

## Saccharomyces cerevisiae에서 합성된 Human Lysozyme 유전자의 발현증대

김기운 · 최선욱 · 이승철 · 백현동 · 황용일\*

경남대학교 공과대학 식품공학과

**Increased Expression of a Chemically Synthesized Human Lysozyme Gene in *Saccharomyces cerevisiae*.** Kim, Ki-Woon, Sun-Uk Choi, Seung-Cheol Lee, Hyun-Dong Paik, and Yong-Il Hwang\*. Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea - We have already prepared a human lysozyme (HLY) structural gene from chemically synthesized 38 oligomers with high codon usage in *Saccharomyces cerevisiae*. For directing the synthesis and secretion of HLY in *S. cerevisiae*, two types of expression vectors, a YCp centromere-based vector, pHK101 and a YEp 2- $\mu$ m circle-based vector, pHK501 were constructed. With the resulting plasmids, we have confirmed that yeast transformant harboring pHK501 has more secreted HLY than pHK101-transformant by using a lyso-plate and a turbidimetric assay. In flask cultivation, pHK501-transformant produced active HLY about 8 times (55 units/ml) higher than pHK101-transformant. From batch cultivation, the HLY productivity was obtained with 1.12 units/ml/h, corresponding to a 1.8-fold increase compared with flask fermentation. These results indicate that yeast transformant with pHK501 vector overexpressed and secreted HLY than that of YCp type vector.

**Key words:** artificial HLY gene, YCp type, YEp type

다당체 분해효소로서 보편적으로 알려진 lysozyme [EC 3.2.1.17]은 세포벽 성분인 peptidoglycan의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의  $\beta$ -1,4 결합을 가수분해하는 효소이다. Lysozyme은 여러 세균의 세포벽을 분해하지만 특히 그람 양성 세균의 세포벽을 잘 분해하며 항염증작용은 이 용균작용에 의존한다. 현재, 난백 유래의 lysozyme(CLY)이 항염증작용, 혈액응고 작용, 화장품 첨가제, 식품산업에 응용 등으로 광범위하게 이용되고 있으나 용균활성이 human lysozyme (HLY)과 비교할 때 3-4배 낮다. 더욱이 HLY는 인간과 면역거동의 일치, 근육 및 정맥주사 가능, 다형핵 백혈구에 의한 세포의 식작용 촉진 등 그 뛰어난 효과로 안전하고 부작용이 없는 의약품으로서 난백 유래의 CLY와 대체될 수 있다[1, 2].

Yoshimura 등[16]은 HLY의 cDNA를 그리고 Jigami 등[8]은 합성유전자를 각각 이용하여 유용성이 뛰어난 HLY의 생산을 시도하였다. 이들 유전자를 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*를 숙주로 이용할 경우 세포내에서 생산된 HLY은 부정확한 disulfide bonds를 형성함으로써 불용성 내지 불활성 단백질의 형태를 포함하는 inclusion body를 형성하였으며 이는 향후 정제 및 제품화에 어려움이 예상된다. 한편, 이들 유전자를 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 생산하기 위하여 분비용 signal

peptide로서 chicken의 CLY signal peptide[8], *Aspergillus awamori*의 glucoamylase signal peptide[6]를 이용하여 생산을 시도하였으나 상당부분이 세포내에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구실에서 HLY 자체의 분비 peptide를 이용하여 *S. cerevisiae*의 고빈도 codon을 채용한 화학적 합성된 38개 oligomer로부터 제작된 HLY 유전자로 생산을 시도하였다[7]. YCp type의 HLY 발현용 벡터 pHK101를 지닌 *S. cerevisiae* HY-1의 배양에서 HLY 생산능이 확인되었으며 또한 숙주 내에서 안정성은 보장되지만 발현율이 낮아 HLY생산성이 떨어졌다.

