATCTTCCACCGCTGGGACGAGCT 300
301 CCTCTTGGCCAGGTCTCACCACCGAGGCCACGCGCACCGTTCCGTTGGGCATCCGCAA 360
361 CTTGTTGGCAACTACAGAACCGCTACGATCTGGTCAATGGCCCGCCACGTTGGCCAC 420
421 GCTGCCGCTCCTCGTCTTCTTCTTCTGTCAGCGCGCTCATCCAGGGCTCACCGC 480

RBS *thbI-gly* →
481 CGGGCGGTGAAGGCTAGGTTCTGGAGGAAACCGCTATGACCGAGAACCGGAAAA 540
M T E N A E

541 ATTCCCTTGGGGAGTGGCCACCGCGCTACAGATTGAGGGGGCCACCCAGGAGGACGG 600
K F L W G V A T S A Y Q I E G A T Q E D

601 CCGGGGCTTCCATCTGGGACGCTTCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 660
G R G P S I W D A F A Q R P G A I R D G

661 CACAGGGAGCGCGCTGCGACCTACCGCGCTACGAGGAGACATCGCGCTGATGCA 720
S T G E P A C D H Y R R Y E E D I A L M

721 ATCCCTCGGGGTGCGGGCTACCGCTTCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 780
Q S L G V R A Y R F S V A W P R I L P E

781 CCGGGGCGGATCAACCCCAAGGGCTCGCGCTTCTACGACCGCTGGTGGACCGCGCTTCT 840
G R G R I N P K G L A F Y D R L V D R L

841 CGCTTCCGGATCACCGCTTCTCACCGCTTACCACTGGGACCTGCGCTTGGCGCTGGA 900
L A S G I T P F L T L Y H W D L P L A L

901 GGAGCGGGGAGGCTGGCGGAGCGGGAGACCGCGCTTCCGCTTCCCGAGTAGCGCGAGGC 960
E E R G G W R S R E T A F A F A E Y A E

961 GGTGGCGGGGCGCTCGCGACCGGGTGGCGCTTCTTCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1020
A V A R A L A D R V P F F A T L N E P W

1021 CTGCGCTTCCG 1080
C S A F L G H W T G E H A P G L R N L E

1081 GGCCCTCCG 1140
A A L R A A H H L L L G H G L A V E A L

1141 GCGCGCGGGGCGAGGCGGGTGGGATCGTCTCAACTTCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1200
R A A G A R R V G I V L N F A P A Y G E

1201 CCGCGAGCGGTGGACGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1260
D P E A V D V A D R Y H N R F F L D P I

1261 GGGCAAGGGTATCCGAAAGCGCTTCCGAGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1320
L G K G Y P E S P F R D P P P V P I L S

1321 CGACCTGGAGCTGCTGGCAAGGCCCTGGACTTCTGGGGGTGAACACTACGCCCCCGT 1380
 R D L E L V A R P L D F L G V N Y Y A P

1381 CCGCCGTGGCCCCGGGGACGGGGACCTTGGCCGTGGCTACCTTCCCCGGGAAGGGCCGGC 1440
 V R V A P G T G T L P V R Y L P P E G P

1441 CACGCCATGGGGTGGGAGTCTACCCGAGGGGCTTTACCACTCTTGAAGCCCTGG 1500
 A T A M G W E V Y P E G L Y H L L K R L

1501 CCGGGAGGTGCCCTGGCCCCTTTACGTACGGAAAACGGGGCCGCTACCCCGATCTGT 1560
 G R E V P W P L Y V T E N G A A Y P D L

1561 GACGGGAGAGGCCGTGGTGGAGGACCCCGAGCGGGTGGCTACCTCGAGGCCACGTGA 1620
 W T G E A V V E D P E R V A Y L E A H V

1621 GGCCGCCCTCCGGGCCGGGAAGAGGGGTGGACCTCCGGGGCTACTTGTCTGGAGCCT 1680
 E A A L R A R E E G V D L R G Y F V W S

1681 CATGACAACCTTGGAGTGGGCTTGGCTACACCCGGGCTTGGCTCTACTACGTGA 1740
 L M D N F E W A F G Y T R R F G L Y Y V

1741 CTTCCCCAGCCAGAGGCATCCCCAAAAGGAGCGCCCTCTGGTACCGGGAGCGGATCGC 1800
 D F P S Q R R I P K R S A L W Y R E R I

1801 GCGGGCCAGACCTAAGTGCCTCCAGAGGGGGCGGCCCTAAAACCTCAAAGAGGCCGG 1860
 A R A Q T -

1861 GACGAAGGCGTAGCCCTCCCTTCCCGCGGATGTACCCGACGGCGGGCCAGGGGAAGTG 1920
 1921 GTAGCGCGTGATC 1980

Figure 2-8. Nucleotide and deduced amino acid sequence of β -glycosidase gene (thb β -gly) of *Thermus thermophilus* HB8(ATCC27634)

1 CCAGGCTTCCACCGGGTGAATCCTGCCCCCTGGCCCTCCCGGGCTCGCGGCTACGGCCGT 60
61 CTACATCTTCTCACCAGCTGGGACGAGCTCCTCTCGCCAGGTCTCACCACCGAGGC 120
121 CACGGCCACCATTCCCGTGGGCATCCGCAACTTCGTGGGCAACTACCAGAACCGCTACGA 180
181 OCTGATCATGGCCGCCACCGGTGGCCACGCTGCCCGTCTCGTCTCTTCTTCTTCTG 240
RBS
241 GCAGCGCCAGCTCATCCAGGCCCTCACCGCCGGGCGGTGAAGGGCTAGGTTCTTGGAGG 300
tib2f-gly →
301 AGAAACGCCCTATGACCAGAACGCGAAAAGTTCTGTGGGGGGTGGCCACCAGCGCCTA 360
M T E N A E K F L W G V A T S A
361 CCAGATTGAGGGCCACCACCGAGGACGGGGCGGGGCTTCCATCTGGGACGCTTGGC 420
Y Q I E G A T Q E D G R G P S I W D A F
421 CCGCCGCCCGGGACATCCGGGACGGAAACACAGGGAGCCCGCTGCGACCACTACCA 480
A R R P G T I R D G S T G E P A C D H Y
481 CCCTACGAGGAGACATCGCCCTGATGCAATCCCTCGGGGTGGGGGCTACCGCTTCTC 540
H R Y E E D I A L M Q S L G V G A Y R F
541 CGTGGCTGGCCCGGATCCTCCCGAGGGCCGGGGCGGATCAACCCCAAGGGCTTGGC 600
S V A W P R I L P E G R G R I N P K G L
601 CTTCTACGACCCTGCTGGACCGGCTTCTCGCGCGGGATCACGCTTTTCTCACCCCT 660
A F Y D R L V D R L L A A G I T P F L T
661 CTACCACTGGGACCTGCCCCAGGCCCTCGAGGACCGGGCGGTTGGCGGAGCCGGGAGAC 720
L Y H W D L P Q A L E D R G G W R S R E
721 CGCCTTGGCTTGGCCGAGTACGCGGAGGCAGTGGCCCGGGCCCTCGCCGACCCTGGTGC 780
T A F A F A E Y A E A V A R A L A D R V
781 CTTCTTCCACCCGAAACGAGCCTTGGTCTCGCCCTTCTCGGGCACTGGACGGGGGA 840
P F F A T L N E P W C S A F L G H W T G
841 ACACGCCCCCGGCTCAGGAACCTGGAGGCGGGCCCTTGGCGCCGCCACCCTCCTCCT 900
E H A P G L R N L E A A L R A A H H L L
901 GGGGCACCGCTCGCCGTGGAGGCTTGGAGGCGAGCGGGACGAAAGCTGTGGGGATCGT 960
L G H G L A V E A L R A A G T K R V G I
961 CCTCAACTTGGCCCGGTGTACGGCGAGGACCCCGAGGCGGTGGACGTGGCCGACCCTA 1020
V L N F A P V Y G E D P E A V D V A D R
1021 CCACAACCGCTACTTCTGGACCCCATCTGGGCGAGGGGTATCCGAAAGCCCTTCCA 1080
Y H N R Y F L D P I L G R G Y P E S P F
1081 AGAATCCCGCCGTTCCATCCTCTCCCGGACCTTGGACTCGTGGCAAGGCCCTTGA 1140
Q D S P P V P I L S R D L E L V A R P L
1141 CTTCTGGGGGTGAACACTACGCCCCCGTCCCGTGGCCCCGGGACGGGGCTTTGGCC 1200
D F L G V N Y Y A P V R V A P G T G P L

1201 CGTGCCTACCTCCCCCGAGGGGCGGTACCGCCATGGGTGGGAGTCTACCCGA 1260
P V R Y L P P E G P V T A M G W E V Y P

1261 GGGCTTTACCACTCTTGAAGCGCTCGGCCGGAGGTGCCCTGGCCCTTACATTAC 1320
E G L Y H L L K R L G R E V P W P L Y I

1321 GGAAACGGGGCCCTACCCCGACCTCTGGACGGAGAGGCCGTGGTGGAGGACCCGA 1380
T E N G A A Y P D L W T G E A V V E D P

1381 GCGGTGGCTAACCAGGCCCCACGTGGAGGCCGCCCTCCGGCCCGGAGGAGGGGT 1440
E R V A Y L E A H V E A A L R A R E E G

1441 GGACCTCAGGGCTACTTGTCTGGAGCCTCATGGACAACITTTAGTGGCCCTCGGCTA 1500
V D L R G Y F V W S L M D N F E W A F G

1501 CACCCGGCCTTCGGCTCTACTACGTGGACTTCCCCAGCCAGGGCGCATCCCCAAAG 1560
Y T R R F G L Y Y V D F P S Q R R I P K

1561 GAGCGCCCTCTGGTACCGGAGCGGATCGCGCGGCCAAACCGGGGGTCCGCACTTG 1620
R S A L W Y R E R I A R A Q T G G S A R

1621 ATCCGCCCCCTTAG 1680

Figure 2-9. Nucleotide and deduced amino acid sequence of β -glycosidase gene (tib2 β -gly) of *Thermus sp.* IB-21(ATCC43815)

1 GCGCCATGGTGGACGGGGCCACGCCCTTCCAGGCCTTCCACCGGGTGATCTGCCCTG 60
61 GCCCTCCCGGGCTCGCGCCACGGCCGTCTACATCTTCTCACCGCCTGGGACGAGCTC 120
121 CTCTTCGCCCAGGTCTCACCACCGAAGCCACGGCCACCGTTCGCCGTGGGCATCCGCAAC 180
181 TTCGTGGGCAACTACCAGAACCCTACGATCTGGTCATGGCCGCCACCGTGGCCACG 240
241 CTGCCCGTCTCGTCTCTTCTTCTTCTCGTGCAGCCAGCTCATCCAGGGCCTCACCGCC 300
RBS *tib10β-gly* →
301 GGGGCGGTGAAGGCTAGGCGTTGGGAGGAGAAACGCGTATGGACGATCACGCCGAAAAG 360
M D D H A E K
361 TTCCTGTGGGGGTGGCCACCAGCGCCTACCAGATTGAGGGGGCCACCCAGGAGGACGGC 420
F L W G V A T S A Y Q I E G A T Q E D G
421 CGGGGCTTCCATCTGGGACGCCCTTCGCCCGCCGCCCGGGGCCATCCGGGACGGGAGC 480
R G P S I W D A F A R R P G A I R D G S
481 ACAGGGAGCCCGCTGCGACCACTACCGCCGTACGAGGAGGACATCGCCCTGATGCAA 540
T G E P A C D H Y R R Y E E D I A L M Q
541 TCCCTCGGGGTGCGGGCTACCGCTTCTCCGTGGCCCGCCCGGATCCTCCCGAGGGC 600
S L G V R A Y R F S V A W P R I L P E G
601 CGGGACGGATCAACCCAAAGGCCTCGCCTTCTACGCCCTGGTGGACCGGCTTCTC 660
R G R I N P K G L A F Y D R L V D R L L
661 GCTTCGGGATCACGCCCTTCTCACCCCTACCACCTGGGACCTGCGCTTGGCCCTGGAG 720
A S G I T P F L T L Y H W D L P L A L E
721 GAGCGGGGAGGCTGGCGAGCCGGAGACCGCCTTCGCCCTCGCCGAGTACGCCGAGGCG 780
E R G G W R S R E T A F A F A E Y A E A
781 GTGGCCGGCCCTCGCCGACCGGGTGCCTTCTTCGCCACCTGAACGAGCCCTGGTGC 840
V A R A L A D R V P F F A T L N E P W C
841 TCGCCTTCTCTGGGCACTGGACGGGGAAACACGCCCCCGCCTCAGGAACCTGGAAGCG 900
S A F L G H W T G E H A P G L R N L E A
901 GCCCTCCGCGCCGCCACCACTCCTCTTGGGCCACGGCCTCGCCGTGGAGGCTTGAGG 960
A L R A A H H L L L G H G L A V E A L R
961 GCCCGGGGGCGAGCGGGTGGGATCGTCCCAACTTCGCCCCGGCCTACGGCGAGGAC 1020
A A G A R R V G I V L N F A P A Y G E D
1021 CCCGAGGGGTGGACGTGGCCGACCGCTACCACAACCGCTACTTCTTGGACCCCATCCTG 1080
P E A V D V A D R Y H N R Y F L D P I L

1081 GGCAAGGGGTATCCGAAAGCCCCTTCCGAGACCCCCGCCGTCCCATCCTCTCCCGC 1140
 G K G Y P E S P F R D P P P V P I L S R

1141 GACCTGGAGCTCGTGGCAAGGCCCTGGACTTCCTGGGGTGAACACTACGCCCCCGTC 1200
 D L E L V A R P L D F L G V N Y Y A P V

1201 CGCGTGGCCCGGGACGGGACCTTGCCTGCGCTACCTTCCCCGGAAGGGCCGGCC 1260
 R V A P G T G T L P V R Y L P P E G P A

1261 ACGCCATGGGGTGGAGGTCTACCCGAGGGCTTACCACCTCTTGAAGCGCTCGGC 1320
 T A M G W E V Y P E G L H H L L K R L G

1321 CGGGAGGTGCCCTGGCCCCTTACGTACGGAAAACGGGCCGCTACCCCGACCTCTGG 1380
 R E V P W P L Y V T E N G A A Y P D L W

1381 ACGGAGAGCCCGTGGTGGAGGACCCGAGCGGGTGGCCTACCTCGAGGCCACGTGGAG 1440
 T G E A V V E D P E R V A Y L E A H V E

1441 GCCGCCCTCCGGCCCGGGAAGAAGGGTGGACCTCCGGGCTACTCGTCTGGAGCCTC 1500
 A A L R A R E E G V D L R G Y F V W S L

1501 ATGGACAACCTTGGAGTGGCCCTTCGGCTACACCGGCGCTTCGGCCCTACTACGTGGAC 1560
 M D N F E W A F G Y T R R F G L Y Y V D

1561 TTCCCAGCCAGAGGCGCATCCCCAAAAGGAGCGCCCTCTGGTACCGGGAGCGGATCGCG 1620
 F P S Q R R I P K R S A L W Y R E R I A

1621 CGGGCCAGACCTAAGTGCCCGCCAGAGGGCGGGCCCTAAAACTCAAAGAAGGCCGGG 1680
 R A Q T -

1681 ACGAAGGTGTAGCCTCCCTTCCCGCCGATGTACCCGACGGCGGCCAGGGGAAGTGG 1740

1741 TAGGCGGTGATCAGGCTCCGCTCCTCCGAGACCTTCTGGAAGAGGCGGGCCCGGGTCCGC 1800

1801 ACCAC 1860

Figure 2-10. Nucleotide and deduced amino acid sequence of β -glycosidase gene (tib10 β -gly) of *Thermus sp.* IB-21(ATCC43815)

제 3 절 β -galactosidase 유전자의 *Pichia pastoris*에 전이 및 발현

1. 서론

고온성 미생물로부터 분리후 *E. Coli*에 plasmid를 사용하여 전이한 유전자는 *E. Coli*의 번식과정 중에 plasmid와 함께 소실될 수 있다. 유전자를 효모의 chromosomal DNA에 삽입하므로서 번식과정 중에 유전자가 소실되는 문제를 해결할 수 있다. *Pichia pastoris*의 alcohol oxidase 생산 promoter를 이용한 외부 유전자 cloning 및 발현체계가 개발되었고, 발현효율이 높아 널리 이용되고 있다. 또한 발현 체계의 선택에 따라 생산된 단백질을 세포외로 분비할 수 있어 실용적인 것으로 인정되고 있다 (Cregg 등, 1993). 본 연구의 2차년도 상반기까지 분리한 β -galactosidase 유전자인 Lac-KNOUC112와 Lac-KNOUC114를 *Pichia pastoris*에 전이, 발현하였다.

2. 재료 및 방법

1) *Pichia pastoris* 전이 및 발현

Pichia pastoris 전이 및 발현 vector인 pPICZ α -C의 EcoR I site에 Lac-KNOUC112와 Lac-KNOUC114를 삽입한 후에 제한효소로 linearization한 후에 *Pichia pastoris* X-33에 electroporation에 의해 전이하였다. KNOUC112 유전자가 삽입된 vector는 BstX I 로, KNOUC114 유전자가 삽입된 vector는 Sac I 으로 linearization하였다. 전이된 *Pichia pastoris*는 Zeocin이 100 μ g/ml의 농도로 함유된 YPDS (yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%, sorbitol 1 M, agar 2%) 배지에서 배양분별하였다 (Invitrogen, 1999).

