

## 효모의 구성적 Promoter들에 의한 Inulinase 유전자의 발현

김연희 · 남수완<sup>†</sup>

동의대학교 미생물학과

## Expression of Inulinase Gene by Yeast Constitutive Promoters

Youn-Hee Kim and Soo-Wan Nam<sup>†</sup>

Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

### Abstract

To express constitutively the inulinase gene (*INU1*) of *Kluyveromyces marxianus* in *Saccharomyces cerevisiae*, three yeast promoters such as *GAPDH*, *ADH1* and *ENO1* were connected upstream of *INU1*. The resulting plasmids, pYIGP, pADH1-*INU*, and pENO-*INU* were introduced to *S. cerevisiae* SEY2102 host strain, respectively, and then each transformants were selected by staining of colonies on sucrose-agar plate. When the yeast transformants were cultivated on 2% dextrose media, the total expression levels of inulinase reached to 1.11 unit/mL, 0.88 unit/mL, and 0.69 unit/mL for respective *GAPDH*, *ADH1*, and *ENO1* promoter systems. On 4% dextrose media, however, the inulinase activities were observed at 2.00 unit/mL for pYIGP, 0.71 unit/mL for pADH1-*INU*, and 1.40 unit/mL for pENO-*INU*. This result indicates that the constitutive expression of *INU1* was significantly affected by the initial concentration of dextrose and the promoter strength was in the order *GAPDH*, *ENO1*, and *ADH1* promoter at high dextrose concentration. Taking into account the plasmid stability, however, it is suggested that the *ENO1* promoter system is more suitable for the *INU1* expression on high dextrose medium or in the fed-batch cultivation accumulating ethanol at high level.

**Key words** – *Saccharomyces cerevisiae*, Inulinase, Constitutive promoter, Plasmid stability

### 서 론

내병성, 내병성 및 번식력이 강하고 특별한 비료도 필요없이 세계적으로 재배되고 있는 돼지감자 (*Jerusalem artichoke; Helianthus tuberosus*)는 농작물 중 탄수화물 함량이 가장 높고 괴경 (tuber)의 고형물 85%가 inulin이다 [1]. 그 외에도 다알리아, 치커리, 우영의 주된 저장 탄수화물

인 inulin은 약 35개의 과당 (fructose)이  $\beta$ -2,1 결합으로 연결되어 있으며, 말단에는 포도당이 한 분자 결합되어 있는 polyfructan으로 1970년대에 *Kluyveromyces*속 효모와 inulin을 이용하여 에탄올 및 단세포단백질 (SCP) 생산연구가 활발히 진행되었다. 그 후 미생물 유래 inulinase를 사용하여 inulin을 효소 가수분해시켜 ultra high-fructose glucose syrup (UHFCS) 및 고순도 과당 생산을 시도하였

<sup>†</sup> Corresponding author

고 [10], 최근 재조합 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현된 inulinase를 이용하여 inulin으로부터 과당 생산이 보고되었다 [2,5]. 또한 difructose anhydride [18]와 inulo-oligosaccharide [6] 등 신소재 감미료의 원료로도 inulin이 크게 주목받고 있다.

*Kluyveromyces* 유래의 inulinase는 다당류 (inulin, levan), raffinose 및 sucrose의 말단  $\beta$ -2,1- 또는  $\beta$ -2,6-fructofuranoside 결합을 절단하는  $\beta$ -fructosidase형 효소이며, 그 유전자 (*INUI*)가 cloning되어 염기서열이 밝혀졌고 [7,8], 효모 *S. cerevisiae*에서도 성공적으로 발현되었다 [13,14]. 그러나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 *S. cerevisiae*에서 inulinase 효소를 대량으로 생산하려는 시도는 현재까지 보고된 바 없다.

