

재조합 *Saccharomyces cerevisiae*에서 Inulinase의 발현과 국재성

남수완 · 우문희 · 김병문 · 정봉현* · 박영훈
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Expression and Localization of Inulinase in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Nam, Soo-Wan, Moon-Hee Woo, Byung-Moon Kim,
Bong-Hyun Chung* and Young-Hoon Park

Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Yusong,
Taejeon 305-600, Korea

Abstract — Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* origin was produced by recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* under the control of *GAL1* promoter, to examine the expression and localization of inulinase in a repressed (galactose-free) or derepressed (galactose-containing) medium. The inulinase gene (*INUIA*) was constitutively expressed at 6.7 units/ml in a repressed medium. When the cell started to utilize galactose in a derepressed medium, the *INUIA* gene began to be expressed, and the final expression level reached about 45 units/ml. According to the nondenaturing-PAGE analysis, inulinase produced by *S. cerevisiae* was found to be less glycosylated than the bakers yeast invertase. In addition, its glycosylation pattern was less heterogeneous than the *K. marxianus* inulinase. The supplementation of inulin or raffinose into the derepressed medium increased the cell growth rate, while the expression of *INUIA* was repressed. Regardless of the carbon sources examined, most of inulinase activity (more than 98%) was found in the extracellular medium, indicating excellent secretion efficiency.

*Kluyveromyces marxianus*에서 inulinase [β -D-fructan fructanohydrolase, E.C.3.2.1.7]는 fructose, sucrose, raffinose, levan 및 inulin과 같은 탄소원에 의해 그 생합성이 유도 조절되며, 생합성된 inulinase는 당단백질 형태로 대부분 균체의 배지로 분비된다고 알려져 있다(1-3). 또한, *K. marxianus* inulinase는 *S. cerevisiae* invertase [β -D-fructofuranoside fructohydrolase, E.C.3.2.1.26]와 함께 다당류의 말단 β -2,1-, β -2,6-fructofuranosidic 결합을 절단하는 β -fructosidase형 효소이며, 이들 두 효소는 최적 pH 또는 sucrose와 inulin 가수분해 활성의 비(S/I ratio)에 의해 구별할 수 있으며, invertase의 S/I비는 5, 800~14,000, inulinase의 S/I비는 3.5~26으로 알려져 있다(1, 4). 최근, *K. marxianus*의 inulinase 유전자 (*INUI* 또는 *INUIA*)가 클로닝 및 그 염기서열이 밝혀져 유전자 수준에서 생합성 조절기작 또는 발현기작 연구에의 길을 열어 놓았다(5, 6).

본 연구에서는 *GAL1* promoter 하류에 *K. marxianus*의 inulinase 유전자(*INUIA*)를 연결한 pYI10 plasmid(7) 함유 재조합 *S. cerevisiae*를 inulinase 단백질의 발현과 분비과정을 연구하기 위한 모델시스템으로 사용하였다. *S. cerevisiae*에서 특히, galactose 유도 시스템을 갖는 재조합 효모를 이용하여 외래 단백질을 생산하려는 발효공정에서 catabolite repression같은 carbon metabolism 및 overexpression에 대한 연구는 오래 전부터 진행되어 오고 있다(8, 9). 또한, 유전자 산물의 분리정제 공정을 감안하여 외래 단백질의 국재성(localization)과 효율적인 분비에 대하여도 최근 활발히 연구가 진행되고 있다(10-12). 따라서, 본 연구에서는 재조합 *S. cerevisiae*의 배양에서 *INUIA* 유전자 발현의 inducer인 galactose 존재 유무에 따른 균체증식과 inulinase 발현양 및 그 국재성 관점에서 조사하였으며 inulin 또는 raffinose와 같은 탄소원의 영향도 함께 조사하였다.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, inulinase, *GAL1* promoter, localization

*Corresponding author

재료 및 방법

숙주세포 및 plasmid

본 연구에 사용한 숙주세포는 *Saccharomyces cerevisiae* HN18(*Mata suc2-9 trp1-289 ura3*)(6)과 *S. cerevisiae* SEY2102(*Mata ura3-52 leu2-3 -112 his4-519*)(13)이며, 재조합 plasmid는 *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* Y-610의 inulinase 유전자(*INU1A*)가 클로닝된 pYI10이다(7). 이들 숙주세포는 염색체상의 *SUC2* 유전자가 완전히 제거되어 그 자체로는 invertase를 생산할 수 없어 재조합 효모가 생산하는 inulinase 활성 측정에는 전혀 영향을 줄 수 없다. Plasmid pYI10은 *Escherichia coli*-*S. cerevisiae* shuttle vector인 pYES2.0(Invitrogen, Co., U.S.A.)에 *INU1A* 유전자를 subcloning 한 것으로 pBR322 vector의 일부 sequences와 효모의 *URA3*(Orotidine-5'-phosphate decarboxylase)유전자, 2- μ m replicon origin 및 galactose inducible promoter인 *GAL1* promoter를 가지고 있다(7). pYI10 plasmid의 *S. cerevisiae* HN18과 SEY2102로의 형질전환은 LiCl 방법(13)을 사용하였다.

배지 및 배양방법

효모의 형질전환체를 얻기 위한 선별배지로 YNBCAD(yeast nitrogen base without amino acids 0.67%, casamino acid 0.5%, dextrose 2%)를 사용하였고 효모 숙주세포 배양과 재조합 효모의 유전자발현 억제 배지(repressed medium)로 YPD(yeast extract 1%, Bacto-peptone 2%, dextrose 2%)를 사용하였다. *INU1A* 유전자발현 유도배지(derepressed medium)로는 YPDG(yeast extract 1%, Bacto-peptone 2%, dextrose 1%, galactose 1%)를 사용하였다. YPD 또는 YPDG 배지에 inulin, raffinose 등을 1% 씩 첨가하여 YPDGI, YPDGR 배지등을 조제하였다. 재조합 효모 균주는 10 ml YPD 배지에서 전배양한 다음 500 ml baffled flask(50 ml working volume)에 접종(5%)하여 30°C, 160 rpm 조건에서 배양하였다. 사용한 모든 배지의 초기 pH는 5.5로 하였다.