따라서 본 연구에서는 HLY 생산성을 높이기 위한 방법의 일환으로 숙주내 벡터의 copy수 증가와 동시에 안정성을 높이고자 새로운 벡터의 제작을 시도하였다. 그리고 만들어진 벡터를 이용하여 평판배지 상에서 증가된 분비량을 직접 확인한 후에 이들 벡터를 이용하여 플라스크배양 상에서의 생산성 향상을 시도하였다. 나아가 형질전환체 효모의 발효조에서의 배양을 통하여 HLY 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주와 plasmid DNA

효모, *S. cerevisiae* HY-1( $\alpha$  *trp1 his3 leu2 can1 pho3 pho5*)[5]은 HLY의 발현 및 분비를 위한 숙주세포로 이용되었고, *E. coli* JM109, DH10B는 plasmid DNA와 gene bank의 제작 및 대량회수 그리고 benchtop assay

\*Corresponding author  
Tel. 82-551-49-2685, Fax. 82-551-43-8133  
E-mail:

를 위한 peptidoglycan만을 추출하기 위해 이용되었다. *Micrococcus luteus*는 lysoplate assay에 의한 HLY의 검정에 기질로 이용되었다[13]. 합성 HLY유전자 및 발현용 plasmid의 제작을 위해서는 pUC12 (*Amp<sup>r</sup> lacZ'*)[14]가 이용되었고, 효모에서 HLY의 발현 및 분비를 측정하기 위하여 pVC727(*TRP1 ARS1 PHO5' CEN3 Amp<sup>r</sup>*)을 대조구로 하여, pHK101(*Amp<sup>r</sup> TRP1 ARS1 HLY' CEN3*)[9]과 pHK501 (*Amp<sup>r</sup> HLY' LEU2 ARS REP3*)을 HLY 발현벡터로 사용하였다. pHK101은 YCp type (1-2 copies/cell) shuttle vector인 pHY101[5]을 이용하여 제작한 것이다. pHK501은 YEp type (50-100 copies/cell) shuttle vector인 YEp13을 근간으로 하여 제작한 것이고 GAP promoter, HLY의 signal peptide를 포함한 합성된 HLY 유전자, PHO5 terminator로 구성되어 있으며 GAP promoter는 EMP경로의 주 구성효소인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [EC 1.2.1.12] 구조유전자의 promoter(0.9 kb)로써 glucose를 탄소원으로 배양할 때 유도된다. 또 세포내 생산된 HLY는 HLY 자신의 signal peptide에 의해 세포밖으로 분비된다[9].

#### 배지

효모의 일반배양을 위해서는 YPD배지(2% glucose, 2% polypeptone, 1% yeast extract)를, 형질전환을 위해서는 SD합성배지 {2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base(w/o amino acid)}를 사용하였다. 합성배지에는 효모의 영양요구성에 맞추어 아미노산을 적당하게 첨가하였다. 대장균의 일반배양 및 형질전환에는 Luria Bertani (LB)배지[14]를 사용하였고, plasmid DNA의 대량 분리를 위한 배지로는 M9 배지[14]를 사용하였으며, 필요에 따라 ampicillin (100 µg/ml)을 첨가하였다. 활성 측정에 기질로 쓰인 *M. luteus* 배양을 위해서는 ENB (1.25% heart infusion broth, 0.54% nutrient broth, 0.25% yeast extract)배지를 사용하였다. 평판배지는 상기 액체배지에 2%의 agar를 첨가하여 조제하였다.

#### 제한효소 및 시약

제한효소와 DNA의 수식효소는 제철화학(주)에서 구입하였으며, agarose와 ligation kit 및 agarose band로부터의 DNA 분리용 원심관은 Takara Shuzo Co. (Japan)에서, 배지류는 Difco Laboratories Co. (USA)에서 구입하였으며 반응액 중의 염 및 미반응물질 제거를 위한 spin column은 Clontech Co. (USA)에서, 전기영동 시약은 주로 Sigma Chemical Co. (USA)의 것을 사용하였다. 그 외의 시약은 주로 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

#### 생물학적 및 생화학적 방법

효모의 형질전환은 Ito 등의 방법[7]을 이용하였으며,

대장균의 형질전환은 Morrison [11]과 Cohen[3]의 방법을 이용하였다. 각종 제한효소의 처리, DNA의 수식, plasmid의 해석 등 DNA 분자의 조작은 Sambrook 등의 방법[14]을 따랐다. SDS-polyacrylamide gel의 조작은 Laemmli의 방법[10]을 따랐다.

