

우유단백질 중 β -Casein 유전자의 효모세포내 형질발현 및 분비에 관한 연구

정 건 섭
(미생물연구실)

I. 서 론

생물공학의 발달로 1980년대 이후부터 의약 및 식품산업분야의 일부에서 획기적인 기술혁신이 이루어지고 있으며, 앞으로도 여러 분야에서 유전공학과 단백질공학기술로 대표되는 생물공학의 기술 혁신이 크게 요구되고 있는 실정이다. 특정 단백질을 대량생산하기 위해서는 유전자조작기술을 통해 양적인 개선과 생산되는 단백질의 여러 기능상의 질적인 개선을 시도하고 있다. 현재까지 이러한 생물공학기술은 주로 의약품이나 효소등에 주로 이용되고 있는 실정이나 식품소재 단백질에도 이 기술을 이용하여 영향학적으로 균형을 갖춘 단백질, 혹은 단백질의 구조변형에 기인하여 단백질의 물리화학적 성질이 변화되어 식품가공적성이 우수한 단백질을 생산하게 된다면 매우 유익할 것으로 생각된다.

한편 우유단백질은 식품소재로 매우 널리 사용되고 있는 것으로 전체 우유의 약 2.2%를 차지하는 casein과 0.4%를 차지하는 whey protein으로 구성되어져 있으며 이중 casein이 우유가공의 주된 단백질로 이용되고 있다. Casein은 구성하고 있는 polypeptide의 종류에 따라 α_1 -, α_2 -, β -, κ -casein으로 구분한다(Swaisgood, 1982). 이들 casein은 각각 한 문자당 8, 10~13, 5, 1개의 seryl phosphate 잔기를 갖고 있으며, 동시에 κ -casein은 분자구조에 당을 함유하고 있다. α_1 -, α_2 - 및 β -casein의 seryl phosphate group은 우유속에서 calcium phosphate 복합체를 형성하는데 이를 casein micelle이라 부르며, micelle 표면을 κ -casein이 둘러 쌓아 전체 caseinate system을 안정화 시키는 것으로 알려져 있다. 이렇듯 casein은 식품소재단백질중에서는 비교적 분자구

조와 기능에 대한 정보가 많이 밝혀져 있기 때문에 유전공학적 연구에 좋은 소재의 단백질이다.

Casein에 대한 유전공학적 연구는 이미 소 및 생쥐의 casein 유전자가 cloning 되었으며(Bonsing and Mackinlay, 1987), κ -casein은 *Escherichia coli* 내에서 발현 되었다(Kang and Richardson, 1988). 앞서 언급하였듯이 소의 β -casein은 5개의 phosphate group을 갖고 있는데 이는 전사단계후의 변형(post-translationally modification)으로 알려져 있다(Eigel et al., 1984). 이러한 변형은 prokaryote인 *E. coli* 세포내에서는 일어나지 않고 있다. 한편 몇몇 외래 단백질(heterologous protein)들이 *Saccharomyces cerevisiae* 세포내에서 발현되어 세포 밖으로 분비됨이 보고되고 있다(Jabbar and Nayak, 1987; Chang et al., 1986). Jimenez-Flores 등은 소의 β -casein을 H-XK1(hexokinase P1) promoter에 연결하여 *S. cerevisiae* AB116-2에서 발현시켰었으나 세포밖으로 분비가 되지 않았다(Jimenez-Flores et al., in press).

본 연구의 목적은 소의 casein 유전자를 in vitro-directed mutagenesis시켜 변형된 β -casein을 생산하는 transgenic bovine을 만들기 위한 장기적 목적 하에서 우선 β -casein 유전자를 미생물에 도입하여 발현 및 분비시키고자 함이다. 특히 β -casein을 세포밖으로 분비시키는 일은 앞으로의 단백질공학연구에서 분리 정제과정을 고려할 때 매우 중요한 과정이다. 따라서 본 논문에서는 분비에 관여하는 leader sequence를 β -casein의 leader sequence와 일반적으로 효모의 중요한 효소인 invertase leader sequence로 달리하여, chelatin promoter를 갖고 있는 pCGY1444 vector에 β -casein 유전자를 삽입하여

expression system을 제조하였으며, 이 재조합 plasmid를 함유한 *S. cerevisiae*에서 β -casein이 발현 및 분비되어 소의 β -casein과 분자량이 같고 antigenicity를 나타내는 β -casein을 배양액에서 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

E. coli 형질전환실험을 위해서는 *E. coli* DH5 α 를 사용했으며 LB배지를 사용하여 배양하였다. 효모 숙주로는 *S. cerevisiae* AB116 (MAT, leu2, trp1, ura3-52, prb1-1122, pep4-3, prc1-407, cir) (Jones, 1977)를 사용하였고, 배양을 위해서는 YPD 배지 (yeast extract 10 g, peptone 20 g, dextrose 20 g /liter)와 최소배지 (yeast nitrogen base W/O amino acid and ammonium sulfate 1.7 g, ammonium sulfate 5 g, dextrose 20 g /liter)에 각 amino acid를 첨가한 배지를 사용하였다. *S. cerevisiae* AB116에서 β -casein induction을 위해서는 일정시간 배양후 CuSO₄를 최종농도 30 mM 되도록 첨가해주고 일정시간 추가 배양 하였다.

