

*Saccharomyces cerevisiae*에서 *Zymomonas mobilis* 유래 Levansucrase의 발현과 분비

임채권¹ · 김이경¹ · 김광현¹ · 김철호² · 이상기² · 남수원*

동의대학교 생명공학과, ¹미생물학과, ²한국생명공학연구원

Received December 5, 2003 / Accepted April 19, 2004

Expression and Secretion of *Zymomonas mobilis* Levansucrase in *Saccharomyces cerevisiae*. Chae-Kwon Lim¹, Yi-Kyung Kim¹, Kwang-Hyeon Kim¹, Chul-Ho Kim², Sang-Ki Rhee² and Soo-Wan Nam^{*}. Department of Biotechnology & Bioengineering, ¹Department of Microbiology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea – Levansucrase gene (*levU*) from *Zymomonas mobilis* was subcloned downstream of GAL1 promoter in pYES 2.0 and pYInu-AT [GAL10 promoter+exoinulinase signal sequence of *Kluyveromyces marxianus*], resulting pYES-*levU* and pYInu-*levU*, respectively. The two expression plasmids were introduced into an invertase-deficient strain, *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102, and then transformants showing high activity of levansucrase were selected. When each yeast transformants was cultivated in medium containing galactose, the extracellular and intracellular activities of levansucrase reached about 7.17 U/ml with the strain harboring pYES-*levU* and 6.61 U/ml with the strain harboring pYInu-*levU*. It was found that about 50% of levansucrase were detected in the medium and periplasmic space, and exoinulinase signal sequence didn't enhance the secretion efficiency. Furthermore, the recombinant levansucrase expressed in yeast seems to be produced as a hyper-glycosylated form.

Key words – *Zymomonas mobilis*, levansucrase, *Saccharomyces cerevisiae*, exoinulinase signal

Levansucrase는 fructosyltransferases의 한 종류로 *Zymomonas mobilis* 경우 sucrose로부터 levan을 형성한다. *Z. mobilis*에서 sucrose의 분해는 sucrose (β-D-fructofuranosidase; EC. 3.2.1. 26)와 levansucrase (sucrose: 2,6-β-D-fructon 6-β-D-fructosyltransferase; EC 2.4.1.10)에 의해서 균체외에서 이루어지지만 주로 levansucrase에 의해 분해가 이루어지는 것으로 알려져 있다[7,19]. 이때 생성된 fructose로부터 levansucrase의 transfructosylation 반응에 의해 levan이 형성된다. Yanase 등[24]과 O' Mullan 등[19]은 *Z. mobilis*에서 3종류의 sucrose 가수분해 효소(균체내 sucrose A (InvA), 균체외 분비성 sucrose B (InvB), 균체외 분비성 levansucrase (LevU))를 분리하고, 이 3종류의 효소가 모두 β-D-fructofuranosidase이며 이중 levansucrase가 fructose polymer인 levan의 형성에 관여한다고 보고하였다. 효소에 의해 합성된 levan은 다수의 β-2,6 결합과 소수의 β-2,1 결합으로 이루어진 fructose-homopolymer로서, 식품과 의약품 등 산업적 유용소재로 활용된다[6,12].

천연 수용성 식이섬유인 levan은 복잡한 생합성 기작에 의한 한정된 생산성과 복잡한 정제 과정으로 인해 다량생산에 어려움이 있다. Levan을 생산할 수 있는 levansucrase는 자연으로부터 직접 얻어서 사용하기에는 그 양이 적다든지, 기능(활성)이 다양하지 못해서 산업적 사용에는 많은 제약이 따른다. Levansucrase 유전자를 *E. coli*에서 발현시켜 inclu-

sion body로 생산될 경우, 고순도로 대량 제조하는 데에는 한계성을 갖고 있다[9]. 따라서, 유전자 재조합 기술을 사용하여 GRAS (Generally recognized as safe) 미생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 재조합 단백질 형태로 생산하는 것이 inclusion body를 만드는 *E. coli* 보다 levan 생산성 향상과 식품소재로서의 안전성 확보 및 기능(활성) 개선에 크게 유리하다.