#### 효모 형질전환체의 lysoplate assay

효모 형질전환체에서 HLY의 발현 및 분비를 조사하기 위하여 *M. luteus*를 기질로 이용한 lysoplate assay법 [13]을 사용하였다. Lysoplate는 두 층으로 구성되는데, 하층은 영양요구성 효모 형질전환체를 성장시키기 위한 선택배지인 SD 합성배지로 형질전환체의 영양요구성에 맞추어 아미노산을 적당하게 첨가하였다. 상층은 기질인 *M. luteus*를 성장시키는 ENB 배지로 분비된 효소의 활성을 측정하기 위해 0.8% agarose를 첨가하였고, 30℃에서 10시간 동안 방치한 후 투명환을 확인하였다.

#### Benchtop assay

Benchtop assay에서는 *E. coli*에서 peptidoglycan층만을 분리하여 기질로서 agarose gel matrix에 섞은 후 분해를 관찰하였다[15]. *E. coli*의 peptidoglycan 순수분리는 Shockman법[3]을 변용하였다. Peptidoglycan plate는 동결건조된 peptidoglycan 2.5 g을 증류수 40 ml에 충분히 녹인 후 agarose 0.4 g을 첨가하여 고압멸균한 다음 55℃에서 미리 살균된 plastic petri dish에 20 ml씩 분주하여 만들어졌고, 원통 top을 세워, 여기에 미리 84시간 동안 배양한 효모 형질전환체의 배양액만을 원심분리하여 첨가한 후 30℃에서 16시간 동안 방치하였다. HLY의 peptidoglycan 분해를 멈추기 위해 20분 동안 증류수로 세척하고, 1% SDS에 30분간 약하게 진탕하였다. 이것을 20분 간격으로 3번 세척한 뒤 ethidium bromide 용액 (0.5 µg/ml)으로 염색하여 peptidoglycan에 결합한 ethidium bromide와 염색되지 않은 HLY분해능에 의해 생성된 투명환을 비교, 관측하였다.

#### HLY의 정량분석

HLY 활성측정은 Mösrky의 방법[12]을 변용하였다. HLY standard는 Sigma Co.에서 구입한 것을 SD 합성배지에 녹여 각각의 unit에 해당하는 HLY 희석액 400 µl를 55 mM phosphate buffer (pH 6.2)에 녹아있는 *M. luteus* (0.1 mg/ml) 현탁액 1600 µl에 첨가한 다음 25℃, 450 nm에서 10분 동안의 흡광도 감소율을 측정하였다. 배양 상등액에 분비된 HLY의 unit수는 각각의 배양 상등액을 상기와 동일한 방법에 의해 측정하여 HLY standard와 비교한 후 계산하였다. HLY 1 unit는 25℃, pH 6.2, 450 nm의 흡광도로 측정하였을 때 *M. luteus* 현탁액을 분당 0.001만큼 감소시키는 양으로 규정하였다.

효모 형질전환체를 이용한 HLY 생산

플라스크 배양은 0.67% yeast nitrogen base(w/o amino acids), 2% glucose, 형질전환체의 영양요구성에 맞추어 아미노산을 첨가한 조성의 본 배양액 200 ml SD 합성배지에 mid-log phase까지 배양한 전 배양액을 2%로 접종한 후 30℃, 180 rpm의 조건으로 진탕배양하였다. 배양액에 대하여 균체농도, pH, turbidimetric method[12]에 의한 HLY 활성측정 등을 실시하였다.