2. 사용 plasmid 및 DNA

Expression system 제조를 위하여 사용한 vector인 pCGY1444와 invertase leader sequence gene은 Genentech사(South San Francisco, CA)의 Dr.Hitzeman으로부터 입수 하였다. pCGY1444는 *E. coli*-yeast shuttle expression plasmid로써 yeast 2 μ m replicon, TrpL gene, chelatin promoter, phosphoglycerate kinase terminator, poly linker region 및 *E. coli* 내에서의 ampicillin marker를 갖고 있으며 크기는 8.3Kb이다. 소의 β -casein 유전자는 pJR1(Jimenez-Flores and Richardson, 1987)로부터 절단하여 사용하였으며, 그밖의 합성 linker로 사용한 oligonucleotide들은 Operon Technologies사(Alameda, CA)로부터 구입하여 사용하였다.

3. 재조합 plasmid 제조 및 형질전환실험

E. coli plasmid 분리 및 재조합 plasmid 제조를

위한 DNA 절단과 연결은 Maniatis 등(1982)의 방법에 준하여 행하였으며, 형질전환을 위한 *E. coli* DH5 α 의 competent cell은 Chung 등 (1989)의 방법에 따라 제조하였다. *S. cerevisiae* AB116에 재조합 plasmid의 도입은 lithium acetate와 poly ethylene glycol를 사용하여 행하였고 *S. cerevisiae*의 plasmid 확인은 *S. cerevisiae* lysate를 *E. coli*에 역형질전환시켜 얻어진 *E. coli*의 형질전환균주로부터 plasmid를 분리하여 확인하였다(Ausubel et al., 1987).

4. 단백질 전기영동 및 Western blot의 면역화학적 염색

배양한 *S. cerevisiae* 추출물의 단백질 분석을 위해 Laemmli(1970) 방법에 따라서 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 행하였으며 이 gel의 단백질을 Bers and Garfin(1985)의 방법에 준해 nitrocellulose에 옮겼다. 이 Western blot 상의 단백질중 β -casein membrane의 존재유무를 확인하고서 면역화학적 염색을 행하였는데, 이때 소의 casein에 대한 rabbit antiserum(Calbiochem 사제품, La Jolla, CA)을 제1차항체로 사용하였고, 제2차항체로는 goat anti rabbit IgG-horseradish peroxidase(G-AR-HRP, Bio-RadLab. 사제품, Richimond, CA)를 사용하였으며 HRP의 발색제로는 4-chloronaphthol을 이용하였다. 면역화학적 염색에서 비특이적인 발색을 방지하기 위하여 제1차 항체용액을 사용하기 전에 vector로 사용한 pCGY1444을 함유하고 있는 *S. cerevisiae* AB116-2 세포의 추출물과 혼합하여 4°C에서 16시간 방치후 사용하였다. β -Casein의 정량은 Western blot의 β -casein band를 기준농도의 표준풀 소 β -casein의 band와 laser densitometer로 그 밝기를 비교하여 행하였다.

5. DE-52 음이온교환수지 chromatography

S. cerevisiae 배양액에 분비된 β -casein을 부분정제하기 위하여 이온교환 chromatography를 행하였다. β -Casein은 phosphate group을 가지고 있으므로 DE-52 음이온교환수지(Whatman 사제품)에 배양여액을 흡착시켜 용출 시키는 chromatography를 행하였다(Davis and Law, 1977). 용출은 0.03M에

서 0.3M NaCl(3M urea, 0.005M tris, pH8.2 buffer) 까지의 염농도구배로 행하였으며, 이때 각 분획은 2.5mℓ씩 받았다. 용출된 각분획을 dot blot하여 면역화학적 염색으로 발색시켜 β -casein을 함유한 분획을 확인하였으며, 이를 β -casein 분획을 모아 종류 수에 투석하고 동결건조 시킨후 SDS-PAGE와 Western blot의 면역화학적 염색으로 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. β -Casein의 expression system 제조

E. coli-yeast shuttle vector인 pCGY1444를 사용하여 소의 β -casein 유전자를 효모세포에서 발현, 분비시키기 위하여 leader sequence를 달리하여 2가지의 재조합 plasmid—효모의 invertase leader sequence를 삽입한 재조합 plasmid인 pISB202와 소 β -casein의 leader sequence를 함유하는 재조합 plasmid인 pDEB303을 제조하였다.

