

Cephalosporin C의 생변환을 위한 *Trigonopsis variabilis*의 D-amino Acid Oxidase 유전자의 클로닝 및 발현

이진형 · 정태완 · *곽성곤 · *임동준 · **윤철식 · **이상기 · †강용호
영남대학교 생화학과, *영남대학교 공업화학과, **한국과학기술연구원 생명공학 연구소
†영남대학교 응용미생물학과

Cloning and Expression of D-amino Acid Oxidase from *Trigonopsis variabilis* for Cephalosporin C Biotransformation

Jin-Hyung Lee, Taeowon Chung, Sung-Gon Kwak*, Dong-Joon Lim*,
Cheol-Sik Yoon**, Sang-Ki Rhee**, and Yong-Ho Khang†

Department of Biochemistry, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

*Department of Industrial Chemistry, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Daejeon 305-600, Korea

†Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

ABSTRACT

Trigonopsis variabilis is a strong producer of D-amino acid oxidase that can transform cephalosporin C (ceph C) to α -keto-adipyl-7-aminocephalosporanic acid (AKA-7ACA). Polymerase chain reaction (PCR) was applied to isolate the D-AAO gene from *T. variabilis*. To clone the PCR fragment, four different methods were examined using enzymatic reactions of Taq DNA polymerase, Klenow, T4 DNA polymerase I, Alkaline phosphatase Calf Intestinal, and T4 kinase. Ligation of phosphorylated blunt-end PCR fragment and dephosphorylated blunt-end of pUC18 plasmid yielded the best cloning efficiency. One of recombinant *E. coli* transformants showed D-AAO activity against ceph C in both cell extracts and permeabilized cells.

서 론

*Trigonopsis variabilis*에 있는 D-amino acid oxidase (E.C.1.4.3.3)는 베타락탐 항생제인 cephalosporin C (ceph C)를 α -keto-adipyl-7-aminocephalosporanic acid (AKA-7ACA)로 생변환하는 산업적으로 중요한 효소이다(1). AKA-7ACA는

ceph C 생변환 반응의 생성물인 hydrogen peroxide에 의하여 비효소반응으로 glutaryl-7-aminocephalosporanic acid (GL-7ACA)로 전환된다(2). D-amino acid oxidase (D-AAO)는 쥐, 토끼, 돼지, 사람등의 뇌나 신장세포 등에 다량 함유 되어 있으나(3), ceph C 생변환을 위해서는 *T. variabilis*, *Fusarium solani*(4), *Rhodotorula gracilis*(5), *Rhodotorula toruloides*(6) 등의 진핵균이 이용되고 있다. *T. variabilis* D-AAO 효소는 ceph C 생변환

† Corresponding Author

에 필요한 산소나 반응 생성물인 hydrogen peroxide의 존재하에서 반감기가 10~15시간인 불안정한 효소이다(2). 따라서 온도나 pH 변화 등 생변환 반응의 환경 변수에 대하여 D-AAO 효소의 안정성을 증진시키기 위하여 효소 및 미생물의 균주를 고정하는 연구가 꾸준히 진행되어왔다(5-9). 그러나 단백질 공학적인 방법으로 D-AAO 효소의 분자구조를 변경함으로써 안정성이 높은 D-AAO 효소를 개발하려는 노력은 국내외적으로 매우 미약하다. 본 연구는 cepH C 기질에 대한 D-AAO 효소의 활성부위 등 D-AAO 효소의 분자구조를 연구하기에 앞서 효모인 *T. variabilis*의 D-AAO 유전자를 클로닝하여 *E. coli*에서 발현한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주와 Plasmid

Trigonopsis variabilis(KCTC 7263; ATCC 10679)는 한국과학기술원 유전공학연구소의 유전자 은행에서 구입하였다. *T. variabilis*는 yeast extract 10g/l; malt extract 15g/l; D-methionine 2g/l를 사용하여 30°C에서 배양하였다. 유전자 클로닝에 이용한 plasmid는 pUC18과 pUC19를 사용하였다.