이제까지 levansucrase 유전자는 8종의 Gram 음성 세균 (*Acetobacter diaxotrophicus*, *Acetobacter xylinus*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas aurantiaca*, *Rahnella aquatilis*, *Zymomonas mobilis*)과 몇몇 Gram 양성 세균(*Bacillus*, *Streptococcus*)에서 cloning 되었다[3,23,24]. 본 연구에서 사용한 levansucrase는 *Z. mobilis* ZM1 유래의 *levU* 유전자이며, ORF가 1272 bp이고 단백질 분자량은 46 kDa이다[23]. pYES2.0을 이용한 GAL1p-native ss-*levU*-GAL7t 발현 cassette와 pYInu-AT[7]를 이용한 GAL10p-INU1 ss-*levU*-GAL7t의 발현 cassette 가지는 *levU* 효모 발현계를 구축한 뒤 *S. cerevisiae*에 형질전환시켜 levansucrase 발현과 분비 양상을 조사하고, levan biopolymer의 경제성있는 대량생산공정 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmids

본 연구에 사용한 숙주세포와 plasmids를 Table 1에 정리

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2276, Fax : +82-51-890-1619

E-mail : swnam@deu.ac.kr

Table 1. Bacterial strain, yeast strain and expression plasmids used in this study

Strains	Genotypes	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>sup44 Δlac U169 (ΔlacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gylA96 Tri-1 relA1</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SEY 2102	<i>MAT α ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-419 suc2-Δ9</i>	Ref. 2
Plasmids	Characteristics	Sources
pZL8	pUC118 + <i>levU</i>	Ref. 23
pYES2.0	<i>GAL1p-MCS-CYCt</i>	Invitrogen Co.
pYInu-AT	<i>GAL10p-INUss- α AT-GAL7t</i>	Ref. 6
pYES- <i>levU</i>	<i>GAL1p-levU-CYC1t</i>	This study
pYInu- <i>levU</i>	<i>GAL10p-levU-GAL7t</i>	This study

하였다. 사용한 효모숙주세포는 *S. cerevisiae* SEY2102[2]로써, invertase 결손 변이주(*suc2-Δ9*) 및 uracil 영양요구성 변이주(*ura3-52*)이며 haploid이다. Plasmid 구축 및 증폭을 위한 숙주로 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다. Levansucrase 유전자는 pZL8[23]로부터 PCR (Perkin Elmer PCR System 2400, USA)로 denaturation 95°C, annealing 55°C, polymerization 72°C의 조건에서 증폭하였다. 증폭·분리된 유전자는 *E. coli-S. cerevisiae* shuttle vector인 pYES 2.0 (Invitrogen Co., USA)과 pYInu-AT (*GAL10* promoter + exoinulinase signal sequence)[10]에 각각 subcloning하였다.

효모 형질전환체 선별 및 배양조건

효모로의 형질전환은 LiCl[5]법을 사용하였다. 효모 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 SD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acids, 2% dextrose)를 사용하였고, 1차 선별한 효모 형질전환체들로부터 levansucrase의 발현유무를 신속히 조사하기 위해 2, 3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 염색법[16,17]을 사용하여 2차 선별하였다. 즉, 2% sucrose 함유 YP (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone) agar 배지에서 48시간 자란 효모 형질전환체 colony들을 증류수로 세척한 후 TTC (0.1% in 0.5 N NaOH) 용액으로 20분간 반응시켰다. 10% 초산으로 세척한 후 나타나는 colony 주위의 적색환은 효모에서 발현된 levansucrase에 의해 sucrose가 fructose와 glucose으로 가수분해되었음을 나타낸다.

효모 형질전환체의 배양은 YP 배지에 1% dextrose와 1% galactose를 첨가한 YPDG 배지에서 행하였다.

균체농도, 잔존환원당 및 Plasmid 안정성

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(OD₆₀₀)로 측정하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid (DNS) 방법[14]을 사용하여 잔존 환원당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100-200개의 CFU (colony

forming unit)를 SD 선별배지로 tooth picking한 다음 생육한 CFU를 백분율로 측정하였다.