분석 방법

균체증식은 배양액의 탁도를 600 nm에서 spectrophotometer(UVICON 930, Switzerland)를 이용하여 측정된 흡광도(OD_{600})로 표시하였다. Inulinase의 활성은 배지분획(medium fraction)과 전세포분획(whole cell fraction)으로 나누어 측정하였다. 즉, 배양액 1.5 ml를 원심분리(5000 rpm, 3 min)하여 배양 상등액(medium fraction)과 균체를 회수한 다음, 균체를 1.5 ml의 0.1 M sodium acetate 완충액(pH 5.1), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride에 현탁하고 glass bead(0.4~0.5 mm)로 파쇄하여 전세포분획(whole cell

fraction)을 얻었다. 각 분획에 inulin 용액(2 g inulin/100 ml sodium acetate 완충액 0.1 M, pH 5.1)을 첨가하여 37°C 항온수조에서 효소반응을 시킨 후 형성된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(15)으로 정량하였다. 이때, 각 분획중의 잔존 환원당도 함께 측정하여 효소반응에 의해 생성된 환원당으로부터 감하였다. Inulinase 활성도는 inulin으로부터 pH 5.1, 37°C 에서 1분당 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Plasmid 안정성은 배양액을 saline용액(0.8% NaCl)으로 $10^6 \sim 10^9$ 배로 희석하여 YPD 배지에 도말한 후 30°C, 48시간 배양한 다음 형성된 약 200개의 colony를 선별배지인 YNBCAD 배지로 toothpicking하여(30°C, 96시간 배양 후) 나타난 colony 수로 측정하였다.

Inulinase 활성 염색은 nondenaturing-polyacrylamide gel electrophoresis(7% gel)와 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride(TTC)를 사용하여 행하였다(16). 이 때, invertase는 Sigma사의 bakers yeast 유래의 invertase(Catalog No. I-9253)를, inulinase는 *K. marxianus* var. *marxianus* Y-610를 YPDI 배지에서 72시간 배양한 배양상등액을 inulinase 원으로 사용하였다.

결과 및 고찰

재조합 효모의 비교

재조합 효모 HN18/pYI10과 SEY2102/pYI10을 유전자발현 억제배지(YPD)와 유전자 발현 유도배지(YPDG)에서 플라스크 회분배양했을 때 대표적인 생육특성과 발현특성을 Fig. 1과 2에 나타내었다. YPD 및 YPDG 배지에서 HN18/pYI10 재조합균주는 배양 후 약 48시간에 20~27 OD_{600} 의 최대증식을 보이지만, SEY2102/pYI10 재조합 균주는 약 30시간만에 36~39 OD_{600} 의 균체증식을 보였다. 한편, YPD 배지에서 inulinase 활성은 6.7 units/ml의 낮은 발현양을 보이지만, 유전자 발현 inducer로 galactose가 첨가된 YPDG 배지에서는 HN18/pYI10의 경우 최종 16 units/ml, SEY2102/pYI10의 경우 최종 45 units/ml의 높은 inulinase 발현양을 보였다.

유전자발현 억제배지(YPD)에서도 6.7 units/ml의 낮은 inulinase 활성을 보인 것은 *INU1A* 유전자의 구성적 발현(constitutive expression)에 기인하는 것으로 생각되며 이는 pYI10 plasmid의 *GAL1* promoter와 *INU1A*의 개시코돈 사이에 *INU1A* promoter 유래의 일부서열(약 200 bp)이 함유되어 있기 때문으