*T. variabilis*의 Chromosomal DNA 정제

Erlenmeyer flask(500ml)에서 4일간 배양한 *T. variabilis* 배양액 100ml를 원심분리하여 Yoon 등의 (10) 방법을 따랐다.

PCR 반응조건

Primer는 *T. variabilis* CBS 4095의 D-AAO 유전자 배열 (11)을 참고하여 hair-pin loop가 발생하지 않도록 설계하여 5'-ATGGCTAAAATCGTTGTT-3' (primer 1)와 5'-CTAAAGGTTTGGACGAGT-3' (primer 2)을 한국생공(대전)에 주문하여 각각 1μM 사용하였다. PCR 반응조건은 Sambrook 등 (12)의 방법을 따랐으며 ThermoJet (EquiBio, Belgium) 기기를 사용하여 pre-cycle 2min, 94°C에서 1min, 55°C에서 1min, 72°C에서 1min, post-cycle 4min으로 35 cycle 수행하였다.

세포추출액 조제

D-AAO 유전자가 들어 있는 재조합 *E. coli*를 500ml Erlenmeyer flask에서 하룻밤 배양하여 OD (600nm) 약 1.0이 되었을 때 lactose 1%를 첨가

하여 12시간 더 배양하였다. 이 균주를 원심분리하여 회수하고 멸균증류수로 세척한 다음 1ml의 인산완충액(50mM, pH7)에 현탁시킨 후 직경 0.1mm의 glass bead를 같은 부피로 넣고 -70°C에서 1시간 냉동하였다. 냉동된 시료는 mini-bead beater (Biospec products, USA)를 사용하여 5000rpm으로 3분간 세포벽을 파쇄하였다. 세포가 파쇄된 내용물을 원심분리하여 상등액을 세포추출액으로 사용하였다.

D-AAO 효소활성 측정

세포추출액 500μl를 cepH C (10mM) 2ml 용액과 혼합하고 UV/VIS spectrophotometer (Hitachi U-2000, Japan)를 이용하여 cepH C의 생변환 반응 결과 생성되는 H₂O₂의 발생량을 240nm에서 3600 sec 동안 측정하였다. 반응조건은 pH 7에서 20°C이었으며 세포추출액이 들어 있지 않은 cepH C (10mM) 용액을 표준시료로 사용하였다.

HPLC 분석을 위한 시료는 세포추출물 대신 permeabilized *E. coli*를 cepH C와 반응하여 제조하였다. 재조합 *E. coli*를 회수하여 toluene 5%가 들어있는 ethanol 10% 용액으로 25°C에서 10분간 permeabilization 시킨 후 멸균한 인산완충용액 (pH 8)으로 두 번 세척하였다. 세척한 균주에 10mM cepH C를 첨가하고 Erlenmeyer flask (500ml)를 이용하여 30°C에서 1시간 반응시켰다. 반응액 0.5ml를 methanol 0.5ml와 혼합하여 저온 원심분리기 (Micro17R, 한일과학산업)에서 12000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 membrane filter(0.25μm)로 여과하여 HPLC (Tosoh Model 8010, Japan)로 분석하였다. HPLC의 조건은 C18 column (Tosoh ODS80-TM, Japan), flow rate 1.0ml/min, UV 254nm를 사용하고 mobile phase는 50mM phosphate buffer (pH 7)에 용해한 3% methanol 용액을 사용하였다. HPLC 분석을 위한 표준시료인 cepH C와 7-ACA는 제일제당의 고영환 박사(충북 음성군 대소공장)가 제공하였으며, GL-7ACA는 Chen 등의(13) 방법을 참고하여 glutaric acid (Aldrich)와 7-ACA를 사용하여 본 실험실에서 제조하여 사용하였다.

