

## 재조합 효모의 유가배양에서 Exoinulinase 생산을 위한 Promoter의 선별

김이경 · 고지현 · 김연희 · 김성구<sup>1</sup> · 남수완\*  
동의대학교 미생물학과, <sup>1</sup>부경대학교 생물공학과

**Selection of Constitutive Promoter for Exoinulinase Production in Fed-Batch Culture of Recombinant Yeast. Kim, Yi-Kyung, Ji-Hyun Ko, Youn-Hee Kim, Sung-Koo Kim<sup>1</sup>, and Soo-Wan Nam\*.** Department of Micro-biology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea, <sup>1</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea – In order to overexpress constitutively the *Kluyveromyces marxianus* exoinulinase gene (*INU1*) in *Saccharomyces cerevisiae*, four episomal expression systems employing *GAPDH*, *ADHI*, *PGK*, and *ENO1* promoters, were constructed as pYIGP, pADHI-INU, pPGK-INU, and pENO1-INU plasmids, respectively. When *S. cerevisiae* transformants harboring each plasmid were batchwisely cultivated in the fermentor containing 5% glucose medium, no significant differences in the cell growth are observed. However, the expression level of exoinulinase and plasmid stability showed a strong dependency on the promoter employed. The expression levels of exoinulinase were about 1.70 unit/ml for *GAPDH* promoter, 1.67 unit/ml for *PGK* promoter, 1.29 unit/ml for *ADHI* promoter, and 0.80 unit/ml for *ENO1* promoter. The plasmid stabilities were maintained above 80% in all expression systems, except the *GAPDH* promoter system of 55%. Based on the plasmid stability and expression level of exoinulinase, the *ADHI* and *PGK* promoter systems were selected for the fed-batch culture to overproduce exoinulinase. By the intermittent feeding of yeast extract and glucose, both promoter systems gave the cell concentration of about 30 g-dry cell weight/l, but the maximal exoinulinase activity of 3.70 unit/ml and plasmid stability of 96% in the *ADHI* promoter were higher than those (2.70 unit/ml, 80%) of *PGK* system. Taking into account the plasmid stability and extended culture time, the *ADHI* promoter systems would be the most feasible expression systems for the constitutive overproduction of exoinulinase through high cell-density fed-batch cultures using non-selective rich medium.

**Key words:** Constitutive promoter, exoinulinase, fed-batch culture, plasmid stability, *Saccharomyces cerevisiae*

Inulin은 돼지감자 (*Jerusalem artichoke; Helianthus tuberosus*), 다알리아, 치커리, 우영의 주된 저장 탄수화물이며 약 35개의 과당(fructose)이  $\beta$ -2,1 결합으로 연결되어 있고, 말단에는 포도당이 한 분자 결합되어 있는 polyfructan이다 [1]. Inulin을 기질로 사용하여 에탄올 및 단세포단백질(SCP)의 생산, inulin을 exoinulinase(EC 3.2.1.80)로 효소 가수분해시켜 고순도 과당의 생산[2,6,11], inulin에 inulin fructotransferase(depolymerizing)(EC 2.4.1.93)를 반응시켜 difructose anhydride의 생산[19], endoinulinase(EC 3.2.1.7)와 반응시켜 inulo-oligosaccharide의 생산[7], cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase의 작용으로 cycloinulo-oligosaccharide (cyclofructans)의 생산[5] 등 다양한 기능성 식품소재 생산의 원료 물질로 inulin이 크게 주목받고 있다.

*Kluyveromyces* 유래의 exoinulinase( $\beta$ -D-fructan fruc-

tanohydrolase)는 다당류(inulin, levan), raffinose 및 sucrose의 말단  $\beta$ -2,1- 또는  $\beta$ -2,6-fructofuranoside 결합을 절단하는  $\beta$ -fructosidase형 효소이며, 그 유전자(*INU1*)의 염기서열이 밝혀졌고[8,9], 효모 *S. cerevisiae*에서도 성공적으로 발현되었다[14,15]. 그러나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 *S. cerevisiae*에서 exoinulinase 효소를 대량으로 생산하려는 시도는 현재까지 보고된 바 없다.