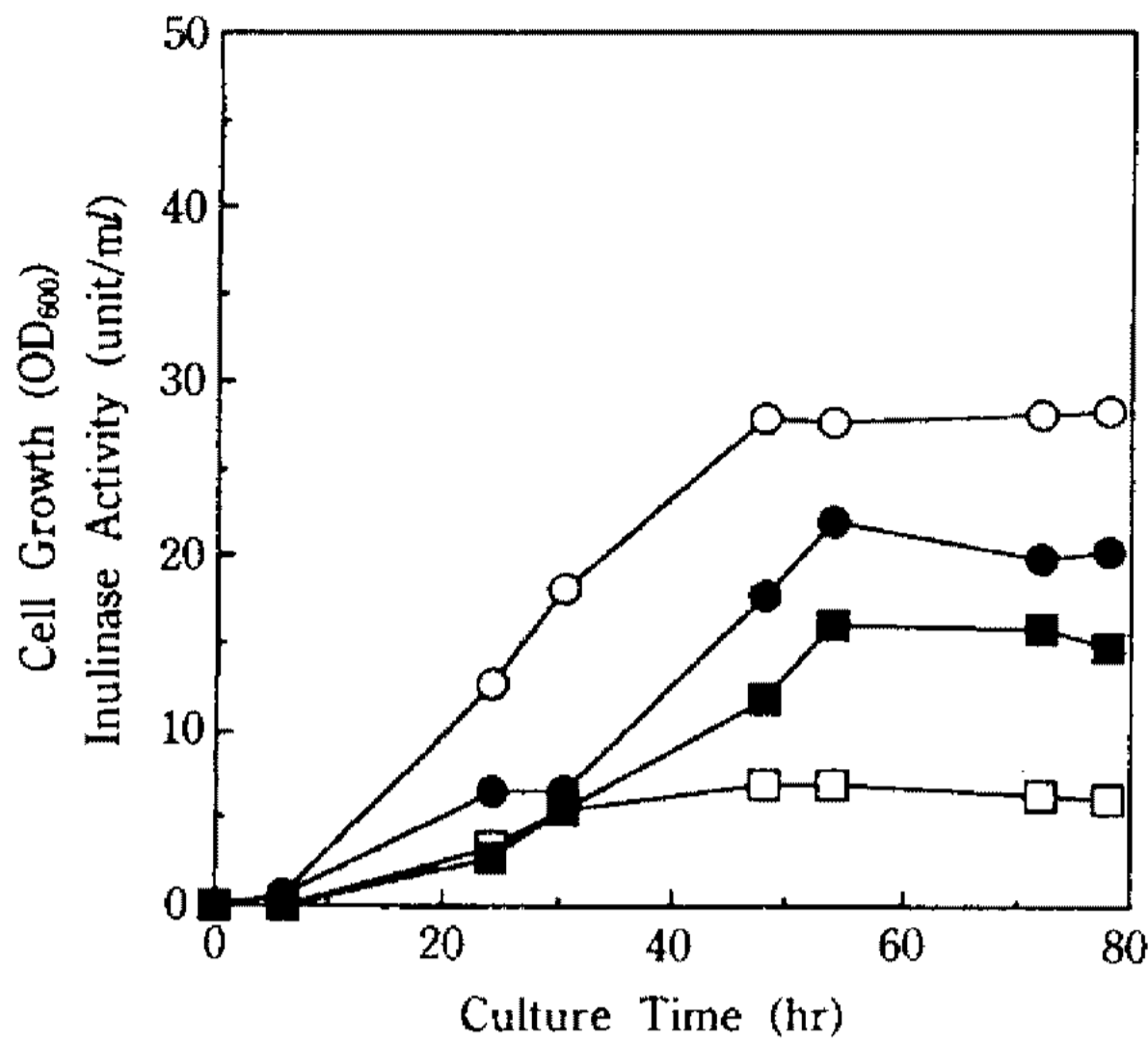


Fig. 1. Cell growth (○, ●) and extracellular inulinase production (□, ■) by *S. cerevisiae* HN18/pYI10 in repressed (YPD, open symbols) and derepressed (YPDG, closed symbols) media.

로 생각된다. 실제 *INU1A* 자체 promoter에 의한 *S. cerevisiae*에서 inulinase 발현 생산시 이러한 구성적 발현 양상이 관찰된 바 있다(6).

사용한 효모 숙주세포에 의해 약 3배의 inulinase 발현양 차이를 보이는 것은 숙주세포 고유의 galactose 대사 활성도 또는 *GALs* 유전자의 유도정도(inducibility) 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 효모 숙주세포에 따른 외래 유전자 발현양 차이는 *GAL* promoter를 이용한 human blood coagulation protein factor XIIIa 발현 생산 경우에서도 보고된 바 있어(17) 숙주세포의 선택이 재조합 효모로부터 유용 단백질 생산에 매우 중요한 인자임을 시사하고 있다.

SEY2102/pYI10 균주를 YPDG 배지에서 72시간 배양한 후 plasmid 안정성을 측정한 결과 80% 이상으로 나타나 galactose의 추가적인 첨가에 의해 inulinase 발현이 상당히 증가할 것으로 예상된다.

Inulin을 기질로 사용한 경우 inulinase의 비활성(specific activity)이 약 60 units/mg protein임을 감안하면(18), YPDG 배지에서 생산된 45 units/ml의 inulinase 활성은 inulinase 효소 단백질이 세포외 배지에 약 0.75 mg/ml 농도로 대량생산됨을 나타낸다.

포도당 고갈 후 galactose에 의한 유전자 발현기(배양 12시간 이후)에서 높은 균체중식과 inulinase 발현율을 보이는 SEY2102/pYI10 재조합 균주를 사용하여 발현된 inulinase의 국제성 및 발현에 미치는 탄소원 영향 조사등의 연구를 수행하였다.