따라서, 본 연구에서는 효모 *S. cerevisiae*에서 재조합 inulinase를 대량으로 발현·생산하기 위한 기초연구로, 높은 copy number (100 copies per haploid genome)를 보이는  $2\mu$ -based episomal vectors (YEPs) [16]와 유전자 발현이 균체증식과 비례하여 일어나는 구성적 (constitutive) promoters (*GAPDH*, *ADH1*, *ENO* 등)를 이용하여 3종의 재조합 plasmid를 구축하고, 이들 plasmid로 형질전환된 재조합 효모들의 배양을 통해 초기 포도당 농도에 따른 각 구성적 promoter의 강도를 상호·비교함으로써 inulinase 효소를 구성적으로 과발현·분비·생산하는 최적의 promoter-host 계를 선별하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용한 효모 숙주세포는 haploid인 *S. cerevisiae* SEY2102 (*MAT $\alpha$  ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2-49*) [3]로써 uracil, leucine 및 histidine 요구성 변이주이다. Plasmid 구축 및 증폭을 위해 *E. coli* JM109와 DH5 $\alpha$ 를 사용하였다. pYIGP [12], pVT-103U [21] 및 pENO-426 [20] plasmid를 *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter, *ADH1* (alcohol dehydrogenase 1) promoter 및 *ENO1* (enolase) promoter 원으로 각각 사용하였다. 이들 plasmid는 효모 선택표지로 *URA3* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 유전자를, 효모 복제원으로  $2\mu$  서열을 함유하고 있다.

### 재조합 Plasmid 제작 및 형질전환

*GAPDH* promoter 발현계는 pYIGP를 사용하였고, *ADH1* promoter 발현계인 pADH1-*INU* plasmid (9.0kb)는 pYI11 [12]을 *Bam*HI과 *Xba*I로 처리하여 얻은 *INUI* 단편을 pVT-103U (*Bam*HI/*Xba*I로 미리 절단)에 subcloning하여 구축하였고, *ENO1* promoter 발현계인 pENO-*INU* plasmid (8.6kb)는 pYK407 [7]을 *Bgl*III로 처리한 후 얻은 *INUI* 단편을 pENO-426 [20] (*Bam*HI로 미리 절단)에 subcloning하여 구축하였다 (Fig. 1). 재조합 plasmids 구축에 사용된 유전자 재조합 기술은 Sambrook 등의 방법 [19]을, 이들 plasmid의 효모로의 형질전환은 LiCl 법 [4]을 사용하였다.

### 효모 형질전환체 선별 및 배양조건

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, 효모 형질전환체 colony들로부터 *INUI*의 발현유무를 신속히 조사하기 위해 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 염색법 [13]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 inulinase에 의해 inulin이 환원당 (fructose)으로 가수분해되었음을 나타낸다. 2차 선별된 효모 형질전환체는 YPD 배지 (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% dextrose 또는 4% dextrose, 초기 pH 5.5)를 50 mL 함유하는 baffled-flask에서 30°C, 180 rpm 조건으로 진탕 배양하였다.

### 균체농도, 포도당, 단백질 및 Plasmid 안정성

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계 (Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600nm에서 탁도 (OD<sub>600</sub>)로 측정하였다. 배양액을 3,000×g 에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid (DNS) 방법 [9]을 사용하여 잔존 포도당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란