결과 및 고찰

PCR에 의한 D-AAO 유전자의 증폭

T. variabilis CBS 4095의 D-AAO 유전자(11)는

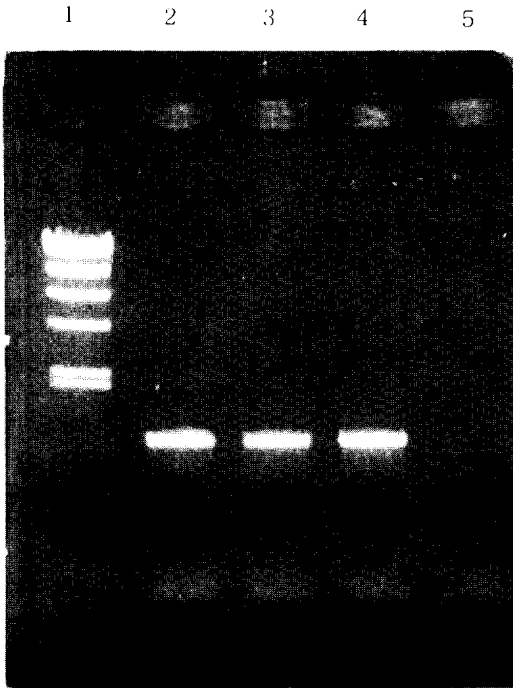


Fig. 1. PCR fragment encoding D-amino acid oxidase from *T. variabilis*.

Lane 1: λ -HindIII DNA marker, lane 2: DNA 5ng, lane 3: DNA 10ng, lane 4: DNA 15 ng, lane 5: no DNA (control).

1071bp이며 computer software (DNASIS, Hitachi, Japan)를 이용하여 대표적인 unique sites를 조사한 결과 EcoRI 절단부위가 245bp에 있었으며 pUC18의 polycloning 부위에 있는 BamHI, HindIII, KpnI 효소의 인식부위는 없었다. 이 유전자의 처음과 끝 부분의 배열을 참고하여 oligonucleotides를 설계하여 PCR반응을 실행한 결과 Fig. 1에서와 같이 모두 약 1kbp의 PCR 단편이 단일 밴드로 검출되었다. Higuchi 등의 (14) 조사에 의하면 DNA template 양이 8~300ng 범위 내에서 증폭되는 PCR 단편의 양은 PCR 반응이 28cycle 이상 일 때 큰 차이가 나지 않았다. 본 연구에서도 *T. variabilis*의 chromosomal DNA량을 5~15ng(Fig. 1의 lanes 2, 3, 4)으로 조절하고 PCR 반응을 35 cycle로 했을 때 나타나는 밴드의 강도는 별다른 차이가 없었다. 이 PCR 단편을 D-AAO 유전자로 가정하고 pUC18 vector에 클로닝을 시도하였다.

Table 1. Cloning efficiency of PCR fragment into pUC18 plasmid (each method was described in text).

	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4
Colony numbers	48	72	36	22
Cloning numbers of PCR fragment	0	0	0	2

