

*Saccharomyces cerevisiae*에서 발현된 *Pseudomonas aurantiaca* Levansucrase의 분비국재성

임채권¹ · 김광현¹ · 김철호² · 이상기² · 남수완*
동의대학교 생명공학과, ¹미생물학과, ²한국생명공학연구원

Secretion and Localization of *Pseudomonas aurantiaca* Levansucrase Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Lim, Chae-Kwon¹, 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(*lscA*) from *Pseudomonas aurantiaca* was subcloned downstream of *GALI* promoter in pYES 2.0 and pYInu-AT [*GALI0* promoter + exoinulinase signal sequence of *Kluyveromyces marxianus*], resulting pYES-*lscA* and pYInu-*lscA*, respectively. The two expression plasmids were introduced into an invertase-deficient strain, *Sacchromayces cerevisiae* SEY2102, and transformants with 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 8.62 U/ml with the strain harboring pYES-*lscA* and 5.43 U/ml with the strain harboring pYInu-*lscA*. The levansucrase activity of 80% was detected in the periplasmic space and cytoplasm. The levansucrase activity in the medium of SEY2102/pYInu-*lscA* was 0.87 U/ml whereas that of SEY2102/pYES-*lscA* was 0.47 U/ml, which implying the exoinulinase signal sequence didn't enhance the secretion efficiency of levansucrase. Furthermore, the recombinant levansucrase expressed in yeast seems to be produced as a hyper-glycosylated form.

Key words: *Pseudomonas aurantiaca*, levansucrase, *Sacchromayces cerevisiae*, exoinulinase signal

Levansucrase(sucrase : 2,6- β -D-fructan 6- β -D-fructosyl-transferase; E.C. 2. 4. 1. 10)는 과당전이반응을 촉매하여 설탕으로부터 levan을 형성한다. Levan의 분자량과 branching 정도는 sucrose와 주어진 levansucrase의 생리학적 기능에 따라 다양하게 나타날 수 있다[13]. Levan은 과당이 β -2,6 구조로 결합된 수용성 다당류로 미생물(*Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* 등)이나 식물체(마늘, 목초 등)에서 발견된다[5, 24, 27]. Levan은 새로운 생물소재로 화장품 보습제, 장내세균 개선제, 식이섬유 원료, 사료첨가제 등으로 사용될 수 있으며, 나아가 의료용 신소재로서 혈장 대용제, 항종양제, 면역증강제로 이용될 수 있음이 보고되었다[7, 4, 13]. 그러나 기존의 미생물 발효법을 이용한 생산공정은 낮은 생산수율과 낮은 levansucrase의 발현, 부산물의 생성 등이 문제였다. 이런 문제를 극복하기 위해 Song 등은 *Z. mobilis*[24]와 *R. aquatilis*[25]으로부터 levansucrase 유전자를 분리하여 대장균에서 발현시켰고, Jong 등[8]은 *Pseudomonas aurantiaca*으로부터 levansucrase 유

전자를 분리하여 대장균에서 발현시켜 효소를 생산하였으며, Kim 등[12]은 glycine을 첨가함으로써 *P. aurantiaca* levansucrase의 분비효율을 향상시켰다.

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 적거나, 기능(활성)이 다양하지 못해서 산업적 사용에는 많은 제약이 따른다. 따라서, 유전자 재조합 기술을 사용하여 GRAS (Generally recognized as safe) 미생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 재조합 단백질 형태로 생산하는 것이 levan 생산성 향상과 식품소재로서의 안전성 확보 및 기능 개선에 크게 유리하다.

P. aurantiaca 유래의 levansucrase는 levansucrase 중에서 낮은 branching point(about 6%)를 가지고 *P. aurantiaca* S-4380로부터 16S rRNA 서열 분석을 통해 cloning된 *lscA* 유전자이며, ORF가 1275 bp이고 단백질 분자량은 47 kDa 이다[8]. 본 논문에서는 pYES2.0을 이용한 *GALI*p-native ss-*lscA* - *CYCt* 발현 cassette와 pYInu-AT[10]를 이용한 *GALI0*p - *INU1* ss-*lscA* - *GAL7t*의 발현 cassette를 가지는 *lscA* 효모 발현계를 구축한 뒤 *S. cerevisiae*에 형질전환시켜 levansucrase 발현과 분비 양상을 비교, 조사하였다.