따라서, 본 연구에서는 효모 *S. cerevisiae*에서 재조합 exoinulinase를 대량으로 발현·생산하기 위한 기초연구로, 높은 copy number(100 copies per haploid genome)를 보이는 2 $\mu$ -based episomal vectors(YEPs)[17]와 유전자 발현이 균체증식과 비례하여 일어나는(growth-associated expression) 구성적(constitutive) promoters(*GAPDH*, *PGK*, *ADHI*, *ENO* 등)를 이용하여 4종의 재조합 plasmid를 구축하고, 이들 plasmid로 형질전환된 재조합 효모들의 회분 및 유가배양을 통해 각 구성적 promoter의 강도를 상호·비교함으로써 exoinulinase 효소를 구성적으로 과발현·분비·생산하는 최적의 promoter-host 계를 선별하고자 한다.

\*Corresponding author  
Tel. 82-51-890-1537, Fax. 82-51-891-7740  
E-mail: swnam@dongeui.ac.kr

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용한 효모 숙주세포는 haploid인 *S. cerevisiae* SEY2102(*MAT ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2-Δ9*)로써 uracil, leucine 및 histidine 요구성 변이주이다. Plasmid 구축 및 증폭을 위해 *E. coli* JM109와 DH5α를 사용하였다. pYIGP[13], pVT-103U[21], pENO-426[20] 및 pJC1[3] plasmid를 *GAPDH*(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter, *ADHI*(alcohol dehydrogenase 1) promoter, *ENO1*(enolase 1) 및 *PGK*(phosphoglycerate kinase) promoter 원으로 각각 사용하였다. 이들 plasmid는 효모 선택표지로 *URA3*(orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 유전자를, 효모 복제원으로 2μ 서열을 함유하고 있다.

재조합 Plasmid 제작 및 형질전환

*GAPDH* promoter 발현계는 pYIGP를 사용하였고, *ADHI* promoter 발현계인 pADH1-INU plasmid(9.0kb)는 pY111[13]을 *Bam*HI과 *Xba*I으로 처리하여 얻은 INU1 단편을 pVT-103U(*Bam*HI/*Xba*I으로 미리 절단)에 subcloning하여 구축하였고, *ENO1* promoter 발현계인 pENO-INU plasmid(8.6kb)는 pYK407 [8]을 *Bgl*II로 처리한 후 얻은 INU1 단편을 pENO-426 [20](*Bam*HI으로 미리 절단)에 subcloning하여 구축하였다. 또한 pYK407을 *Eco*RI과 *Bgl*II로 처리한 후 얻은 INU1 단편을 pJC1(*Eco*RI과 *Bgl*II으로 미리 절단)에 subcloning하여 구축하였다 (Fig. 1). 이들 plasmid의 효모로의 형질전환은 LiCl 법 [4]을 사용하였다.

효모 형질전환체 선별

효모 형질전환체의 1차 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 exoinulinase의 발현유무를 신속히 조사하기 위해 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(TTC) 염색법 [14]을 사용하여 2차 선별하였다. 즉,

2% sucrose 함유 YP agar 배지에서 48시간 자란 효모 형질전환체 colony들을 증류수로 세척한 후 TTC(0.1% in 0.5 M NaOH) 용액으로 20분간 반응시켰다. 10% 초산으로 세척한 후 나타나는 colony 주위의 적색환은 효모에서 발현된 exoinulinase에 의해 inulin이 환원당(fructose)으로 가수분해되었음을 나타낸다.