전이된 *Pichia pastoris* X-33과 KM71H를 methanol을 함유하는 MM agar 배지에서 번식시키고 X-gal(1.4 mg/ml)을 함유하는 Z-buffer를 부어 70 $^{\circ}$ C에서 정치하여 X-gal 분해 청색으로 발현을 확인하였다. 또한 methanol이 0.5% 농도로 유지되는 BMMY (yeast extract 1%, peptone 2%, K-phosphate buffer pH 6.0 100mM, YNB 1.34%, biotin 0.00004%) 배지에서 진탕 (250 rpm)배양하면서 β -galactosidase 유전자를 발현시킨 후 배양여액과 crude cell free extract를 70 $^{\circ}$ C에서 2시간 가열후 ONPG 분해능으로 발현을

재 확인하였다.

2) β -galactosidase 생산최적화

*Pichia pastoris*에 전이된 β -galactosidase 유전자의 적절한 발현조건을 결정하기 위해 발현초기 *Pichia pastoris* X-33의 세포농도, 발현 inducer인 methanol농도, 배양기간, extracellular protease의 저해제인 casamino acid 첨가효과를 조사하였다. β -galactosidase 생산은 효소활성의 unit로 표현하였다. 1 unit는 culture 1 ml의 β -galactosidase가 1분에 1 μ mole의 ONPG를 분해하는 활성으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

1) β -galactosidase 유전자의 *Pichia pastoris*로 전이

KNOUC112 β -gal 및 KNOUC114 β -gal를 pPICZaC에 ligation한후 *E. Coli* JM109에 전이하여 Zeocin(25 μ g/ml)을 함유하는 LB 배지에서 cloning하였다. 전이된 *E. Coli* JM109에서 plasmid를 제조한후 유전자가 pPICZaC에 올바른 방향으로 ligation되었는 가 여부를 *Acc* I 으로분해하여 생산된 DNA fragment의 크기로 판단하였으며 그 결과는 figure 3-1과 같다. 옳은 방향으로 ligation 되었을 경우 1805 bp와 3731 bp의 DNA fragment가 생산된다.

KNOUC112 β -gal이 삽입된 pPICZaC(pPICZaC-KNOUC112)는 *Bst*X I 으로, KNOUC114 β -gal을 운반하는 pPICZaC(pPICZaC-114)는 *Sac* I 으로 linearization 하여 *Pichia pastoris* X-33, GS115, KM71H에 electroporation으로 전이하였다. 전이된 *Pichia pastoris*는 Zeocin(100 μ g/ml)를 함유하는 YPDS배지에서 번식, 분별하였다.

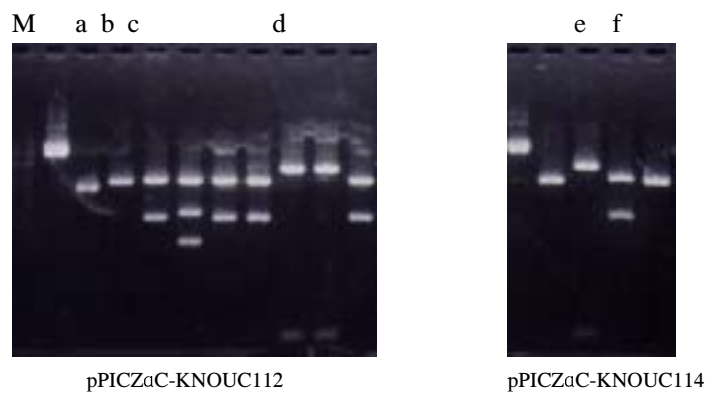


Figure 3-1. Digestion of pPICZαC-KNOUC112 and pPICZαC-KNOUC114 with Acc I

- M: molecular weight marker a: pPICZαC undigested
 b: pPICZαC digested with Acc I c: pPICZαC harboring Lac-KNOUC112(right oriented)
 d: pPICZαC harboring Lac-KNOUC112(wrong oriented)
 e: pPICZαC harboring Lac-KNOUC114(wrong oriented)
 f: pPICZαC harboring Lac-KNOUC114(right oriented)

2) β -galactosidase 유전자의 *Pichia pastoris*에서의 발현

전이되어 YPDS 배지에 형성된 colony를 methanol을 함유하는 MM agar 배지에 복제 배양한 후 X-gal을 포함하는 Z-buffer를 가한 후 70°C에서 반응시키었던 바 X-gal 분해 색깔인 청색을 확인할 수 있었다 (figure 3-2). BMMY에서 발현 후 배양여액의 ONPG 분해 활성도 확인되었다.

3) *Pichia pastoris* X-33에서의 β -galactosidase 생산 최적화

KNOUC112 β -gal과 KNOUC114 β -gal β -galactosidase 조효소의 적정온도, 적정pH가 유사하고 KNOUC112 β -gal β -galactosidase의 내열성이 다소 좋았으며, *Pichia pastoris* X-33에서의 β -galactosidase 생산이 KNOUC112 β -gal가 KNOUC114 β -gal β -galactosidase의 1.7배이었기 때문에 KNOUC112 β -gal발현을 위한 적정조건을 조사하였다.

유전자 발현의 적정조건은 발현개시때의 *Pichia pastoris* X-33의 세포농도, methanol 농도, casamino acid 첨가효과 등을 조사하여 결정하였다.

(1) 발현초기 *Pichia pastoris* X-33 세포농도

발현초기 세포농도를 $A_{600}=1.0\sim 8.0$ 까지로 하고, 4일간 발현시키면서 β -galactosidase 활성으로 생산량증가 등을 조사하였다. $A_{600}=1.0$ 과 2.0에서는 생산량에 차이가 없었고 $A_{600}=4.0$ 일 때 4일 배양후 효소생산량이 1.56 unit로서 약 20%가 증가하였다. $A_{600}=4.0$ 이상의 세포농도에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

(2) Methanol 농도

Pichia pastoris X-33에 전이된 외래 유전자의 발현을 위한 Promotor의 촉발제인 methanol의 농도가 β -galactosidase생산에 미치는 영향을 조사하였다. Methanol을 0.5~6.0%로 첨가하였다. Methanol함량은 0.5%에서 2.0%까지 증가하였을 때 4일 배양 후 β -galactosidase의 생산이 7.51 unit로서 약 6.5배 증가하였다. Methanol함량을 4%, 6%로 증가하였을 때 β -galactosidase 생산량이 감소하였다.

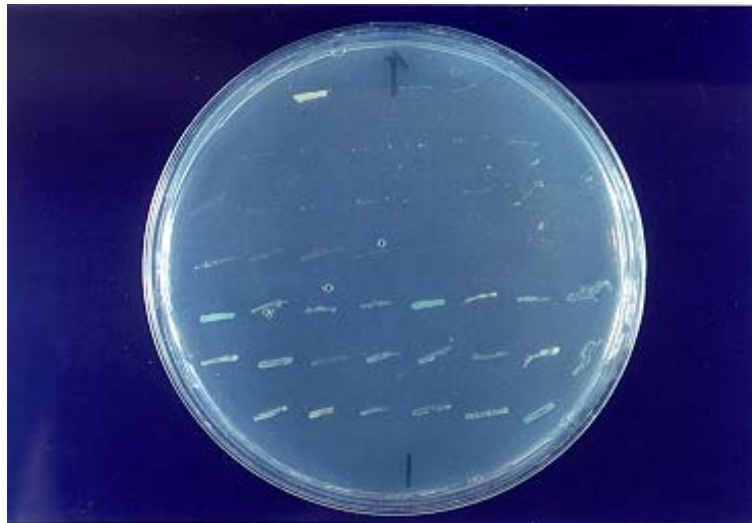


Figure 3-2. Hydrolysis of X-gal by β -galactosidase produced in *Pichia pastoris* X-33

Table 3-1. β -galactosidase production by *Pichia pastoris* X-33 at different initial cell density

Incubation time (day)	Initial cell density (A_{600})	β -galactosidase activity (unit)				
		1.0	2.0	4.0	6.0	8.0
1		0.33	0.38	0.48	0.48	0.36
2		0.96	0.91	1.01	0.88	1.23
3		1.23	1.39	1.26	1.29	1.61
4		1.36	1.29	1.56	1.56	1.69

Table 3-2. Effect of methanol concentration on the expression of KNOUC112 β -gal in *Pichia pastoris* x-33

Concentration of methanol (%)		β -galactosidase activity (unit)				
		0.5	1.0	2.0	4.0	6.0
Incubation time (day)	1	0.45	0.50	0.35	0.15	0.18
	2	1.16	2.02	1.97	1.39	0.02
	3	0.98	3.50	3.73	2.27	0.02
	4	1.11	5.24	7.51	3.12	0.15

(3) Casamino acid 첨가 효과

Pichia pastoris X-33이 중성 pH에서 활성이 높은 protease를 분비할 경우 β -galactosidase가 분해되어 생산수율이 낮아질 수 있다. 이 경우 extracellular protease의 활성을 저해하는 casamino acid를 첨가함으로써 β -galactosidase의 분해를 방지할 수 있다. Casamino acid를 0.5~4% 첨가하여 β -galactosidase의 생산변화를 조사하였다. Casamino acid를 첨가했을 때 β -galactosidase생산이 감소하여 extracellular protease에 의한 β -galactosidase의 분해가 없는 것으로 판단되고 오히려 casamino acid가 β -galactosidase생산을 저해하였다.

(4) 발현배양 조건의 적정화에 의한 β -galactosidase 생산의 증가

세포최초농도를 $A_{600}=1.0$, methanol을 0.5%수준에서 발현시켰을 때 4일간 배양한 배양액의 β -galactosidase 생산량이 1.56이었다. 세포최초농도를 4.0, methanol농도를 2%로 증가하여 발현한 결과 4일간 배양한 배양액의 β -galactosidase 생산량이 7.51 unit로 증가하여 생산이 4.8배 증가되었다.

Thermus KNOUC112와 *E. Coli* JM109 DE3에서 발현했을 때 배양액 1 ml의 활성이 각각 0.21 unit, 3.51 unit이었던 바 유전자를 *Pichia pastoris*에 전이함으로써 생산량이 각각 35.8배 (7.51 unit/0.21 unit), 2.1배 (7.51 unit/3.51 unit) 증가하였다.

*Pichia pastoris*에서 발현, 생산된 Lac-KNOUC112 β -galactosidase의 specific activity가 125 unit/mg 이었으므로 (제4절) 배양액 1 l에서 KNOUC112 β -gal β -galactosidase가 약 60 mg (7.51 unit \times 1000/125 unit/mg) 생산되는 것으로 추정된다.

Table 3-3. Effects of casamino acid on the expression of KNOUC112 β -gal in *Pichia pastoris* X-33

Incubation time (day)	Concentration of casamino acid (%)					
	0	0.5	1	2	3	4
1	1.04	0.75	0.37	0.26	0.22	0.26
2	1.16	1.24	0.53	0.35	0.33	0.35
3	1.84	1.81	0.78	0.57	0.58	0.62

Table 3-4. Enhancement of β -galactosidase production by optimizing initial cell density and concentration of methanol for 4 days' incubation

	Unoptimized condition	Optimized condition
Initial cell density (A_{600})	1.0	4.0
Concentration of methanol (%)	0.5	2
Production of β -galactosidase (unit)	1.56	7.51

제 4 절 내열성 유당분해효소 특성

1. 서론

유당분해효소의 우유 유당분해에 사용하기 위해서는 그 특성이 조사되어야 한다. 실제 이용에 필수적인 적정온도, 적정 pH, 내열성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

1) 정제

(1) KNOUC 112 β -galactosidase

Pichia pastoris X-33를 BMMY배지에서 발현배양하여 β -galactosidase를 생산하였다. *Pichia pastoris* X-33을 32°C에서 4일간 진탕배양 (150 storkes/min)하였다. 초기세포농도는 $A_{600}=4.0$ 이었고 methanol함량은 2%이었다. 배양액을 4°C에서 10분간 원심분리 (10,000×g)하여 세포체를 제거하고 여액을 β -galactosidase 정제원료로 사용하였다. 배양여액에 ammonium sulfate를 45~65% 첨가 용해하여 β -galactosidase를 침전시켰다. 침전물은 Tris-HCl (0.02M, pH8.2) buffer에 용해 후 동일 buffer에 투석하고 이를 DEAE-Sepharose CL-6B에서 정제하였다. DEAE-Sepharose CL-6B column에 0~0.5 M NaCl (0.02M Tris-HCl buffer, pH8.2)의 linear gradient로 elution하였다. DEAE-Sepharose CL-6B의 Bed volume은 100 ml, eluent의 유속은 45 ml/hr이었고, 0 M NaCl buffer와 0.5M NaCl buffer는 각각 250 ml이었다.

(2) tib β -gal의 β -galactosidase 및 tat β -gly, tfi β -gly, tib2 β -gly의 β -glycosidase

pUC118에 삽입후 cloning된 유전자에 poly histidine tag를 결합하여 His-binding affinity chromatography로 정제하였다.

pUC118에 삽입되어 있는 유전자 양말단에 Nde I 과 Sal I site를 PCR에 의해 형성하고 PCR 단편을 pGEMT-Easy Vector에 삽입하였다. pGEMT-Easy에 삽입된 유전자를 Nde I 과 Sal I 으로 분해하여 분리한 후 polyhistidine tag 염기를 가지고있는 pET21b(+)₁의 Nde I, Xho I site에 삽입하고 *E. Coli* BL21(DE-3)에 전이, cloning하였다.

각 유전자를 함유하는 *E. Coli* BL21 (DE3)를 LB (Amp⁺, 100 μ g/ml) broth에서

$A_{600}=1.0$ 이 될 때까지 37°C에서 건탕배양후 IPTG를 최종농도 1 mM 첨가하여 대량발현을 유도하여 6시간을 저배양하였다. 배양된 균체를 4°C에서 20분간 원심분리 (3000 g)하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 Z buffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0)에 현탁후 30분간 초음파처리 (200 Hz)하여 세포벽을 파괴하였다. 초음파처리후 4°C에서 20분간 원심분리 (14000 g)하여 cell debris를 제거한 후 80°C water bath에서 30분간 가열하였다. 가열 후 4°C에서 20분간 원심분리 (14000 g)하여 응고물을 제거하고 그 여액을 His-binding affinity chromatography의 시료로 사용하였다. 시료를 binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl 20 mM Tris-HCl, pH7.9)에 dialysis후 His binding resin column에 loading 후 elution buffer (0.5M imidazole, 0.25 M NaCl, 1 mM Tris-HCl, pH 7.9)로 elution하여 정제하였다.

(3) KNOUC114 β -gal, KNOUC105 β -gal (β -galactosidase)와 KNOUC202 β -glycosidase (pUC118)의 부분정제

pET5-b에 삽입된 KNOUC114 β -gal가 전이된 *E-Coli* JM109 (DE3), KNOUC202 β -gly를 함유하는 *E. Coli* XL1 Blue (F⁻)를 pUC118에 삽입된 KNOUC105 β -gal를 함유하는 *E. Coli* XL1 Blue (F⁻)를 LB (Amp⁺, 100 μ g/ml) broth에서 18시간 건탕배양 (37°C, 200 rpm) 후 4°C에서 원심분리 (3,000 \times g, 20분)하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 Na-phosphate buffer (0.01M, pH7.0)에 현탁시킨 후 30초간 5회 초음파 처리하여 세포벽을 파괴하였다. 4°C에서 원심분리 (14000 \times g, 20분)하여 세포파편을 제거하여 cell free extract를 제조하였다. KNOUC114 β -gal β -galactosidase와 KNOUC202 β -gly β -glycosidase의 cell free extract를 80°C에서 30분간 가열 후 4°C에서 원심분리 (14000 \times g, 20분)하여 응고물을 제거한 부분정제효소액을 제조하였다. Lac-KNOUC105 β -gal β -galactosidase의 cell free extract를 ammonium sulfate 35~85% 포화 침전분획을 분리한 부분정제효소액을 제조하였다.

(4) 정제의 확인

KNOUC112 β -gal β -galactosidase, tib β -gal β -galactosidase 및 tat β -gly, thb β -gly, tfi β -gly, tib2 β -gly, thb10 β -gly β -glycosidase의 정제를 acrylamide 함량 7.5%인 SDS-PAGE라 native PAGE (Laemmli, 1970)로 확인하였다.

2) 특성조사

(1) KNOUC112 β -gal, KNOUC114 β -gal, KNOUC105 β -gal β -galactosidase, KNOUC202 β -gly β -glycosidase

적정 온도, 적정 pH, 그리고 65~85°C에서의 내열성을 조사하였다.

적정 pH는 4.66~7.68에서 조사하였고 pH 4.66~6.64는 citrate-NaOH (0.04M) buffer, pH 6.1~7.68은 Na-phosphate (0.04M) buffer를 사용하였으며, 각 pH의 buffer에서의 초기 반응속도를 측정하였다. 적정 온도는 60~90°C에서 조사하였으며 효소의 활성은 Na-phosphate pH 7.0 (0.04M)에서 측정하였다. 활성에 대한 기질의 농도는 ONPG를 Na-phosphate (pH 7.0, 0.04M)를 0.002~0.04M 용해하여 기질로 사용하였다.