*Corresponding author

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

E-mail: swnam@deu.ac.kr

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmids

본 연구에 사용한 숙주세포와 plasmids를 Table 1에 정리하였다. 사용한 효모숙주세포는 *S. cerevisiae* SEY2102[3]로써, invertase 결손 변이주(*suc2-Δ9*) 및 uracil 영양요구성 변이주(*ura3-52*)이며 haploid이다. Plasmid 구축 및 증폭을 위한 숙주로 *E. coli* DH5α를 사용하였다. Levansucrase 유전자는 pLK1[8]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(*GALI0* promoter + exoinulinase signal sequence)[10]에 각각 subcloning하였다.

효모 형질전환체 선별 및 배양조건

효모로의 형질전환은 LiCl[6]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 발현 유무를 신속히 조사하기 위해 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(TTC) 염색법[18, 19]을 사용하여 2차 선별하였다. 즉, 2% sucrose 함유 YP(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone) agar 배지에서 48 시간 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 가수분해 되었음을 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[16]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 patch한 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[17]. 이들 분획과 배양상등액을 사용하여 각 분획에서의 levansucrase 활성을 측정하였다. Levansucrase 활성은 DNS법[16]을 이용하여 2% sucrose 기질로 pH 4.7(50 mM 초산 완충액), 37°C에서 분당 1 μmol의 환원당(fructose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 비활성은 각 효소 활성을 균체농도(OD₆₀₀)로 나누어서 계산하였다. 각 효소들의 분비효율은 전체 효소활성(균체외 활성 + 균체내 활성)에 대한 균체의 효소 활성비를 백분율로 나타내었다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

재조합 levansucrase의 효소학적, 생화학적 제특성을 조사하기 위해 Laemmli 법[14]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 초산완충액(pH 4.7)에 첨가하여 37°C에서 반응시킨 후 TTC 염색[16]을 통해 활성 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

Levansucrase(*lscA*) 발현 plasmids의 구축

효모에서 levansucrase 유전자(*lscA*)를 발현시키기 위해 자체분비신호를 포함한 것과 *K. marxianus* exoinulinase의

Table 1. Strains and expression plasmids used in this study.

Strains	Genotypes	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>sup44 Δlac U169(ΦlacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gylA96 Tri-1 relA1</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SEY 2102	<i>MATΔa ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-419 suc2-Δ9</i>	Ref. 2
Plasmids	Characteristics	Sources
pLK1	pUC118 + <i>lscA</i>	Ref. 7
pYES2.0	<i>GALI0</i> p-MCS-CYCt	Invitrogen Co.
pYInu-AT	<i>GALI0</i> p-INU1 ss-αAT-GAL7t	Ref. 10
pYES- <i>lscA</i>	<i>GALI0</i> p- <i>lscA</i> -CYCt	This study
pYInu- <i>lscA</i>	<i>GALI0</i> p-INU1 ss- <i>lscA</i> -GAL7t	This study

분비 신호 서열(*INU1* ss; 23개 아미노산 잔기로 구성; MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKR)을 갖는 2가지의 발현계를 구축하였다(Fig. 1). *lscA* 유전자는 pLK1[7]을 template로 하여 PCR 증폭을 위한 primers로 LSC-1, LSC-2를 사용하였으며, 각각의 서열은 LSC-1 : 5'-TGAAGAATTC AGATCTATGAAAAGCAACAC-3' (*Bg*III : underline)와 LSC-2 : 5'-TTCAAAGCTTTGTCGACTTACTTGAGCGTTA-3' (*Sal*I : underline)로서 PCR 증폭한 후, *Bg*III와 *Sal*I으로 처리하여 *lscA* 단편(1.3 kb)을 분리하였다. 분리한 단편을 pYES 2.0의 *GAL1* promoter 하류에 subcloning하여 자체분비신호를 갖는 발현 cassette, pYES-*lscA*(7.2 kb)를 구축하였다. 또한, pYInu-AT[10]의 α_1 -antitrypsin 유전자를 *Bg*III-SalI 처리로 잘라내고 *lscA*로 치환하여 *GAL10p*-*INU1* ss-*lscA*-*GAL7t*의 발현 cassette, pYInu-*lscA*(7.4 kb)를 구축하였다(Fig. 1).

효모 형질전환체의 선별

구축된 발현 plasmids(pYES-*lscA*, pYInu-*lscA*)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 시험관에서 YPD배지에서 48시간 배양한 결과, 균체증식과 활성이 가장 좋은 형질전환체 *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*lscA* No. 4와 *S. cerevisiae* SEY2102/pYInu-*lscA* No. 3 균주를 각각 3차 선별하였다(Fig. 3).