배지 및 배양조건

2차 선별된 효모 형질전환체는 YPD 배지(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% dextrose, 초기 pH 5.5)를 50 mL 함유하는 baffled-flask에서 30°C, 180 rpm 조건으로 전배양하였다. 전배양액 50 ml을 발효조(Ko Biotech., Co., Korea)에 접종하여 회분배양하였다. 회분배양 배지는 YP5D(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 5% dextrose)이며, 배양부피는 1.0l, 배양 온도는 30°C, 배양중의 pH 조절은 50% NH<sub>4</sub>OH와 1N HCl를 사용하여 pH 5.5로 조절하였다. 교반속도(200~600 rpm)의 조절로 용존산소(DO)를 공기포화의 30% 이상으로 유지하였고, 통기속도는 2 vvm을 유지하였다.

간헐적 유가배양에서는 YP5D 배지로 9~12시간 회분배양 후 농축 배지(10% yeast extract, 30% dextrose)를 50 ml씩 여러 번 나누어 공급하였다. 초기 배양액 부피는 1.0 l, 통기속도는 3 vvm, 교반속도는 300~1000 rpm (DO≥20%), pH 5.5 등의 조건으로 유가배양하였다.

균체농도, 포도당, 단백질 및 Plasmid 안정성

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD<sub>600</sub>)로 측정하였다. 탁도와 건조 균체량의 보정곡선에 의해 OD<sub>600</sub>값을 건조 균체농도(g-dry cell weight, g-DCW)로 환산하였다. 배양액을 3,000 × g 에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dini-trosalicylic acid(DNS) 방법[10]을 사용하여 잔존 포도당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100-200개의 colony를 SD 선별배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비(백분율)로 측정하였다.

균체분획 및 효소 활성 측정

균체 침전물을 Zymolyase 100T(Seikagaku Kogyo, Japan)와 glass beads(0.4-0.5 mm)를 사용하여 전세포분획을 얻었으며[15], 이 분획과 배양상등액을 사용하여 exoinulinase 활성을 측정하였다. Exoinulinase 활성은 1.5% inulin (Jerusalem artichoke, Sigma, USA)을 기질로 사용하여 측정하였으며 pH 5.0(0.1 M Na·acetate buffer), 50°C에서 1분당 1 μmole의 환원당(fructose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 비활성(specific activity)

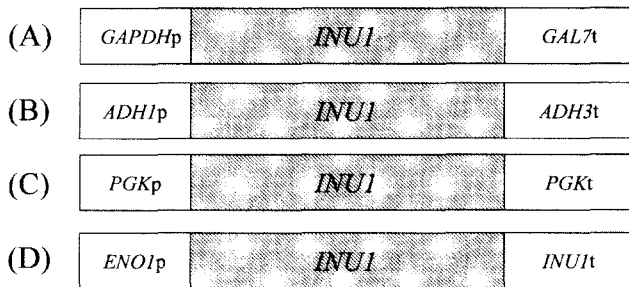


Fig. 1. Schematic diagram of pYIGP (A), pADH1-INU (B), pPGK-INU (C), and pENO1-INU (D) plasmids.

는 각 효소 활성을 균체농도(g-DCW/l)로 나누어서 계산하였다. 효소 활성 측정시 환원당의 정량은 DNS 방법[10]을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