1) 재조합 plasmid pISB202 제조

재조합 plasmid pISB202는 Fig. 1a,b,c에서 보는 바와 같이 3단계로 제조하였다. 우선 vector인 pCGY1444에 약 60여 bp 되는 invertase leader sequence를 vector의 poly linker region의 EcoRI/KpnI 위치에 삽입시켜 pIS9을 제조하였으며 (Fig. 1a), 이 때 EcoRI/ClaI 절단으로 invertase leader sequence 삽입여부를 확인하였다. Invertase leader sequence를 갖고 있는 pIS9에 소 β -casein의 leader sequence를 제외한 β -casein의 structural DNA 만을 삽입하기 위하여, 먼저 β -casein 유전자의 5'-region인 pJRI의 RsaI/ApaI 단편을 분리하여, BglII/RsaI의 합성 linker와 함께 pIS9의 BglII/ApaI 위치에 삽입시켜 pISB19를 제조하였으며 (Fig. 1b), BglII/ApaI 절단으로 β -casein 유전자의 5'-region인 180bp 단편의 삽입을 확인하였다. 이어서 β -casein 유전자의 3'-region을 삽입하고자 pJRI으로부터 분리한 ApaI/DraI 단편에 ApaI linker를 연결시킨후 다시 ApaI으로 절단하여 이 단편을 ApaI/ApaI 단편으로 변형시켜 pISB19의 ApaI 위치에 삽입하여 pISB202 재조합 plasmid를 제조하였다 (Fig. 1c). β -Casein 유

전자의 3'-region 삽입여부는 pISB202를 BglII/ApaI으로 절단하여 540, 180 bp 단편을 확인하므로, 3'-region의 정방향삽입은 ApaI/DraI(539 bp) 단편내에 StuI 절단부위가 비대칭적으로 위치해 있으므로 ClaI/StuI으로 절단하여 280 bp 단편을 확인하므로써 알수 있었다 (Fig. 2).

2) 재조합 plasmid pDEB303 제조

재조합 plasmid pDEB303은 Fig. 3a, b와 같은 순서로 제조하였다. pJRI에 함유되어 있는 소의 cDNA 중 β -casein 유전자의 leader sequence는 AvaiII/RsaI 단편 부분이므로 (Jimenez-Flores et al., in press), 먼저 β -casein 유전자의 5'-region인 pJRI의 AvaiII/ApaI 단편을 분리하여 EcoRI/AvaII 합성 linker와 함께 pCGY1444의 EcoRI/ApaI 위치에 삽

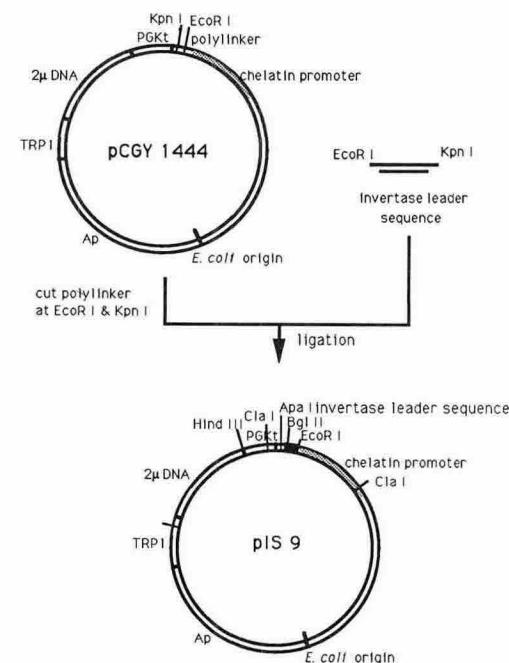


Fig. 1a. Schematic diagram representing the subcloning of the invertase leader sequence into a precursor plasmid, pCGY1444. The resulting plasmid pIS9 was used for the construction of the expression plasmid pISB202 containing the invertase leader sequence.