발효조 배양에서는 중균배양은 먼저 최소배지 SD-Leu(leucine을 제외한 amino acids 1%)에서 자란 pHK 501 재조합균주의 단일 콜로니를 10 ml SD-Leu 액체배지에 접종한 후 180 rpm, 30℃에서 24시간 동안 배양한 후 다시 350 ml의 최소배지가 들어 있는 500 ml 진탕 플라스크에 1%(v/v) 접종하여 21시간 동안 동일 조건하에서 배양하였다. 본 실험에서 5 l jar fermenter(Model SM-F11, SUN MI TECHNOLOGY Co., Korea)의 발효조를 이용하여 working volume 3.5 l, 전 배양 접종비율은 10%(v/v)로 실시하였다. 배양조건은 온도 30℃, 통기 속도 0.7 vvm, 교반속도 700 rpm이었으며, 배양 중 거품 발생시 20%(v/v) 실리콘 소포제를 미량 첨가하였다. 활성측정은 플라스크 배양과 동일한 방법으로 실시하였다.

결과 및 고찰

HLY 생산용 multicopy벡터 제작

종래의 HLY발현용 벡터, pHK101은 특성상 효모속주 내에서 뛰어난 안정성을 보이는 반면 벡터의 숙주내 copy수가 1~2개로 낮다. 이는 세포당 낮은 생산성을 의미하며 이를 개선하기 위하여 2µm plasmid 유래의 multicopy plasmid YEp를 근간으로 HLY 생산용 벡터를 제작하였다. Fig. 1에서와 같이 pHK101로부터 1.2 kb의 BamHI-HindIII DNA단편을 분리하여 부분분해한 10.2 kb의 YEp13의 동일부위에 삽입하여 pHK501벡터를 제작하였다. 제작된 벡터pHK501은 pHK101 및 pVC727과 비교함으로써 HLY의 생산성을 확인, 검증하였다.

pHK101, pHK501 효모 형질전환체의 HLY 생산성 검증

상기 실험에서 제작된 HLY 생산용 벡터들의 검증을 위하여 공시균으로 *M. luteus*를 이용하여 배지상의 생육 저지환의 생성을 보았다. Plasmid pVC727의 형질전환체에서는 뚜렷한 변화가 형질전환체 주위에 나타나지 않았으나(결과 미제시), Fig. 2에서와 같이 60시간정도 배양하여 형성된 pHK101 및 pHK501의 형질전환체에 *M. luteus*를 함유한 중층배지를 가하여 30℃에 12시간 배양한 결과 형질전환체 주위에는 투명환이 형성됨과 아울러 저 copy수의 pHK101보다 고발현 벡터인 다 copy 수의 pHK501의 투명환이 콜로니의 크기에 비해 상대적으로

