

## *Enterococcus faecalis* 유래의 신규 L-aspartate $\beta$ -decarboxylase의 cloning, 정제 및 활성 규명

이동근 · 송태윤 · 김남영 · 이어진 · 하상안<sup>1</sup> · 이재화 · 하종명 · 하배진 · 이상현\*

신라대학교 공과대학 생명공학과, <sup>1</sup>신라대학교 공과대학 환경공학과

Received October 17, 2005 / Accepted November 23, 2005

**Cloning, Purification and Characterization of Novel L-Aspartate  $\beta$ -Decarboxylase from *Enterococcus faecalis*.** Dong-Geun Lee, Tae-Yoon Song, Nam Young Kim, Eo-Jin Lee, Sang-An Ha<sup>1</sup>, Jae-Hwa Lee, Jong-Myung Ha, Bae Jin Ha and Sang-Hyeon Lee\*. *Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, <sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Silla University* – The gene for a L-aspartate  $\beta$ -decarboxylase (ADC) from *Enterococcus faecalis* was cloned and sequenced. The gene comprised an open reading frame of 1,611 base pairs, which encodes a protein of 58,960 Da consisting of 536 amino acid residues. The gene was subcloned into an expression plasmid for overexpression of the ADC. The recombinant ADC was produced using *E. coli* as the host and purified to homogeneity. Our result showed that the ADC may be obtained from bacteria known nucleotide sequence. Thus, we suggest that high value L-alanine might be produced by low value aspartate.

**Key words** – alanine, aspartate  $\beta$ -carboxylase, *Enterococcus faecalis*

아미노산은 생리적 역할 외에도 맛과 영양을 가지고 있어 식품용, 사료용, 의약품, 미용원료, 합성원료용 등으로 널리 이용되며[17] 이중 부가가치가 높은 의약품 아미노산은 대부분 일본과 유럽 회사들이 독점 생산하고 있는 실정이다[19].

알라닌(L-alanine)은 감미료의 개질(改質)제, 화장품 및 의 약원료로도 사용되어 전세계적으로 1998년 현재 11,000톤이 생산되었고[17] 향후 그 수요가 증가될 전망이다[19] 현재 국내에서는 L-alanine의 산업적 생산이 어려워 주로 일본으로부터 전량 수입되고 있는 실정이다[17].

아미노산의 생산은 산(acid) 분해 후의 추출법, 균주를 이용한 발효법, 효소를 이용한 효소법, 화학적으로 합성하는 화학법 등이 있는데[17] L-alanine의 생산에는 주로 세균을 이용한 미생물 발효법과[6,8] ADC (L-aspartate  $\beta$ -decarboxylase)를 이용하여 저가의 L-aspartic acid로부터 고가의 L-alanine을 생산하는 효소법[3]이 있다. 이중 세균을 이용하는 미생물 발효공정은 낮은 생산수율과 D-form과 L-form의 이성질체가 동시에 생성되어 상품성이 떨어지는 문제가 있어 ADC를 이용한 효소적 전환공정이 채택되어 사용되고 있다[3]. 알라닌 생산 균주를 확보하기 위한 시도가 계속되고 있어 *Tetragenococcus halophila*[1], *Thermococcus profundus*[9], *Clostridium species*[11], *Thermococcus profundus*[12], *Pyrococcus furiosus*[14,16], *Pseudomonas speceis*[2], *Lactococcus lactis*[6] 등의 균주가 보고되어 있으며, 이들은 고부가가치의 L-alanine 생산을 위한 재조합균주와[18] 효소의 유전자원으로[3] 사용될 수 있다.