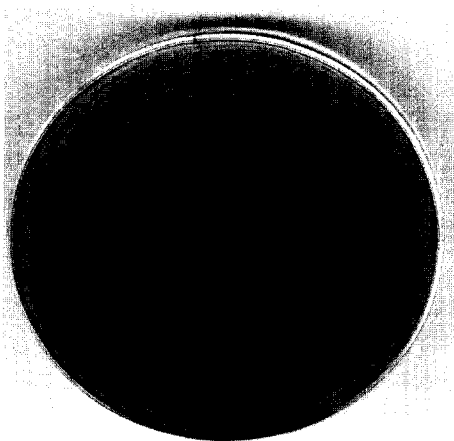
**효모 형질전환체의 선별**

*S. cerevisiae*의 대표적인 구성적 promoter로 *GAPDH*, *ADHI*, *PGK* 및 *ENO1*를 사용하고 이들 promoter 하류에 *INU1*의 ORF를 in frame으로 연결한 각각의 plasmid pYIGP(8.41 kb), pADHI-*INU*(9.0 kb), pPGK-*INU*(9.19 kb) 및 pENO1-*INU*(8.6 kb)를 구축하였다(Fig. 1). 이때 *INU1* 하류에는 *GAL7*, *ADH3*, *PGK* 및 *INU1* 유래의 전사종결자 (terminator)를 각각 사용하였다.

pYIGP, pADHI-*INU*, pPGK-*INU* 및 pENO1-*INU* plasmid를 각각 SEY2102 균주에 형질전환시킨 후 uracil 결핍 최소배지인 SD 평판배지에서 형질전환체를 1차 선별하였다. 형질전환 균주들을 sucrose 함유 평판배지에서 exoinulinase 활성 염색으로 2차 선별한 뒤 exoinulinase 발현정도를 비교하였다 (Fig. 2). 숙주세포인 SEY2102에서는 적색환이 전혀 나타나지 않았고 재조합 균주들은 모두 sucrose 분해 활성을 나타내었다. 적색환의 크기와 진한 정도로 볼 때 exoinulinase 발현에 미치는 promoter의 세기는 *GAPDH*, *ADHI*, *PGK*, *ENO1* promoter 순서임을 정성적으로 파악할 수 있었다.

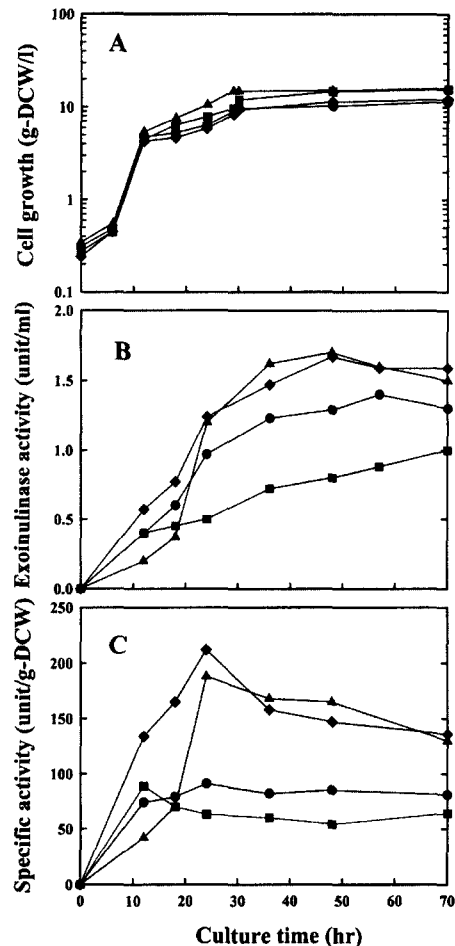
**회분배양에서의 균체증식과 *INU1* 발현**

2차 선별된 효모 형질전환체들을 이용하여 YP5D 배지에서 72시간 배양하여 균체증식, 균체의 exoinulinase 활성



**Fig. 2.** Active staining of exoinulinase expressed by yeast transformants which were grown on YP plus sucrose agar plate. (a) *S. cerevisiae* SEY2102 host cell; (b) *S. cerevisiae* SEY2102/pYIGP; (c) *S. cerevisiae* SEY2102/pADHI-*INU*; (d) *S. cerevisiae* SEY2102/pPGK-*INU*; (e) *S. cerevisiae* SEY2102/pENO1-*INU*