PCR 단편의 클로닝

PCR 단편은 Taq DNA polymerase의 non-templated terminal deoxynucleotide transferase 활성에 의하여 3' 말단에 single A overhang을 가지게 되어 blunt-end ligation이 쉽지 않다. 이런 문제를 해결하기 위하여 다른 실험실에서는 Taq polymerase로 blunt-end vector에 single thymidine을 붙이거나(15), single stranded phage vector를 이용하기도 하였으며(16), plasmid vector에 HphI, MboII, XcmI 등 single base 3' T-extension을 남기는 제한효소를 polycloning sites에 삽입하여 PCR vector를 개발하기도 하였다(17, 18). 상업용의 PCR vector (TA Cloning™ system, Invitrogen, USA; pGEM-T vector system, Promega, USA)는 간편한 점은 있지만 가격이 비싸고 사용횟수가 제한되어 있는 것이 단점이다. 본 논문에서는 실험실에서 많이 사용하는 효소를 이용하여 경제적인 방법으로 PCR 단편을 plasmid vector에 클로닝하는 것을 연구하였다. 첫번째 방법은 pUC18 vector를 SmaI으로 절단하여 blunt end로 만들고 Taq DNA polymerase로 vector의 3' 말단에 single deoxythymidine (dT)를 붙인 다음 증폭된 PCR 단편을 그대로 ligation하였다(method 1). 이 방법은 dT를 붙인 vector의 추출과 정제가 어려웠으며, ligation한 plasmid를 *E. coli*에 형질전환하여 agar plate에 도말한 결과 48 colony가 나타났으나 PCR 단편이 클로닝된 것은 발견할 수 없었다(Table 1). 그래서 PCR 단편을 Klenow polymerase로 blunt end를 만든 다음 blunt end의 pUC18 plasmid에 ligation한 결과, agar plate상에 많은 colony가 검출되었지만 PCR 단편이 들어간 것은 발견하지 못하였다(method 2). 따라서 plasmid의 재결합을 방지하기 위하여 blunt end된 pUC18를 CIP (Alkaline phosphatase Calf Intestinal)로 처리하여 5' 부분을 dephosphorylation 시키고 처리하지 않은 PCR 단편을 그대로 ligation 하였으나 역시 클로닝에 실패

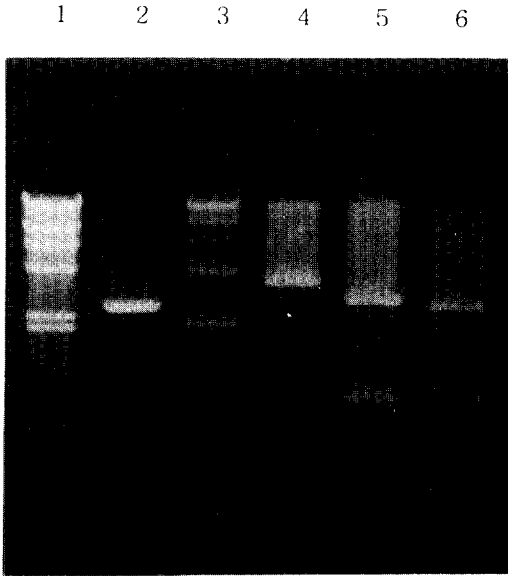


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis patterns of digestion of pUC18 and recombinant plasmid. Lane 1: λ -HindIII DNA marker, lane 2: pUC18 digested with SmaI, lane 3: undigested pUC18, lane 4: recombinant plasmid digested with HindIII, lane 5: recombinant plasmid digested with EcoRI, lane 6: recombinant plasmid digested with EcoRI and HindIII.

하였다(method 3). 마지막 방법은 PCR 단편의 3' 말단의 dA를 dNTP 존재하에 T4 DNA polymerase I로 제거하여 blunt end로 만든 다음 다시 T4 DNA kinase로 phosphorylation 한 후 세번째 방법에서 준비한 pUC18과 ligation하였다(method 4). 네번째 방법에서는 클로닝 된 두 개의 plasmid를 발견하여 DNA를 정제한 후 EcoRI 제한 효소로 절단하여 D-AAO 유전자를 확인하였다.

D-AAO 유전자의 확인

PCR 단편의 클로닝을 확인하기 위하여 pUC18을 SmaI 효소로 절단하여 linear plasmid를 만들었다(Fig. 2의 lane 2). Method 4에서 얻은 2개의 plasmid DNA는 SmaI 부위가 없어졌으므로 HindIII로 절단하여 linear plasmid를 만들었다(Fig. 2의 lane 4). 이들의 크기를 비교한 결과 pUC18 vector에 약 1kbp의 PCR 단편이 들어간 것을 확인할 수 있었