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636  
E-mail : slee@silla.ac.kr

따라서 ADC를 이용한 L-alanine의 산업적 생산을 위해서는 기존 균주가 아닌 새로운 균주를 이용하는 것이 필요하다고 판단된다. 이에 본 연구에서는 새로운 ADC 유전자를 얻기 위하여 전체 유전체 염기서열이 밝혀져 있지만 아직 ADC 유전자에 대한 연구가 이루어져 있지 않은 *Enterococcus faecalis* 균주로부터 새로운 ADC 유전자를 찾아내고 ADC를 생산하는 재조합 균주를 제조하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주, plasmid 및 배양

새로운 ADC 유전자원으로 *Enterococcus faecalis* 균주(KCTC 2011)를 이용하였고 nutrient broth 배지를 사용하여 진탕배양하였다(30°C, 250 rpm). 유전자의 cloning과 발현을 위하여 각각 *E. coli* DH5a (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 BL21(DE3) (Invitrogen)를 이용하였고, Luria-Bertani (LB) 배지를 사용하여 진탕배양하였다(37°C, 250 rpm). 필요에 따라서 LB 배지에 항생제 ampicillin (100  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였다. pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)와 pTXB1 (New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA)을 각각 cloning 및 발현용 plasmid로 사용하였다.

### Primer의 설계

*Enterococcus faecalis* 균주의 유전체 전체 서열을 확보한 후 [7] MacVector (Accelrys, USA)를 이용하여 유전자 분석을 행하였고, 그 결과를 토대로 L-aspartate  $\beta$ -decarboxylase 유전자의 증폭을 위해 forward primer EF\_ADC02-F (-27/-6

relative to the start codon ATG, 5'-TGA CTG TGT GTG CTT CAG GAG G-3') 및 reverse primer EF\_ADC02-R (+1866/+1847, 5'-TGC TTT GTC TCT TGC GGA CC-3')을 제작하여 사용하였다. 클로닝된 유전자를 발현 plasmid에 삽입하기 위한 단편의 증폭을 위해서는 EF\_ADC\_E2-F (+1/+21, 5'-CAT ATG ATA ACA AGT GAT GAA TTG-3', 밑줄은 *NdeI* site)와 EF\_ADC\_E2-R (+1608/+1585, 5'-CTC GAG TTT AAT TGC TTG GCG CTT TTG GCG-3', 밑줄은 *XhoI* site)을 제작하여 사용하였다. 클로닝에 사용한 primer들은 (주) 바이오니아(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

#### ADC 유전자의 증폭, cloning 및 발현플라스미드의 제작

Genomic DNA isolation kit (Promega)를 사용하여 확보된 *Enterococcus faecalis* 균체로부터 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 *Enterococcus faecalis*의 genomic DNA를 주형으로 하여 forward primer EF\_ADC02-F와 reverse primer EF\_ADC02-R을 이용하여 ADC 유전자 단편의 증폭(Perkin-Elmer model 2400 thermal cycle, USA)을 행하였다. DNA 단편의 증폭은 정확성을 기하기 위하여 Pyrobest DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하였다. 증폭 조건은 95°C에서 5분간 반응한 후 30 cycle의 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분을 반복 수행하였고 마지막 extension을 위하여 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭이 끝난 반응액은 0.8% agarose gel에서 전기영동을 행하여 목적 DNA 단편을 확인하였다. 목적 DNA 단편을 pGEM-T easy vector (Promega)에 연결하고 대장균(*E. coli* DH5 $\alpha$ )으로 도입하여 형질전환시켰다. 유전자의 cloning과 형질전환에는 Sambrook *et al.*의 방법을[13] 이용하였다. 클로닝된 재조합체 plasmid를 갖는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 LB (ampicillin, 100  $\mu$ g/ml) broth 배지 4 ml를 이용하여 배양하고 원심분리(12000 $\times$ g, 5분)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체로부터 Plasmid mini kit (Quiagen, USA)를 이용하여 플라스미드를 분리하고 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 목적 DNA 단편을 확인하였다. 이렇게 제작된 재조합 플라스미드를 pGEMTe-EF\_ADC022라고 명명하였다. 삽입된 DNA 단편에 대한 염기서열 결정은 (주) 바이오넥스(Seoul, Korea)에 의뢰하여 행하였다.