(발현량), 균체당 exoinulinase 활성(비활성) 등을 조사하였다(Fig. 3). 포도당 고갈이 일어나는 12시간까지 균체증식은 활발하며, exoinulinase 발현은 대략 48시간까지 계속되었다. 12시간까지의 비증식속도( $\mu$ )는 약  $0.232 \text{ hr}^{-1}$ 로 4종의 형질 전환주 모두 비슷한 값을 보였지만, 배양 12시간 이후의 2차 증식기에서의 비증식속도는  $0.036\sim 0.059 \text{ hr}^{-1}$ 로 크게 감소하였다. 이렇게 포도당 고갈 후에 일어나는 2차 균체증식은 생성된 에탄올이 탄소원으로 이용되기 때문이며[13], exoinulinase 발현이 2차 증식기에도 계속되는 이유는 본 연구에 사용한 구성적 promoter의 특성인 growth-associated expression (균체증식과 유전자 발현이 연관됨) 때문으로 사료된다[12]. Exoinulinase 발현량(활성)은 *GAPDH*와 *PGK* promoter가 비슷한 수준을 보이며, 다음이 *ADHI* promoter이고, *ENO1* promoter가 가장 낮은 발현량을 보였다. 균체증식과 exoinulinase 발현과의 정확한 비례관계가 성



**Fig. 3.** Time profiles of cell growth (A), exoinulinase expression (B), and specific exoinulinase activity (C) in the batch cultures of yeast transformants.

Symbols: (●), SEY2102/pADHI-*INU*; (■), SEY2102/pENO1-*INU*; (▲), SEY2102/pYIGP; (◆), SEY2102/pPGK-*INU*

립하지 않는데, 이는 *Clostridium endoglucanase*와 mouse 및 *Bacillus amylo-liquefaciens* 유래  $\alpha$ -amylase의 *S. cerevisiae*에서의 발현에서도 관찰된 바 있다 [12,16,18].

구성적 promoter의 강도(발현능)을 정확히 분석하기 위해 단위균체농도당 exoinulinase 활성 즉, 비활성의 경시변화를 각 promoter 발현계 별로 나타내었다(Fig. 3(C)). 발현된 exoinulinase의 분비국재성(또는 분비효율)를 조사하면 약 95%의 exoinulinase 활성이 균체외에서 측정되기 때문에 [14], 비활성은 세포외 exoinulinase 활성을 기준으로 계산하였다. *GAPDH*와 *PGK* promoter계의 경우 배양 12시간(정지기) 이후에서도 비활성 증가가 계속되어 24시간까지 지속되었다. 그러나, *ENO1*과 *ADH1* promoter계의 경우에는 정지기 이후 비활성 변화가 거의 없었다. *GAPDH*와 *PGK* promoter계에서 배양 24시간 이후 나타나는 비활성 감소는 plasmid 불안정성(plasmid 불포함 세포의 비율이 증가) 때문이라 생각되며, plasmid 안정성이 90% 이상 (Table 1)으로 높게 유지되는 *ADH1*와 *ENO1* promoter계에서는 exoinulinase 활성 감소도 관찰되지 않을뿐더러 비활성 감소도 발생하지 않았다.

유기배양에서의 균체증식과 INU1 발현

이상의 회분배양 결과로부터 plasmid 안정성이 높은 *ADH1* 및 비활성도가 높은 *PGK* promoter 발현계를 선정하여 유기배양을 수행하였다. 다양한 유기배양을 수행하였지만 배양 70시간에서의 최종 균체농도가 약 30 g-DCW/l 수준으로 얻어진 간헐적 유기배양을 대표적으로 나타내었다 (Fig. 4-5). *ADH1* 발현계의 경우, 포도당 소모 구간에서 균체증식은 활발히 일어나며, 포도당 고갈이 나타난 배양 30시간 이후에서도 균체증식은 느리지만 계속되었다. 배양 30시간 이후에서는 생성된 에탄올을 탄소원으로 소모하면서 균체증식이 계속되는 것으로 보여진다[13]. 포도당 소모 구간에서의 exoinulinase 발현은 빠른 속도로 일어나지

만, 배양 30시간 이후의 에탄올 소모 구간에서는 그 발현 속도가 현저히 감소되었다.