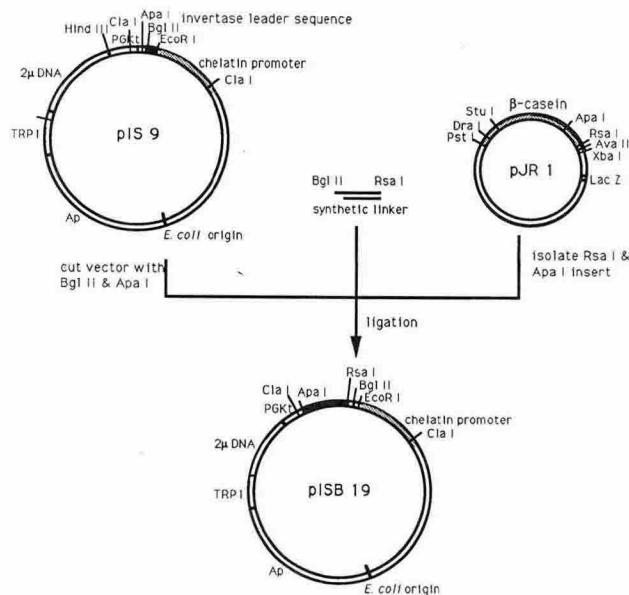


Fig. 1b. Insertion of the 5'-region of β -casein cDNA coding for bovine β -casein of β -casein cDNA was inserted into pIS9 using Bgl II/Rsa I synthetic linker, yielding pISB19.

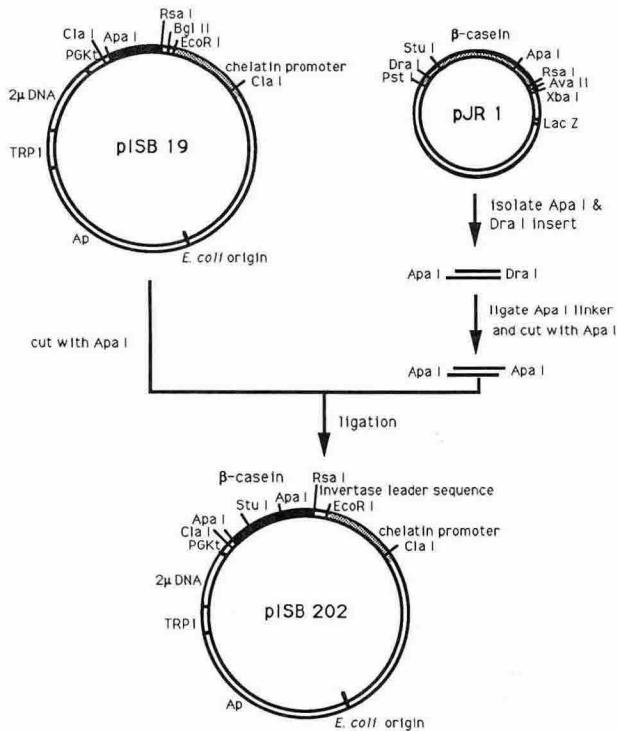


Fig. 1c. Insertion of the 3'-region of β -casein cDNA coding for bovine β -casein into pISB19. The Apa I / Dra I fragment(539 bp) for the 3'-region of β -casein cDNA was isolated, ligated to the Apa I oligonucleotide linker, generating the Apa I / Apa I fragment cut with Apa I . This Apa I / Apa I fragment was inserted into pISB19 at the Apa I site, yielding the expression plasmid pISB202.

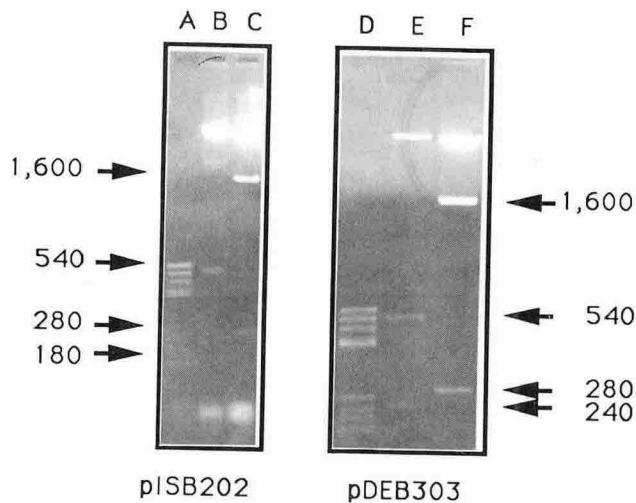


Fig. 2. Agarose gels of the restriction fragments of the constructed plasmid pISB202 and pDEB303 containing the β -casein cDNA insert. Lane A and D, molecular weight markers, pBR322 digested with HaeIII, Lane B, plasmid pISB202 digested with Apa I and BglII, Lane C, plasmid pISB202 digested with Stu I and Cla I, Lane E, plasmid pDEB303 digested with Apa I and EcoR I, Lane F, plasmid pDEB303 digested with Stu I and Cla I.