클로닝된 재조합체로부터 Plasmid mini kit (Quiagen, USA)를 이용하여 pGEMTe-EF\_ADC022를 분리하고 이를 주형으로 하여 발현 plasmid 제작을 위하여 적절한 위치에서 제한효소를 작용시킬 수 있는 primer set인 EF\_ADC\_E2-F와 EF\_ADC\_E2-R를 이용하여 발현 plasmid 제작용 ADC 유전자 단편의 증폭(Perkin-Elmer model 2400 thermal cycle, USA)을 행하였다. DNA 단편의 증폭은 정확성을 기하기 위하여 Pyrobest DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하였다. 증폭 조건은 95°C에서 5분간 반응한 후 30 cycle의 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분을 반복 수행하였

고 마지막 extension을 위하여 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭이 끝난 반응액은 0.8% agarose gel에서 전기영동을 행하여 목적 DNA 단편을 확인하였다. 목적 DNA 단편을 pGEM-T easy vector (Promega)에 연결하고 대장균(*E. coli* DH5 $\alpha$ )에 도입하여 형질전환시켰다. 클로닝된 재조합체 plasmid를 갖는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 LB (ampicillin, 100  $\mu$ g/ml) broth 배지 4 ml를 이용하여 배양하고 원심분리(12000 $\times$ g, 5분)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체로부터 Plasmid mini kit (Quiagen, USA)를 이용하여 플라스미드를 분리하고 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 목적 DNA 단편을 확인하였다. 이렇게 제작된 재조합 플라스미드를 pGEMTe-EF\_ADCE22라고 명명하였다. 삽입된 DNA 단편에 대한 염기서열 결정은 (주) 바이오넥스(Seoul, Korea)에 의뢰하여 행하였다.

pGEMTe-EF\_ADCE22를 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*으로 절단하여 agarose gel에서 전기영동을 행하고 1611 bp DNA 단편을 gel extraction kit (Quiagen)를 이용하여 agarose gel로부터 회수하였다. 회수된 DNA 단편을 대장균용 고발현 플라스미드인 pTXB1의 같은 제한효소 부위에 연결하여 ADC 유전자의 발현 플라스미드를 구축하고 이를 pTXB1-EF\_ADCE22로 명명하였다.

#### L-aspartate $\beta$ -decarboxylase 유전자의 발현 및 정제

구축된 ADC 유전자의 발현 플라스미드 pTXB1-EF\_ADCE22를 이용하여 대장균 BL21 (DE3)를 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균을 LB (Amp) broth 10 ml에 접종하고 하룻밤동안 진탕배양(37°C, 250 rpm)한 후 배양액을 LB (Amp) broth 1 L에 재접종하여 3시간동안 추가로 진탕배양(37°C, 250 rpm)하였다. 여기에 IPTG를 최종농도 0.3 mM이 되도록 첨가하여 다시 3시간동안 진탕배양(30°C, 250 rpm)하였다. 배양된 균체를 원심분리 (4,000 $\times$ g, 10분)하여 균체를 회수한 후, 여기에 ice-cold column buffer (20 mM Tris (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 0.2% Triton X-100, 2 mM EDTA) 30 ml를 첨가하여 현탁한 후, 초음파처리로 균체를 파쇄하고 이를 다시 원심분리(20,000 $\times$ g, 20분)하여 상층액을 취하여 세포추출액으로 하였다. 세포추출액을 column buffer로 평형시킨 chitin bead column (20 ml of set volumes, New England Biolabs, MA, USA)에 주입하여 부착시켰다. Column buffer로 column을 세정한 후, cleavage buffer (column buffer with 30 mM DTT)로 평형시키고 4°C에서 하룻밤동안 방치하였다. 정제된 단백질은 column buffer 50 ml로 용출시켰다. 단백질의 양은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 BCA protein assay reagent (Pierce Biotechnology, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### L-aspartate $\beta$ -decarboxylase의 활성측정