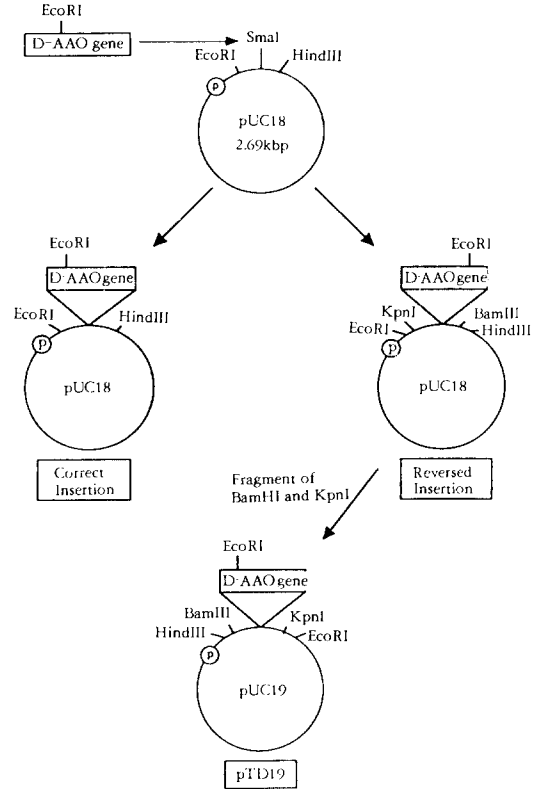


Fig. 3. Schematic diagram of pTD19 construction. Restriction sites in plasmid are placed in polycloning sites and P indicates promoter site.

다. 발표된 *T. variabilis* CBS4095의 D-AAO 유전자는 EcoRI 인식부위가 245bp에서 하나만 있었다. 만약 증폭한 PCR 단편이 이와 유사한 DNA 배열을 갖고 있으며 pUC18 promoter 위치에 제대로 들어가면 EcoRI으로 절단할 때 Fig. 3에서 보듯이 약 250bp와 3.5kbp의 DNA 단편이 나타나야 한다. 그러나 앞뒤가 뒤바뀌어 들어가면 EcoRI으로 절단할 때 약 830bp와 2.9kbp의 DNA 단편이 검출된다. Method 4에서 검출한 2개의 plasmid는 Fig. 2의 lane 5에서 보듯이 D-AAO 유전자가 모두 역으로 들어갔다. 이 결과를 재확인하기 위하여 plasmid를 EcoRI으로 절단한 후 다시 HindIII로 절단한 결과, 약 250bp, 830bp, 2.65kbp의 DNA 단편이 나타나서(Fig. 2의 lane 6) 예측한 결과와 일치하였으므로 D-AAO 유전자가 역으로 들어갔음을 재확인하였다. 역으로 들어간 D-AAO 유전자는 vector의 promo-

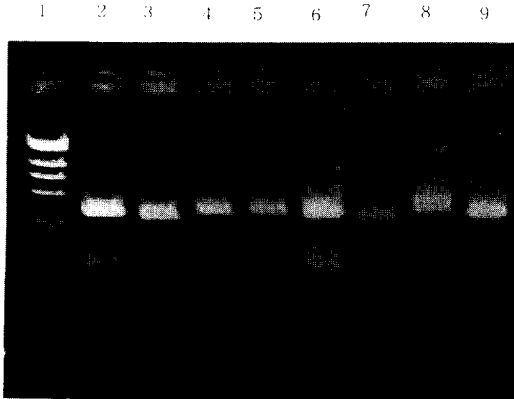


Fig. 4. Digestion of recombinant plasmids with EcoRI. Lane 1: λ -HindIII DNA marker. Lanes 2, 4, 5, 6, and 8 indicate pTD19 plasmids and lanes 3, 7, and 9 religated pUC19 plasmids.