재조합 levansucrase 발현과 분비국재성

시험관 배양 결과로 선택된 *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*lscA* No. 4와 *S. cerevisiae* SEY2102/pYInu-*lscA*

No. 3 형질전환체를 플라스크 배양하여 재조합 levansucrase의 활성을 측정한 결과를 Fig. 4과 Table 2에 나타내었다. pYES-*lscA*와 pYInu-*lscA* 모두 비슷한 균체증식을 보이며, 잔존 환원당 소모도 비슷하였다. *lscA* 발현은 dextrose 소모

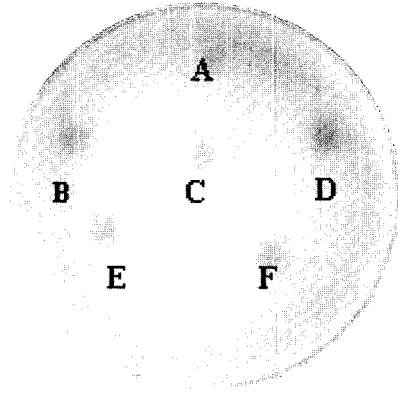


Fig. 2. Active staining of levansucrase with yeast transformant which are grown on galactose and sucrose containing medium. A, *S. cerevisiae* SEY2102; B, *S. cerevisiae* 2805; C and D, *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*lscA*; E and F, *S. cerevisiae* SEY2102/pYInu-*lscA*.

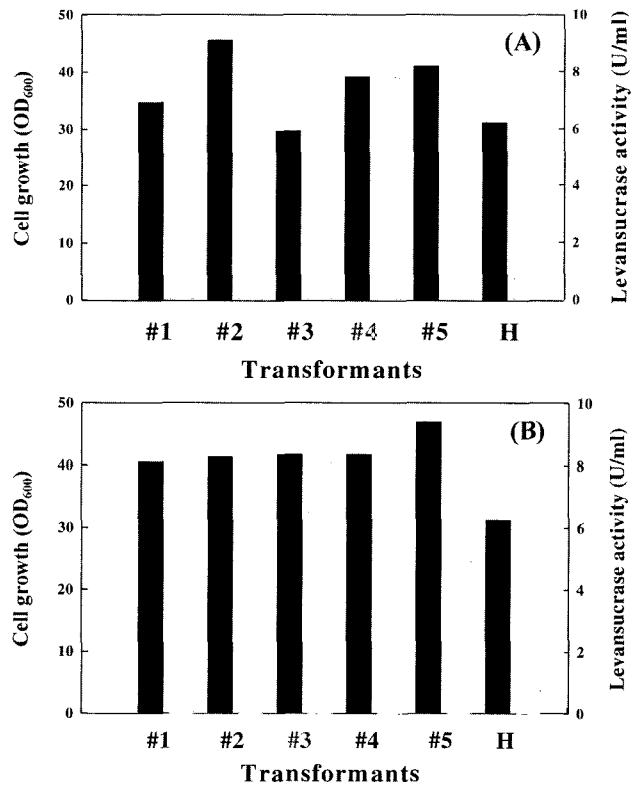


Fig. 3. Comparison of cell growth and levansucrase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*lscA* #4(A) *S. cerevisiae* SEY2102/pYInu-*lscA* #3(B) grown on YPDG medium. H means the host cell, *S. cerevisiae* SEY2102. Symbols : (■), cell growth; (□), levansucrase activity.

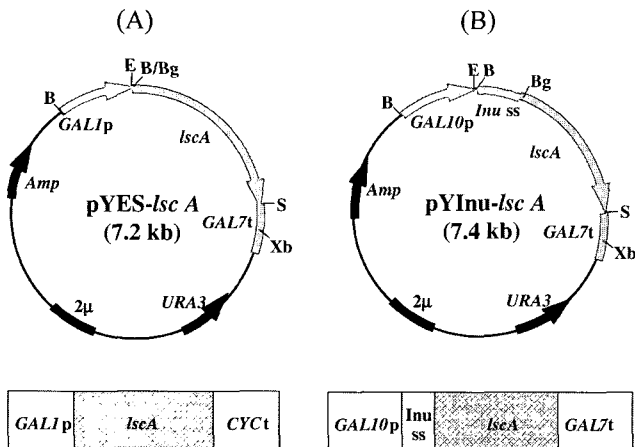


Fig. 1. Schematic diagram of plasmid pYES-*lscA* (A) and plasmid pYInu-*lscA* (B). *GAL1p*, *GAL10p*, galactose-regulated promoter; *lscA*, *P. aurantiaca* levansucrase; *Inu* ss, inulinase signal sequence; *CYCt* and *GAL7t*, transcriptional terminator; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; S, *Sal*I; Bg, *Bg*III; Xb, *Xba*I.