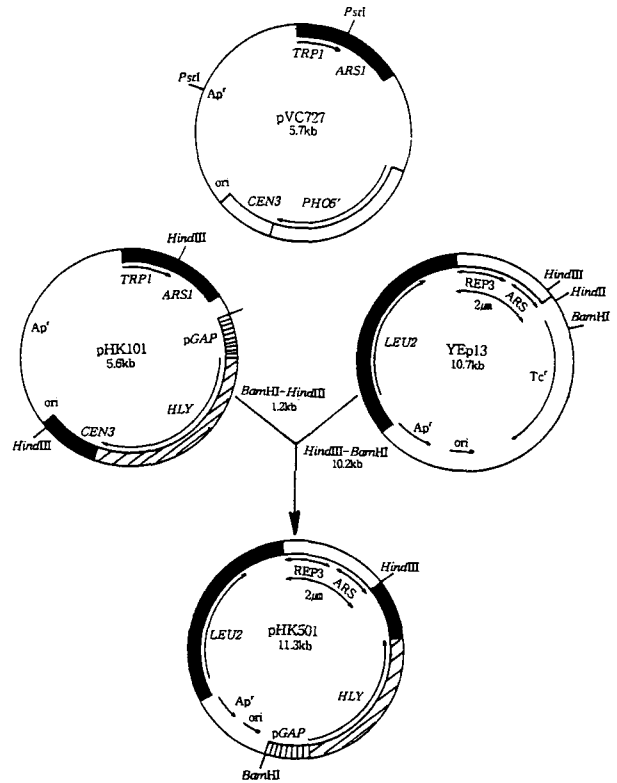
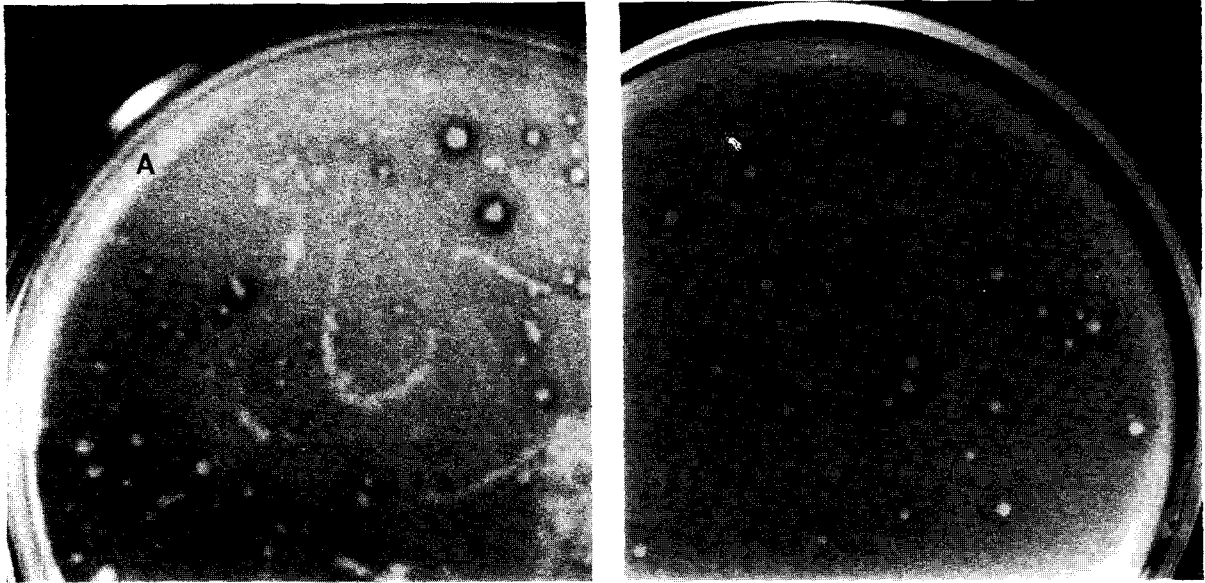


Fig. 1. Construction of human lysozyme expression vectors. pVC727, Control (HLY); pHK101, YCp type [centromere-based low copy number (HLY<sup>+</sup>)]; pHK501, YEp type [2-µm circle-based multicopy number (HLY<sup>+</sup>)]. The inner archs represent the region and direction of translation of these genes. Closed bars arched arrows represent DNAs derived from *S. cerevisiae*. The striped and obliquely striped bears the GAP promoter and HLY gene, respectively.