*PGK* promoter 발현계의 경우(Fig. 5), 균체증식과 exoinulinase 발현 양상은 전체적으로 *ADH1* 발현계와 비슷하였다. 즉, 포도당 소모 구간에서의 균체증식과 exoinulinase 발현은 빠르게 일어나지만, 배양 30시간 이후의 에탄올 소모 구간에서는 균체증식속도와 exoinulinase 발현속도는 크게 감소하는 양상을 보였다. 그렇지만, *PGK* 발현계에서의 균체증식은 *ADH1* 발현계보다 느리게 일어났다. 이러한 느린 균체증식을 보완하기 위해 exoinulinase 발현 특성을 단위 균체당 exoinulinase의 활성(비활성)으로 비교해 보면(Fig. 6), *PGK* promoter의 경우 *ADH1* promoter 보다 비활성 증가가 훨씬 빠르게 일어나며, 이러한 사실은 회분배양에서도

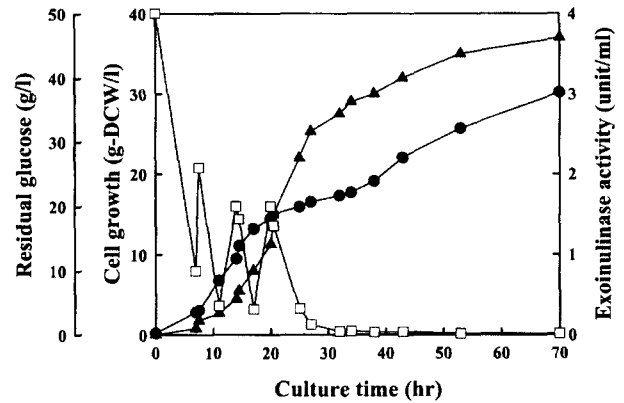


Fig. 4. Time profiles of cell growth, glucose consumption, and exoinulinase expression in the intermittent fed-batch culture of *S. cerevisiae* SEY2102/pADH1-INU. Each feeding medium (50 ml) was consisted of 10% yeast extract and 30% glucose. Symbols: (●), cell growth; (▲), extracellular exoinulinase activity; (□), residual glucose concentration

Table 1. Comparison of cell growth, plasmid stability, and exoinulinase expression in the batch cultures of *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pADH1-INU, pENO1-INU, pYIGP, or PGK-INU plasmid

Promoter	Cell Growth (g-DCW/l)	Plasmid Stability <sup>2)</sup> (%)	Exoinulinase Activity (unit/ml)	Specific Activity <sup>1)</sup> (unit/g-DCW)
ADH1	15.1	98	1.29	91
ENO1	14.7	91	0.80	63
GAPDH	10.3	62	1.70	188
PGK	11.4	81	1.67	212

The culture medium was YP plus 5% dextrose and the results were from 48 hr culture time.

<sup>1)</sup>The data were at 24th hr.

<sup>2)</sup>Plasmid stability at the end of cultivation (70 hr).

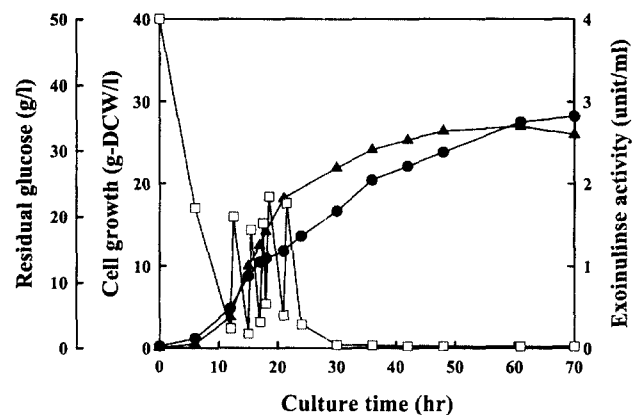


Fig. 5. Time profiles of cell growth, glucose consumption, and exoinulinase expression in the intermittent fed-batch culture of *S. cerevisiae* SEY2102/pPGK-INU. Symbols are the same as in Fig. 4.