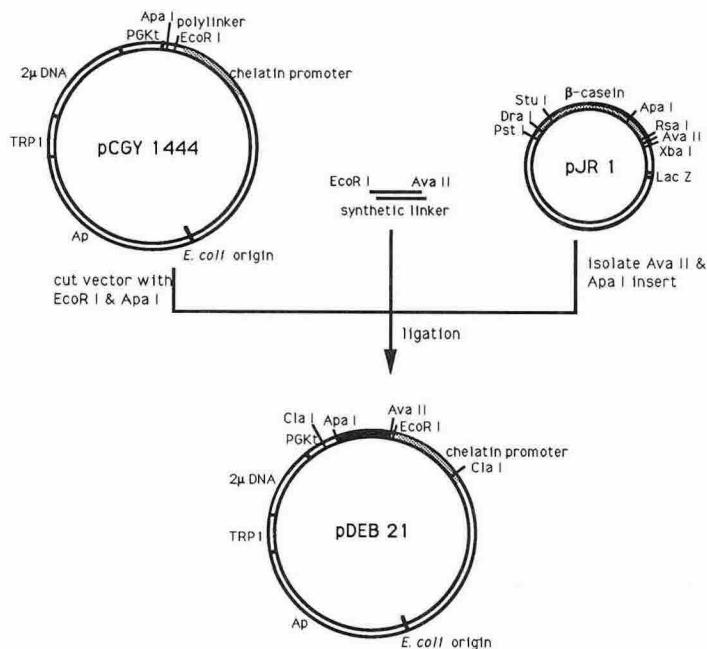


Fig. 3a. Schematic diagram representing the subcloning of the 5'-region of β -casein cDNA into a precursor plasmid, pCGY1444. The resulting plasmid pDEB21 was used for the construction of the expression plasmid pDEB303 containing the β -casein leader sequence. The AvaII/Apa I fragment(229 bp) from the 5'-region of β -casein cDNA harbouring the β -casein leader sequence was inserted into pCGY1444 using an EcoR I /AvaII synthetic linker, yielding pDEB21.

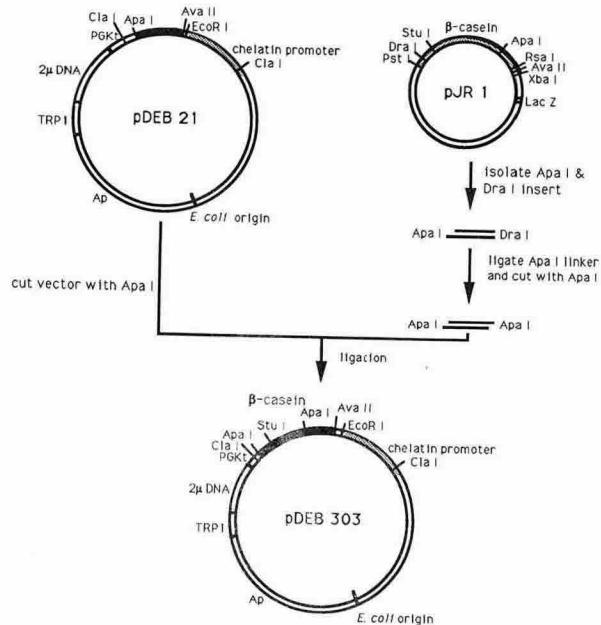


Fig. 3b. Insertion of the 3'-region of β -casein cDNA coding for bovine β -casein into pDEB21. The Apa I /Apa I fragment generated from the 3'-region of β -casein cDNA(Apa I /Dra I fragment, 539 bp) was inserted into pDEB21 at the Apa I site, yielding the expression plasmid pDEB303.

입시켜 pDEB21을 제조하였다(Fig. 3a). pJRI1이 갖고 있는 β -casein 유전자 3'-region의 삽입은 p-ISB202 제조시와 동일한 방법으로 행하여 pDEB303 재조합 plasmid를 얻었다. pDEB303은 EcoRI/ApaI으로 절단하였을 때 540, 240 bp 단편이 존재함을 통하여 전체 β -casein 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었고, β -casein 유전자 3'-region의 정방향삽입은 Cla I/Stu I 절단을 통하여 확인하였다(Fig. 2).