현저히 크을 관찰할 수 있었다. 이는 pHK101에 비해 pHK501의 형질전환체에서 HLY이 고발현되어 분비되었음을 의미한다. 또한, 인공 합성된 유전자 HLY가 GAP promoter 및 PHO5 terminator, 그 자신의 signal peptide에 의하여 효모에서 생산, 분비되었음을 시사한다. 한편, 이들 벡터 pHK101 및 pHK501 형질전환체에서 HLY가 생산, 분비되었음을 직접적으로 증명하기 위하여 peptidoglycan을 분리하여 기질로 이용하였다. *E. coli* JM109에서 peptidoglycan만을 순수분리하여 기질로 한 plate상에서 benchtop assay를 실시하였다. pHK 501의 Leu<sup>+</sup> 형질전환체를 배양하여 배양액만을 원형 top을 이용하여, standard HLY와 동시에 검증하였다. Fig. 3에서의 B와 같이 pHK501형질전환체의 배양액은 뚜렷한 분해능을 보였으며 이는 47 unit의 standard HLY를 이용한 실험결과 A에서보다 명확한 분해능을 보였다. 이는 벡터 pHK501의 형질전환체에서 활성형 HLY이 생산됨을 입증한다. 한편, control pVC727을 이용한 Fig. 3의 C에서는 변화가 관찰되지 않았다. 이와 함



**Fig. 2. Lysoplate assay of HLY<sup>+</sup> transformants harboring plasmid.**

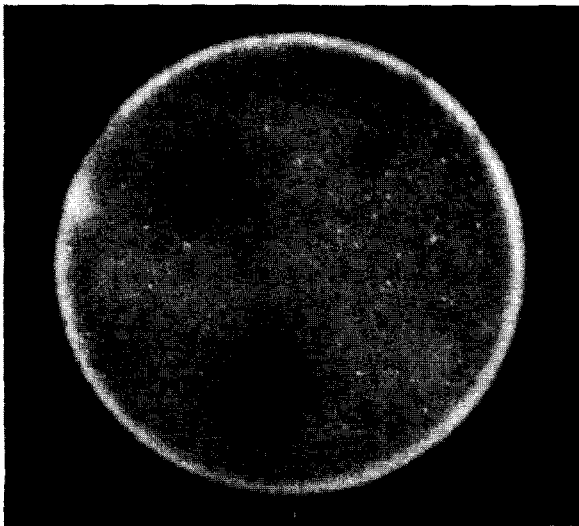
A, Trp<sup>+</sup> transformants of HY-1 harboring the YCp type vector, pHK101; B, Leu<sup>+</sup> transformants of HY-1 harboring the YEp type vector, pHK501.

께 pHK501 형질전환체의 배양농축액을 전기영동하여 nitrocellulose 막에 옮긴 후 토끼의 HLY항체를 이용한 Western blotting을 실시하여 반응하는 단일 band를 확인할 수 있었다(결과 미제시).

**플라스크 배양에서의 HLY 생산**

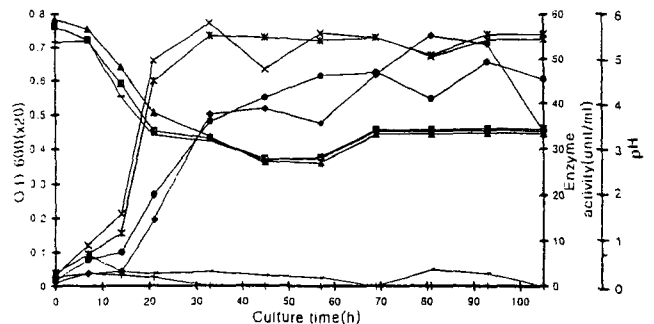
각 벡터의 형질전환체를 이용하여 플라스크 배양시

HLY 생산성을 경시적으로 검토하였다. 각 플라스크 별로 배양시간에 따른 균체농도, pH, turbidimetric method에 의한 HLY 활성 등을 측정된 결과, pHK501은 포도당을 탄소원으로 배양 초기부터 HLY을 생산하여 81시간이 경과됐을 때 HLY 최대 생산량(55 units/ml)을 기록하였고 pH는 배양 초기에 5.8에서 배양말기에 3.3으로 떨어졌다. pHK101의 경우 7시간 경과시 HLY 최대 생산량(7 units/ml)을 기록했고 pVC727은 뚜렷한 활성이 관찰되지 않았다(Fig. 4). 세포성장 및 배양시간에 따른 pH 변화는 pHK501과 비슷한 양상을 나타냈다. 이 상에서 벡터의 copy수에 따른 효소활성의 차이(약 8배 증가)를 측정할 수 있었으며, HLY 발현생산의 최적화를 통한