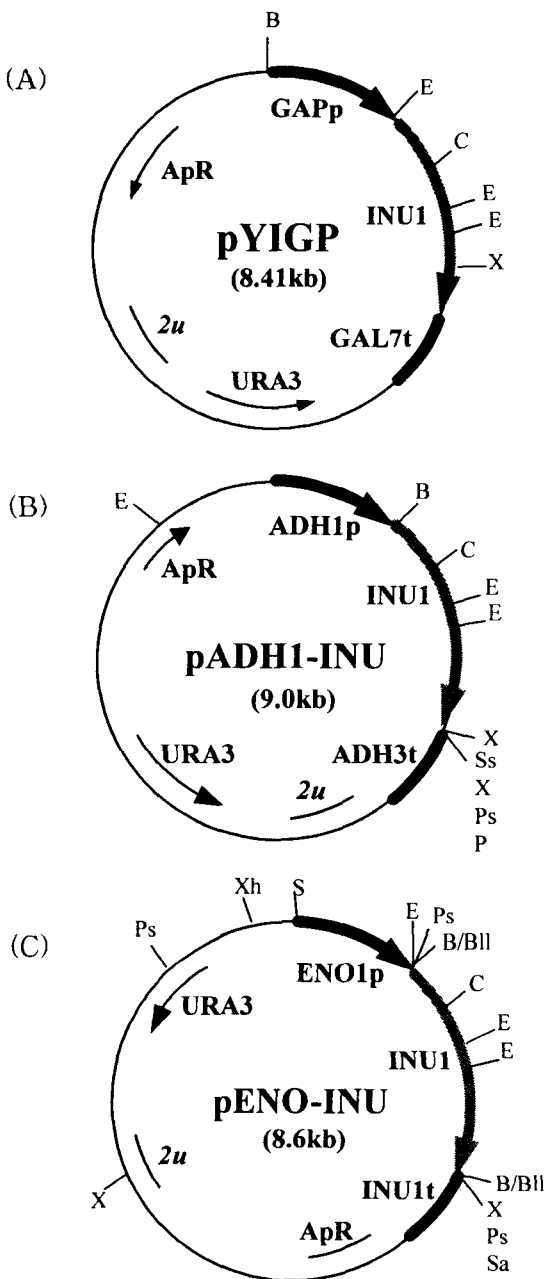


Fig. 1. Schematic diagram of pYIGP (A), pADH1-INU (B), and pENO-INU (C) plasmids. Restriction enzyme sites; B, *Bam*HI; Bll, *Bgl*II; C, *Clal*; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pvu*I; Ps, *Pst*I; S, *Sal*I; Sa, *Sac*I; Ss, *Sst*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I.

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 [14], 이 분획과 배양상등액을 사용하여 inulinase 활성을 측정하였다. Inulinase 활성은 1.5% inulin (Jerusalem artichoke, Sigma)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)는 각 효소 활성을 세포농도 (OD<sub>600</sub>)로 나누어서 계산하였다. 효소 활성 측정시 환원당의 정량은 DNS 방법 [9]을 사용하였다.

결과 및 고찰

효모 형질전환체의 선별

*S. cerevisiae*의 대표적인 구성적 promoter로 *GAPDH*, *ADH1* 및 *ENO1*를 사용하고 이들 promoter 하류에 *INU1*의 ORF를 in frame으로 연결한 각각의 plasmid pYIGP (8.41kb), pADH1-INU (9.0kb) 및 pENO-INU (8.6kb)를 구축하였다 (Fig. 1). 이때 *INU1* 하류에는 *GAL7*, *ADH3* 및 *INU1* 유래의 전사종결자 (terminator)가 각각 사용되었다

pYIGP, pADH1-INU, pENO-INU plasmid를 SEY2102 균주에 형질전환시킨 후 uracil 결핍 최소배지인 SD 평판배지에서 형질전환체를 1차 선별하였다. 형질전환 균주들을 sucrose 함유 평판배지에서 inulinase 활성 염색으로 2차 선별한 뒤 inulinase 발현정도를 비교하였다 (Fig. 2). 숙주세포인 SEY2102에서는 적색환이 전혀 나타나지 않았고 재조합 균주들은 모두 sucrose 분해활성을 나타내었으며, SEY2102/pYIGP 균주에서 가장 크고 진한 적색환이 관찰되었다.

균체증식과 INU1 발현

2차 선별된 효모 형질전환체들을 이용하여 초기 포도당 농도를 2%와 4%로 달리한 YP 배지에서 72시간 배양하여 균체증식, 포도당 소모 및 균체의 inulinase 활성 (발현량) 등을 조사하였다 (Fig. 3과 Fig. 4).

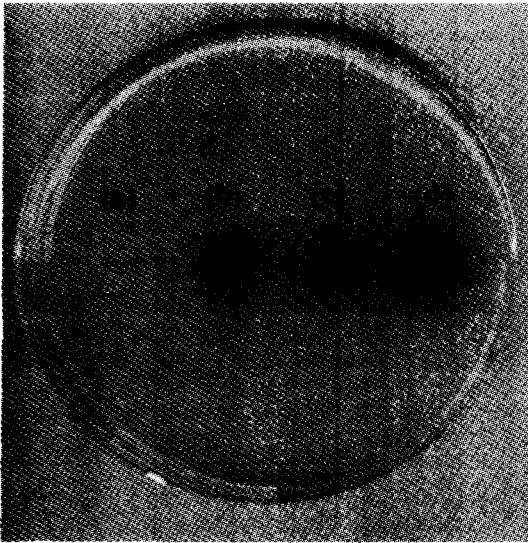


Fig. 2. Active staining of inulinase expressed by yeast transformants which were grown on YP plus sucrose medium.