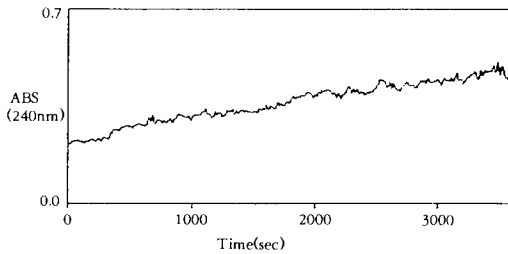


Fig. 5. Time scanning of reaction mixture containing ceph C and cell extract of recombinant *E. coli*. Reaction mixture (3ml) was placed in a spectrophotometer and the absorbance was measured in room temperature (20°C) at 240nm.

ter 위치에 바로 넣기 위하여 pUC18 polycloning sites에 있는 BamHI과 KpnI으로 절단하여 pUC18과 polycloning sites가 정반대로 구성된 pUC19 vector에 클로닝하였다. *E. coli* (JM101)에 형질전환하여 agar plate 상에 나타난 8개의 colony에서 plasmid DNA를 추출하여 EcoRI으로 절단한 결과 5개가 D-AAO 유전자가 클로닝된 것이 확인되었다 (Fig. 4의 lanes 2, 4, 5, 6, 8). 이 plasmid를 pTD19라 명명하고 D-AAO 발현을 시험하였다.

D-AAO 활성 측정

Ceph C가 D-AAO 효소에 의하여 생변환되면 반

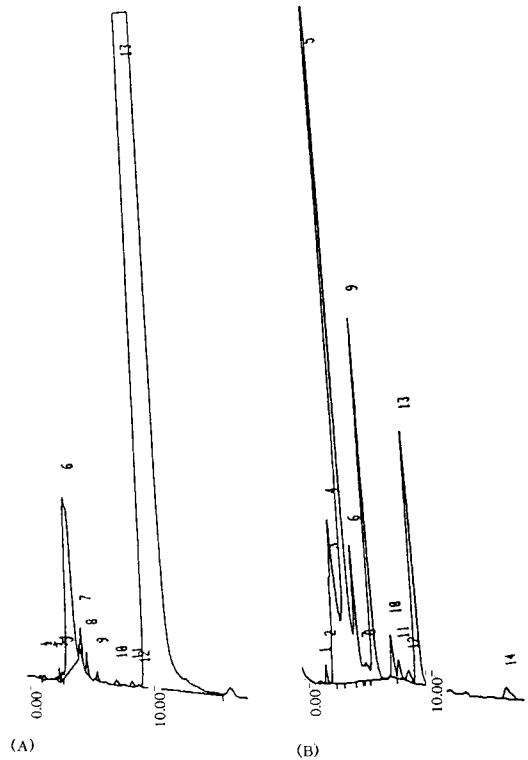


Fig. 6. HPLC chromatograms of reaction mixture containing ceph C and permeabilized recombinant *E. coli*. (A) standard solutions of GL-7ACA (2mM; peak 6) and ceph C (10mM; peak 13). (B) bioconversion products of ceph C: initial ceph C concentration was 10mM. peak 4 indicates GL-7ACA, peak 5 H₂O₂, and peak 13 ceph C.

응 부산물로서 H₂O₂, AKA-7ACA, GL-7ACA가 생성된다. D-AAO 효소의 발현 여부를 시험하기 위하여 세포추출물을 ceph C (10mM) 용액과 혼합하고 spectrophotometer를 이용하여 20°C에서 H₂O₂의 발생 정도를 측정하였다. Fig. 5에서 보듯이 OD 값이 최초의 0.206에서 0.649까지 증가하여서 ceph C의 생변환에 의한 H₂O₂의 발생을 확인할 수 있었다. 재조합 *E. coli*에서의 D-AAO 효소의 활성을 재확인하기 위하여 permeabilization 한 재조합 *E. coli*를 ceph C (10 mM) 용액과 30°C에서 1시간 반응시킨 후 그 결과를 HPLC로 분석하였다. 표준

Table 2. Match percentages of maximum homology sequences of various D-AAO genes: Data were obtained from GenBank and EMBL and analyzed using DNASIS software (Hitachi, Japan).