L-aspartate  $\beta$ -decarboxylase의 활성은 효소반응의 결과 L-aspartate에서 유리되는 CO<sub>2</sub>를 압력계(CO<sub>2</sub> gas analyzer,

model CD95)를 이용하여 측정, 정량 하는 방법으로 측정하였다 [13]. 시험관에 효소액(Enzyme 15 or 128.6 µg, 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0), 2 mM α-ketoglutaric acid, 0.86 mM pyridoxal 5'-phosphate, Bovine serum albumin (1 mg/ml)) 2.5 ml를 넣고 반응조에서 온도를 37°C로 맞춘 후, 여기에 온도를 37°C로 맞춘 기질액(40 mM L-aspartic acid, pH 5.0) 0.5 ml를 넣고 섞어 반응시킨 후 발생하는 CO<sub>2</sub>를 압력계를 이용하여 반응 1분 후에 측정하고, 이후 5분 간격으로 측정하였다. 대조구는 효소를 제외하고 실험을 진행하였으며 실험구와 대조구의 차이값을 기록하여 활성으로 하였다.

**SDS-PAGE**

SDS-PAGE는 11% polyacrylamide gel을 이용하여 Laemmli의 방법으로 행하였다[10]. 효소용액을 sample buffer와 혼합하여 5분간 끓인 후 gel에 주입하였다.

**결과 및 고찰**

***Enterococcus faecalis*의 ADC 유전자의 분석**

고순도의 L-alanine 생산을 위해 새로운 균주를 이용한 시

도가 많이 있었고[2,8,11,12.] 재조합 대장균을 이용한 생산 등도 보고되고 있어[5] 저자들은 신규 ADC (L-aspartate β-decarboxylase) 유전자를 확보하기 위하여 게놈 프로젝트가 완료된 세균들[7]을 대상으로 현재까지 알려진 ADC 유전자의 염기서열간의 비교를 수행하였지만 상동성을 찾을 수 없었다. 하지만 아미노산서열로 검색한 결과 *Pseudomonas dacunhae* 유래의 ADC [3] (NCBI accession #, BAC65229)와 부분적 상동성을 가진 영역을 *Enterococcus faecalis*의 게놈서열에서 확인할 수 있었다. MacVector 프로그램을(Accelrys, USA) 이용하여 상동성을 갖는 부위는 약 1600 bp의 ORF로 구성되어 있으며 게놈서열에서는 아직 기능을 정확히 알 수 없는 putative protein을 발현시키는 유전자로 표시된 것을 확인하였고 연구를 수행하였다. Fig. 1은 본 연구에서의 *Enterococcus faecalis*의 ADC와 *Pseudomonas dacunhae*의 ADC의 아미노산 서열을 비교한 것으로 약 48%의 상동성을 나타내는 것을 알 수 있다.

**재조합 ADC 유전자의 발현**

EF\_ADC02-F/EF\_ADC02-R primer set를 이용한 약 1,900 bp의 PCR 산물을 pGEMT-easy vector (Promega, USA)와