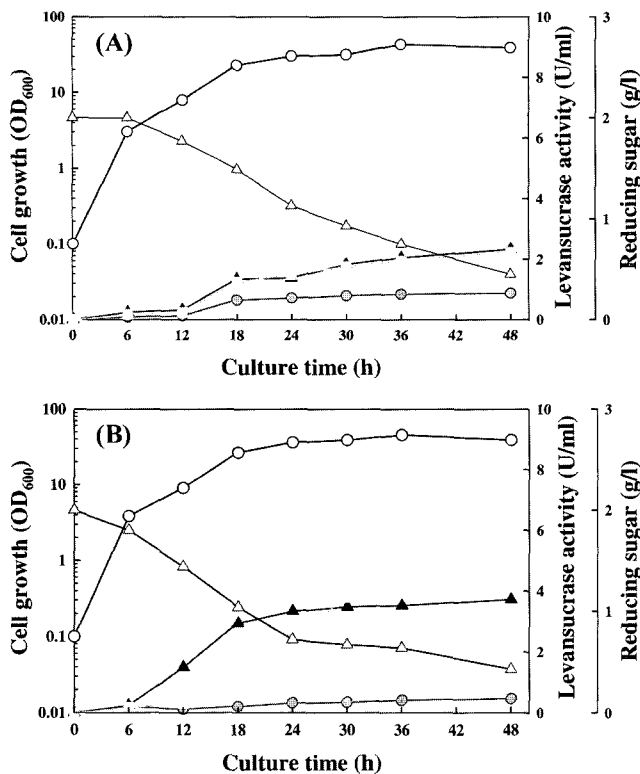


Fig. 4. Cell growth and levansucrase expression in flask cultures of yeast transformant *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*lscA* (A) and SEY2102/pYInu-*lscA* (B) grown on YPDG medium. Symbols are (○), cell growth; (△), Residual sugar; (●), levansucrase activity in medium; (▲), levansucrase activity in periplasmic space; (◐), levansucrase activity in cytoplasm.

후 galactose를 이용하는 12시간 이후부터 발현되어 48시간 까지 계속 발현량이 증가하는 양상을 나타내었다. 12시간 이후 48시간까지의 정지기 구간에서 전체농도의 감소가 관찰되지 않았고, 따라서 세포 용해(lysis)는 일어나지 않은 것으로 판단된다. pYES-*lscA* 함유 형질전환 효모는 48시간 배양 시 균체농도인 OD₆₀₀가 39.2이고, levansucrase 활성은 세포 밖 배지에 0.46 U/ml, periplasmic space에 3.72 U/ml, cytoplasm에 4.44 U/ml로 나타났다. pYInu-*lscA* 함유 형질전환 효모는 48시간 배양 시 균체농도가 OD₆₀₀ 39.0이고, levansucrase 활성은 배지에 0.87 U/ml, periplasmic space에 2.33 U/ml, cytoplasm에 2.23 U/ml로 나타났다. 즉, levansucrase 자체 분비신호와 exoinulinase 분비 신호에 의

한 배지와 periplasmic space까지의 분비 효율은 각각 50%와 60%로 나타났다. 이 결과는 이전에 보고되었던 *Z. mobilis* 유래의 levansucrase를 발현 시켰을 때[15]의 50%보다 exoinulinase 분비신호에 의한 분비효율이 약 10% 증가하였다. 본 연구에 사용된 두 plasmids의 promoter는 *GAL1*과 *GAL10*으로 서로 다르지만 두 promoter 간의 exoinulinase 발현에는 차이가 거의 없었기 때문에[19], 두 promoters 간의 발현강도에 따른 levansucrase 발현량에도 큰 영향이 없는 것으로 판단되었다. 따라서 promoter가 분비 효율에 미치는 영향이 배제되어 위의 결과는 levansucrase와 exoinulinase 분비 신호들 자체에 의한 분비능으로 사료된다.