**Fig. 3. Benchtop assay based upon digestion of peptidoglycan prepared from *E. coli* JM109 in an agarose gel matrix.**

A, 100 µl supernatant of Leu<sup>+</sup> transformant (pHK501) culture; B, 47 units soln of commercial human lysozyme; C, 100 µl supernatant of Trp<sup>+</sup> transformant (pVC727) culture. The gel was left for 16 h at 30°C and then stained with ethidium bromide solution.



**Fig. 4. Human lysozyme production by pVC727, pHK101 and pHK501 transformed yeast cells in flask fermentations.**

×, pVC727 cell growth; \*, pHK101 cell growth; ●, pHK501 cell growth; —, pVC727 pH; ■, pHK101 pH; ▲, pHK501 pH; +, pVC727 HLY activity; -, pHK101 HLY activity; ◆, pHK501 HLY activity. Growth conditions were described in the text in details.

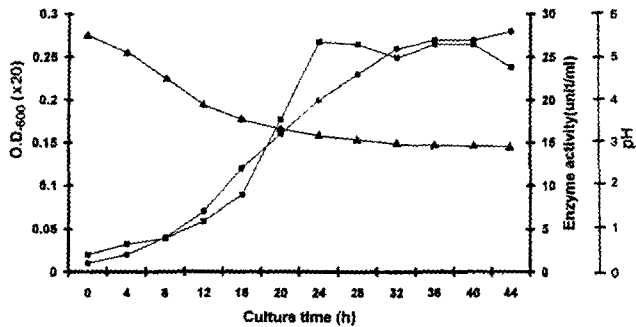


Fig. 5. Human lysozyme production by the Leu<sup>+</sup> yeast transformants harboring the YEp type expression vector, pHK501 in a jar fermentor.

●, pHK501 cell growth; ■, pHK501 HLY activity(units/ml); ▲, pHK501 pH. Growth condition was described in the text in details.

재조합균주 발효로서 HLY의 생산량 증대를 피할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 발효조에서의 HLY 생산

플라스크 배양에 이어 GAP promoter 발현계를 함유한 pHK501 형질전환체를 발효조에서 회분배양하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 HLY 활성은 24시간만에 최대 26.8 units/ml로 1.12 units/ml/h를 보였다. 이로써 플라스크 배양(0.625 units/ml/h)과 비교해 볼 때 productivity는 약 1.8배 정도 증가하였다. 그러나 24시간 이후 HLY activity는 더 이상 증가되지 않았고 pH는 3.04까지 떨어졌으며, 균체농도는 약간씩 증가하는 경향이 관찰되었다. 그리고 HLY의 분비량은 배양액 중의 pH 감소에 따라 반비례적으로 증가하는 현상을 보였다. 이는 향후 HLY생산과 관련하여 상세한 검토가 요구된다. 이상의 결과로부터 초기 균체증식이 본격적으로 시작되는 log phase 단계가 매우 짧고, 배양말기 균체농도도 플라스크 배양시보다 낮은 것으로 보아 본 배양에서 사용된 접종량(10%, v/v)이 HLY생산에는 높은 것으로 생각된다.

향후 본 실험에서의 발효 최적화를 위하여 접종량을 낮추고, pH를 조절하고, 통기속도를 1 vvm 이상으로 유지시키는 것이 바람직하다고 판단된다. 또한, 효모가 생산하는 에탄올 농도가 세포성장 및 단백질 생산속도에 미치는 영향 등을 조사하기 위해 에탄올 농도도 고려되어야 할 것이며, 산업화를 위해서는 효율적인 배지 선정과 여러 발효시스템에서의 HLY생산이 검토되어야 할 것이다. 또한, 유전자 발현에 따른 이종산물의 생산은 숙주 세포의 증식에 영향을 미칠 수 있으므로 유도 발현계에 의한 고농도 세포배양 후 유전자 발현을 유도하는 방법이 필요하다고 생각되며 아울러 발현 분비가 좀더 강력한 vector의 개발도 검토 중에 있다.