β -galactosidase의 내열성은 65~85°C의 온도에서 조사하였다. 효소액을 직경 1.2 cm 유리 tube에 넣고 mineral oil로 표면을 도포 후 각 온도의 water bath에서 가열하면서 잔존활성으로 내열성을 조사하였다. 효소는 Na-phosphate buffer (pH 6.8, 0.04 M)에서 가열했으며 잔존활성은 citrate-NaOH buffer (pH 5.65, 0.04M), 70°C에서 측정하였다. 활성은 ONPG 분해력으로 조사하였다.

(2) tib β -gal β -galactosidase 및 tat β -gly, thb β -gly, tti β -gly, tib2 β -gly, thb10 β -gly β -glycosidase

적정 온도, 적정 pH, 70~90°C에서의 내열성을 조사하였다.

적정 온도는 Z-buffer (pH 7.0)에서 ONPG를 기질로 하여 조사하였다. 적정 pH 조사에 사용한 buffer는 citrate-phosphate buffer (0.12-0.17M, pH 3.0-6.6), Na-phosphate buffer (0.2M, pH 5.7-7.5), boric acid-borax buffer (0.05-0.2 M, pH 7.6-9.0)이었다. 내열성은 잔존활성으로 조사하였다. 활성은 ONPG를 기질로 하여 조사하였다. 효소의 활성은 ONPG를 기질로 하여 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

1) β -galactosidase

(1) KNOUC 112 β -gal β -galactosidase

Ammonium sulfate에 의해 분리된 조효소액을 DEAE-sepharose CL-6B column에서

정제한 결과는 그림과 같다. Native PAGE (figure 4-1) 결과 140 kD 위치에서 단일 밴드가 확인되었으나 SDS-PAGE (figure 4-2)에서는 70 kD 부근에서 3개의 band가 관찰되었다. KNOUC112 β -gal β -galactosidase의 아미노산배열 속에 2개의 Asn-X-Se의 구조를 갖는 곳이 있는 것으로 보아 단백질 합성 후에 post-glycosylation이 된 것으로 추정된다. 또한, 이 효소는 Dimer상태로 존재하는 것으로 판단된다. 정제한 β -galactosidase의 specific activity는 109.25 unit/mg이었다. DEAE Sepharose CL-6B에서의 수율은 86%이었다. Ammonium sulfate에 의한 fractionation과 DEAE-Sepharose CL-6B 과정을 통한 전체 수율은 68.5%이었다.

KNOUC112 β -gal β -galactosidase의 적정온도, 적정 pH, 기질농도에 의한 활성변화, 70°C에서의 내열성이 figure 4-3에 제시되어 있다. 70~85°C에서 높은 활성을 보였고 80°C에서의 활성이 140 unit/mg으로 제일 높았다. pH 5.5~6.5에서 활성이 좋았으며 적정 pH는 5.75로서 활성은 170 unit/mg이었다. 우유의 pH인 pH6.8에서는 적정 pH에서의 활성의 56%를 나타내었다. 65~70°C에서는 매우 안정하였고 85°C에서는 불안정하였고, 75°C, 80°C에서는 40~20분간 활성을 유지하였으나 2시간후에는 활성이 20%감소하였다.

온도별 활성 및 내열성을 고려할 때 이 효소의 적정온도는 80°C로 인정되나 실제 이용에서는 70~75°C가 적당한 것으로 판단된다.

ONPG를 기질로 했을 때 pH7.0, 70°C에서 K_m 은 0.0067M이었고 V_{max} 는 125 unit/mg이었다.

(2) tib β 5-gal

Cell free extract를 열처리하여 응고물을 제거한 후 His-tag affinity chromatography에 의해 figure 4-4와 같이 정제를 할 수 있었다. 정제후 회수율은 90%이었으며 specific activity는 269 unit/mg 이었다.

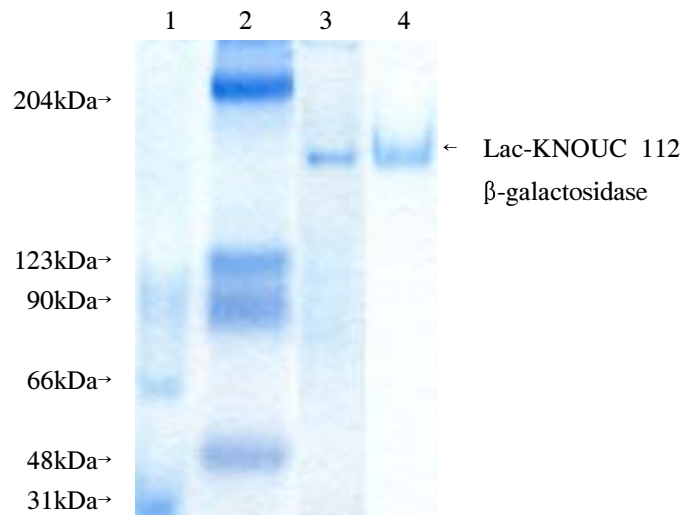


Figure 4-1. Native PAGE electrophoresis of KNOUC 112 β -gal β -galactosidase. The protein was analyzed on a 7.5% polyacrylamide gel, and stained with Coomassie Brilliant R250. Lane 1, low MW marker; lane 2, high MW marker; lane 3, Lac-KNOUC 112 β -galactosidase before DEAE-Sepharose CL-6B ion-exchange chromatography; lane 4, Lac-KNOUC 112 β -galactosidase after DEAE-Sepharose CL-6B ion-exchange chromatography.

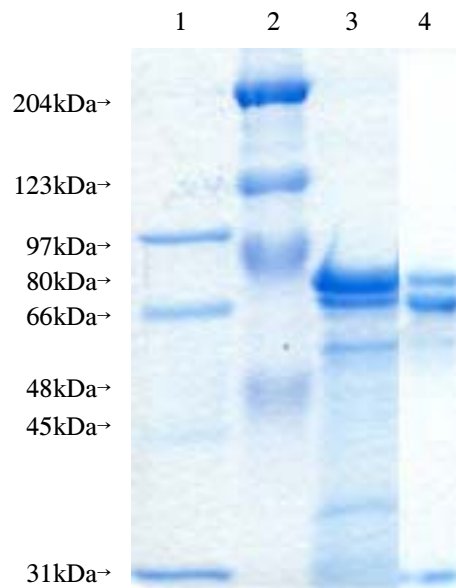
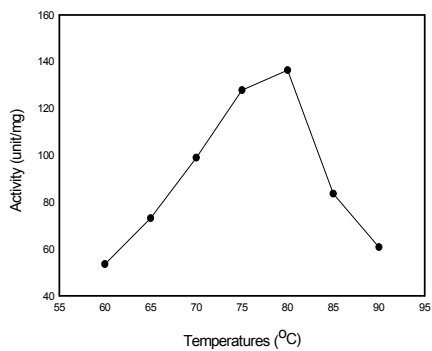
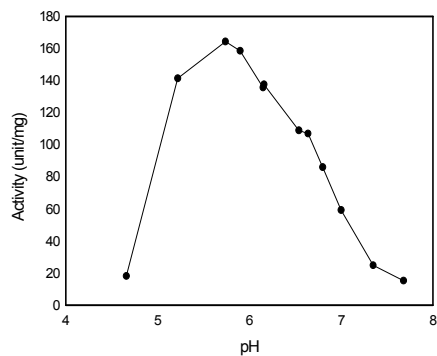


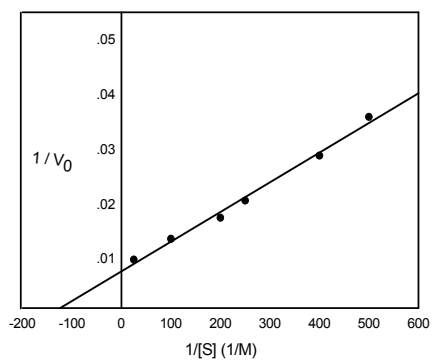
Figure 4-2. SDS-PAGE electrophoresis of KNOUC112 β -gal β -galactosidase. The protein was analyzed on a 7.5% polyacrylamide gel, and stained with Coomassie Brilliant R250. Lane 1, low MW marker ; lane 2, high MW marker ; lane 3, Lac-KNOUC112 β -gal β -galactosidase before DEAE-Sepharose CL-6B ion-exchange chromatography ; lane 4, KNOUC 112 β -gal β -galactosidase after DEAE-Sepharose CL-6B ion-exchange chromatography.



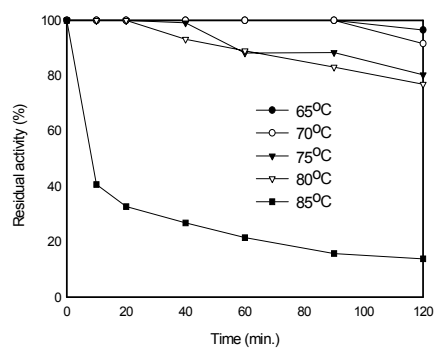
Effect of temperature on activity



Effect of pH on activity



Effect of substrate (ONPG) on activity



Thermostability

Figure 4-3. Characteristics of KNOUC112β-gal β-galactosidase

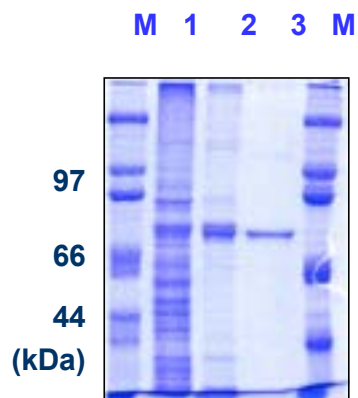


Figure 4-4. SDS PAGE of purified tib β 5-gal β -galactosidase
Lane M, Mw marker ; Lane I , transformant ; Lane 2, heat treatment ; Lane 3, His-tag
affinity chromatography

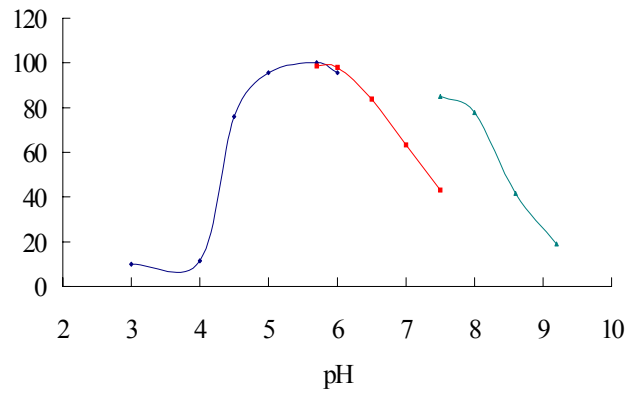
적정 pH, 적정온도, 내열성은 figure 4-5와 같다. pH 4.5~7.0에서 높은 활성을 가지며 pH 5.5~6.0이 적정 pH이었다. 70~95℃에서 활성이 높았고 90℃에서 활성이 제일 높았다. 70℃에서는 12시간동안, 80℃에서는 7시간동안 활성을 유지하여 내열성이 매우 높았다. 90℃에서는 2시간후에 활성이 50%로 감소하였다. 온도별 활성과 내열성을 고려할 때 이 효소의 적정온도는 90℃이며, 70~80℃에서 사용하는 것이 적절할 것으로 전달된다.

(3) KNOUC114β-gal, KNOUC105β-gal β-galactosidase

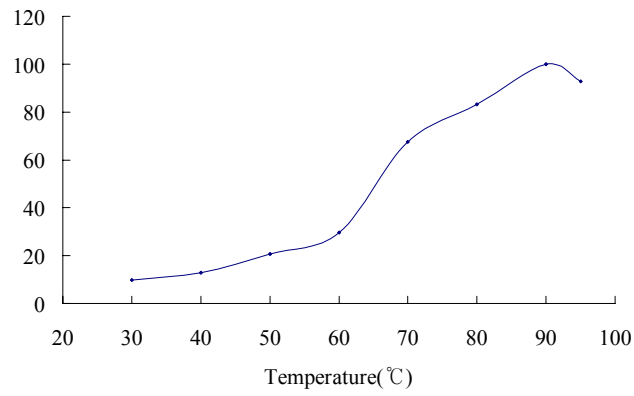
부분정제한 KNOUC114β-gal, KNOUC105β-gal β-galactosidase의 적정온도, 적정 pH, 내열성은 figure 4-6, figure 4-7과 같다.

KNOUC114β-gal β-galactosidase는 pH 5.5~6.0에서 높은 활성을 가지고 있으며 pH 5.5이하, pH 6.0이상의 pH에서는 활성이 급속하게 낮아져 적정한 pH범위가 매우 좁았다. 온도가 90℃ 증가할 때까지 활성이 계속 증가하긴 하였으나 75℃이상에서는 활성이 크게 증가하지는 않았다. 65~80℃의 온도에서는 2시간동안 활성감소 경향에 큰 차이가 없었고, 85℃에서는 1시간후에 활성이 50%로 감소하였다. 온도별 활성과 내열성을 고려할 때 실제 이용시에는 75~80℃에서 사용하는 것이 적당할 것으로 판단된다.

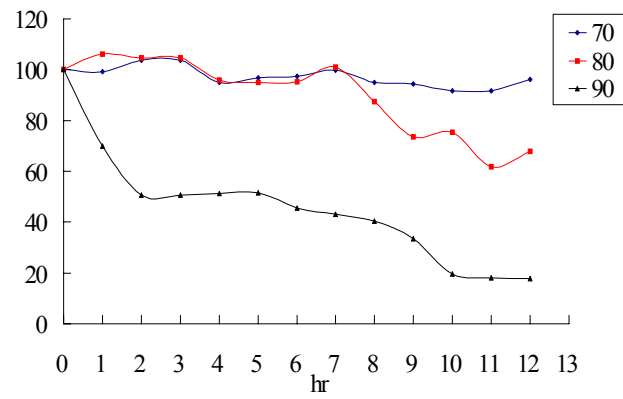
KNOUC105β-galβgalactosidase는 pH 6.0~pH 7.0에서는 활성을 가지고 있어 적정 pH가 우유유당분해에 적당하였다. 65~80℃에서 활성이 높았으며 75℃에서 제일 높은 활성을 나타내었고 85℃에서는 활성이 거의 사라졌다. 60℃에서는 3시간동안 활성을 유지하였으나 65℃, 70℃에서는 3시간동안에 활성이 각각 70%, 60%로 감소하였고 75℃에서는 30분만에 거의 불활성화하여 활성을 보이지 않았다. 온도별 활성 및 내열성을 고려할 때 KNOUC105β-galβgalactosidase는 실제 이용시 65℃이하에서 사용하는 것이 적절할 것으로 판단된다.