균체 분획 및 효소 활성 측정

균체 침전물을 Zymolyase 100T (Seikagaku Kogyo, Japan)를 사용하여 균체의 세포벽을 파쇄한 후 원심분리(13,000 rpm, 10분)하여 얻은 상등액을 periplasmic space 분획으로 얻었고, 침전물을 glass beads (0.4-0.5 mm)를 사용하여 파쇄하여 cytoplasm 분획을 얻었다[15]. 이들 분획과 배양상등액을 사용하여 각 분획에서의 levansucrase 활성을 측정하였다. Levansucrase 활성은 DNS법[14]을 이용하여 2% sucrose 기질로 pH 4.7 (50 mM 초산 완충액), 37°C에서 분당 1 μ mol의 환원당(fructose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 비활성은 각 효소 활성을 균체농도(OD₆₀₀)로 나누어서 계산하였다. 각 효소들의 분비효율은 전체 효소활성(균체의 활성 + 균체내 활성)에 대한 균체의 효소 활성비를 백분율로 나타내었다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

재조합 levansucrase의 효소학적, 생화학적 제특성을 조사하기 위해 Laemmli 법[13]에 따라 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)의 존재하에서 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 수행하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다.

Levansucrase 활성염색은 nondenaturing-PAGE gel을 2% sucrose를 포함하는 50 mM 초산 완충액(pH4.7)에 첨가하여 37°C에서 반응시킨 후 TTC 염색[15]을 통해 활성 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

Levansucrase (*levU*) 발현 vectors의 구축

효모에서 levansucrase 유전자(*levU*)를 발현시키기 위해 exoinulinase 분비신호를 갖지 않는 것과 갖는 것 등 2가지의 발현계를 구축하였다(Fig. 1). *levU* 유전자는 pZL8을 template로 하여 PCR 증폭을 위한 primers로 LEV-1, LEV-2를 사용

하였으며, 각각의 서열은 LEV-1: 5' - TGAAGAATTCAGATCTATGTTGAATAAAGC - 3'와 LEV-2: 5' - TTCAAAGCTTGTCGACTTATTATCAATA - 3'로서 (각각 양 말단에 *Bgl*II와 *Sal*I 부위가 만들어지도록 설계) PCR 증폭한 후, *Bgl*II와 *Sall*으로 처리하여 *levU* 단편을 분리하였다. 분리한 단편을 pYES 2.0의 *GAL1* promoter 하류에 subcloning하여 자체분비신호를 갖는 발현 cassette를 가지는 pYES-*levU* (7.2 kb)를 구축하였다. 그리고 *K. marxianus* exoinulinase의 분비신호 서열(*INU1* ss; 23개 아미노산 잔기로 구성; MKLAYSL LPLAGVSASVINYKR) 하류에 *levU*를 in-frame으로 연결하기 위해 pYInu-AT[7]의 α_1 -antitrypsin 유전자를 *Bgl*II - *Sall* 처리로 잘라내고 *levU*로 치환하여 *GAL10p*-*INU1* ss-*levU*-*GAL7t*의 발현 cassette를 가지는 pYInu-*levU* (7.4 kb)를 구축하였다(Fig. 1).

효모 형질전환체의 선별

구축된 발현 plasmids (pYES-*levU*, pYInu-*levU*)를 효모에 형질전환하여 SD배지에서 1차 선별하고, 2% sucrose가 포함된 agar plate에서 TTC 염색법으로 적색환을 형성(Fig. 2)하는 colony를 2차 선별하였다. 2차 선별된 colony 중 5개를 시험관(2.3×20 cm)에서 YPDG배지에서 48 시간 배양한 결과, 균체증식과 활성이 가장 좋은 형질전환체 No. 4 균주를 각각 3차 선별하였다(data not shown). 숙주세포인 *S. cerevisiae* SEY2102 경우 균체증식은 형질전환체와 비슷했지만, levansucrase 활성은 거의 나타나지 않았다(0.5 U/ml 이하).