INUI signal peptide를 사용하여 Chung 등[2]은 human lipocortin-1를 효모에서 80% 정도 분비시켰고, Kang 등[10]은 human α -antitrypsin를 70%의 분비 효율로 생산하였고, human serum albumin도 효과적으로 분비시켰다[11]. Scotti 등[23]은 다양한 signal peptides(α -factor, invertase, acid phosphatase, *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase)를 사용하여 *B. subtilis* 유래의 levansucrase에 대한 효모에서의 분비 효율을 조사한 바 있다. 그 연구결과에 따르면 성숙 단백질 N-말단의 net charge와 signal peptide의 소수성 core 영역 외에 성숙 단백질 전체의 net charge 등이 개선되어야만 소포체(endoplasmic reticulum)에서 Golgi체로, Golgi체에서 분비과립으로, 분비과립에서 세포 밖으로의 일련의 분비경로 중 율속 단계를 해결하여 분비능을 향상시킬 수 있을 것으로 보고되었다[21, 22]. 본 연구에서의 levansucrase signal peptide(MKSNTKFGKAPHQPSLWTRADALKVHAD)도 levansucrase를 세포질에 52% 정도 존재시켰고, *INUI* signal peptide(MKLAISLLLPLAGVSASVINYKR)의 경우도 균체 외로의 분비는 약간 증가되었으나 여전히 세포질에 약 41% 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 분비능을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다

재조합 levansucrases의 전기영동 양상

전기영동 분석을 통해 효모에서 생산되는 재조합 levansucrase의 당쇄부가 양상을 조사하기 위해 *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*lscA*과 SEY2102/pYInu-*lscA*의 배양 상등액과 균체 분획의 재조합 levansucrase를 SDS-PAGE로 분석

Table 2. Comparison of the levansucrase expression and localization in the *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*lscA* and SEY2102/pYInu-*lscA* after 48 h cultivation on YPDG medium.

Strain	Cell Growth (OD ₆₀₀)	Levansucrase Activity(U/ml)			Total Activity (U/ml)
		Medium	Periplasm	Cytoplasm	
SEY2102/pYES- <i>lscA</i>	40.6	0.46(5.3)*	3.72(43.1)	4.44(51.5)	8.62
SEY2102/pYInu- <i>lscA</i>	39.0	0.87(16.0)	2.33(42.9)	2.23(41.0)	5.43

*The numbers in parenthesis represent the localization percentage of levansucrase.

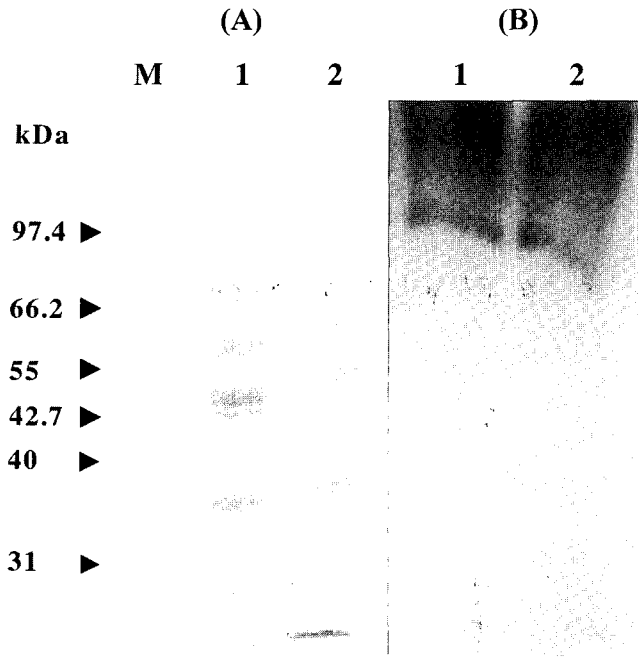


Fig. 5. Analyses of recombinant levansucrase by SDS-PAGE (A) and non-denaturing-PAGE (B). lane M: Protein molecular weight markers, lane 1: *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-*lscA*, lane 2: *S. cerevisiae* SEY2102/pYInu-*lscA*.

하였다. Coomassie 염색에서는 정확한 levansucrase의 band를 확인할 수 없었고(Fig. 5A), non-denaturing PAGE 후 활성 염색에서 넓고 분산된 밴드를 나타내어 전형적인 당단백질임을 확인하였지만(Fig. 5B), 정확한 분자량 확인은 불가능하였다. Levansucrase에는 3개의 N형 당쇄 부가부위(63Asn-Ile-Thr, 342Asn-Gly-Ser, 350Asn-Pro-Ser)가 존재하는데 [8], 이 세 부위의 Asn에 당쇄가 부가되어 넓은 스펙트럼 밴드를 나타내는 것으로 생각된다. *Bacillus cyclodextrin* glucanotransferase [20, 21], thermoalkalophilic lipase [1], endoxylanase 및 β -xylosidase [26] 등에서 관찰된 것처럼 당쇄 부가된 효소는 생화학적 변화(열안정성 증가)로 인해 반응온도를 높일 수 있으므로, 당쇄 부가된 levansucrase를 이용하면 고온에서 고농도의 설탕을 기질로 levan의 생산성 향상을 기대할 수 있다.