2. 효모내에서 β -casein 유전자의 발현

효모에서 β -casein 유전자를 발현시키기 위하여 재조합 plasmid pISB202와 pDEB303을 각기 효모숙주인 *S. cerevisiae* AB116에 lithium acetate 방법으로 도입하여 uracil과 leucine을 첨가한 효모의 최소

한천배지에서 얻어진 군락을 동일배지에 재이식하여 생육이 우수한 군락을 선별하였다. 선별한 형질전환 효모를 최소액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 후 CuSO₄를 최종농도 30mM 되도록 첨가해 주고 추가로 24~36시간 진탕배양하였다. 배양한 효모세포를 모아 glass bead와 SDS-PAGE 용 sample buffer를 넣고 격력히 혼합하여 세포를 파괴한 cell lysate를 제조하였고 이를 원심분리하여 얻어진 상등액을 끓는 물에 5분간 방치한 후 SDS-PAGE를 행하였다. SDS-PAGE gel을 Western blot 하여 소 casein의 항체를 사용한 면역화학적 염색으로 β -casein의 발현여부를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pISB202를 함유한 invertase leader sequence expression system인 *S. cerevisiae* AB116-234 군주의 lysate와 pDEB303을 함유한

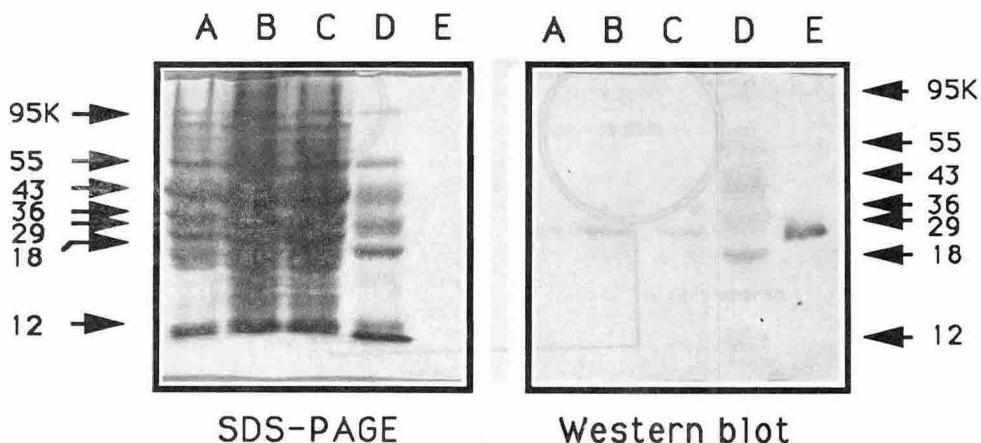


Fig. 4. SDS-PAGE and Western blot patterns of the extract of strains AB116-234 and AB116-314 cells transformed with the plasmid pISB202 and pDEB303, respectively. Lane A, cell extract of the strain harbouring pCGY1444 as a control, Lane B, cell extract of the AB116-234, Lane C, cell extract of the AB116-314, Lane D, prestained molecular weight standards(mid range kit, Diversified Biotech. Inc.), Lane E, standard bovine β -casein.

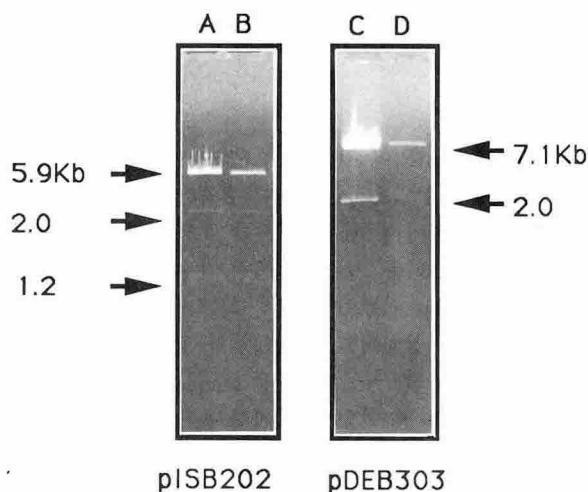


Fig. 5. Agarose gels of the digestion of plasmid pISB202 and pDEB303 which were harboured in yeast transformants. Lane A, transformed pISB202 digested with BglII and HindIII, Lane B, authentic pISB202 digested with BglII and HindIII, Lane C, transformed pDEB303 digested with HindIII, Lane D, authentic pDEB303 digested with HindIII.

β -casein leader sequence expression system인 *S. cerevisiae* AB116-314 균주 lysate는 표준품인 소의 β -casein과 같은 24K 부근에 band를 나타냈으나, 대조군으로 행한 *S. cerevisiae* AB116-2(pCGY1444함유) 균주 lysate에서는 24K부근에 아무런 band도 나타내지 않았다. 이러한 사실을 통하여 이들 β -casein 유전자를 함유한 재조합 plasmid가 효모내에서 발현되어 소의 β -casein과 동일한 β -casein을 세포내 생산함을 알 수 있었다. 효모내에서 발현된 β -casein의 양은 면역화학적 염색의 band의 밝기로 보아 약 0.5 ~1mg 정도로 추정되었다. 한편 *S. cerevisiae* A-B116-234와 *S. cerevisiae* AB116-314 균주내에 재조

합 plasmid가 안정적으로 유지되고 있는지 여부를 조사하기 위하여 이들 yeast cell의 lysate를 *E. coli*에 역형질전환 시켜 분리한 plasmid의 제한효소 절단양상을 살펴 본 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 처음 재조합 plasmid 제조시와 같은 크기의 단편들을 갖으므로 이들 plasmid pISB202와 pDEB303이 효모세포내에 안정적으로 존재함을 알 수 있었다.