제조합 levansucrase 발현과 subcellular translocation 시험관 배양 결과로 선택된 No. 4 형질전환체를 플라스스크

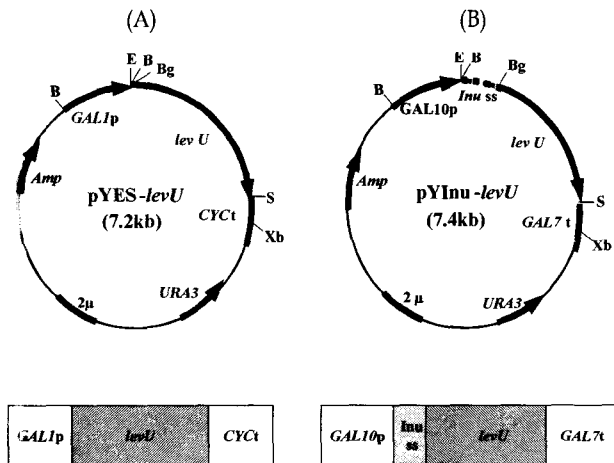


Fig. 1. Schematic diagram of plasmid pYES-*levU* (A) and plasmid pYInu-*levU* (B). *GAL1p*, *GAL10p*, galactose-regulated promoter; *levU*, *Z. mobilis* levansucrase; *Inu ss*, inulinase signal sequence; *CYCt* and *GAL7t*, transcriptional terminator; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; S, *Sall*; Bg, *Bgl*II; Xb, *Xba*I.

배양하여 제조합 levansucrase의 활성을 측정된 결과를 Fig. 3과 Table 2에 나타내었다. pYES-*levU*와 pYInu-*levU* 모두 비슷한 균체증식을 보이며, 잔존 환원당 소모도 비슷하였다. *LevU* 발현은 dextrose 소모 후 galactose를 이용하는 12시간 이후부터 발현되어 48시간까지 계속 발현량이 증가하는 양상을 나타내었다. 12시간 이후 48시간까지의 정지기 구간에서 균체농도의 감소가 관찰되지 않았고, 따라서 세포 용해(lysis)는 일어나지 않은 것으로 판단된다. pYES-*levU* 함유 형질전환 효모는 48시간 배양 시 균체농도인 OD₆₀₀가 38.7이고, levansucrase 활성은 세포 밖 배지에 0.44 U/ml, periplasmic space에 3.51 U/ml, cytoplasm에 3.22 U/ml로 나타났다. pYInu-*levU* 함유 형질전환 효모는 48시간 배양 시 균체농도가 OD₆₀₀ 40.6이고, levansucrase 활성은 세포 밖 배지에 0.91 U/ml, periplasmic space에 2.34 U/ml, cytoplasm에 3.36 U/ml로 나타났다. 즉, levansucrase 자체 분비신호든 exoinulinase 분비신호든 배지와 periplasmic space까지의 분비효율은 약 50%로 나타나 분비신호에 따른 분비능에 큰 차이를 보이지 않았다.

INU1 signal peptide 사용하여 Chung 등[1]은 human lipocortin-1를 효모에서 80% 정도 분비시켰고, Kang 등[10]은 human α -antitrypsin를 70%의 분비효율로 생산하였고, human serum albumin도 효과적으로 분비시켰다[11]. Scotti 등[22]은 다양한 signal peptides (α -factor, invertase, acid phosphatase, *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase)를 사용하여 *B. subtilis* 유래의 levansucrase에 대한 효모에서의 분비효율을 조사한 바 있다. 그 연구결과에 따르면 invertase signal peptide (MLLQAFLLLAGFAAKISA) 하류에 mature levansucrase

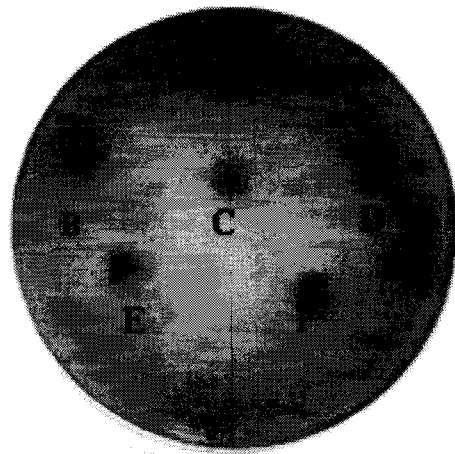


Fig. 2. Active staining of levansucrase with yeast transformant which are grown on galactose and sucrose containing medium. A, *S. cerevisiae* SEY2102; B, *S. cerevisiae* 2805; C and D, *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*levU*; E and F, *S. cerevisiae* SEY2102/pYInu-*levU*.