발현된 inulinase의 국제성 및 당쇄부가

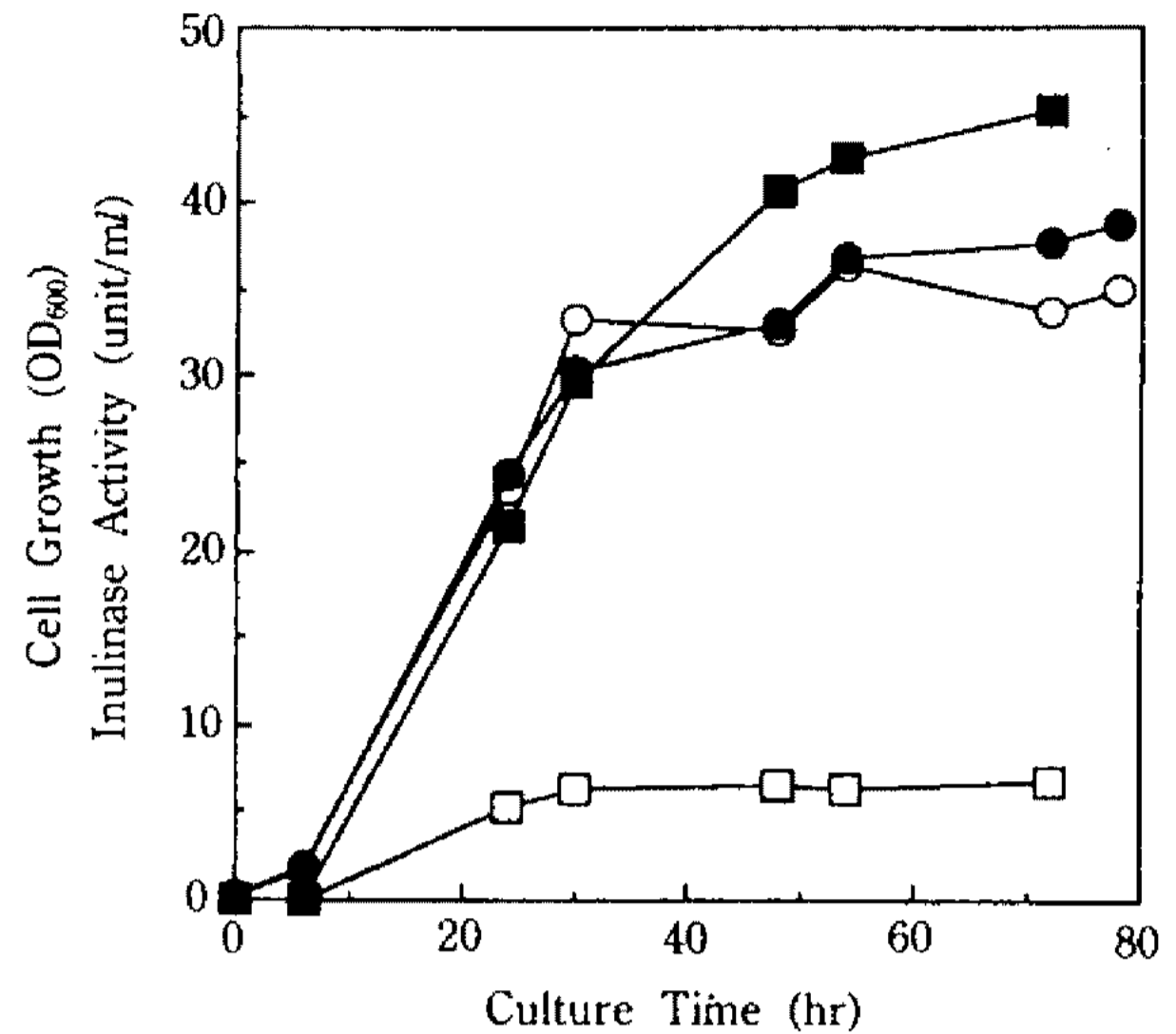


Fig. 2. Cell growth (○, ●) and extracellular inulinase production (□, ■) by *S. cerevisiae* SEY 2102/pYI10 in repressed (YPD, open symbols) and derepressed (YPDG, closed symbols) media.

SEY2102/pYI10 재조합 균주를 YPDG 배지에서 48시간 배양한 후 inulinase의 분비 국제성 및 bakers yeast invertase와의 당쇄부가 정도를 nondenaturing-PAGE를 통해 비교·분석하였다.

Fig. 3의 lane 3~5에서 보는 바와 같이 배양상등액의 10배 이상에 해당하는 전세포 분획을 통해서만 세포내 잔존 inulinase 활성을 관찰할 수 있었다. 따라서, *S. cerevisiae*에서 발현·생산된 inulinase는 대부분 배지분획에 존재하며 periplasmic space를 포함하는 세포내(전세포분획)에는 거의 존재하지 않음을 알 수 있다. 이러한 사실은 배양상등액(배지분획)과 전세포분획의 inulinase 활성을 측정하였을 경우에서도 전체 생산된 inulinase의 98% 이상이 배지에서 측정되어 inulinase는 *S. cerevisiae*에서 효율적으로 배지로 분비됨을 확인할 수 있었다. 이러한 분비 효율은 HN18 균주를 숙주세포로 사용한 경우에서도 같은 양상으로 관찰되었다(6). 실제로 *K. marxianus*에서 생산된 inulinase의 경우 약 70% 정도가 배지로 분비된다고 알려져 있다(2, 4). 이러한 효율적인 분비 결과는 *INU1A* 유전자가 자체분비 signal 서열을 함유하고 있기 때문으로 생각되며, 또한 *S. cerevisiae*와 *K. marxianus*의 두 효모 사이에는 *INU1A* signal 서열의 분비 기능, 단백질(당단백질) 분비경로 또는 분비효율성이 상당히 다를 수 있다.

*S. cerevisiae*에서 분비된 inulinase(lane 3)와 *K. marxianus* inulinase(lane 2) 및 bakers yeast invertase(lane 1)의 당쇄부가 정도를 비교했을 때, invertase보다 inulinase에 당쇄가 적게 부가됨을 알 수