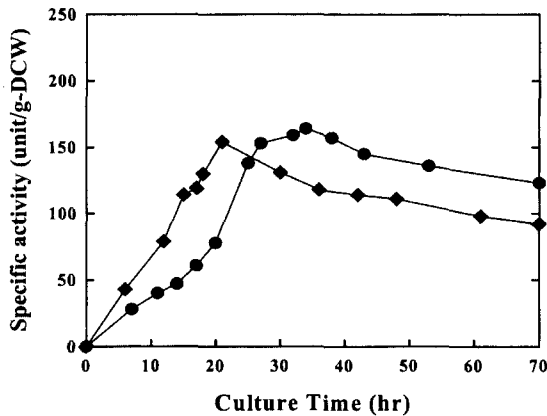


Fig. 6. Time profile of specific exoinulinase activity in the fed-batch cultures of *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pADH1-INU (●) or pPGK-INU (◆).

Table 2. Comparison of cell growth, plasmid stability, and exoinulinase expression in the intermittent fed-batch cultures of *S. cerevisiae* SEY2102/pADH1-INU and SEY2102/pPGK-INU

Promoter	Cell Growth <sup>1)</sup> (g-DCW/l)	Plasmid Stability <sup>2)</sup> (%)	Exoinulinase Activity <sup>1)</sup> (unit/ml)	Specific Activity <sup>1)</sup> (unit/g-DCW)
ADH1	30.2	96	3.70	164
PGK	28.2	80	2.70	154

<sup>1)</sup>The data were from its maximum values.

<sup>2)</sup>Plasmid stability at the end of cultivation (70th hr).

관찰된 바 있다(Fig. 3(C)). PGK promoter의 경우 배양 21시간 이후, ADH1 promoter의 경우 배양 34시간 이후 비활성은 서서히 감소하였다. PGK 발현계의 경우 비활성 감소가 일찍 일어나는 것은 plasmid 불포함 균체농도의 증가 때문이라 사료된다. PGK promoter에서 최대 비활성은 154 unit/g-DCW, ADH1 promoter에서는 164 unit/g-DCW를 보여(Table 2), 회분배양에서 만큼 두 발현계 사이의 비활성 차이는 크지 않았다. 즉, 포도당 소모 구간에서는 PGK 발현계가, 에탄올 소모 구간에서는 ADH1 발현계가 더 우수함을 알 수 있었다. 따라서, 본 연구에서처럼 비선택적 영양배지를 사용하고 (에탄올 생성이 필연적인), 배양시간이 장시간인 고농도세포 유가배양에서는 plasmid 안정성이 높게 유지되는 ADH1 promoter 발현계가 보다 높은 exoinulinase 발현수율을 얻게 해줄 것으로 예상된다.

요 약

*Kluyveromyces marxianus* exoinulinase를 *Saccharomyces cerevisiae*에서 구성적으로 과발현·생산하기 위해, 구성적 promoter인 GAPDH, ADH1, PGK 및 ENO1 promoters 하류에 exoinulinase 유전자(INUI)의 ORF를 in frame으로