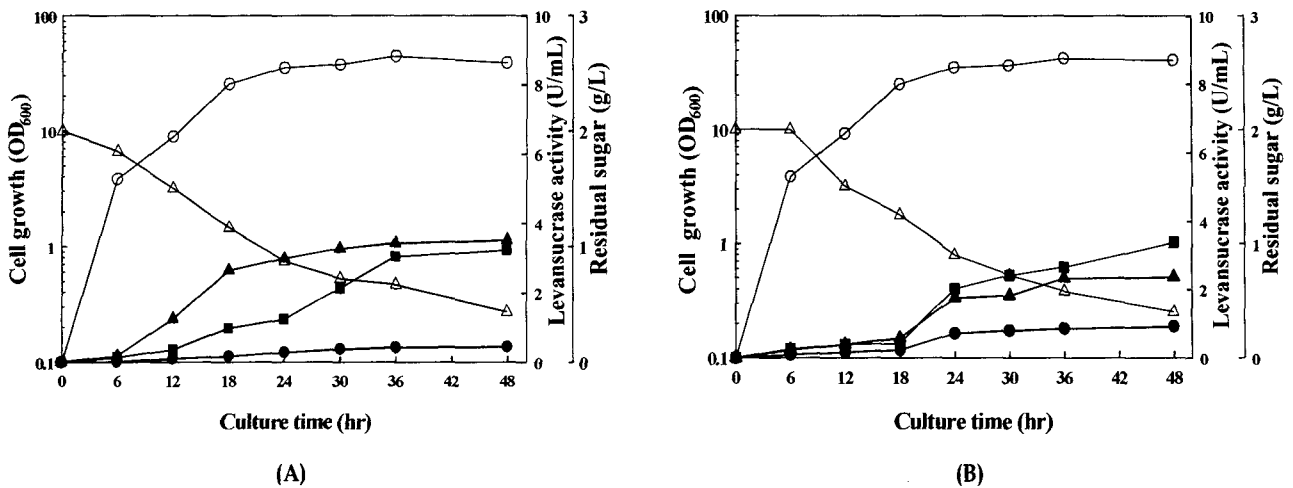


Fig. 3. Cell growth and levansucrase expression in flask cultures of yeast transformant *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-levU (A) and SEY2102/pYInu-levU (B) grown on YPDG medium. Symbols are (○), cell growth; (△), Residual sugar; (●), levansucrase activity in medium; (▲), levansucrase activity in periplasmic space; (■), levansucrase activity in cytoplasm.

Table 2. Comparison of the cell growth and levansucrae expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-levU and SEY2102/pYInu-levU after 48 hr cultivation on YPDG medium

Strain	Cell Growth (OD ₆₀₀)	Levansucrase Activity (U/ml)			Total Activity (U/ml)
		Medium	Periplasm	Cytoplasm	
SEY2102 / pYES-levU	38.7	0.44 (6.1)*	3.51 (48.9)	3.22 (44.9)	7.17
SEY2102 / pYInu-levU	40.6	0.91 (13.0)	2.34 (35.4)	3.36 (50.9)	6.61

* The number in parenthesis represents the distribution percentage.

sucrase의 N-말단 아미노산 서열을 GSKETNQKPY에서 GST QTNQTPY으로 치환하여 negative net charge를 neutral net charge로 바꾸었을 때 endoplasmic reticulum (ER)의 lumen으로 levansucrase가 효과적으로 수송되지만 배지 내로의 분비는 미약하였다. 성숙 단백질 N-말단의 net charge와 효모 signal peptide의 소수성 core 영역은 효모 분비경로의 첫 단계인 ER로의 수송과 signal peptide 절단에는 효과적으로 기능을 하나, Golgi체로의 이동 및 균체 외로의 분비에는 불충분한 것으로 나타났다[21,22]. 본 연구에서의 levansucrase signal peptide (MLNKAGIAEPLWTRADAM)도 levansucrase를 세포질에 45% 정도 존재시켰고, INU1 signal peptide (M KLAYSLLLP LAGVSASVINYKR)의 경우도 균체 외로의 분비는 약간 증가되었으나 세포질에 약 51% 정도 분포되는 양상을 보였다(Table 2). 따라서 이는 성숙 단백질 N-말단의 net charge와 signal peptide의 소수성 core 영역 외에 성숙 단백질 전체의 net charge 등이 개선되어야만 ER에서 Golgi체로, Golgi체에서 분비과정으로, 분비과정에서 세포 밖으로의 일련의 분비경로 중 율속 단계를 해결하여 분비능을 향상시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