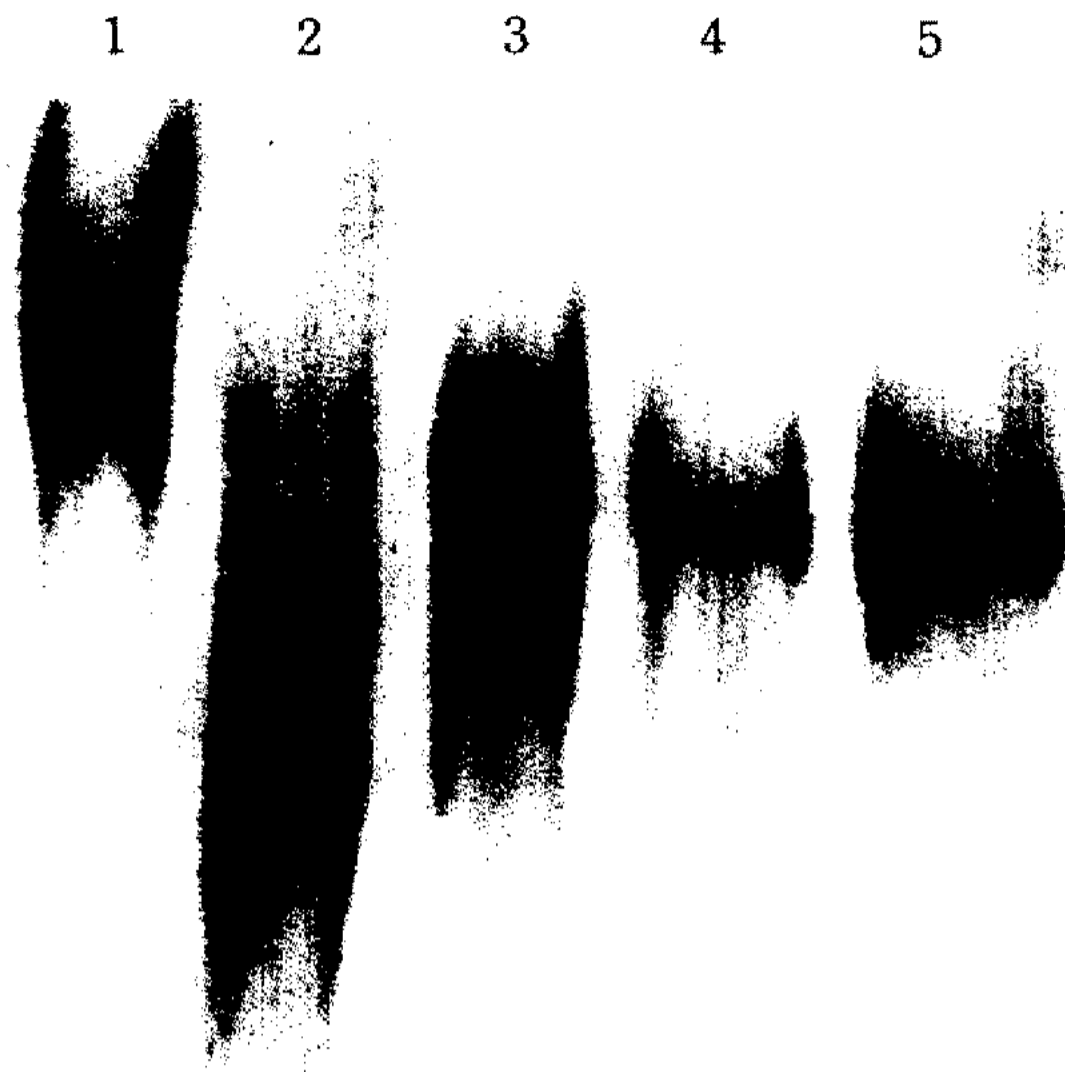


Fig. 3. Nondenaturing-polyacrylamide gel electrophoresis (7% gel) of inulinase and invertase.

lane 1; baker's yeast invertase (Sigma, I-9253), lane 2; extracellular inulinase produced by *K. marxianus* Y-610, lane 3; inulinase produced by recombinant *S. cerevisiae* (medium fraction 3 μ l), lane 4; inulinase produced by recombinant *S. cerevisiae* (whole cell fraction 20 μ l), lane 5; inulinase produced by recombinant *S. cerevisiae* (whole cell fraction 40 μ l).

있다. 또한, *S. cerevisiae* inulinase보다 *K. marxianus* inulinase가 더욱 heterogeneous하게 당쇄가 부가됨을 관찰할 수 있다. 즉, 단백질 분비경로 뿐만 아니라 당쇄부가(glycosylation) 기작과 양상에도 이 두 효모 간에는 상당한 차이가 있음을 의미한다.

S. cerevisiae invertase의 경우 N-linked glycosylation 가능부위(Asp-X-Ser/Thr) 13개소 중 9~10개소가 glycosylation되어 invertase 당단백질 질량의 50%가 당으로 이루어져 있고(19-21), *K. marxianus* inulinase의 경우 N-linked glycosylation 가능부위는 15개소이며(5, 6) inulinase 당단백질의 약 30%가 당쇄라고 알려져 있다(18). 따라서, 이러한 당쇄부가 정도의 차이가 Fig. 3과 같은 결과를 나타낸 것으로 생각되며, 앞으로의 계속적인 연구를 통해 *S. cerevisiae*가 생산한 inulinase에 대한 자세한 생화학적 및 당쇄부가 특성 규명이 이루어 질 것이다.

이상과 같은 inulinase 효소의 세포밖 국제성은 외래유전자 발현시 중요하며, 외래유전자 산물의 분리·정제공정은 이러한 국제성에 좌우되므로 균체회수 및 파괴없이 산물의 고농도 농축이 가능하다. 따라서,