<i>E. faecalis</i>	1	MITDELTENLSPFELSFLKELHEENHNLETLLNAGRGNPNWTAPTR	50
<i>P. dacunhae</i>	1	MSKDYQSLANLSPFELKDELIKIASGDGN--RLMLNAGRGNPNFLATTPR	48
		* *	
<i>E. faecalis</i>	51	EAFFLLGQFATKETLREGSEQ--T-AGMIQPSFGRTQRFNLFLAEN-PSK	96
<i>P. dacunhae</i>	49	RAFFRLGLFAAAESELSSYMNVTGVGGLAKIEGIEGRFERYIAENRDGE	98
		* *	
<i>E. faecalis</i>	97	GATFLQEIWTAEHNYFGMKEMWLDAMLDDYVIGDYNPNPVRCLKACEQPI	146
<i>P. dacunhae</i>	99	GVRFLGKLSYVRDQLGLDPAFLHEMVDGILGCNYPVPPRMLNISEKIV	148
		* *	
<i>E. faecalis</i>	147	KAYLNQELFSSEAQP--FDIFAVEGGTAGICYLFDLANNYLLEKGDRIA	194
<i>P. dacunhae</i>	149	RQYIIREMGADAI PSESVNLFGVEGGTAAMAYIFESMKVNGLLKAGDKVA	198
		* *	
<i>E. faecalis</i>	195	LLLPTFAPYLEIPELPRYDFDVVKIAEQMIIDGKTTYQYSNKEIDKDKD	244
<i>P. dacunhae</i>	199	IGMPVFTPYIEIPELAQYALEEVAINADPALN----WQYPSDELKDKD	243
		* *	
<i>E. faecalis</i>	245	PSIKAVFVNPSPNPTANAMGKPTIEQIKQISAVDNPKMLITDDVYGTFV	294
<i>P. dacunhae</i>	244	PAIKIFFCVNPNPPSKMDERSLERVRKIVAEHRPDLMLITDDVYGTFV	293
		* *	
<i>E. faecalis</i>	295	PAFRSLFTELPYNTACIYSYSKYFGATGWRVGTIAVSQENIFDQLLKELP	344
<i>P. dacunhae</i>	294	DGFQSLFAICPANTLLVYSFSKYFGATGWRLGVAAHKENIFDLALGRLP	343
		* *	
<i>E. faecalis</i>	345	VARKMELQARYATLNADTSQINFISRLVADSRDIALNHAAGLSSIQQAMM	394
<i>P. dacunhae</i>	344	ESEKTLDDRYRSLLPVRSKFLDRLVADSRVALNHTAGLSTPQQVQM	393
		* *	
<i>E. faecalis</i>	395	ALFSLYALLKDGQAYKDEVMDICHTREKLLFRTLGIIEPLASLNTAYYCE	444
<i>P. dacunhae</i>	394	TLFSLFALMDESQYKHTLKQLIRREATLYRELGTTPQORDENAVDYTYL	443
		* *	
<i>E. faecalis</i>	445	INFRDWTEKRYGPEFSSYLTKSWTITKVLTSLAKEKMLLKADAFGSDK	494
<i>P. dacunhae</i>	444	IDLQDVTSKLYGEAFKAWKQSSSTGDMFLRIADETGVLLPGRFGSDR	493
		* *	
<i>E. faecalis</i>	495	WSVRI SLANLATNQYSEVGKRMIRLSEHIKEEWLRQKRQAIK*	537
<i>P. dacunhae</i>	494	PSGRASLANLNEYEYAAIGRALRQMADELYAQYTTQ--GNKR	533
		* *	

Fig. 1. Amino acid similarity analysis in ADC from *P. dacunhae* and *E. faecalis*. (\* : homologous amino acid residues, · : similar amino acid residues). Similarity was about 48% between two sequences.

연결하고 *E. coli* DH5a에 형질전환시킨 후 플라스미드 DNA를 분리하여 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 약 1900 bp 크기의 단편을 확인하여(data not shown) pGEMTe-EF\_ADC022를 구축하였다.

pGEMTe-EF\_ADC022 플라스미드를 주형으로 EF\_ADC\_E2-F/EF\_ADC\_E2-R primer set를 이용하여 DNA 단편을 증폭하고 이를 대장균용 발현벡터에 연결하여 최종적으로 *Enterococcus faecalis*의 ADC 유전자의 발현을 위한 플라스미드인 pTXB-EF\_ADCE22를 구축하였다.

Fig. 2는 pTXB-EF\_ADCE22로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하여 발현된 ADC 단백질을 정제하여 SDS-PAGE 상에서 확인한 것으로 분자량이 약 59 KDa이며, 불순물을 포함하지 않는 순수한 ADC로 정제된 것을 확인할 수 있었다.