Effect of pH on activity

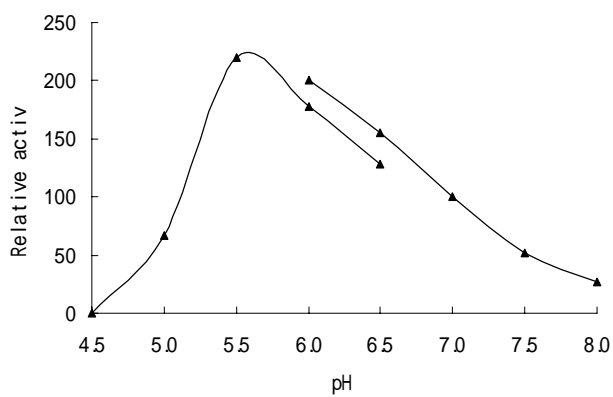


Effect of temperature on activity

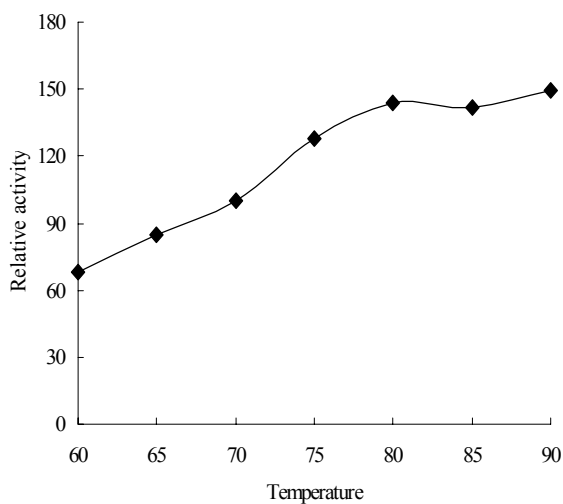


Thermostability

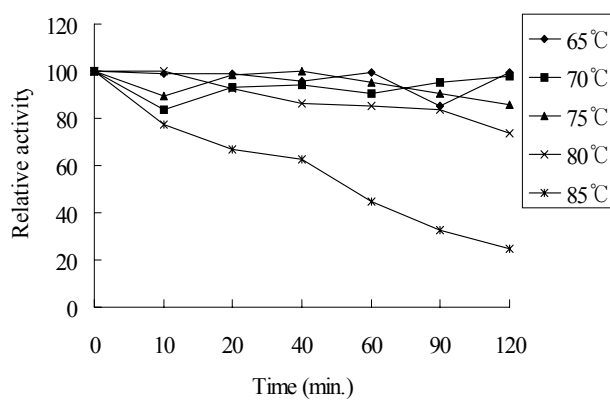
Figure 4-5. Characteristics of β -galactosidase tib β 5-gal



Effect of pH on activity

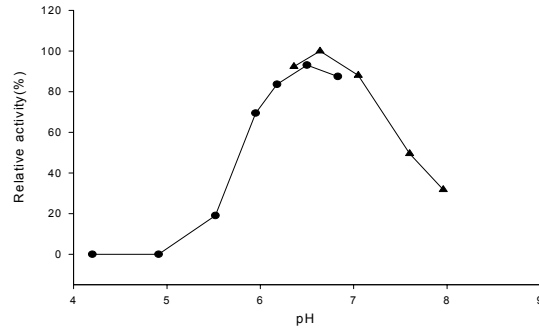


Effect of temperature on activity

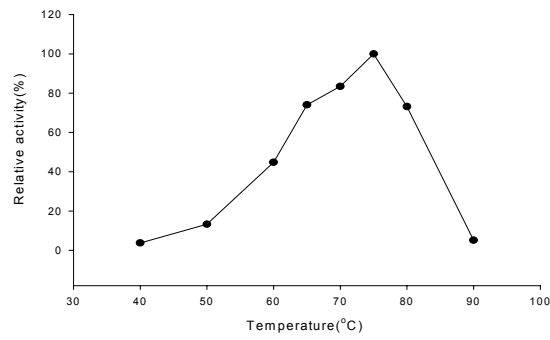


Thermostability

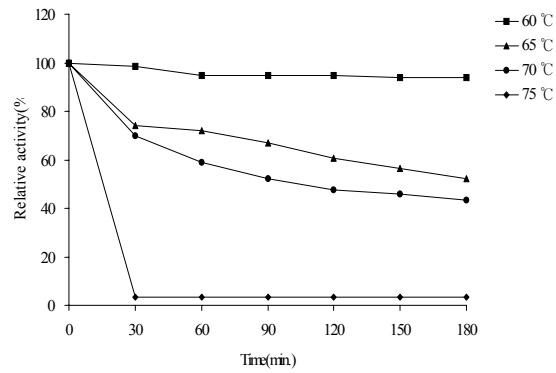
Figure 4-6. Characteristic of KNOUC114β-gal crude β-galactosidase



Effect of pH on activity



Effect of temperature on activity



Thermostability

Figure 4-7. Characteristics of KNOUC105β-gal crude β-galactosidase

2) β -glycosidase

(1) tat β -gly β -glycosidase

Cell free extract를 열처리하여 응고물을 제거한 후 His-tag affinity chromatography에 의해 정제를 완료하였다 (figure 4-8). 회수율은 77%이었으며 specific activity는 113 unit/mg이었다.

pH 및 온도에 의한 영향을 figure 4-9와 같다. pH4.5~6.5의 넓은 범위에서 좋은 활성을 가지고 있으며 pH5.0~6.0에서 활성이 제일 높았다. 온도가 80°C에 이르기까지 활성이 증가하였으며 70~90°C에서 상당히 높은 활성을 보였고, 95°C에서는 활성이 급속히 감소하였다. 70°C에서는 13시간동안 활성을 유지하였으나 80°C이상에서는 내열성이 약하여 1.5시간후에 활성이 50%로, 90°C에서는 1시간 후에 활성이 20%로 감소하였다. 온도별 활성과 내열성을 고려할 때 tat β -gly β -glycosidase는 실제이용시는 70°C~80°C에서 반응시키는 것이 적절할 것으로 판단된다.

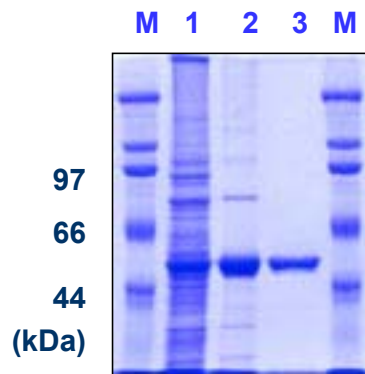
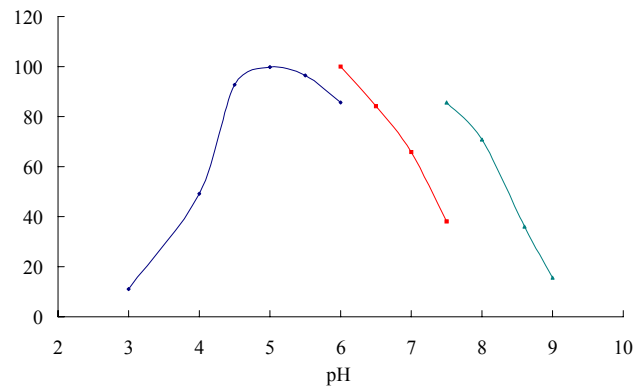
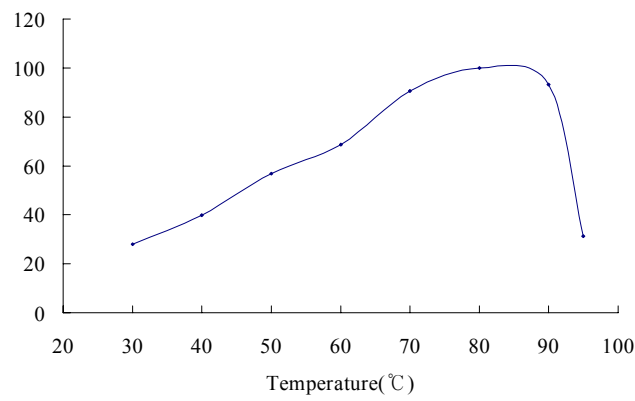


Figure 4-8. SDS-PAGE of purified tat β -gly β -glycosidase

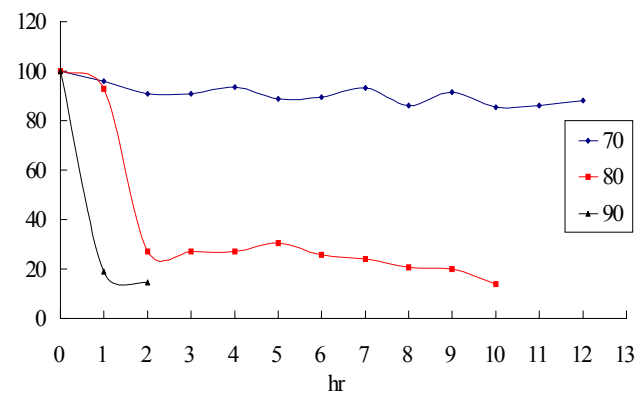
Lane M, Mw marker ; Lane I , transformant ; Lane 2, heat treatment ; Lane 3, His-tag affinity chromatography



Effect of pH on activity



Effect of temperature on activity



Thermostability

Figure 4-9. Characteristics of tatβ-glycosidase

(2) tib2 β -glycosidase

Cell free extract를 열처리하여 응고물을 제거하고 His-tag affinity chromatography에 의해 정제된 결과가 figure 4-10에 제시되어 있다. 회수율은 73%이고 specific activity는 66 unit/mg이었다.

tib2 β -gly β -glycosidase의 pH 및 온도별 활성, 내열성이 figure 4-11에 제시되어 있다. pH4.5~6.5의 넓은 범위에서 거의 유사하게 높은 활성을 보였고 pH5.5에서 활성이 제일 높았다. 70 $^{\circ}$ C에서 활성이 제일 높았고 75 $^{\circ}$ C이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. 70 $^{\circ}$ C에서는 12시간 후에 활성이 90%유지되었으나 80 $^{\circ}$ C이상에서는 한시간 후에 활성이 20%이하로 감소하였다. tib2 β -gly β -glycosidase는 내열성, 온도별 활성으로 보아 70 $^{\circ}$ C가 반응에 적당한 온도이다.

(3) tti β -gly β -glycosidase

Cell free extract를 열처리하여 응고물을 제거한 후 His-tag affinity chromatography에 의해 figure 4-12와 같이 정제하였다. 회수율은 85%이고 specific activity는 120 unit/mg이다.

tti β -gly β -glycosidase의 pH 및 온도에 의한 영향이 figure 4-13에 제시되어 있다. pH 4.5~6.5의 범위에서 높은 활성을 가지고 있으며 pH 5.0이 적정 pH이었다. 70~90 $^{\circ}$ C에서 유사하게 높은 활성을 가지고 있으며 95 $^{\circ}$ C에서는 활성이 매우 낮았다. 70 $^{\circ}$ C에서는 12시간동안 활성이 유지되었으며 80 $^{\circ}$ C에서는 6시간후에 활성이 50%로 감소하였고 90 $^{\circ}$ C에서는 1시간후에 활성이 20%로 감소하였다. 이 효소의 온도별 활성과 내열성을 고려할 때 70~80 $^{\circ}$ C가 반응에 적당한 온도이다.

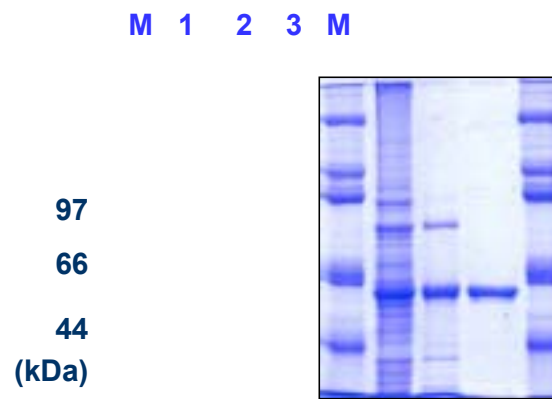
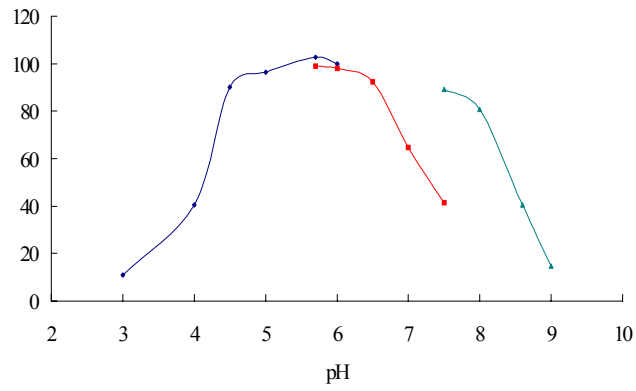
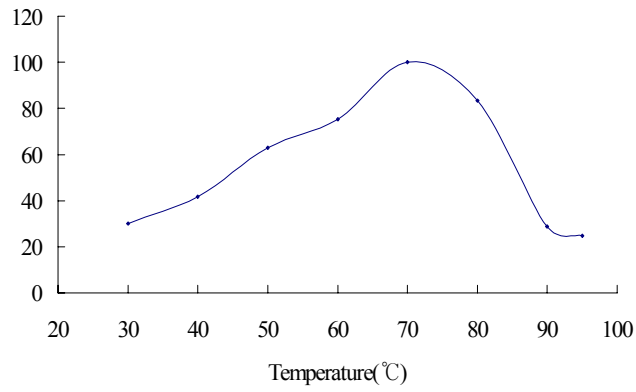


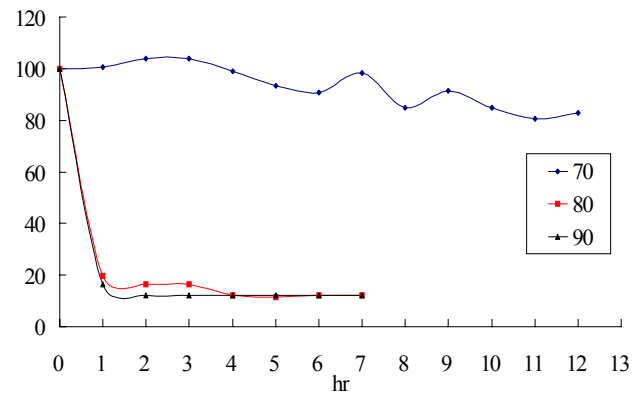
Figure 4-10. SDS-PAGE of purified tib2 β -gly β -glycosidase
Lane M, Mw marker ; Lane 1, transformant ; Lane 2, heat treatment ; Lane 3, His-tag
affinity chromatography



Effect of pH on activity



Effect of temperature on activity



Thermostability

Figure 4-11. Characteristics of tib2β-gly β-glycosidase

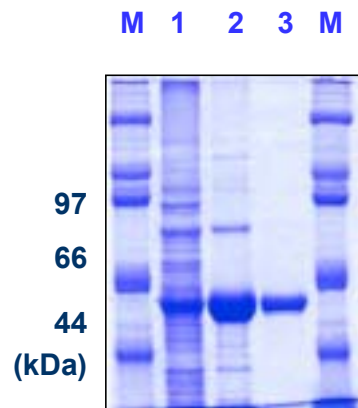
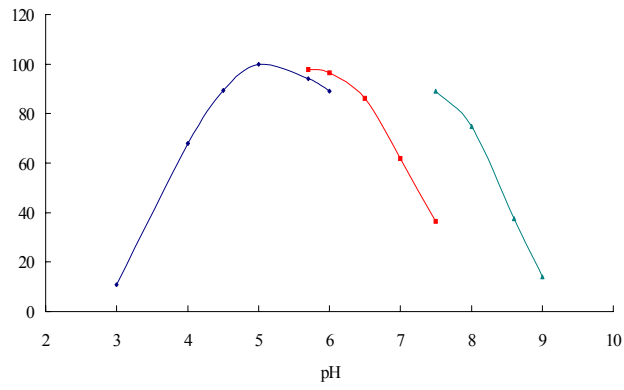
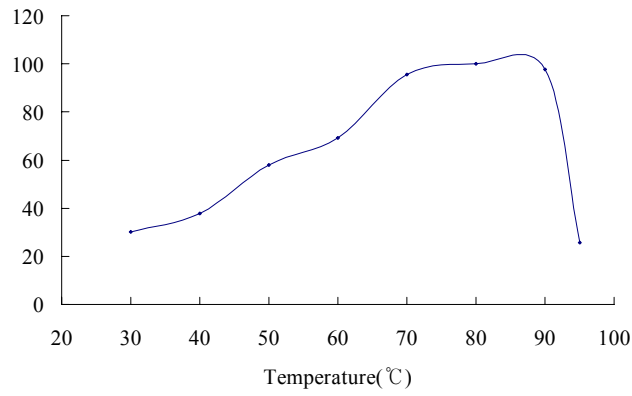


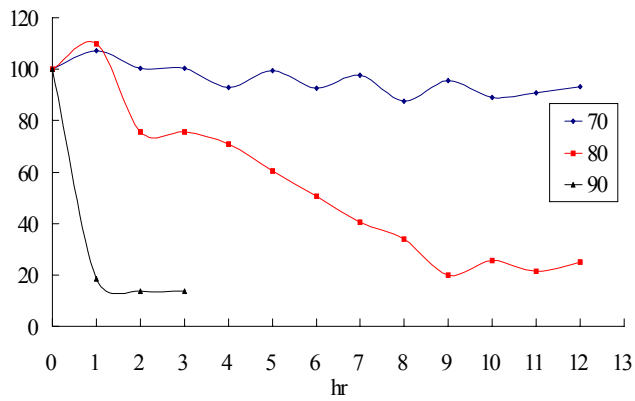
Figure 4-12. SDS-PAGE of purified t*fi*β-gly β-glycosidase
Lane M, Mw marker ; Lane I , transformant ; Lane 2, heat treatment ; Lane 3, His-tag
affinity chromatography



Effect of pH on activity



Effect of temperature on activity

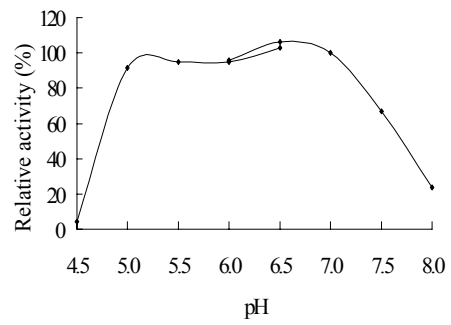


Thermostability

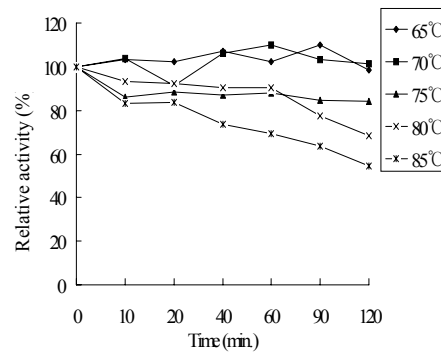
Figure 4-13. Characteristics of tfiβ-glyβ-glycosidase

(4) KNOUC202 β -gly β -glycosidase

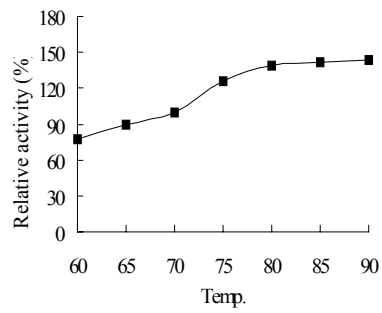
부분정제한 KNOUC202 β -gly β -glycosidase활성의 pH 및 온도에 의한 영향이 figure 4-14에 제시되어 있다. pH 5.0~7.0의 넓은 범위에서 유사하게 높은 활성을 가지고 있으며 적정 pH는 6.5이다. 온도가 90℃에 이르기까지 활성이 증가하였으며 75~90℃에서 거의 유사한 활성을 보였다. 65~75℃에서는 3시간동안 활성에 변화가 없었으며 80℃와 85℃에서는 3시간 후에 활성이 각각 80%, 70%로 감소하였다. KNOUC202 β -gly β -glycosidase의 온도별 활성과 내열성을 고려할 때 실제 이용시에는 70~75℃에서 사용하는 것이 적절할 것이다.