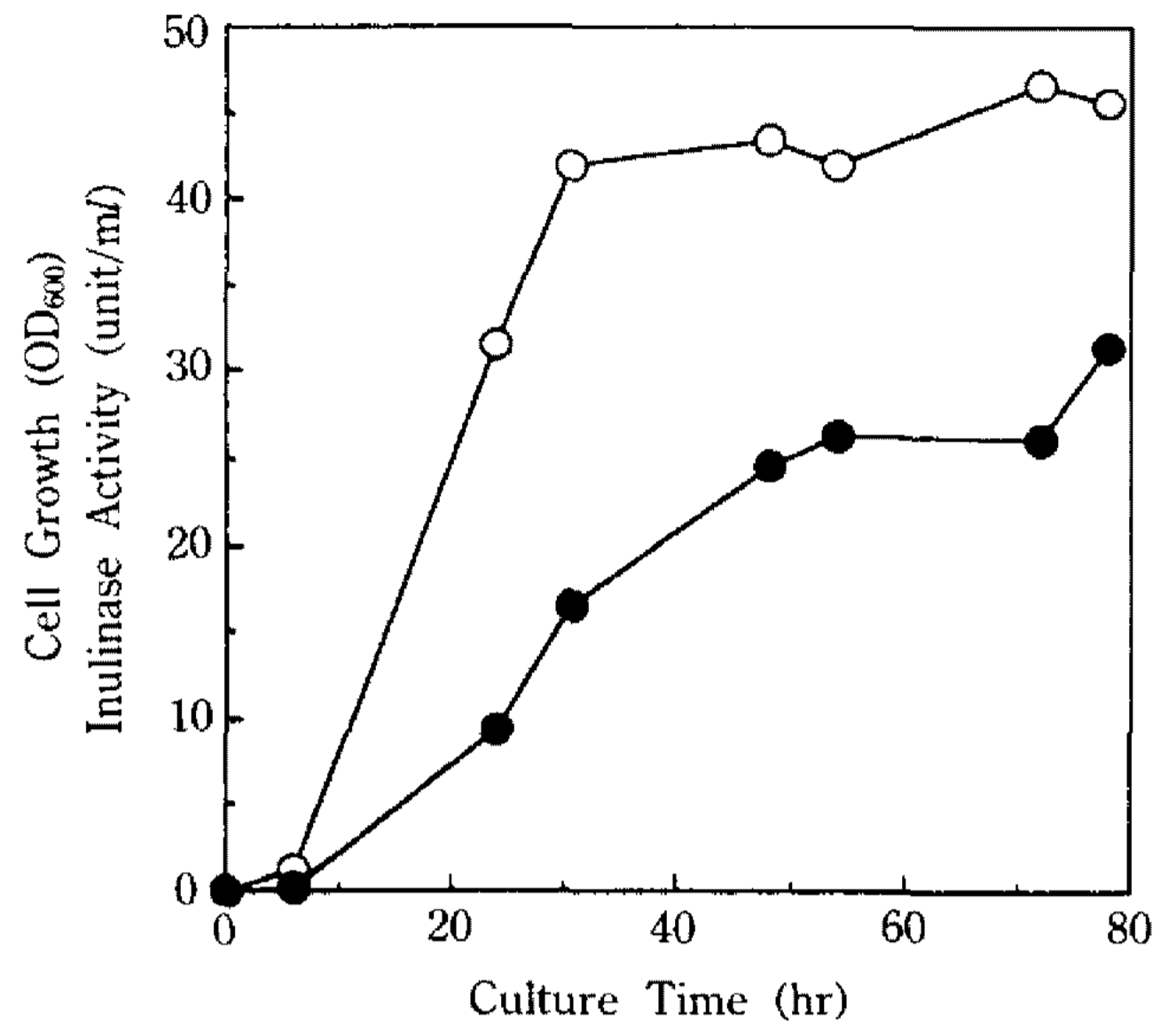


Fig. 4. Cell growth (○) and extracellular inulinase production (●) by *S. cerevisiae* SEY 2102/pYI10 in YPDG medium supplemented with 1% inulin.

재조합 *S. cerevisiae*가 생산하는 inulinase는 단백질 분비기작 연구에 널리 이용되어온 invertase(22, 23)에 버금가는 하나의 좋은 모델 시스템을 제공할 것으로 판단된다.

Inulinase의 발현에 미치는 탄소원의 영향

SEY2102/pYI10 재조합 균주의 균체증식과 inulinase 발현에 미치는 inulin 및 raffinose 등 탄소원의 영향을 플라스크 회분배양을 통해 살펴 보았다(Fig. 4, 5). YPDG 배지보다 YPDGI 또는 YPDGR 배지에서 약 20% 증가된 균체증식(약 45 OD₆₀₀)을 보여 첨가된 inulin 및 raffinose는 탄소원 및 에너지원으로 재조합 *S. cerevisiae*에 의해 대사됨을 알 수 있다. 별도의 실험을 통해 YPDI와 YPDR 배지에서 숙주세포 SEY 2102의 균체증식을 살펴 본 결과 약 17 OD₆₀₀ 값을 보였다(data not shown). 또한, YPDI와 YPDR 배지에서 SEY2102/pYI10 재조합 균주를 배양했을 때, 약 43 OD₆₀₀ 값을 보였다(data not shown). 원래 이들 다당류는 효모의 세포벽을 통과 못하며 대사되기 위해서는 세포밖에서 가수분해되어야 한다. 따라서, *INU 1A* 유전자를 함유하는 재조합 *S. cerevisiae* 균주는 galactose 없이도 구성적으로 발현·분비되는 inulinase(Fig. 1, 2)에 의해 inulin 및 raffinose 대사능을 가지게 된 것으로 생각된다.

Inulin 또는 raffinose 첨가에 의해 inulinase 발현은 오히려 감소하는 경향을 보이고 있으며(Fig. 4, 5), 각각 31, 17 units/ml의 최종발현양을 보였다. Inulinase

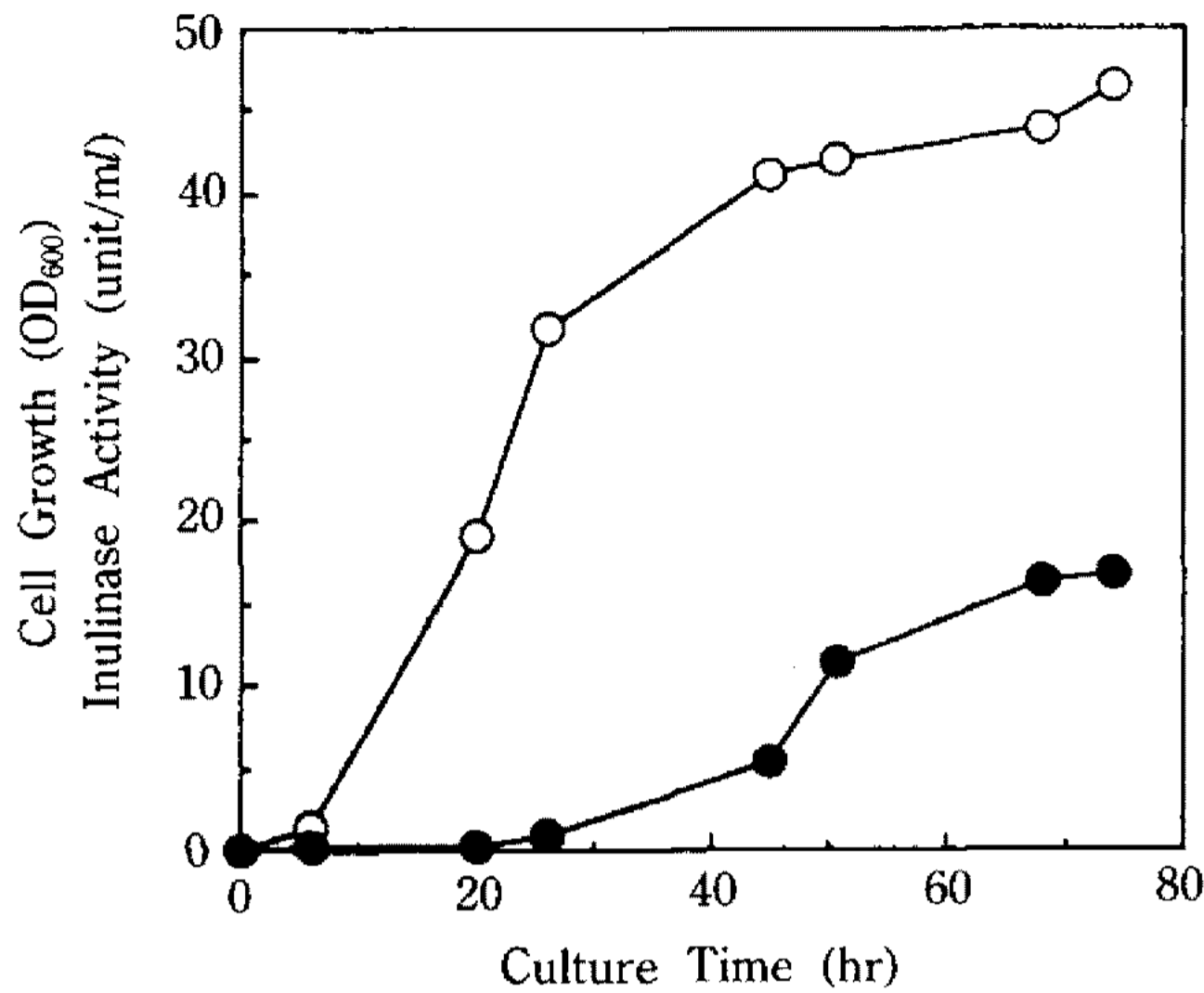


Fig. 5. Cell growth (○) and extracellular inulinase production (●) by *S. cerevisiae* SEY 2102/pYI10 in YPDG medium supplemented with 1% raffinose.