## 요 약

본 연구에서는 안정성이 보장된 효모를 숙주로 하여 이미 lysozyme 생산능이 확인된 저 copy 수의 YCp type인 pHK101의 생산능을 높이기 위해 고발현 벡터인 다 copy 수의 YEp type인 pHK501을 구축하였다. pHK501과 pHK101형질전환체의 *M. luteus*를 기질로 한 lysoplate assay 비교에서 확실한 생산량의 증가를 생육저지환을 통해 확인하였다. 또한 *E. coli*에서 peptidoglycan만을 추출하여 기질로 사용한 lysoplate assay에서도 pHK501형질전환체의 배양액 중에는 정상적인 HLY의 생산을 직접 확인할 수 있었다. 플라스크 배양에서 배양시간에 따른 HLY의 최대 생산량은 81시간만에 pHK501형질전환체가 55 units/ml에 도달됨으로써 pHK101(7 units/ml)에 비해 약 8배 증가됐다. 발효조규모에서의 HLY 생산은 24시간만에 26.8 units/ml(1.12 units/ml/h)에 도달하였고 전체 생산성은 플라스크배양(0.625 units/ml/h)에 비해 약 1.8배 정도 증가되었다.

## 감사의 말

본 연구는 1996년 교육부 학술연구조성비(유전공학 GE 96-186)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Arnheim, N., J. Sobel, and R. Canfield. 1971. Immunological resemblance between human leukemia and hen egg white lysozyme and their reduced carboxymethyl derivatives. *J. Mol. Biol.* **61**: 237-250.
2. Canfield, R. E., J. C. Collins, and H. J. Sobel. 1974. Human leukemia lysozyme, pp. 63-70. In E. F. Osserman, R. E. Canfield and S. Beychok(eds.), Academic Press, Inc., New York.
3. Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110-2114.
4. Conover, M. J., J. S. Thompson, and G. D. Shockman. 1966. Autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis*: release of soluble enzyme from cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**: 713-719.
5. Hwang, Yong-II, Ae-Ran Seo, Sang-Kook Shim, and Dong-Hyo Chung. 1991. Construction of an expression vector system with the GAP promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 568-574.
6. Innis, M. A., M. J. Holland, P. C. McCabe, G. E. Cole, V. P. Wittman, R. Tal, W. K. Watt, D. H. Gelfand, J. P. Holland, and J. H. Meade. 1985. Expression, glycosylation, and secretion of an *Aspergillus glucoamylase* by

- Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **228**: 21-26.
7. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cell treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
  8. Jigami, Y., M. Muraki, N. Harada, and H. Tanaka. 1986. Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene* **43**: 273-279.
  9. Kim, Ki-Woon, Seung-Cheol Lee, and Yong-Il Hwang. 1995. Chemical synthesis of a human lysozyme gene and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 138-144.
  10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680-685.
  11. Morrison, D. A. 1977. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* **132**: 349-351.
  12. Mörsky, P. 1983. Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: reexamination of reaction conditions. *Anal. Biochem.* **128**: 77-85.
  13. Osserman, E. F. and D. P. Lawlor. 1966. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **124**: 921-951.
  14. Sambrook, J., E. F. Fritsch., and T. Maniatis. 1989. *In Molecular Cloning*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
  15. Wayne, J. B. and A. B. Walter. 1985. A lysoplate assay for *Escherichia coli* cell wall-active enzymes. *Anal. Biochem.* **150**: 258-263.
  16. Yoshimura, K., A. Toibana, and K. Nakahama. 1988. Human lysozyme: sequencing of a cDNA, and expression and secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 794-801.

(Received October 19, 1997)