3. 효모배양액내 β -casein의 분비

추후의 β -casein 구조와 기능성에 대한 연구를 수행하기 위해서는 효모내에서 발현된 β -casein이 세포 밖으로 분비되어야만 분리 및 정제과정이 용이하여 효율적인 연구를 수행할 수 있다. 그러므로 본 연구에서 세포 밖 분비를 목적으로 소 β -casein 유전자를 함유하는 재조합 plasmid 제조시 효모 invertase leader sequence와 β -casein 자체의 leader sequence를 β -casein의 structural DNA 앞에 연결하였으며, 이들 재조합 plasmid가 도입되어 소 β -casein 유전자를 세포내에서 발현시킨 *S. cerevisiae* A-B116-234와 *S. cerevisiae* AB116-314 두 균주가 생산한 β -casein을 세포 밖으로 분비하는지 여부를 조사하였다. 배양액내의 분비된 β -casein의 존재유무를 조사하기 위하여 배양액을 원심분리하여 세포를 제거한 배양액을 직접 DE-52 음이온교환수지를 통과시켜 염농도구배(0.03~0.3 M NaCl)로 chromatography를 행하고, 얻어진 각 분획을 dot blot 하여 면역학적 염색을 한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 NaCl 농도 0.2M 부근의 분획에 β -casein이 용출됨을 알 수 있었다(*S. cerevisiae* AB116-314의 결과는 생략함). 이 β -casein 분획농축물의 Western blot은 Fig. 7과 같이 두 expression system 모두 표준품으로 사용한 소 β -casein과 같은 위치인 24K 부근에 선명한 β -casein의 band를 나타내었다. 이로부터 두가지 expression system 모두 발현된 β -casein을 세포 밖으로 분비함을 알 수 있었으며, 분비되는 량도 약 50 μ g/l로 거의 유사하였다. 한편 두 expression system간의 차이는 invertase leader sequence system(*S. cerevisiae* AB116-234)이 β -casein leader sequence system(*S. cerevisiae* AB116-314)보다 생육시기상 이른 시기에 분비된다는 점이

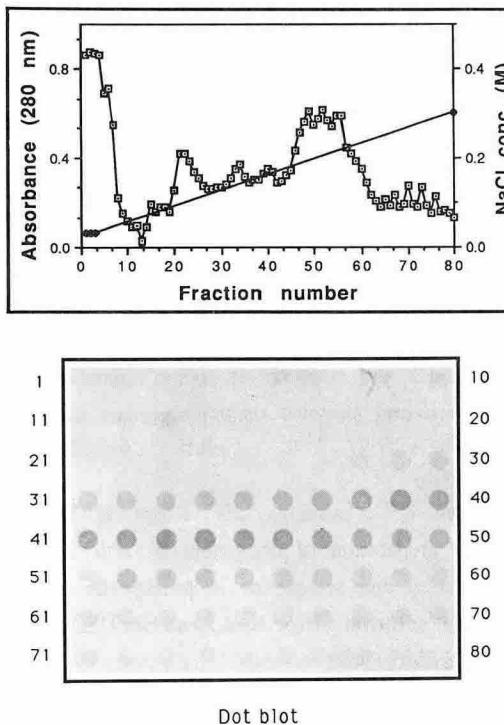


Fig. 6. DE-52 anion exchange chromatography of secreted β -casein and dot blot analysis of the fraction. β -casein secreted into the culture broth of strain AB116-234 was applied to the column and eluted using 0.03~0.3 M NaCl linear gradient. Fractions were analyzed using dot blotting and immunochemical staining.

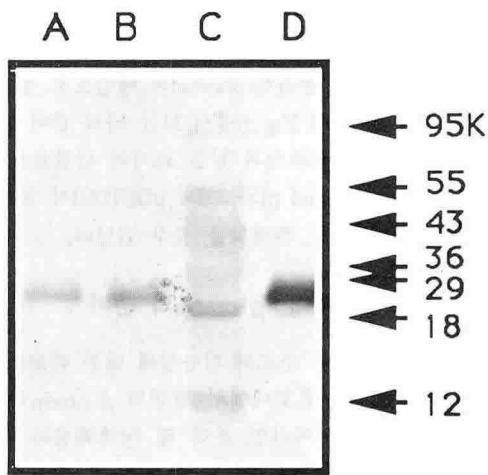


Fig. 7. Western blot pattern of concentrates of the positive fractions obtained from DE-52 chromatography. Lane A, the concentrate of the culture broth from strain AB116-234, Lane B, the concentrate of the culture broth from the strain AB116-314, Lane C, molecular weight standards, Lane D, standard bovine β -casein.