Effect of pH on activity



Effect of temperature on activity



Thermostability

Figure 4-14. Characteristics of KNOUC202β-gly crude β-glycosidase

제 5 절 β -galactosidase 돌연변이

1. 서론

내열성을 증진하고 적정 pH를 변화하여 중성 pH에서 활성을 높이고자 KNOUC112 β -gal의 돌연변이를 제조하였다. *E. Coli* β -galactosidase의 3차구조는 규명되어 있으나 KNOUC112 β -gal β -glycosidase와는 homology가 너무 낮아 구조추정에 이용할 수 없다. 그러므로 활성자리로 추정되는 부위를 임의적으로 변화하여 특성의 개선을 시도하였다.

2. 재료 및 방법

1) 돌연변이 위치

내열성 증진을 위해 4개의 돌연변이를, 적정 pH의 변화를 위하여 7개의 돌연변이를 시도하였다 (table 5-1).

구조내부의 소수성결합을 증가하여 내열성을 증진하기 위해 활성자리 근처의 친수성 아미노산인 valine, proline을 각기 소수성 아미노산인 tryptophan, leucine으로 대체하였으며, disulfide 결합을 유도하여 내열성을 증진하기 위하여 근접해 있는 321번째의 alanine과 324번째의 asparagine을 cysteine으로, 320번째 tryptophan과 325번째의 proline을 cysteine으로 대체하였다.

활성자리의 중요한 기능기부분으로 인정되고 있는 134번째의 theronine을 alanine, lysine, arginine, tyrosine, cysteine, aspartic acid, glutaminic acid으로 대체하여 적정 pH의 변화를 시도하였다.

2) 돌연변이 유전자제조

돌연변이 유전자는 Quick change site directed mutagenesis (stratagen, 2001)법에 의해 제조하였다.

Table 5-1. Mutation of KNOUC112 β -gal β -galactosidase

Site of amino acid	Mutation	Purpose	Mutation No.
134th	T→A	Change of opt pH	M1
366th	V→W	Thermostability	M2
384th	P→L	"	M3
320th, 325th	W→C P→C	"	M4
321th, 324th	A→C N→C	"	M5
134th	T→L	Change of opt pH	M6
134th	T→R	"	M7
134th	T→Y	"	M8
134th	T→C	"	M9
134th	T→D	"	M10
134th	T→E	"	M11

(1) Template DNA의 제조

KNOUC112 β -gal을 pUC118에 ligation하였다. Ligation후 *E. Coli* JM109에 전이, cloning하여 mutant gene의 template로 사용할 KNOUC112 β -gal gene을 포함하는 pUC118을 대량으로 제조하였다.

(2) PCR에 의한 mutant gene 함유 DNA의 복제

각 mutant의 forward primer와 reverse primer를 사용하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 실시하여 Template DNA 상에서 mutant gene을 함유하는 새로운 DNA를 복제하였다.

(3) Parental DNA의 분해

Template로 사용된 parental DNA를 *Dpn* I endonuclease로 분해하였다. Parental DNA는 methylation되어 있어 *Dpn* I endonuclease에 의해 선택적으로 분해되어 mutant gene을 함유하는 복제된 DNA만이 남게 된다.

(4) *E. Coli* XL1-blue의 transformation

E. Coli XL1-blue에 mutant gene을 함유하는 pUC118을 삽입, transformation한 후 LB(Amp+) agar배지에 도말, 배양하였다.

(5) Mutant gene의 sequencing

Bigdye automatic sequencer (ABI 377)와 PTC-200 Peltier Thermal cycler (MJ Research)를 사용하여 mutant gene의 nucleotide sequence를 결정, 확인하였다.

3) 돌연변이유전자의 발현

Mutant gene을 함유하는 pUC118로 transformation된 *E. Coli* XL1-blue를 LB (Amp+) agar에 도말하고 37°C에서 24시간 colony가 형성되도록 하였다. plate를 70°C에서 2시간 가열하여 *E. Coli* XL1-blue의 β -galactosidase를 불활성화시켰다. X-gal을 포함하는 Z-buffer를 균락위에 도말후 70°C에서 2시간 반응시켜 X-gal 분해색깔인 청색으로 발현을 판단하였다.

Table 5-2. PCR condition

Initial denaturation	95°C, 30 sec
18 cycle of PCR	95°C, 30 sec (Denaturation)
	55°C, 1 min (Annealing)
	68°C, 10 min (Extention)

4) 돌연변이 β -galactosidase 특성 조사

LB 액체배지에서 돌연변이 유전자를 발현한 *E. Coli* XL1-blue를 원심분리 (3,000×g, 20분, 4°C)하여 회수한 후 Na-phosphate (0.01M, pH7.0)에 현탁하여 30초간 5회 초음파처리하고 cell debris를 원심분리 (14,000×g, 20분, 40°C)에 의해 제거한 돌연변이 β -galactosidase 조효소의 적정온도를 65~95°C에서, 적정 pH를 pH 4.5~8.0에서, 내열성을 80°C와 85°C에서 조사하였다. 적정온도는 Na-phosphate buffer (0.04M, pH 7.0)에서 ONPG 분해활력을 조사하여 결정했다. 적정 pH조사에 사용한 완충용액은 Citrate-NaOH buffer (pH 4.5~6.5, 0.04M), Na-phosphate buffer (pH6.5~8.5, 0.04M)이었다. 내열성은 Na-phosphate buffer (0.04M, pH 7.0, 85°C)에서 잔존활성으로 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

KNOUC112 β -gal의 돌연변이 β -galactosidase조효소의 pH와 온도별 활성 및 내열성의 변화가 figure 5-1, 5-2, 5-3에 제시되어 있다.

M₃ (384th P→L), M₄ (320th W→C, 325th P→C), M₅ (321th A→C, 324th N→C), M₇ (134th T→R)은 발현, 생산된 β -galactosidase의 총활성이 KNOUC112 β -gal β -galactosidase의 1/10~1/20로서 대단히 낮아 아미노산의 교환이 β -galactosidase의 활성을 매우 감소시켰다.

pH별 활성은 M₁₀ (124th T→D)를 제외하고는 거의 변화가 없었다. 134번째 threonine을 aspartic acid로 교체한 M₁₀의 경우 적정 pH가 5.5에서 6.0으로 전환되어 다소 알카리쪽으로 이동하였다.

M₁ (134th T→A), M₆ (134th T→L), M₁₁ (134th T→E) β -galactosidase의 온도별 활성은 KNOUC-112 β -gal β -galactosidase와 동일했으며 M₉ (134th T→C), M₈ (134th T→Y)

은 90℃에서의 활성이 85℃보다 높아 적정 온도가 다소 증가하였다. M₂ (366th V→W), M₃ (384th P→L), M₄ (320th W→C, 325th P→C)의 β-galactosidase는 제일 높은 활성을 보이는 온도가 낮아져 M₂와 M₃ β-galactosidase는 80℃, M₄ β-galactosidase는 70℃에서 활성이 제일 높았다. 특히 M₂와 M₄는 KNOUC112β-galβ-galactosidase가 제일 높은 활성을 가지는 85℃에서의 활성이 매우 낮아져 내열성이 매우 낮아졌음을 시사한다.

85℃에서의 내열성은 M₆ (134th T→L)의 β-galactosidase가 KNOUC112β-galβ-galactosidase의 β-galactosidase와 유사하였으며 그외의 돌연변이 β-galactosidase는 모두 KNOUC112β-gal의 β-galactosidase보다 나빴다. 특히 M₂ (366th V→W), M₄ (320th W→C, 325th P→C)의 β-galactosidase는 40분만에 활성을 거의 모두 잃었다.

11개의 돌연변이 β-galactosidase 중 특성이 부분적으로 개선된 것은 M₈, M₁₀ 두 개이었다. 적정 pH가 5.5에서 6.0으로 다소 증가한 M₁₀의 β-galactosidase는 내열성이 나빠졌고, M₈의 β-galactosidase도 제일 높은 활성을 보이는 온도가 85℃에서 90℃로 다소 증가하였으나 내열성이 나빠져 돌연변이에 의한 특성의 개선에서 성과를 거두지 못했다.

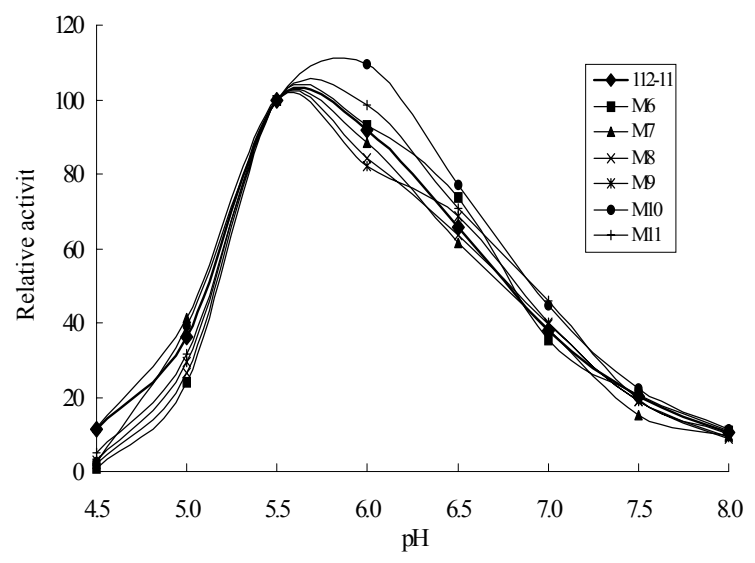
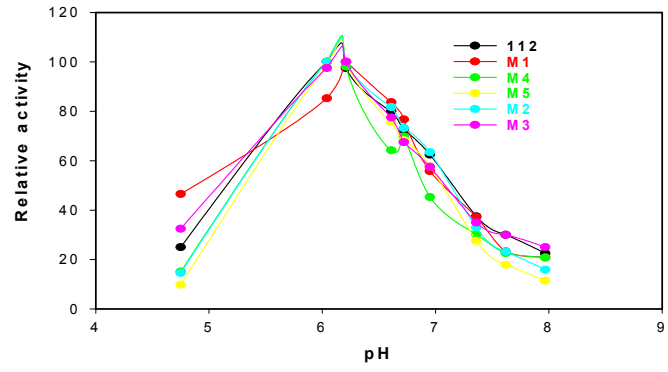


Figure 5-1. Effect of pH on activity of mutants of KNOUC112β-gal β-galactosidases

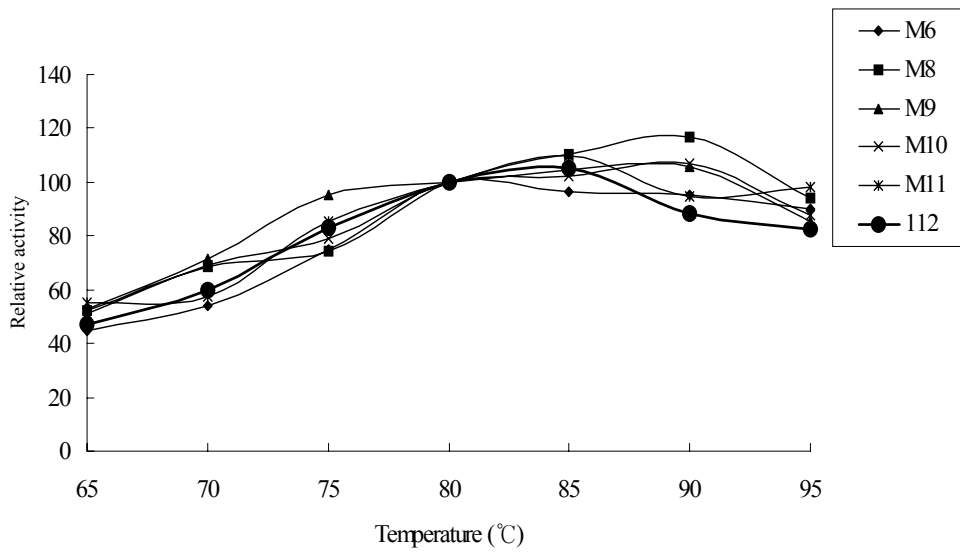
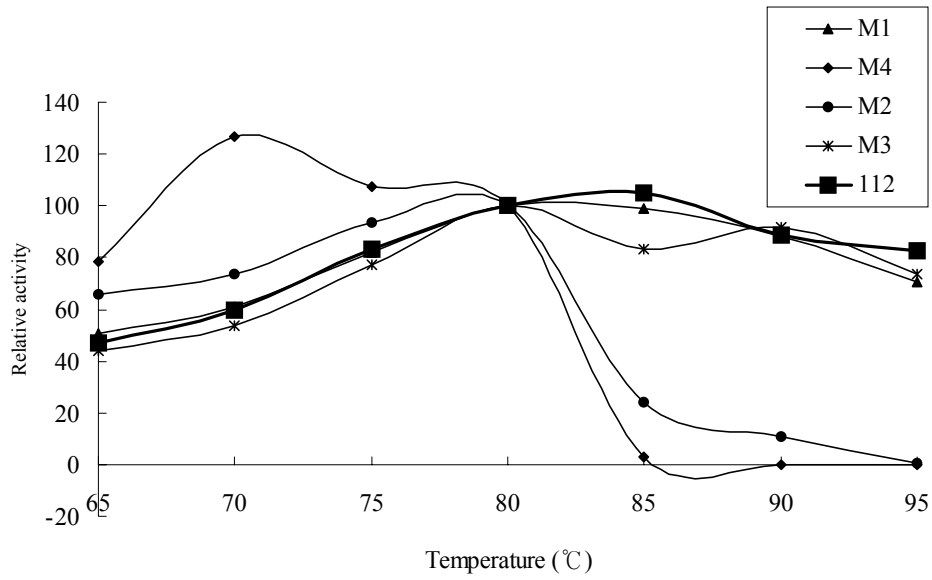


Figure 5-2. Effect of temperature on activity of mutants of KNOUC112 β -gal β -galactosidases

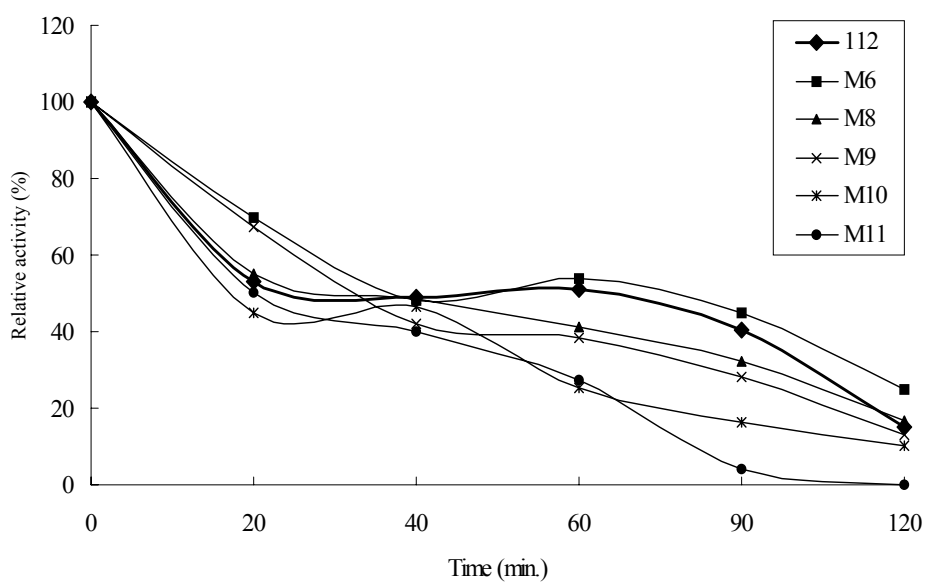
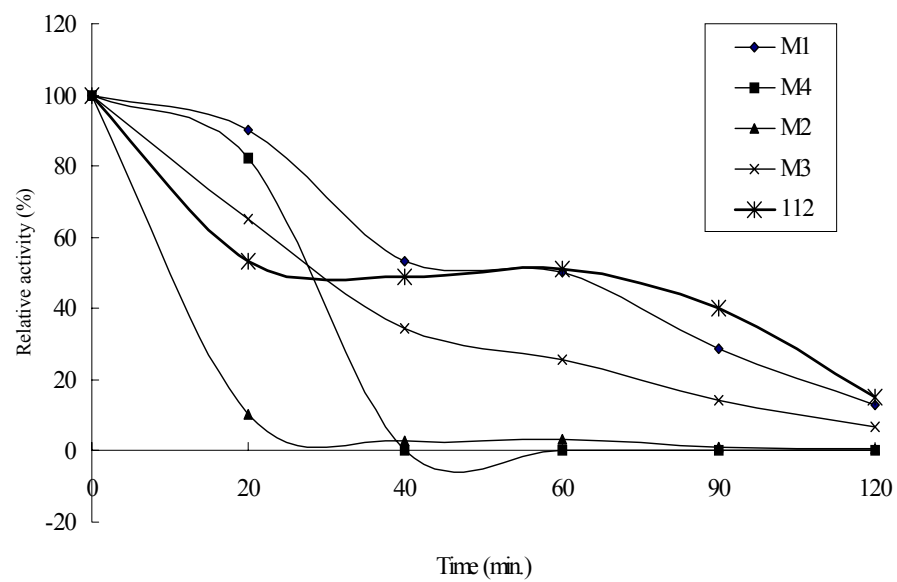


Figure 5-3. Thermostability of mutants of KNOUC112 β -gal β -galactosidase at 85°C

제 6 절 유당분해효소의 유당분해

1. 서론

β -galactosidase와 β -glycosidase 등 유당분해효소의 β -1,4-glycosidic 결합분해력은 기질의 종류에 따라 다르다. 그러므로 합성기질인 ONPG의 분해력과 유당의 분해력에는 차이가 있을 수 있다. 또한 우유에는 유당외에 여러 가지성분이 존재하므로 이들 성분이 유당분해효소의 유당분해력에 영향을 미치기 때문에 유당분해효소들간에 우유의 유당분해력은 차이가 있을 수 있다.