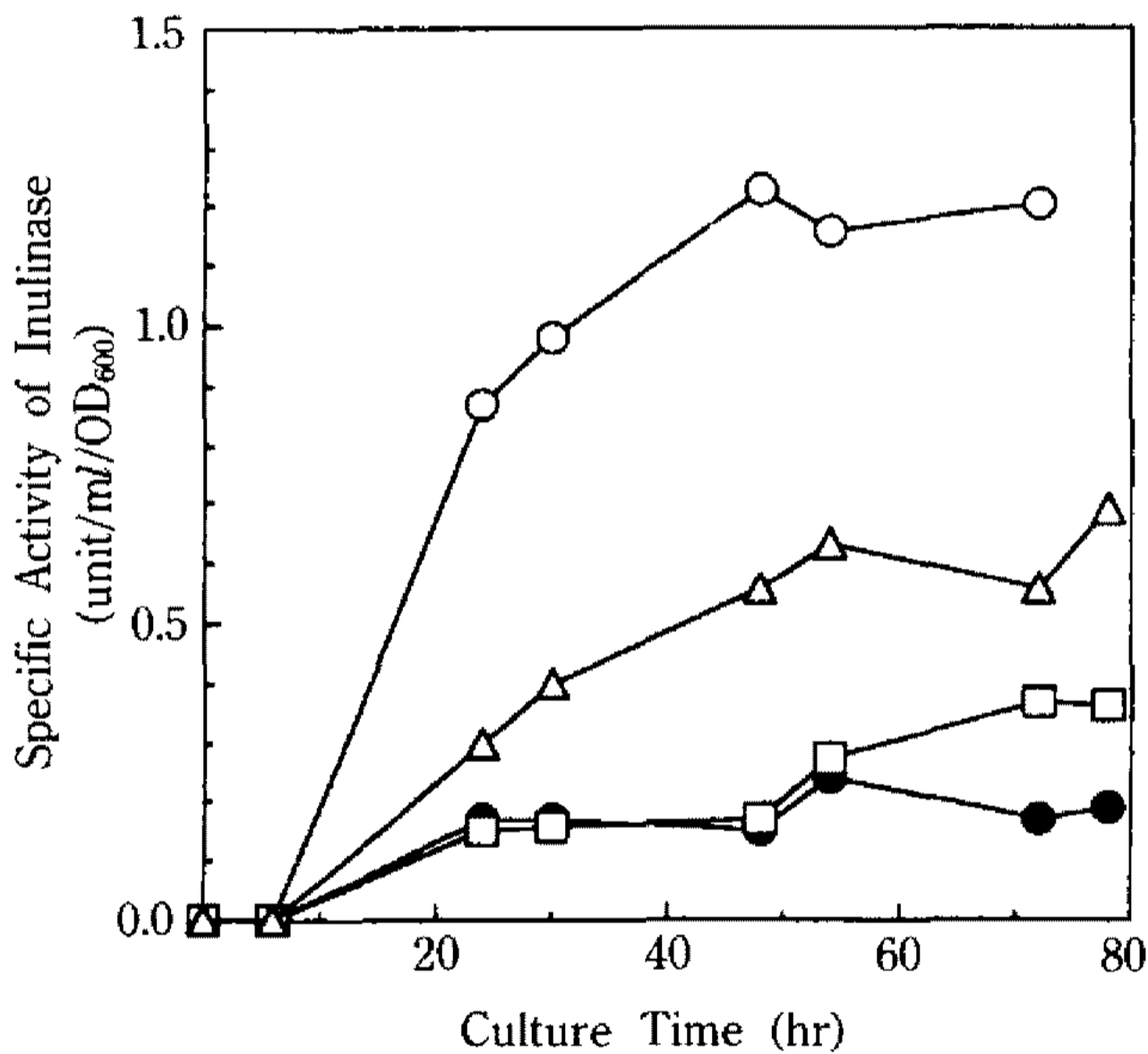


Fig. 6. Specific activity of inulinase produced by recombinant yeast grown on various carbon sources. (●) glucose, (○) glucose + galactose, (△) glucose + galactose + inulin, (■) glucose + galactose + raffinose.

발현시점 이후(배양 12시간 이후)에서도 YPDG 배지와 비교해 볼 때 상당히 느린 속도로 inulinase가 발현·분비되고 있음을 알 수 있다. 이 경우 전세포 분획의 활성을 조사했을 때, 배양액 1 ml 당 1 unit 이하로 측정되어 Fig. 2의 YPDG 배지에서 배양에서와 마찬가지로 발현된 inulinase의 대부분(98% 이상)이 균체의 배지로 분비됨을 알 수 있었다.

결과적으로, 각 탄소원에 따른 inulinase의 발현은 YPDG 배지에서 가장 효율적으로 발현·분비되었으며 단위 균체당 inulinase 활성(specific activity)도 YPDG

Table 1. Effect of carbon sources on cell growth and inulinase secretion by recombinant yeast

Media	Cell Growth (OD ₆₀₀)	Inulinase Activity (unit/ml)	Specific Activity (unit/ml/OD ₆₀₀)
Repressed (YPD)	36.36	6.69	0.18
Derepressed (YPDG)	38.76	45.34	1.17
Derepressed + Inulin	46.70	31.25	0.67
Derepressed + Raffinose	44.50	16.86	0.38

*All measurements were made at the 78th hr in shake flask cultures of *S. cerevisiae* SEY2102/pYI10.