연결한 각각의 plasmid pYIGP, pADH1-INU, pPGK-INU 및 pENO-INU를 구축하였다. 이들 각 plasmid를 함유한 형질전환주 4종을 포도당 농도 5% 배지에서 회분배양한 결과, 균체증식은 pro-moter에 따라 큰 차이를 보이지 않았지만, exoinulinase 발현수준과 plasmid 안정성은 사용한 promoter에 크게 좌우되었다. 즉, exoinulinase 발현수준은 GAPDH, PGK, ADH1, ENO1 promoter 각각 1.70, 1.67, 1.29, 0.80 unit/ml였으며, plasmid 안정성은 GAPDH promoter계의 55%를 제외하고 모두 80% 이상으로 높게 나타났다. 이상의 plasmid 안정성과 exoinulinase 발현수준을 고려하여, ADH1 및 PGK 발현계를 선정하여 유가배양하였다. Yeast extract와 포도당을 간헐적으로 공급한 유가배양 결과, 두 발현계에서 약 30 g-DCW/l의 균체농도를 얻었지만, ADH1 promoter계에서는 3.70 unit/ml의 최대 exoinulinase 활성과 96%의 plasmid 안정성을 보였고, 반면에 PGK promoter계는 각각 2.70 unit/ml와 80%를 나타내었다. 따라서, plasmid 안정성과 긴 배양시간을 고려할 때, 비선택적 영양배지를 사용하는 고농도세포 유가배양에서는 ADH1 promoter가 exoinulinase의 구성적 과발현·생산에 더 적합할 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 동의대학교의 1999년도 교내연구과제(자유공모과제) 지원에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bajpai, P. K. and P. Bajpai. 1991. Cultivation and utilization of Jerusalem artichoke for ethanol, single cell protein, and high-fructose syrup production. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 359-362.
- Brevnova, E. E., D. G. Kozlov, B. D. Efremov, and S.V. Benevolensky. 1998. Inulase-secreting strain of *Saccharomyces cerevisiae* produces fructose. *Biotechnol. Bioeng.* **60**: 492-497.
- Crous, J. M., I. S. Pretorius, and W. H. van Zyl. 1995. Cloning and expression of an *Aspergillus kawachii* endo-1,4-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **28**: 467-473.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Kanai, T., N. Ueki, T. Kawaguchi, Y. Teranishi, H. Atomi, C. Tomorbaatar, M. Ueda, and A. Tanaka. 1997. Recombinant thermostable cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4956-4960.
- Kim, B. W., H. W. Kim, and S. W. Nam. 1997. Continuous

- production of fructose-syrups from inulin by immobilized inulinase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biopro. Eng.* **2**: 90–93.
7. Kim, D. H., Y. J. Choi, S. K. Song, and J. W. Yun. 1997. Production of inulo- oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.* **19**: 369–371.
  8. Ko, J. H. 1987. Studies on the extracellular secretion of proteins in yeast. Ph.D. Thesis, The University of Tokyo.
  9. Laloux, O., J. P. Cassart, J. Delcour, J. Van Beeumen, and J. Vantenhaute. 1991. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Lett.* **289**: 64–68.
  10. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**: 952–959.
  11. Nakamura, T., Y. Ogata, A. Shitara, A. Nakamura, and K. Ohta. 1995. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 164–169.
  12. Nam, S. W., D. K. Chung, and B. H. Chung. 1997. Constitutive expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**: 430–437.
  13. 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.
  14. 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.
  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. Park, Y. S., S. Shiba, S. Iijima, T. Kobayashi, and F. Hishinuma. 1993. Comparison of three different promoter systems for secretory -amylase production in fed-batch cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 854–861.
  17. Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423–488.
  18. Ruohonen, L., M. K. Aalto, and S. Keranen. 1995. Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *J. Biotechnol.* **39**: 193–203.
  19. Sakurai, H., A. Yokota, Y. Sumita, Y. Mori, H. Matsui, and F. Tomita. 1997. Metabolism of DFAIII by *Arthrobacter* sp. H65-7: purification and properties of a DFAIII hydrolysis enzyme (DFAIIIase). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 989–993.
  20. Tantirungkij, M., N. Nakashima, T. Seki, and T. Yoshoda. 1993. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 83–88.
  21. Vernet, T., D. Dignard, and D. Y. Thomas. 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**: 225–233.

(Received Sep. 17, 2001/Accepted Dec. 7, 2001)