었다. 이들 expression system⁹⁾ β -casein 유전자를 효모 세포내 발현하여 생산하는 β -casein이 약 0.5~1mg/liter 인데 비하여 세포 밖으로 분비된 량이 50 μ g/l 이므로 분비효율은 5~10% 정도로 매우 낮은 편이며, 또한 분비되는 량이 절대적으로 낮으므로 앞으로 분비과정의 최적화를 통한 분비효율증대에 대한 연구의 필요성이 제기되고 있다.

IV. 요 약

효모세포에서 소의 β -casein 유전자를 발현시켜 세포 밖으로 분비 시키고자 효모 invertase leader sequence와 소 β -casein leader sequence를 각각 *E. coli*-yeast shuttle vector인 pCGY1444의 chelatin promoter 뒤에 연결하고 소 β -casein의 structural DNA를 삽입한 재조합 plasmid pISB202와 pDEB 303를 제조하였으며, 이들 재조합 plasmid를 *S. cerevisiae* AB116에 도입하여 각각 *S. cerevisiae* A-B116-234와 *S. cerevisiae* AB116-314의 expression system을 얻었다. 두 형질전환 효모는 모두 세포내

에 β -casein을 약 0.5~1mg/liter 정도 발현 생산하였으며, 동시에 세포 밖으로 약 50 μ g/liter 분비하였으나 분비시기에서는 *S. cerevisiae* AB116-234(invertase leader sequence system)⁹⁾ *S. cerevisiae* A-B116-314(β -casein leader sequence system)보다 이른 시기에 분비하였다. 분비된 β -casein은 Western blot의 면역화학적 염색 결과 표준품인 소의 β -casein과 동일한 24K의 분자량을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Ausubel, S.M., Brent, R., Kingstone, R.R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1987, New York, NY
2. Bers, G., Garfin, D.; Protein and nucleic acid blotting and immunochemical detection, Biotechnology, 3 : 276-288(1985)
3. Bonsing, J., Mackinlay, A.G.; Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins, J.Dairy Res., 54 : 447-461(1987)
4. Chang, C.N., Matteucci, M., Perry, L.J., Wulf, J.J., Chen, C.Y., Hitzeman, R.A.; *S. cerevisiae* secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptide, Mol. Cell.Biol., 6 : 1812-1819 (1986)
5. Chung, C.T., Suzanne, L.N., Roger, H.M.; One step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86 : 2172-2175(1989)
6. Davies, D.T., Law, A.J.R.; An improved method for the quantitative fractionation of casein mixture using ion-exchange chromatography, J.Dairy Res., 44 : 213-221(1977)
7. Eigel, W.W., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M.Jr., Harlwakar, V.R., Jenness, R., Whitney, R. McL.; Nomenclature of proteins in cow's milk, Fifth revision, J.Dairy Sci., 67 : 1599-1631(1984)

-
8. Jabbar, M.A., Nayak, D.P.; Signal processing, glycosylation, and secretion of mutant hemagglutinins of a human influenza virus by *S. cerevisiae*, *Mol.Cell.Biol.*, 7 : 1476-1485(1987)
 9. Jimenez-Flores, R., Richardson, T.; Cloning and sequence analysis of bovine β -casein cDNA, *Biochem.Biophys.Res.Com.*, 142 : 617-621(1987)
 10. Jimenez-Flores, R., Richardson, T., Bisson, L.F.; Expression of bovine β -casein in *S. cerevisiae* and characterization of the protein produced in vivo, *J.Agri.Food Chem.*(in press)
 11. Jones, E.W.; Proteinase mutants of *S. cerevisiae*, *Genetics*, 85 : 23-33(1977)
 12. Kang, Y.C., Richardson, T.; Molecular cloning and expression of bovine K-casein in *E. coli*, *J.Dairy Sci.*, 17 : 29-40(1988)
 13. Laemmli, U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, 227 : 680-685(1970)
 14. Maniatis, T., Fritsh, E.F., Sambrook, J.; *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, New York, NY
 15. Swaisgood, H.E.; Chemistry of milk protein, in *Developments in Dairy Chemistry*, Vol.1, P.F.Fox ed., Applied Sci., 1982, London