배지에서 1.2 units/ml/OD₆₀₀의 최대값을 보였다(Fig. 6, Table 1). Inulin이나 raffinose가 YPDG 배지에 첨가되었을 때, 구성적으로 생산된 inulinase 및 galactose에 의해 유도 발현된 inulinase가 이들 다당류를 분해하고 이때 생성된 포도당과 같은 단당류에 의해 catabolite repression을 받아 *GAL1* promoter의 조절을 받는 *INUIA* 유전자의 전사가 억제되는 것으로 판단된다. 또한, inulin이나 raffinose는 재조합 *S. cerevisiae*에서 탄소원과 에너지원으로 유용하게 이용되지만 *K. marxianus*에서와 같이 inulinase 생합성의 inducer로는 작용하지 않음을 알 수 있다.

요 약

Inulinase 유전자(*INUIA*)를 함유하는 재조합 효모 균주를 YPD 배지에서 배양했을 때, inulinase 활성은 6.7 units/ml의 낮은 발현양을 보이지만, 유전자 발현 inducer로 galactose가 첨가된 YPDG 배지에서는 HN 18/pYI10의 경우 최종 16 units/ml, SEY2102/pYI10의 경우 최종 45 units/ml의 높은 inulinase 발현양을 보였다. 또한, invertase보다 *S. cerevisiae* inulinase에 당쇄가 적게 부가됨을 알 수 있었으며 *S. cerevisiae* inulinase보다 *K. marxianus* inulinase가 더욱 heterogeneous하게 당쇄가 부가됨을 관찰할 수 있었다. Inulin이나 raffinose는 재조합 *S. cerevisiae*에서 구성적으로 발현된 inulinase에 의해 탄소원과 에너지원으로 유용하게 이용되지만 *K. marxianus*에서와 같이 inulinase 생합성의 inducer로는 작용하지 않음을 알 수 있었다. 각 탄소원에 따른 inulinase의 발현은 YPDG 배지에서 가장 효율적으로 발현·분비되었으며 단위 균체당 inulinase 활성(specific activity)도 1.2 units/ml/OD₆₀₀의 최대값을 보였다. 또한, 사용한 모든 배지에서 inulinase는 항상 98% 이상 균체의 배지로 발현·분비됨을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 과기처의 선도기술개발 사업에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Snyder, H.E. and H.J. Phaff. 1960. Studies on a β -fructosidase(inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek: J. Microbiol. Serol.* **26**: 433-452.
2. Rouwenhorst, R.J., L.E. Visser, A.A. Van Der Baan, W.A. Scheffers, and J.P. Van Dijken. 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1131-1137.
3. GrootWassink, J.W.D. and G.M. Hewitt. 1983. Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase(inulase) in batch and continuous cultures of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 31-41.
4. Rouwenhorst, R.J., W.S. Ritmeester, W.A. Scheffers, and J.P. Van Dijken. 1990. Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3329-3336.
5. Laloux, O., J.P. Cassart, J. Delcour, J. van Beuemen, and J. Vandenhoute. 1991. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Lett.* **289**: 64-68.
6. Kim, J.G., J.H. Ko, K. Yoda, and M. Yamasaki. 1993. Molecular cloning of a structural gene for inulinase of *Kluyveromyces marxianus* Y-610. *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.* (submitted).
7. 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.
8. Johnston, M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51**: 458-476.
9. Mylin, L.M., K.J. Hofmann, L.D. Schultz, and J.E. Hopper. 1990. Regulated *GAL4* expression cassette providing controllable and high-level output from high-copy galactose promoter in yeast, Pp. 297-308. In D.V. Goeddel (ed.), *Methods Enzymol.*, Vol. 185, Academic Press, New York, London.
10. Zsebo, K.M., H.S. Lu, J.C. Fieschko, L. Goldstein, J. Davis, K. Duker, S.V. Suggs, P.H. Lai, and G. A. Bitter. 1986. Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro- α -factor leader region. *J. Biol. Chem.* **261**: 5858-5865.
11. Sleep, D., G.P. Belfield, and A.R. Goodey. 1990. The secretion of human serum albumin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using five different leader sequences. *Bio/Technol.* **8**: 42-46.
12. Sleep, D., G.P. Belfield, D.J. Ballance, J. Steven, J. Jones, L.R. Evans, P.O. Moir, and A.R. Goodey. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. *Bio/Technol.* **9**: 183-187.
13. Carlson, M. and D. Botstein. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell.* **28**: 145-154.
14. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
15. Gascon, S. and J.O. Lampen. 1968. Purification of the internal invertase of yeast. *J. Biol. Chem.* **243**: 1567-1572.
16. Ballou, C.E. 1990. Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects, Pp. 440-470. In D.V. Goeddel (ed.), *Methods Enzymol.*, Vol. 185, Academic Press, New York, London.
17. Broker, M., O. Bauml, A. Gottig, J. Ochs, M. Bodenbenner, and E. Amann. 1991. Expression of human blood coagulation protein factor XIIIa in *Saccharomyces cerevisiae*: dependence of the expression levels from host-vector systems and medium compositions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 756-764.
18. Rouwenhorst, R.J., M. Hensing, J. Verbakel, L.E. Visser, W.A. Scheffers, and J.P. Van Dijken. 1990. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3337-3345.
19. Neumann, N.P. and J.O. Lampen. 1967. Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry* **6**: 468-475.
20. Trimble, R.B. and F. Maley. 1977. Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **252**: 4409-4412.
21. Taussig, R. and M. Carlson. 1983. Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase. *Nucl. Acids Res.* **11**: 1943-1953.
22. Esmon, B.E., P.C. Esmon, and R. Schekman. 1984. Early steps in processing of yeast glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **259**: 10322-10327.
23. Esmon, P.C., B.E. Esmon, I.E. Schauer, A. Taylor, and R. Schekman. 1987. Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. *J. Biol. Chem.* **262**: 4387-4394.

(Received February 21, 1994)