우유의 유당을 유당분해효소로 분해하기 위해서는 일정한 반응시간이 필요한 데 고온성 유당분해효소는 우유살균온도에서 높은 활성을 가질뿐만 아니라 안정하기 때문에 살균과 동시에 분해할 수 있어 반응과정 중의 미생물 성장의 우려가 없어 위생적 품질을 확보할 수 있고 유당분해를 위한 공정의 추가 설치 필요성이 없다.

본 연구에서 분리한 6종의 β -glycosidase 중 tib10 β -gly β -glycosidase는 tat β -gly β -glycosidase와 동일하고, thb β -gly β -glycosidase는 이미 발표된 바 있는 tth β -gly β -glycosidase와 동일하기 때문에 실험에서 제외하고 4종의 β -glycosidase와 4종의 β -galactosidase의 우유유당 분해력을 우유살균온도에서 조사하였다.

2. 재료 및 방법

1) 유당분해효소

KNOUC112 β -gal, KNOUC114 β -gal, KNOUC105 β -gal, tib β -gal 등의 4종 유전자로부터 발현된 β -galactosidase와 KNOUC202 β -gly, tat β -gly, tti β -gly, tib2 β -gly 등 4종 유전자로부터 발현된 β -glycosidase의 유당용액의 유당과 원유의 유당 분해력을 조사하였다.

효소는 *E. Coli*에서 발현, 생산하였다. LB (Amp+, 100 μ g/ml)에서 배양후 세포체를 원심분리 (3,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 20분)하여 회수하고 이를 Na-phosphate (0.01M, pH6.8)에 현탁하고, 30초간 5회 초음파처리후 원심분리에 의해 cell debris를 제거하였다. KNOUC105 β -gal β -galactosidase를 제외한 유당분해효소는 cell debris를 제거한 효소액을 80 $^{\circ}$ C에서

30분 가열후 원심분리 (14,000×g, 4℃, 20분)하여 응고물을 제거한 부분정제효소를 사용하였다.

KNOUC105β-galβ-galactosidase는 cell debris를 제거한 조효소액의 ammonium sulfate 35~85% 포화분획을 사용하였다.

2) 유당분해력 조사

Na-phosphate buffer (pH6.8, 0.01M) 유당용액 (4.32%)과 원유를 사용하여 63℃에서 1시간 30분동안, 73℃에서 30분동안 유당분해력을 조사하였다. 원유의 유당농도가 4.32%이었기 때문에 유당용액의 유당농도를 4.32%로 하였다.

시료 10 ml를 falcon tube (35 ml 용량)에 첨가하고 유당분해효소를 63℃, 73℃에서 100 unit의 활성을 가지는 량을 첨가, 혼합하고 water bath에서 100 stroke/min으로 진탕하면서 조사하였다. 유당분해정도는 HPLC로 조사하였다. 시료 2 ml에 H₂O (HPLC용) 4 ml를 가하고 균질 후 centriconYM-10 filter (Millipore, USA)에서 12,000 rpm, 12분간 원심분리 여과한 여액을 분석용 시료로 사용하였다. Guard column polypher CH CA HP Column (300 mm×6.5 mm, Merck, USA)을 사용하였고, mobile phase는 DDI H₂O이고, flow rate는 0.5 ml/min이며, refractive index detector를 사용하였다.

원유의 일반성분은 Milko Scan (A/S, N, Foss Electric, Denmark)으로 측정하였으며 총고형분 13.15%, 유당 4.32%, 지방 4.30%, 단백질 3.44%이었다.

3. 결과 및 고찰

1) β-galactosidase

(1) KNOUC112β-galβ-galactosidase

원유의 유당을 63℃에서 30분간 18.5% 분해하였고 73℃에서는 분해정도가 더 낮아 30분간 14.09%를 분해하였다 (figure 6-1). 73℃에서 5분동안에는 0.27%분해하였다. Na-phosphate완충용액에 용해되어 있는 유당을 63℃에서 30분동안에 14.38%, 73℃에서 30분동안에 7.83%분해하여 원유의 유당보다 분해정도가 매우 낮아 우유성분이 유당분해를 증진하는 것으로 추측된다. 원유유당을 73℃에서 5분동안에는 0.27%분해하였다. 원유유당의 63℃에서의 분해정도는 ONPG를 기질로 했을 때의 분해력이 15.09% (초기 10분간 분해), 7.76% (초기 30분간 분해) 이었다.

(2) KNOUC105 β -gal β -galactosidase

63 $^{\circ}$ C에서 30분동안의 원유의 유당은 22.1%, Na-phosphate 완충용액의 유당은 15.71% 분해하였으며, 73 $^{\circ}$ C에서는 30분동안에 각기 15.59%, 12.98% 분해하여 원유의 유성분이 유당분해를 다소 증진한 것으로 추측된다 (figure 6-2). 73 $^{\circ}$ C에서 5분동안에는 원유유당이 7.91% 분해하였다. 원유유당의 63 $^{\circ}$ C에서의 분해정도는 ONPG를 기질로 했을 때 분해력의 11.70% (초기10분간 분해), 9.27% (초기30분간)이었다.

(3) tib5 β -gal β -galactosidase

tib5 β -gal β -galactosidase는 원유의 유당을 63 $^{\circ}$ C에서 30분동안에 7.5%, 73 $^{\circ}$ C에서 30분동안에 5.9%를 분해했으며 73 $^{\circ}$ C에서 5분동안에는 거의 분해하지 못하였다 (figure 6-3). Na-phosphate 완충용액의 유당은 63 $^{\circ}$ C에서 30분동안에 14.96% 분해하여 원유의 유당보다 2배 분해되어 유성분이 유당분해를 방해하는 것으로 추측된다. 원유유당의 63 $^{\circ}$ C에서의 분해정도는 ONPG를 기질로 했을 때 분해력의 5.28% (초기 10분간 분해), 3.14% (초기 30분간 분해)이었다.

(4) KNOUC114 β -gal β -galactosidase

원유의 유당을 63 $^{\circ}$ C에서 30분동안에 5.08% 분해하였고 73 $^{\circ}$ C에서 30분동안 10.41% 분해하였다. 73 $^{\circ}$ C에서 5분동안에는 거의 분해하지 못하였다 (figure 6-4). Na-phosphate 완충용액의 유당은 63 $^{\circ}$ C에서 30분동안에 9.64%, 73 $^{\circ}$ C에서 30분동안에 13.22% 분해하여 원유의 유당보다 다소 더 많이 분해되었다. 원유유당의 63 $^{\circ}$ C에서의 분해정도는 ONPG를 기질로 했을 때 분해력의 4.13% (초기10분간 분해), 2.13% (초기30분간 분해)이었다.

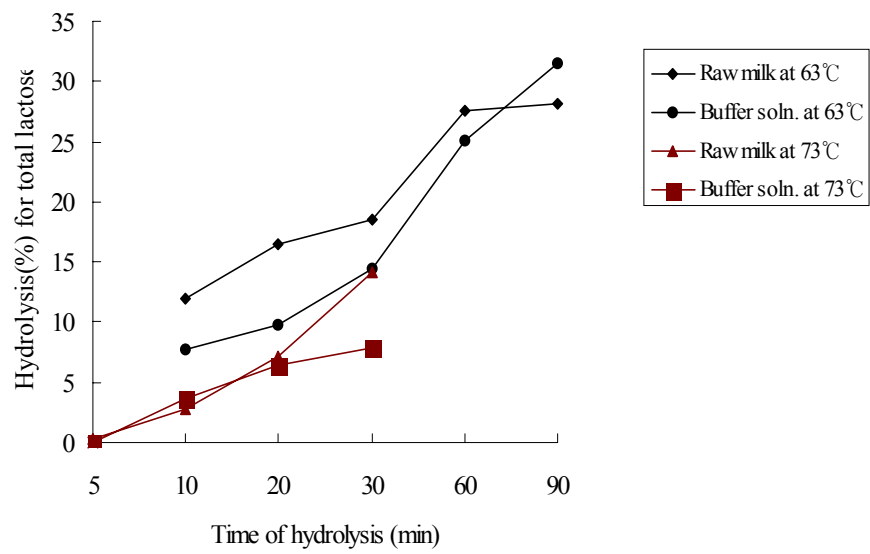


Figure 6-1. Hydrolysis of lactose in raw milk and Na-phosphate buffer (0.01M, pH6.8) by KNOUC112 β -gal β -galactosidase at 63°C and 73°C

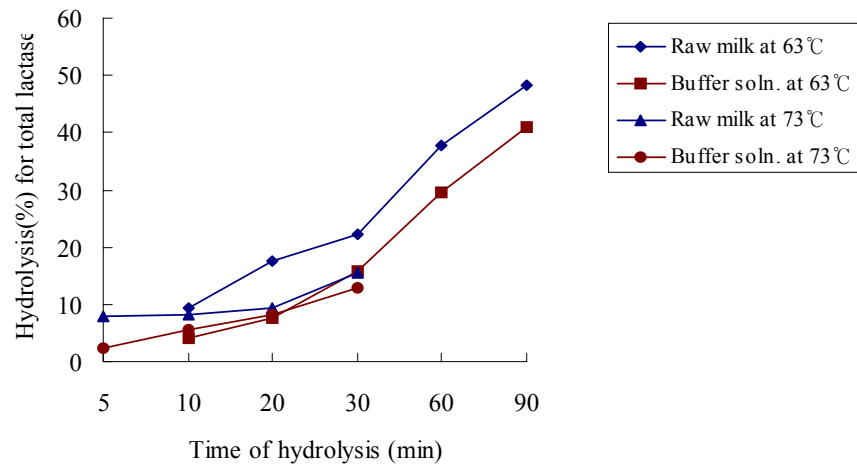


Figure 6-2. Hydrolysis of lactose in raw milk and Na-phosphate buffer (0.01M, pH6.8) by KNOUC105 β -gal β -galactosidase at 63°C and 73°C

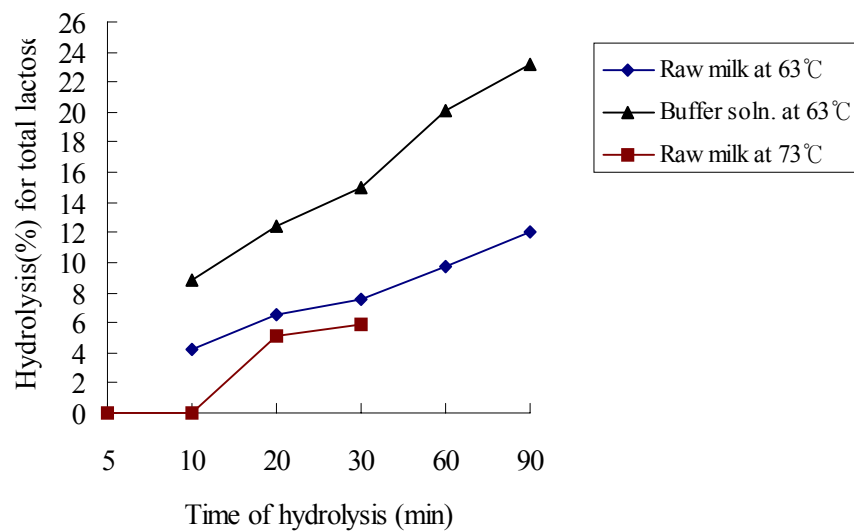


Figure 6-3. Hydrolysis of lactose in raw milk and Na-phosphate buffer (0.01M, pH6.8) by $\text{tib5}\beta\text{-gal}\beta\text{-galactosidase}$ at 63°C and 73°C

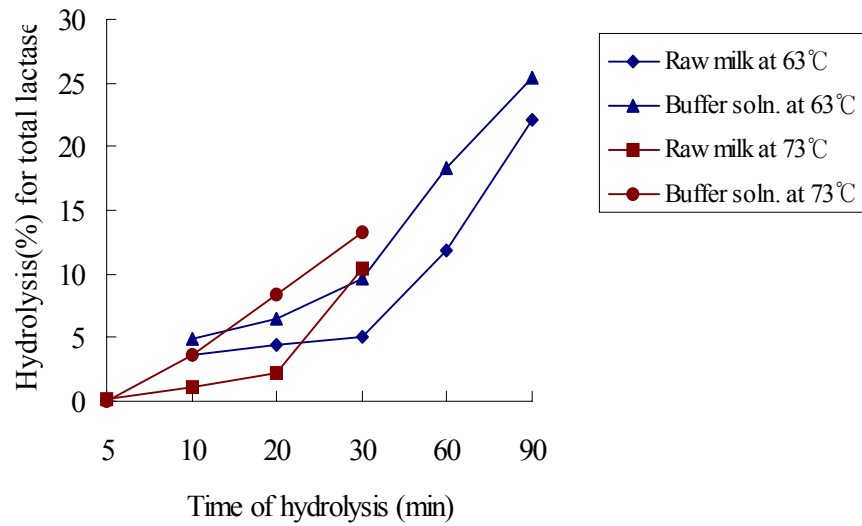


Figure 6-4. Hydrolysis of lactose in raw milk and Na-phosphate buffer (0.01M, pH6.8) by KNOUC114 β -gal β -galactosidase at 63°C and 73°C

2) β -glycosidase

(1) $\text{tfi}\beta$ -gly β -glycosidase

원유의 유당을 63℃에서 30분동안에 51.8%, 73℃에서 30분동안에 52.61% 분해하였고 73℃에서 5분동안에는 34.19%분해하였다 (figure 6-5). Na-phosphate완충용액의 유당은 63℃에서 30분동안에 47.97%, 73℃에서 30분동안에 57.2%분해하여 원유의 유당과 유사한 정도로 분해하였다. 원유유당의 63℃에서의 분해정도는 ONPG를 기질로 했을 때 분해력의 43.90% (초기10분간분해), 21.72% (초기30분간 분해)이었다.

(2) $\text{tat}\beta$ -gly β -glycosidase

원유유당을 63℃에서 30분동안에 42.69%, 73℃에서 20분동안에 46.48%분해하였다. 73℃에서 5분동안에는 25.61%분해하였다 (figure 6-6). Na-phosphate완충용액의 유당은 63℃에서 30분동안에 64.02%, 73℃에서 20분동안에 73.23%분해하여 원유의 유당보다 더 많이 분해되어 유성분이 유당분해를 저해하는 것으로 추측된다. 원유유당의 63℃에서의 분해정도는 ONPG를 기질로 했을 때 분해력의 30.7% (초기10분간 분해), 17.90% (초기30분간 분해)이었다.

(3) $\text{tib}2\beta$ -gly β -glycosidase

$\text{tib}2\beta$ -gly β -glycosidase는 원유의 유당을 63℃에서 30분동안에 64.44%, 73℃에서 30분동안에 74.29% 분해하였고 73℃에서 5분동안에는 52.01% 분해하였다 (figure 6-7). Na-phosphate완충용액의 유당은 63℃에서 30분동안에는 62.52%, 73℃에서 30분동안에는 62.47%분해하여 원유유당분해정도와 63℃에서는 유사하였으나 73℃에서는 매우 낮았다. 원유유당의 63℃에서의 분해정도는 ONPG기질로 했을 때 분해력의 59.03% (초기10분간 분해), 27.02% (초기 30분간 분해) 이었다.

(4) $\text{KNOUC}202\beta$ -gly β -glycosidase

Lac-KNOUC202 β -gly β -glycosidase는 원유유당을 63℃에서 1시간동안에는 14.27%, 73℃에서 30분동안에 33.14%분해하였고 73℃에서 10분동안에는 14.37%분해하였다 (figure 6-8). Na-phosphate완충용액의 유당은 63℃에서 1시간동안에 67.62%, 73℃에서 30분동안에 57.56% 분해하여 유성분이 유당분해를 매우 저해하는 것으로 추측된다. 원유유당의 63℃에서의 분해정도는 ONPG를 기질로 했을 때 분해력의 3.00% (초기 1시간분해) 이었다.