**재조합 ADC의 활성**

Fig. 3은 정제된 재조합 ADC의 활성을 나타낸 그래프이다. ADC는 aspartate에 작용하여 탈탄산 작용을 통하여 alanine을 생산하는데[15] Fig. 3를 보면 128.6 ug의 효소를 사용하였을 때 15 ug을 사용한 경우와 달리 5분 이내에 대부분의 반응이 이루어지는 것을 알 수 있었다. 이로써 값이 저렴한 aspartate를 대상으로 1단계의 효소반응으로[17] 부가가치가 높은 alanine의 생산을 기대할 수 있었다. Alanine은 다양한 경로로 생성되지만[6,9,14,15] aspartate를 이용한 생산이 효과적이며[2,4,5] ADC를 이용한 생산이 가장 효율적인 것으로 보고되어 있다[3].

본 연구는 게놈서열이 완료된 균체를 대상으로 한 신규 효소 개발에 이용될 수 있을 것이다. 즉 알려진 유전자와 기능은 알 수 없지만 염기서열이 알려진 게놈과의 비교로 가능성

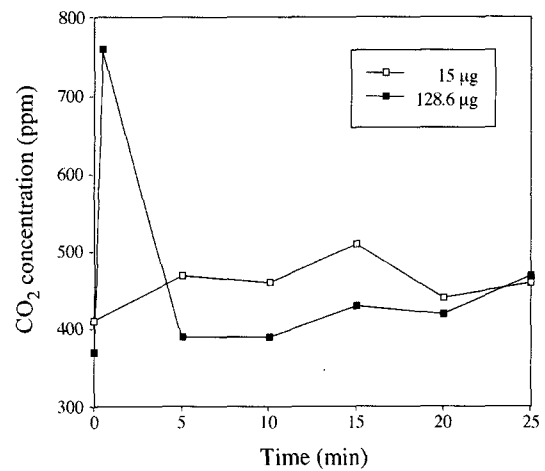


Fig. 3. Enzymatic activities of purified L-aspartate β-decarboxylase. Carbon dioxide production was active within 5 minutes at high ADC and rather low and constant at low ADC. Differences of CO<sub>2</sub> concentration with and without ADC were represented.

있는 균체를 선정하여 신규효소를 개발하였다. 신규 유전자가 생산하는 단백질의 아미노산 분석 결과와(Fig. 1) 재조합 단백질의 정제를(Fig. 2) 통하여 537개의 아미노산으로 구성된 분자량 약 59 KDa의 효소를 얻을 수 있었고 실제로 예상했던 ADC의 기능을 보유하고 있음을 확인한 것은(Fig. 3) 향후 연구의 토대를 마련하였다 할 것이다. 또한 저가의 aspartate를 이용한 고부가가치 L-alanine을 생산할 수 있는 신규 효소의 개발과 이를 토대를 한 생산균주를 개발할 수 있는 것도 의미있는 일이라 할 것이다.

**요 약**

L-alanine의 산업적 생산을 위한 신규의 L-aspartate β-carboxylase 유전자를 *Enterococcus faecalis*에서 검색하고 이를 대장균에 형질전환시켰다. *E. faecalis* 유래의 ADC 유전자는 1611 bp의 염기서열로 구성되어 있으며 형질전환된 대장균에서 59 KDa의 효소를 생산하며 L-aspartate β-carboxylase의 촉매활성을 나타내는 것을 확인하였다. 본 연구결과로 기능은 모르고 유전체 서열만 아는 균체에서 신규 효소를 개발하는 방법을 확립하였으며 저가의 aspartate를 이용한 고부가가치 L-alanine을 생산할 수 있는 신규효소를 개발할 수 있었다.

**참 고 문 헌**

1. Abe, K., F. Ohnishi, K. Yagi, T. Nakajima, T. Higuchi, M. Sano, M. Machida, R. I. Sarker and P. C. Maloney. 2002. Plasmid-Encoded *asp* operon confers a proton motive metabolic cycle catalyzed by an aspartate-alanine exchange

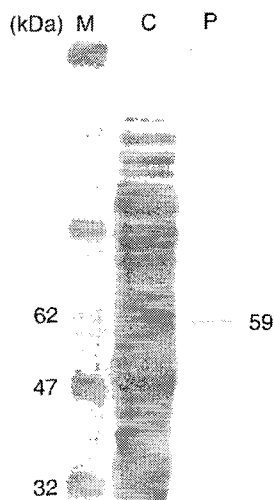


Fig. 2. SDS-PAGE result of ADC produced and purified in *E. coli* BL21 (DE3) cells harboring pTXB-EF\_ADCE22 (M : molecular marker, C : crude extract, P : purified enzyme).