	<i>T. variabilis</i>	<i>F. solani</i>	Human	Rabbit	Mouse
<i>T. variabilis</i>	100	52.5	47.5	44.1	42.5
<i>F. solani</i>	52.5	100	44.0	44.7	41.5
Human	47.5	44.0	100	73.2	70.8
Rabbit	44.1	44.7	73.2	100	70.1
Mouse	42.5	41.5	70.8	70.1	100
Pig	46.5	45.5	84.4	72.5	70.8

시료인 GL-7ACA (4 mM)와 ceph C (20 mM)를 1:1(v/v) 혼합하여 HPLC로 분석한 결과 Fig. 6 (A)와 같이 ceph C는 peak 13에서, GL-7ACA는 peak 6에서 각각 나타났다. Ceph C 생변환의 반응 생성물은 표준시료의 retention time을 비교하여 각 성분의 peak를 조사한 결과, Fig. 6 (B)와 같이 ceph C (peak 13)의 농도가 현저히 감소되었으며 GL-7ACA (peak 4)와 H₂O₂ (peak 5)가 생성되는 것을 확인하였다. AKA-7ACA는 표준시료가 없어서 확인하지 못하였으나 peak 9일 것이라고 생각된다. D-AAO 효소활성이 나타나지 않을 경우에는 GAL promoter가 있는 *E. coli*/*S. cerevisiae* shuttle vector 인 YEp-352를 사용하려고 하였으나 pUC19 promoter로서 충분히 D-AAO 효소의 발현을 유도할 수 있었다.

본 실험의 결과를 고찰해 보면 *T. variabilis* D-AAO는 *E. coli*에서 봉합체(inclusion body)를 형성하지 않는 것으로 생각되며, 동물들의 D-AAO 유전자와는 달리 intron 배열이 없는 것으로 생각된다. *T. variabilis* D-AAO 유전자와 GenBank나 EMBL 등 유전자 은행에 등록된 다른 D-AAO 효소의 유전자를 본 연구실에 설치된 컴퓨터 프로그램(DNASIS, Hitachi, Japan)으로 분석하여 보았다. 그 결과 Table 2에서와 같이 *T. variabilis* D-AAO는 *F. solani* D-AAO 유전자와 유사성이 높았으며 *T. variabilis* D-AAO와 동물들의 D-AAO는 유사성이 50% 이하로 낮았다. 그러나 동물들의 D-AAO 유전자들 사이에는 유사성이 70% 이상으로 비교적 높은 수준이었다. *R. gracilis*의 D-AAO와 pig D-AAO 효소의 활성부위는 서로 유사한 것으로 보고되었으나(19), 생물학적 분류에 따라서 D-AAO 유전자의 유사성이 증가하는 것을 고려하면 *T.*

variabilis D-AAO는 같은 종류의 효모인 *R. gracilis* D-AAO 유전자와 유사성이 매우 높을 것으로 예상된다. *R. gracilis*의 D-AAO와 *T. variabilis* D-AAO는 세포 내에서 모두 dimer로 존재하며 각 효소의 분자량은 *R. gracilis*의 D-AAO가 약 37000(20), *T. variabilis* D-AAO가 약 43000(21)이며 alanine이나 valine 등에 대한 기질 특이성은 서로 다르게 나타났다(22). 본 연구실의 실험 결과에 의하면 ceph C의 초기 생변환 속도는 *R. gracilis*의 D-AAO가 *T. variabilis* D-AAO 보다 약 2배 정도 낮았다(23). *R. gracilis* D-AAO의 유전자가 밝혀지면 두 효소의 아미노산 배열의 homology sequence를 조사하여 *T. variabilis* D-AAO의 활성부위를 어느 정도 예측할 수 있으리라 기대한다.

결론적으로 본 연구에서 클로닝한 D-AAO 효소의 유전자를 이용하면 경제적인 D-AAO 효소의 대량생산은 물론, cloned gene의 random mutation(24, 25)을 유도하여 ceph C에 대한 활성 및 반응환경에 대하여 안정성이 증가된 새로운 D-AAO 효소의 개발이 가능하리라 본다.