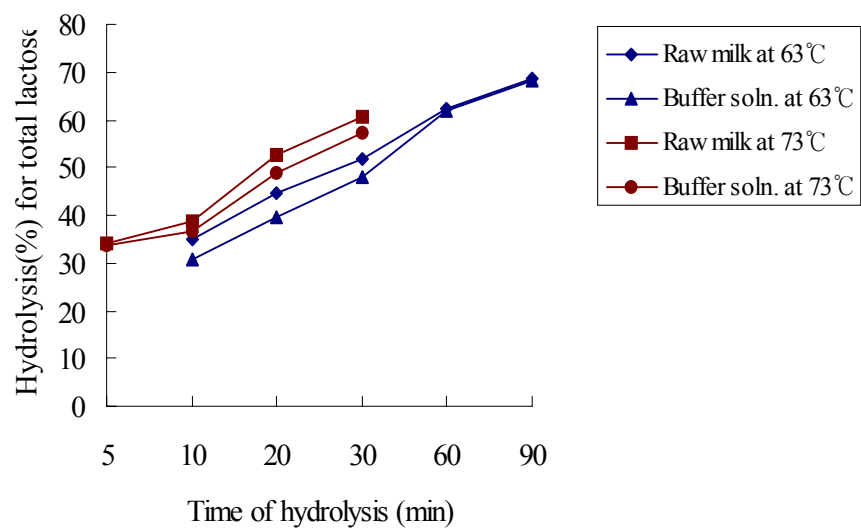


Figure 6-5. Hydrolysis of lactose in raw milk and Na-phosphate buffer (0.01M, pH6.8) by $\text{tf}\beta\text{-gal}\beta\text{-galactosidase}$ at 63 °C and 73 °C

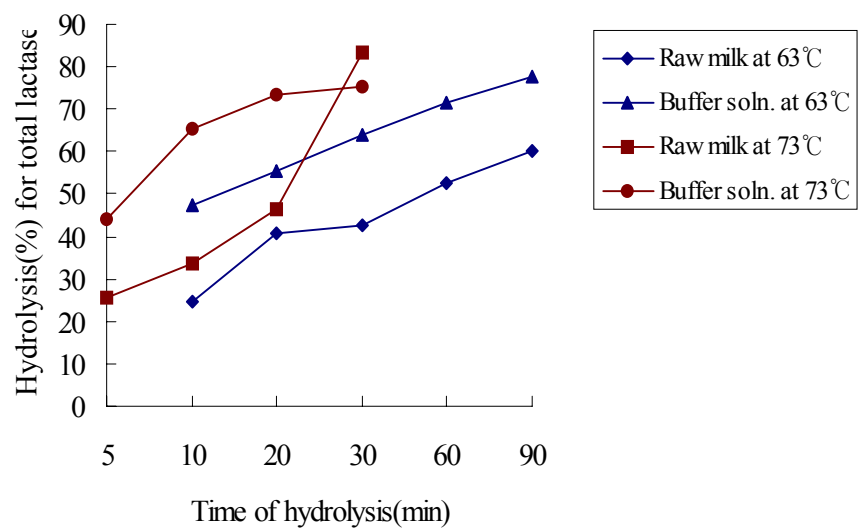


Figure 6-6. Hydrolysis of lactose in raw milk and Na-phosphate buffer (0.01M, pH6.8) by $\text{tat}\beta\text{-gly}\beta\text{-glycosidase}$ at 63°C and 73°C

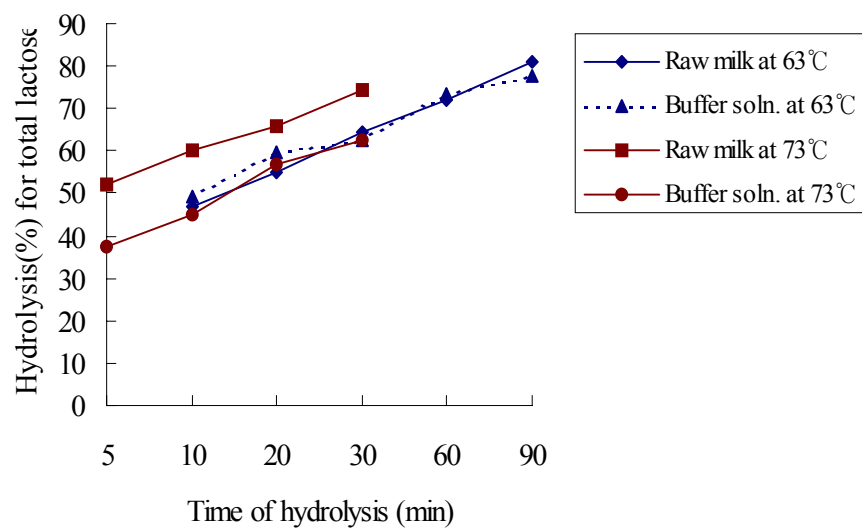


Figure 6-7. Hydrolysis of lactose in raw milk and Na-phosphate buffer (0.01M, pH6.8) by α -D-galactosidase at 63 °C and 73 °C

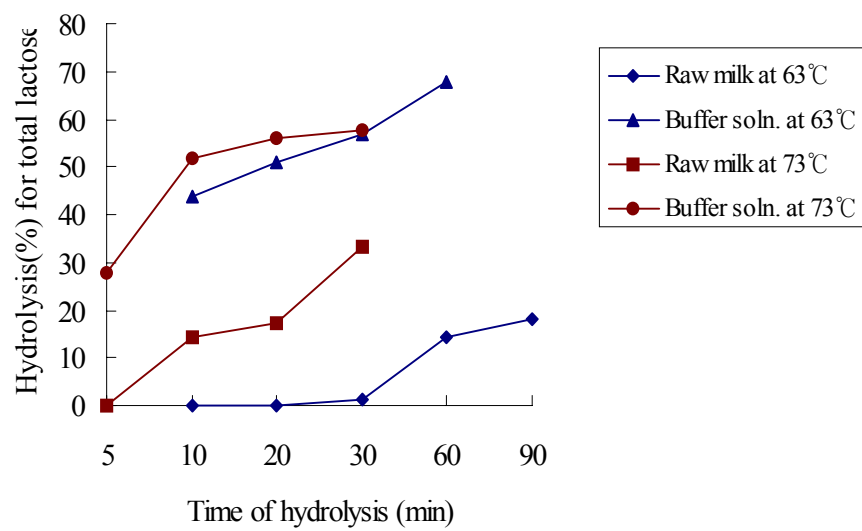


Figure 6-8. Hydrolysis of lactose in raw milk and Na-phosphate buffer (0.01M, pH6.8) by Lac-KNOUC202 β -glycosidase at 63°C and 73°C

제 7 절 유당분해시유 생산체계

1. 유당분해효소의 선발

분리한 10종의 유당분해효소 중 산업에 이용대상효소를 우유살균온도에서의 원유의 유당분해력과 내열성에 근거하여 선발하였다.

유당이 유당소화장애의 원인이긴 하지만 소화되지 않은 유당은 Ca흡수를 촉진하고 대장건강에 크게 기여하기때문에 우유의 유당을 완전히 분해하여 섭취하는 것보다는 우유유당의 40~60%정도만을 분해하여 섭취하므로써 소화되지 않은 상당량의 유당이 장관에 존재할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 유당의 일부만을 분해하므로써 유당 분해우유의 결점으로 지적되기도 하는 감미의 문제도 해결할 수도 있다.

본 연구에서 분리한 4종의 β -galactosidase는 저온장시간 살균체계인 63℃에서 30분 동안 우유유당의 18.5% (KNOUC112 β -gal β -galactosidase), 22.1% (KNOUC105 β -gal β -galactosidase), 7.5% (tib5 β -gal β -galactosidase), 5.08% (KNOUC114 β -gal β -galactosidase)에 불과하여 실험에서 이용된 효소량인 우유 1 ml당 ONPG분해력 100 unit보다 훨씬 많은 유당분해효소를 필요로 한다.

고온단시간 살균온도인 73℃에서의 분해력도 5분동안에 모두 8%미만으로서 분해력이 매우 낮았다.

β -glycosidase 4종 중 KNOUC202 β -gly β -glycosidase는 63℃와 73℃에서 매우 낮았으나 그외 3종의 β -glycosidase는 양호하여 63℃에서 30분동안 51.8% (tfi β -gly β -glycosidase), 42.69% (tat β -gly β -glycosidase), 64.44% (tib2 β -gly β -glycosidase)이었고 73℃에서 5분동안에 tib2 β -glycosidase는 유당의 52.01%를 분해하였다.

그러므로 tat β -gly, tfi β -gly 및 tib2 β -gly β -glycosidase를 사용하여 63℃에서 30분 분해하면 유당의 40~60%를 분해할 수 있다. tib2 β -gly β -glycosidase는 73℃에서 5분간 유당의 50%를 분해할 수 있어 이 효소의 73℃에서의 사용도 고려할 수 있으나 과도한 가열처리이기 때문에 적절치 않을 것으로 판단한다. 세 효소 모두 우유의 pH와 살균온도인 pH 6.8 및 63℃가 적정 pH 및 적정온도가 아니긴 하나 최대활성의 70%이상의 활성을 가진다. 또한 70℃에서 12시간동안 활성의 변화가 없는 것으로 보아 63℃에서의 내열성이 매우 양호하다.

상기와 같은 결과에 근거할 때 *tatβ-glyβ-glycosidase*, *tib2β-glyβ-glycosidase*, *tfiβ-glyβ-glycosidase*를 유당분해우유생산에 이용할 수 있다.

2. 유당분해효소의 생산

효소말단에 6개의 *histidine*이 결합되도록 변형된 유전자를 함유하는 vector *pET21b+*에 의해 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3)를 LB broth (Amp⁺, 100μg/ml)에서 37℃, 12시간 진탕배양 (200 rpm)한다. 배양후 원심분리 (4℃, 6000g, 20분)하여 세포를 회수하고 Z-buffer에 1회 세척 후 동일 buffer에 현탁한다. 현탁된 세포액을 초음파처리하여 세포벽을 파괴하고 원심분리 (14,000×g, 20분, 4℃)하여 제거한다. 80℃에서 30분간 가열후 응고물을 원심분리 (14,000×g, 4℃, 20분), 제거하여 *his-binding affinity column*에서 정제한다. 정제후 *centriplus column* (amicon)을 통과하여 *desalting*후 *freeze drying*한다.

3. 유당분해시유 생산체계

tatβ-glyβ-glycosidase, *tib2β-glyβ-glycosidase*, *tfiβ-glyβ-glycosidase*를 사용하여 63℃에서 30분 가열하여 살균하는 저온장시간 살균 (LTLT)시 유당을 분해하여 유당분해우유를 생산한다.

원유유당 50% 분해에 필요한 효소는 *tatβ-glyβ-glycosidase*는 정제효소 0.1 mg/원유 ml, *tib2β-glyβ-glycosidase*는 정제효소 0.12 mg/원유 ml, *tfiβ-glyβ-glycosidase*는 정제효소 0.08 mg/원유 ml이다.

효소를 살균탱크의 원유에 첨가하여 유당을 분해한다. 이 효소들은 모두 63℃에서의 내열성이 우수하기 때문에 효소를 고정화하여 살균탱크에 설치, 장기간 이용하므로 효소 이용량을 최소화할 수 있다.

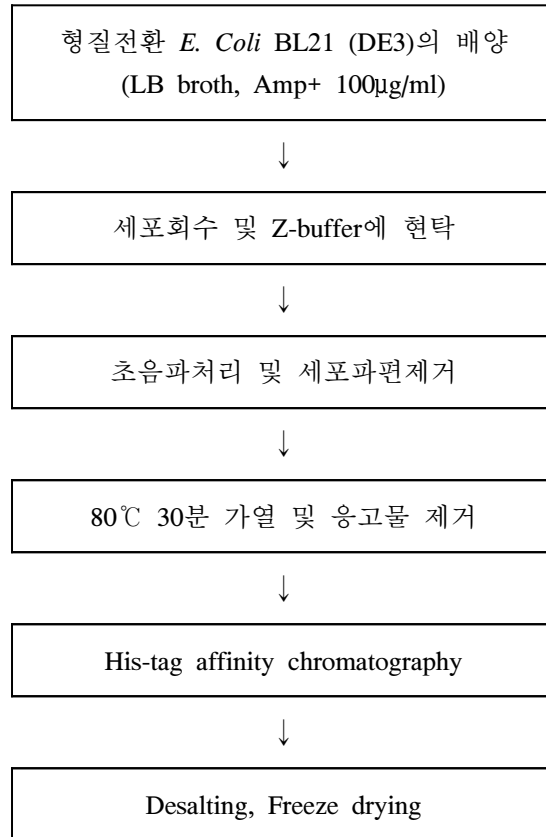


Figure 7-1. 정제유당분해효소 생산체계

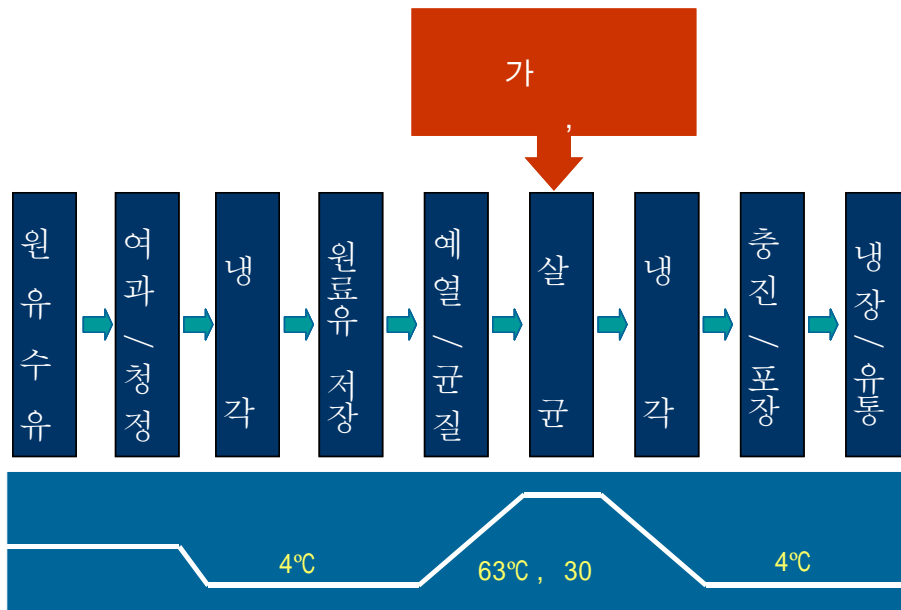


Figure 7-2. 유당분해우유 생산체계

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 및 달성도

1. 연도별 연구목표 및 연구내용

1) 1차년도

(1) 연구개발목표

특성이 우수한 내열성 β -galactosidase와 그 생산원인 미생물을 분리, 선발하고 β -galactosidase 유전자를 분리한다.

(2) 연구내용

① β -galactosidase 생산 고온성미생물의 확보

ATCC로부터 내열성 β -galactosidase를 생산할 것으로 예측되는 미생물10주를 구입, 확보하였고, 일본과 뉴질랜드 화산지역에서 39종의 시료를 채취하여 β -galactosidase를 생산하는 고온성 미생물 29종을 분리하였다.

② 내열성 β -galactosidase 생산원의 선발

ATCC균주 10종 중 β -galactosidase를 생산하는 것으로 확인된 6종을 선발하였고, 화산지역사료에서 분리한 29종 중에서 8종을 조효소의 적정효소, 적정 pH, 내열성, 효소생산량에 근거하여 선발하였다.

③ 유전자의 분리

선발된 14종의 고온성미생물로부터 PCR법과 제한효소 부분분해방법을 이용하여 β -galactosidase 유전자를 분리하였으며 1차년도에 2종의 β -galactosidase 유전자 (KNOUC112 β -gal, KNOUC114 β -gal)를 분리하였다.

2) 2차년도

(1) 연구개발목표

내열성이 우수한 β -galactosidase의 유전자를 *Pichia pastoris*의 chromosomal DNA에 결합, 전이하고 적정생산조건을 조사하므로써 내열성 β -galactosidase를 대량으로 생산할 수 있는 안정한 체계를 확보한다. 유전자를 분리하지 못한 미생물로부터 유전자분리를 계속 실시한다.

(2) 연구내용

① 분리한 β -galactosidase 유전자의 구조규명

1차년도에 분리한 KNOUC112 β -gal과 KNOUC114 β -gal의 유전자의 deoxyribonucleotide서열을 규명하였으며 두 유전자 모두 β -galactosidase 유전자임을 확인하였다.

② β -galactosidase 유전자의 *Pichia pastoris*로의 전이

KNOUC112 β -gal과 KNOUC114 β -gal 유전자를 *Pichia pastoris*에 전이하여 세포외 β -galactosidase를 생산하였다.