재조합 levansucrases의 전기영동

전기영동 분석을 통해 효모에서 생산되는 재조합 levansucrase의 당쇄 부가 양상을 조사하기 위해 *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-levU과 SEY2102/pYInu-levU의 배양 상등액과 균체 분획의 재조합 levansucrase를 SDS-PAGE로 분석하였다. Coomassie 염색에서는 정확한 levansucrase의 band를 확인할 수 없었고(Fig. 4A), non-denaturing PAGE 후 활성 염색에서 넓고 분산된 밴드를 나타내어 전형적인 당단백질임을 확인하였지만(Fig. 4B), 정확한 분자량 확인은 불가능하였다. Levansucrase에는 3개의 N형 당쇄 부가부위(140Asn-Asp-Thr, 327Asn-Gly-Ser, 335Asn-Pro-Ser)가 존재하는데 [23], 이 세 부위의 Asn에 당쇄가 부가되어 넓은 스펙트럼 밴드를 나타내는 것으로 생각된다. 당쇄 부가된 levansucrase는 생화학적 변화(열안정성 증가)로 인해 반응온도를 높일 수 있어 고농도의 sucrose를 기질로 levan의 생산성 향상을 기대할 수 있다. 실제로 당쇄부가에 의해 열안정성이 크게 증가된 효소로는 *Bacillus endoglucanase*[4], *Bacillus cyclonulooligosaccharide fructanotransferase*[8], *Bacillus cyclodextrin glucanotransferase*[18], *Bacillus α-amylase*[20] 등 다양하다.

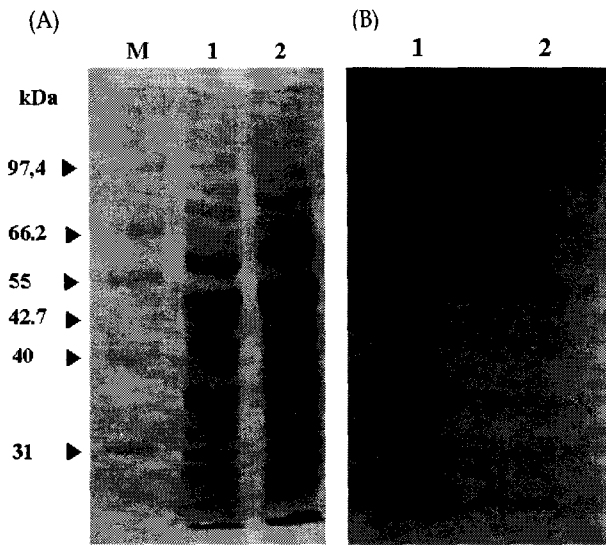


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and non-denaturing-PAGE (B) analyses of recombinant levansucrase.
 lane M: Protein molecular weight marker.
 lane 1: *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-levU.
 lane 2: *S. cerevisiae* SEY2102/pYInu-levU.

감사의 글

본 연구에 연구비를 지원해준 과학기술부 중점생명공학실 용화사업단(Bioproducts & Biotechnology Research Center)에 감사드립니다.

요 약

Zymomonas mobilis 유래 levansucrase 유전자(levU)를 GAL1 promoter 하류에 연결시킨 pYES-levU와 GAL10 promoter 하류에 *Kluyveromyces marxianus* exoinulinase의 분비 신호서열 INU1 ss 하류에 연결시킨 pYInu-levU를 각각 구축하였다. 이들 plasmid를 invertase 결손 변이주(suc2-49)인 *S. cerevisiae* SEY2102에 형질전환시켜 고효율형질전환주를 선발하였다. 효모 형질전환주를 galactose 함유 배지로 배양한 결과, pYES-levU 함유 형질전환주인 경우 levansucrase의 총활성은 7.17 U/ml이고, pYInu-levU 함유 형질전환주인 경우 6.61 U/ml에 도달하였다. 발현된 levansucrase의 약 50% 정도가 배지 외 periplasmic space에 존재하였고, INU1 ss에 의한 분비효율을 증가는 관찰할 수 없었다. 또한, 효모에서 발현된 재조합 levansucrase는 과당쇄화된 형태로 생산되는 것으로 보여진다.