요 약

*Trigonopsis variabilis*는 베타락탐 항생제인 cephalosporin C(ceph C)를 α -keto-adipyl-7-aminocephalosporanic acid(AKA-7ACA)로 생변환하는 강력한 D-amino acid oxidase 효소를 갖고 있다. 본 연구는 이 D-AAO 효소의 유전자를 추출하기 위하여 polymerase chain reaction(PCR)을 사용하였다. PCR 단편을 클로닝하기 위하여 Taq DNA polymerase, Klenow, T4 DNA polymerase I, Alkaline phosphatase Calf Intestinal와 T4 kinase의 효소반응을 이용하여 4가지의 방법을 사용한 결과, blunt-end의 PCR fragment를 phosphorylation하고 blunt-end의 pUC18 plasmid를 dephosphorylation 한 후 ligation 한 것이 가장 좋은 클로닝 효율을 보였다. Ceph C에 대한 D-AAO 효소의 활성은 재조합 *E. coli*의 세포추출액과 permeabilized cells에서 모두 확인할 수 있었다.

감 사

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단 자유공모과제의 연구비 지원을 받았기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. F. M. Huber, J. T. Vicenzi and A. J. Tietz (1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 195.
2. J. T. Vicenzi and G. J. Hansen (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 281.
3. R. Konno and Y. Yasumura (1992), *Int. J. Biochem.*, **24**, 519.
4. T. Isogai, H. Ono, Y. Ishitani, J. Kojo, Y. Ueda and M. Kohsaka (1990) *J. Biochem.*, **108**, 1063.
5. M. S. Pilone, L. Pollegioni and S. Buto (1992), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **16**, 252.
6. Y-H. Lee, W-S. Chu and W-H. Hsu (1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 467.
7. 김종균, 임종윤 (1994), 한국산업미생물학회지, **22**, 296.
8. P. Gemeiner, V. Stefuca, A. Welwardova, E. Michalkova, L. Welward, L. Kurillova and B. Danielsson (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 50.
9. E. S. Dey, S. Flygare and K. Mosbach (1991), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **27**, 239.
10. C-S. Yoon, D. A. Glawe and P. D. Shaw (1991), *Mycologia*, **83**, 835.
11. K. Komatsu, A. Matsuda and K. Sugiura (1987), Jpn. Kokai. Tokkyo Koho, JP 62-262994.
12. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
13. J-T. Chen, S-Y. Lin and H. Tsai (1991), *J. Biotechnol.*, **19**, 203.
14. R. Higuichi, C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson (1993), *Biotechnology*, **11**, 1026.
15. D. Marchuk, M. Drumm, A. Saulino and F. S. Collins (1991), *Nucl. Acid. Res.*, **19**, 1154.
16. W. Zimmer (1993), *Nucl. Acid. Res.*, **21**, 773.
17. J. Cha, W. Bishai and S. Chandrasegaran (1993), *Gene*, **136**, 369.
18. D. A. Mead, N. K. Pey, C. Herrnstadt, R. A. Marcil and L. M. Smith (1991), *Biotechnology*, **9**, 657.
19. L. Pollegioni, S. Ghisla and M. S. Pilone (1992), *Biochem. J.*, **286**, 389.
20. M. P. Simonetta, M. A. Vanoni and P. Casalin (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **914**, 136.
21. E. Szwajcer and K. Mosbach (1985), *Biotechnol. Lett.*, **7**, 1.
22. L. Pollegioni, B. Lankau, W. Tischer, S. Ghisla and M. S. Pilone (1993), *J. Biol. Chem.*, **268**, 13850.
23. 정대현, 강용호 (1995), 영남대학교 자원문제연구논문집, **14**, 1.
24. S. Akasaka and K. Yamamoto (1994), *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 500.
25. W-Z. Xu, J. Fukuhara, K. Yamamoto, T. Yomo and I. Urabe (1994), *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 252.