③ *Pichia pastoris*의 β -galactosidase 생산최적화 및 β -galactosidase 특성의 규명

*Pichia pastoris*가 생산한 KNOUC112 β -gal의 β -galactosidase와 KNOUC114 β -gal의 β -galactosidase 중 KNOUC112 β -gal의 내열성을 포함하는 특성이 우수하였으므로 *Pichia pastoris*의 KNOUC112 β -gal β -galactosidase 생산조건을 최적화하였고, *Pichia pastoris*가 생산한 β -galactosidase를 정제하여 특성을 조사하였다.

④ 일본 및 뉴질랜드 온천지역 분리, 선발 미생물의 동정

일본 및 뉴질랜드 온천지역에서 분리하여 선발된 미생물 8종을 동정하였다. 7종은 *Thermus sp.*, 1종은 *Geobacillus sp.*로 규명되었다.

⑤ Tat β -gly, KNOUC202 β -gly 유전자분리

유전자를 분리하지 못한 미생물로부터 유전자 분리를 계속 하였다. Tat β -gly,

KNOUC202 β -gly 두 유전자를 분리하여 deoxyribonucleotide 배열을 확인하였던 바 이들 두 유전자는 모두 β -glycosidase 유전자이었다.

3) 3차년도

(1) 연구개발목표

β -galactosidase의 내열성을 포함하는 특성을 개선하기 위하여 site directed mutagenesis에 의해 돌연변이 β -galactosidase를 제조한다.

유전자를 분리하지 못한 미생물로부터 유전자 분리를 계속 실시한다.

(2) 연구내용

① 돌연변이 β -galactosidase 생산

2차년도에 선발한 KNOUC112 β -gal 유전자의 11부위를 site directed mutagenesis에 의해 변환하여 11종의 돌연변이 유전자를 합성하고 이를 발현하여 11종의 돌연변이 β -galactosidase를 합성하였다.

② tib5 β -gal, tti β -gly, tib2 β -gly, thb β -gly, tib10 β -gly 유전자 분리

유전자를 분리하지 못한 미생물로부터 유전자분리를 계속하였다. tib5 β -gal, tti β -gly, tib2 β -gly, thb β -gly, tib10 β -gly 5종의 유전자를 분리하여 deoxyribonucleotide 배열을 규명하였다. tib5 β -gal은 β -galactosidase유전자이었고 그외 4종은 모두 β -glycosidase유전자이었다. 이중 thb β -gly 유전자는 기발표된 것과 동일한 것이었고 tib10 β -gly는 2차년도에 분리한 tat β -gly와 동일한 것이었다.

4) 4차년도

(1) 연구개발목표

3차년도에 제조한 돌연변이 β -galactosidase의 특성과 2차년도, 3차년도에 분리한 β -galactosidase와 β -glycosidase들의 특성을 조사한다.

본 연구에서 분리한 모든 β -galactosidase와 β -glycosidase의 우유살균조건에서의 우유유당분해능력을 조사하여 실용성을 검증하고 유당분해우유생산체계를 확립한다.

(2) 연구내용

① KNOUC105 β -gal 유전자 분리

유전자를 분리하지 못한 미생물로부터 KNOUC105 β -gal 유전자를 분리하여 deoxyribonucleotide구조를 규명하였으며 이 유전자는 β -galactosidase 유전자로 확인되었다.

② 돌연변이 β -galactosidase 특성조사

11종의 돌연변이 β -galactosidase의 적정 pH, 적정온도, 내열성을 조사하였다. 돌연변이 β -galactosidase 중 일부의 특성이 부분적으로 변화하였으나 실용성이 없었으므로 소기의 목적을 달성하지 못하였다.

③ β -galactosidase, β -glycosidase 특성조사

2차년도에 정제, 조사한 KNOUC112 β -gal β -galactosidase를 제외한 3종의 β -galactosidase와 4종의 β -glycosidase의 특성을 조사하였다. tib5 β -gal, tat β -gly, tfi β -gly, tib2 β -gly는 정제하여 특성을 조사하였고 KNOUC114 β -gal, KNOUC105 β -gal, KNOUC202 β -gly는 시간이 부족하여 부분정제효소의 특성을 조사하였다.

④ β -galactosidase와 β -glycosidase의 우유 유당분해능력 조사

4종의 β -galactosidase와 4종의 β -glycosidase의 원유 유당분해능력을 우유의 LTLT 살균온도인 63 $^{\circ}$ C와 HTST살균온도인 73 $^{\circ}$ C에서 조사하였다. tat β -gly, tfi β -gly, tib2 β -gly β -glycosidase의 유당분해능력이 우수하여 실용성이 있는 것으로 인정되었다.

본 연구는 β -galactosidase를 목표로 시작하였으나 실용성에서 β -glycosidase가 더 우수하였다.

⑤ 유당분해시유 생산체계

tat β -gly, tfi β -gly, tib2 β -gly β -glycosidase를 사용하여 LTLT살균체제인 63 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하여 원유의 유당이 40~60% 분해하된 유당분해시유를 생산하므로써 위생적품질이 이러한 유당분해시유는 유당이 가지는 건강증진가치를 유지하면서 유당소화장애를 해결할 수 있다.

2. 연구개발목표의 달성도

년도	연구개발목표	달성도
1차년도	▪ β -galactosidase 생산고온성미생물 확보	100%
	▪ 미생물로부터 생산된 β -galactosidase 특성 확인 및 미생물 선발	100%
	▪ 선발된 미생물의 genomic library 확립	100%
	▪ β -galactosidase 및 β -glycosidase 유전자 분리	100%
2차년도	▪ β -galactosidase 유전자의 <i>Pichia pastoris</i> 에 전이 및 발현	100%
	▪ <i>Pichia pastoris</i> 에서 생산된 recombinant β -galactosidase의 특성 확인	100%
	▪ β -galactosidase의 생산 최적조건 확립	100%
3차년도	▪ 돌연변이 위치 결정 및 돌연변이 유전자 합성	100%
	▪ 돌연변이 유전자의 발현 및 돌연변이 β -galactosidase 생산	100%
4차년도	▪ 돌연변이 β -galactosidase의 특성조사 및 선발	100%
	▪ β -galactosidase 및 β -glycosidase의 정제	100%
	▪ β -galactosidase 및 β -glycosidase의 생화학적 특성조사	100%
	▪ 우유유당분해 양태조사	100%
	▪ 유당분해시유제조 체계 확립	100%

제 2 절 관련분야에의 기여

1. 내열성 유당분해효소 생산 신균주의 분리 및 유당분해효소 유전자 구조 확인

내열성 β -galactosidase를 생산하는 2종의 *Thermus sp.*와 1종의 *Geobacillus sp.* 및 내열성 β -glycosidase를 생산하는 1종의 *Thermus sp.*를 새로이 분리하였고, 이들의 유전자가 새로운 유전자임을 확인하였다.

2. ATCC 고온성 균주의 유당분해효소 유전자 규명

ATCC가 확보하고 있는 고온성 균주 4종에서 1종의 β -galactosidase 유전자와 3종의 β -glycosidase 유전자를 분리하여 구조를 확인함으로써 해당균주의 유전학적 특성을 규명하는 데 기여하였다.

3. 내열성 세균 β -galactosidase 유전자의 효모로의 전이

*Thermus sp.*의 내열성 β -galactosidase 유전자를 *Pichia pastoris*로 전이, 발현함으로써 세균으로부터 분리한 내열성 β -galactosidase 유전자가 효모에서 발현될 수 있음을 확인하였다.

4. 위생적 품질이 확보되는 유당분해시유의 경제적인 생산체계의 확립

원유 살균시 유당분해효소를 동시에 처리하여 유당분해시유를 생산함으로써 유당분해시유를 제조하기 위한 별도의 과정이 필요하지 않을 뿐만 아니라 위생적 품질이 확실하게 확보되는 생산체계를 확립하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용계획

실용성이 있는 것으로 확인된 $t\text{fi}\beta\text{-gly}$, $t\text{at}\beta\text{-gly}$, $t\text{ib}2\beta\text{-gly}$ 등 3종의 $\beta\text{-glycosidase}$ 유전자는 특허출원 중에 있으며, 특허등록이 완료된 후에 기업에 기술이전을 추진할 것이다. 그 외의 연구결과는 학술지에 발표할 예정이다.

제 2 절 추가연구의 필요성

$\beta\text{-glycosidase}$ 를 기업에서 이용할 경우 고정화하므로서 경제성을 더욱 높일 수 있을 것이다. 또한 유전자를 *Pichia pastoris*에 전이하므로서 더욱 안정한 효소생산체계를 확보할 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 돌연변이 유전자 제조기술의 개발

돌연변이 유전체의 제조를 위하여 single strand DNA방법과 PCR법이 사용되어 왔으나 이들 방법은 유전자에 따라 돌연변이체의 제조가 용이하지 않을 수도 있다. 근래 Quick change site directed mutagenesis법이 개발되어 돌연변이 유전자를 정확하게, 용이하게 제조할 수 있었다.

2. 유전자 구조변환에 의한 효소정제방법의 개선

효소의 정제는 경우에 따라 매우 많은 단계의 과정과 시간이 필요로 한다. 그러나 효소특성에 변화가 없는 한 유전자의 후미에 poly histidine tag를 결합시키므로써 His-binding affinity chromatography에 의해 효소를 신속하게 정제할 수 있다.

3. 저온성 효소의 연구

극한 온도조건과 관련된 효소의 연구는 내열성 효소에 대한 연구가 주류를 이루었으나, 최근에는 저온성 효소에 대한 연구가 시작되고 있음이 확인되었다.

제 7 장 참 고 문 헌

- Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A. and A. M. Klibanov. 1987. Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering. Proc. Natl. Acad. Sci., 84:675-679.
- Amelunxen, R. and M. Lins. 1968. Comparative thermostability of enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*. Arch. Biochem. Biophys., 125:765-769.
- Clare, J. J., Romanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith, M. A., Payne, M. M., Sreekrishna, K. and C. A. Henwood. 1991. Production of mouth epidermal growth factor in yeast : high level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. Gene, 105:205-212.
- Crabb, J. W., Murdock, A. L. and R. E. Amelunxen. 1977. Purification and characterization of thermolabile glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the facultative thermophile *Bacillus coagulans* KU. Biochem., 16:4840-4847.
- Cregg, J. M., T. S. Vedvick and W. C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Bio/Technology. 11:905-910.
- Dabrowski, S., G. Sobiewska, J. Maciunska, J. Synowiecki and J. Kur. 2000. Cloning, expression and purification of the His₆-tagged thermostable β -galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia Coli* and some properties of the isolated enzyme. Protein Expression and purification. 19:107-112.
- Dalquist, F. W., Long, J. W. and W. L. Bigbee. 1976. Role of calcium in thermal stability of thermolysin. Biochemistry, 15(5):1103-1111.
- Davis, A. E. and T. Bolin. 1967. Lactose intolerance in Asians. Nature. 216:1244-1245.
- De Vos, W. M. and G. Simons. 1988. Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phospho- β -galactosidase and β -galactosidase genes and their expression products. Biochimie, 70(4):461-473.
- Dion, M., L. Fourage, Jean-Noël Hallet and B. Colas. 1999. Cloning and expression of a β -glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. Glycoconjugate J. 16:27-37.
- Estell, D. A., Graycar, T. P. and J. A. Wells. 1985. Engineering an enzyme by

- site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.*, 260:6518-6521.
- Flatz, G., Saengudom, C. and T. Sanguanbhokhai. 1969. Lactose intolerance in Thailand. *Nature*, 221:758-759.
- Gilat, T., Malachi, S. EG. and Sb. Shochet. 1971. Lactose intolerance in an Arab population. *Am. J. Dig. Dis.*, 16:203(Cited from Simmons, F. J. 1973. *Dig. Dis.*, 18:595-610)
- Goodman, R. E. and D. M. Pederson. 1976. β -Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Can. J. Microbio.*, 22:817
- Greenberg, N. A., and R. R. Mahoney. 1982. Production and characterization of β -galactosidase form *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, 47:1824.
- Hardjito, L., Greenfield, P. F. and P. L. Lee. 1992. A model for β -galactosidase production with a recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch culture. *Biotechnology progress*, 8(4):298-306.
- Hirata, H., Negoro, S. and O. H. C. S. Wakanodo. 1985. High production of thermstable β -galactosidase of *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 49(6):1547-1549.
- Ikagaya, K., Ishida, Y., Murakami, Masaki, A., Sugio, N., Takechi, K., Murakami, S., Tatsumi, H., Ogawa, Y., Nakano, E. Motai, H. and H. Kawabe. 1992. Enhancement of the thermostability of the alkaline protease from *Aspergillus oryzae* by introduction of a disulfide bond. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56:326-327.
- Ikai, A. 1980. thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem.*, 88:1895-1898.
- Invitrogen. 1996. Pichia expression kit, protein expression.
- Invitrogen. 1999. Manual methods for expression of recombinant protein in Pichia pastoris. catalog No. K1710-01.
- Jacobson, R. H., Zhang X. J., Dubose, R. F. and B. W. Matthews. 1994. Three dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature*, 369(30):761-766.
- Kim, N. S. and S. I. Kim. 1991. Some molecular characteristics and improving methods for thermal stability of enzyme. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, 19(1):101-108.
- Kotsuka, T., Akanuma, S., Tomuro, M., Yamagishi, A. and T. Oshima. 1996. Further

- stabilization of 3-isopropylmalate dehydrogenase of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, by a suppressor mutation method. J. Bact., 178:723-727.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
- Macris, B. J. 1982. Production of thermostable β -D-galactosidase by *Alternaria alternata* grown in whey. Appl. Environ. Microbiol. 44:1035.
- Matsmura, M., Signor, G. and B. W. Matthews. 1989. Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. Nature, 342:291-293.
- McGill, D. B. 1983. Diagnostic tests for lactase deficiency in milk intolerance and rejection (edited by Nice, J. D.). Karger, New York. 35-44pp.
- Mozhaev, V. V. 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. Trends in Biotech, 11(March):88-95.
- Mozhaev, V. V. and K. Martinek. 1984. Structure-stability relationship in proteins : new approaches to stabilizing enzymes. Enzyme Microb. Technol. 6(February):50-59.
- Nakamura, S. Ohta, S., Arai, K., Arai, N., Oshima, T. and Y. Kaziro. 1978. studies on polypeptide-chain-elongation factors from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8 : 3. Molecular properties. Eur. J. Biochem., 92:533-543.
- Nosoh, Y. and T. Sekiguchi. 1990. Protein engineering for thermostability. Trends in Biotech., 8(January):16-20.
- Ohtsu, N., H. Motoshima, K. Goto, f. Tsukasaki and H. Matsuzawa. 1998. Thermostable β -galactosidase from an extreme thermophile, thermus sp. A4: Enzyme purification and characterization, and gene cloning and sequencing. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(8):1539-1545.
- Olsen, O. and K. K. Thomsen. 1991. Improvement of bacterial β -galactosidase thermostability by glycosylation. J. Gen. Microbiol. 137:579-585.
- Park, Y. K., DeSanti, M. S. S. and G. M. Pastore. 1979. Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. J. Food Sci, 44:100-103.
- Ramana Rao, M. V. and S. M. Dutta. 1981. Purification and properties of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. J. Food Sci, 46:149.
- Sakanaka, K., Yan, W., Kishida, M. and T. Sakai. 1996. Introduction of mitochondria into respiratory-deficient mutant of yeast and improvement of thermostability. J. of

- Fermentation and Bioengineering, 81(2):109-114.
- Shukla, T. P. 1975. β -Galactosidase technology : a solution of the lactose problem. CRC critical review in Food Tech., January:325-356.
- Simoons, F. J. 1973. New light on ethnic differences in adult lactose intolerance. Dog. Dis., 18:595-610.
- Sorensen, S. G. and E. V. Crisan. 1974. Thermostable lactase from thermophilic fungi. J. Food Sci., 39:1184-1187.
- Stratagen, 2001. Quick chang XLsite-directed mutagenesis kit. Instruction manual.
- Ulich, J. T., Mcfeters, G. A. and K. L. Temple. Induction and characterization of β -galactosidase in an extreme thermophile. J. Bacteriology, 110(2):691-698.
- Widmer, F. and J. A. Leuba. 1979. β -Galactosidase from *Apergillus niger*. Eur. J. Biochem., 100:559-567.
- Xiangyuan, H., Z. Shuzheng and Y. Shoujun. 2001. Cloning and expression of thermostable β -glycosidase gene from *Thermus nonproteolyticus* HG102 and characterization of recombinant enzyme. Applied Biochem and Biotech. 94:243-255.
- Yoo, J., K. W. Han, H. K. Kim, M. H. Kim and S. T. Kwon. 2000. Purification and characterization of a thermostable β -glycosidase from *Thermus caldophilus* GK24. J. Microbiol. Biotechnol. 10(5):638-642.
- 김종우. 1994. 한국인의 유당소화장애에 관한 연구. 한국낙농학회지, 16(1):105-114.
- 안종건, 김유용, 홍경훈. 1993. β -Galactosidase의 urea에 의한 구조변화가 활성 및 내열성에 미치는 영향. 한국방송통신대학교 논문집, 16:539-550.
- 안종건, 김현욱. 1981. *Bacillus coagulans* ATCC 8038이 생산한 β -galactosidase의 특성에 관한 연구. 한국낙농학회지, 3(2):115-127.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.