참 고 문 헌

1. Chung, B. H., S. W. Nam, B. M. Kim and Y. H. Park. 1996. Highly-efficient secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal peptide. *Bio-*

technol. Bioeng. **49**, 473-479.
 2. Emr, S. D., R. Schekman, M. C. Flessel and J. Thorner. 1983. An MF α 1-SUC2 (α -factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 7080-7084.
 3. Gunasekaran, P., T. Gunasekaran, B. Caimi, A. G. Mukundan, L. Preziosi and J. Baratti. 1990. Cloning and sequencing of the sacA gene: characterization of a sucrose from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **172**, 6726-6735.
 4. Han, Y. J., D. O. Kang, S. C. Lee, B. Y. Kim, H. H. Suh, J. M. Kim, T. I. Mheen and J. S. Ahn. 1994. Secretion of a *Bacillus* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* by its own signal sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 24-29.
 5. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
 6. Jang, K. H., K. B. Song, C. H. Kim, B. H. Chung, S. A. Kang, U. H. Chun, R. W. Choue and S. K. Rhee. 2001. Comparison of characteristics of levansucrose produced by different preparations of levansucrose from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 339-344.
 7. Johns, M. R., P. F. Greenfield and H. W. Doelle. 1992. Byproducts from *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **44**, 97-121.
 8. Kanai, T., N. Ueki, T. Kawaguchi, Y. Teranishi, H. Atomi, C. Tomorbaatar, M. Ueda and A. Tanaka. 1997. Recombinant thermostable cycloinulo-oligosaccharide fructantransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4959-4960.
 9. Kandlula, S., B. H. Chung, K. H. Jang, K. B. Song, C. H. Kim and S. K. Rhee. 2000. Refolding and purification of *Zymomonas mobilis* levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.* **18**, 388-393.
 10. Kang, H. A., S. W. Nam, K. S. Kwon, B. H. Chung and M. H. Yu. 1996. High-level secretion of human α 1-antitrypsin from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal sequence. *J. Biotechnol.* **48**, 15-24.
 11. Kang, H. A., M. S. Jung, W. K. Hong, J. H. Sohn, E. S. Choi and S. K. Rhee. 1998. Expression and secretion of human serum albumin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 42-48.
 12. Kogima, I., T. Saito, M. Iizuka, N. Minamiura and A. Ono. 1993. Characterization of levansucrose produced by *Serratia* sp. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 9-12.
 13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 14. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**, 952-959.
 15. Nam, S. W., K. Yoda and M. Yamasaki. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1049-1054.
 16. Nam, S. W., M. H. Woo, B. M. Kim, B. H. Chung and Y. H. Park. 1994. Expression and localization of inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.* **22**, 152-157.
17. Nam, S. W., H. J. Lim, B. H. Chung and Y. K. Chang. 1996. Expression and secretion of recombinant inulinase under the control of GAL or GAP promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 445-452.
 18. Nam, S. W., H. Y. Park, J. H. Kim, J. H. Seo, N. S. Han and B. W. Kim. 2001. Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 727-730.
 19. O'Mullan, P., M. Szakacs-Dobozi and D. E. Eveleigh. 1991. Identification of saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4. *Biotechnol. Lett.* **13**, 137-142.
 20. Ruohonen, L., P. Hackman, P. Lehtovaara, J. C. K. Knowles and S. Keranen. 1987. Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by its own signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* host cells. *Gene* **59**, 161-170.
 21. Scotti, P. A., R. Chambert and M. F. Petit-Glatron. 1994. Extracellular levansucrase of *Bacillus subtilis* produced in yeast remains in the cell under its precursor form. *Yeast* **10**, 29-38.
 22. Scotti, P. A., M. Praestegaard, R. Chambert and M. F. Petit-Glatron. 1996. The targeting of *Bacillus subtilis* levansucrase in yeast is correlated to both the hydrophobicity of the signal peptide and the net charge of the N-terminus mature part. *Yeast* **12**, 953-963.
 23. Song, K. B., H. K. Joo and S. K. Rhee. 1992. Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). *Biochim. Biophys. Acta.* **1173**, 320-324.
 24. Yanase, H., H. Fukushi, N. Ueda, Y. Maeda, A. Toyoda and K. Tonomura. 1991. Cloning, sequencing, and characterization of intracellular invertase from *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1383-1390.