요 약

Pseudomonas aurantiaca 유래 levansucrase 유전자(*lscA*)를 *GAL1* promoter 하류에 연결시킨 pYES-*lscA*와 *GAL10* promoter와 *Kluyveromyces marxianus* exoinulinase의 분비 신호서열(*INU1* ss) 하류에 연결시킨 pYInu-*lscA*를 각각 구축하였다. 이들 plasmid를 invertase 결손 변이주(*suc2-Δ9*)인 *S. cerevisiae* SEY2102에 형질전환시켜 고효성 형질전환주를 선발하였다. 효모 형질전환주를 galactose 함유 배지로 배양한 결과, pYES-*lscA* 함유 형질전환주인 경우 levansucrase

의 총활성은 8.62 U/ml이고, pYInu-*lscA* 함유 형질전환주인 경우 5.43 U/ml에 도달하였다. 발현된 levansucrase의 약 80% 정도가 periplasmic space와 cytoplasm에 존재하였고, *INU1* ss에 의한 분비효율 증가는 관찰할 수 없었다. 또한, 효모에서 발현된 재조합 levansucrase는 과당체화된 형태로 생산되는 것으로 보여진다.

감사의 글

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

참고문헌

- Ahn, J. O., H. W. Jang, H. W. Lee, E. S. Choi, S. J. Haam, T. K. Oh, and J. K. Jung. 2003. Overexpression of thermoalkalophilic lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 451-456.
- 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. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 473-479.
- Emr, S. D., R. Schekman, M. C. Flessel, and J. Thorner. 1983. An *MF α 1-SUC2* (-factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 7080-7084.
- Han, Y. W. 1990. Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol.* **35**: 171-194.
- Hettwer, U., F. R. Jaeckel, J. Boch, M. Meyer, K. Rudolph, and M. S. Ullrich. 1998. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3180-3187.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- 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 levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **23**: 339-344.
- Jang, E. K., K. H. Jang, I. KOH, I. H. Kim, S. H. Kim, S. A. Kang, C. H. Kim, S. D. Ha, and S. K. Rhee. 2002. Molecular characterization of the levansucrase gene from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 and its expression in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 603-609.
- 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 bod-

- ies 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. Kim, S. H., E. K. Jang, I. H. Kim, K. H. Jang, S. A. Kang, and B. I. Chang. 2003. Effect of glycine supplement on extracellular secretion of levansucrase from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 in recombinant *Escherichia coli*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**: 312-317.
 13. Kogima, I., T. Saito, M. Iizuka, N. Minamiura, and A. Ono. 1993. Characterization of levan produced by *Serratia* sp. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 9-12.
 14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 15. Lim, C. K., Y. K. Kim, K. H. Kim, C. H. Kim, S. K. Rhee, and S. W. Nam. 2004. Expression and secretion of *Zymomonas mobilis* levansucrase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Life Sci.* **14**: 429-434.
 16. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**: 952-959.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. Park, H. Y., S. H. Jeon, H. J. Kwon, S. W. Nam, H. W. Kim, K. H. Kim, and B. W. Kim. 2002. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase that expressed by *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 293-297.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Song, K. B. and S. K. Rhee. 1994. Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **16**: 1305-1310.
 25. Song, K. B., J. W. Seo, M. G. Kim, and S. K. Rhee. 1998. Levansucrase of *Rahnella aquatilis*; cloning, expression, and levan formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **864**: 506-511.
 26. Heo, S. Y., J. K. Kim, Y. M. Kim, and S. W. Nam. 2004. Xylan Hydrolysis by treatment with endoxylanase and β -xylosidase expressed in yeast. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 171-177.
 27. Tajima, K., T. Tanio, Y. Kobayashi, H. Kohno, M. Fujiwara, T. Shiba, T. Erata, M. Munekata, and M. Takai. 2000. Cloning and sequencing of the levansucrase gene from *Acetobacter xylinum* NCI 1005. *DNA Res.* **7**: 237-242.

(Received Jul. 15, 2004/Accepted Aug. 25, 2004)