- reaction. *J. Bacteriol.* **184**, 2906-2913.
2. Bódalo, A., J. Bastida, J. L. Gómez, E. Gómez, I. Alcaraz and M. L. Asanza. 1997. Stabilization studies of L-aminoacylase-producing *Pseudomonas* sp. BA2 immobilized in calcium alginate gel. *Enzyme Microb. Tech.* **21**, 64-69.
  3. Çalik, G., H. Vural and T. H. Özdamar. 1997. Bioprocess parameters and oxygen transfer effects in the growth of *Pseudomonas dacunhae* for L-alanine production. *Chem. Eng. J.* **65**, 109-116.
  4. Fusee, M. C. and J. E. Weber. 1984. Immobilization by polyurethane of *Pseudomonas dacunhae* cells containing l-aspartate  $\beta$ -decarboxylase activity and application to l-alanine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 694-698.
  5. Fusee, M. C., W. E. Swann and G. J. Calton. 1981. Immobilization of *Escherichia coli* cells containing aspartase activity with polyurethane and its application for L-aspartic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 672-676.
  6. Hols, P., M. Kleerebezem, A. N. Schanck, T. Ferain, J. Hugenholtz, J. Delcour and W. M. de Vos. 1999. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nat. Biotechnol.* **17**, 588-592.
  7. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub\\_g.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub_g.html)
  8. Kengen, S. W. and A. J. M. Stams. 1994. Formation of L-alanine as a reduced end product in carbohydrate fermentation by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch. Microbiol.* **161**, 168-175.
  9. Kobayashi, T., S. Higuchi, K. Kimura, T. Kudo and K. Horikoshi. 1995. Properties of glutamate dehydrogenase and its involvement in alanine production in alanine production in a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus Profundus*. *J. Biochem.* **120**(3), 531-539.
  10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
  11. Orlygsson, J., R. Anderson, and B. H. Svensson. 1995. Alanine as an end product during fermentation of monosaccharides by *Clostridium* strain P2. *Anton. Leeuw.* **68**, 273-280.
  12. Ravot, G., B. Ollivier, M.-L. Fardeau, B. K. Patel, K. T. Andrews, M. Magot and J.-L. Garcia. 1996. L-Alanine production from glucose fermentation by hyperthermophilic members of the domains *Bacteria* and *Archaea*: a remnant of an ancestral metabolism? *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2657-2659.
  13. Sambrook, J. and D. W. Russell. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, New York.
  14. Schaefer, T., K. B. Xavier, H. Santos and P. Schoenheit. 1994. Glucose fermentation to acetate and alanine in resting cell suspensions of *Pyrococcus furiosus*: proposal of a novel glycolytic pathway based on  $^{13}\text{C}$  labelling data and enzyme activities. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**, 107-114.
  15. Tate, S. S. and A. Meister. 1971. L-aspartate  $\beta$ -decarboxylase; structure, catalytic activities, and allosteric regulation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **35**, 503-543.
  16. Ward, D. E., S. W. Kengen, J. van der Oost and W. M. de Vos. 2000. Purification and characterization of the alanine aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its role in alanine production. *J. Bacteriol.* **182**, 2559-2566.
  17. 임변삼. 2003. 아미노산 발효공업. KISTI 기술동향분석보고서
  18. 임변삼. 2003. 아미노산 생산균주의 개량. KISTI 기술동향분석보고서
  19. 임변삼. 2004. 발효산업의 현황과 발전방안. KISTI 기술동향보고서