- (a) *S. cerevisiae* SEY2102 host cell
- (b) *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pADH1-INU plasmid
- (c) *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pENO-INU plasmid
- (d) *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pYIGP plasmid

2% 포도당배지에서는 포도당 고갈이 일어나는 12시간까지 균체증식은 활발하며, inulinase 발현은 36-48시간까지 계속되었다. 4% 포도당배지에서는 배양 24시간만에 포도당의 고갈이 일어났으며, inulinase 발현은 배양초기부터 시작되어 배양말기인 72시간까지 지속적으로 일어났다. 모든 균주들은 배양 12시간까지 대수증식기를 보이다가 포도당 농도에 관계없이 12시간 이후부터는 정지기에 들어갔으며, 정지기에서도 느리지만 균체증식은 계속되었다. 포도당 고갈 후에 일어나는 균체증식은 생성된 에탄올을 세포가 탄소원으로 이용하기 때문으로 보여지며 [12], inulinase 발현이 정지기에도 계속되는 이유는 본 연구에 사용한 구성적 promoter의 특성인 growth-associated expression (균체증식이 일어나는 한 유전자 발현도 지속) 때문으로 사료된다 [11]. 또한, 4% 포도당에서의 세포농도가 2% 포도당 때보다 크게 증가하지 않은 이유는 에탄올과 같은 부산물의 생성때문으로 생각된다. 그러나, inulinase 발현량 (활성)은 ADH1 promoter 계를 제외하고 GAPDH와 ENO1 promoter의 경우 약 2배 정도 증가함을

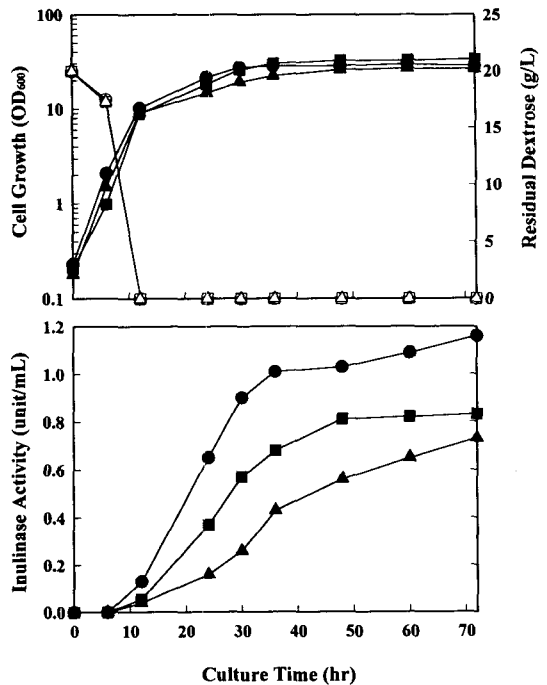


Fig. 3. Effects of constitutive promoters on cell growth and inulinase expression on YP plus 2% dextrose medium.

Symbols: (○,●), SEY2102/pYIGP; (□,■), SEY2102/pADH1-INU; (△,▲), SEY2102/pENO-INU. Open symbols are the concentration of residual dextrose.

알 수 있다. 이와 같이 구성적 발현계에서 균체농도와 유전자 발현량과의 정확한 비례관계가 성립하지 않음은 *Clostridium endoglucanase*와 mouse  $\alpha$ -amylase의 *S. cerevisiae*에서의 발현에서도 관찰된 바 있다 [11, 15].

#### 단위균체농도당 Inulinase 활성의 변화

포도당 농도에 따른 구성적 promoter의 강도 (발현능)을 정확히 분석하기 위해 단위균체농도당 inulinase 활성 즉, 비활성의 경시변화를 GAPDH, ADH1 및 ENO1 promoter 발현계별로 조사하였다 (Fig. 5). 배양 60시간때 inulinase 활성의 세포내의 분포 (또는 분비효율)를 조사하면 약 95%의 활성이 세포외에서 측정되었기 때문에 (Table 1과 Table 2) 비활성은 세포외로 분비된 inulinase 활성을 기준으로 계산하였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 GAPDH와 ENO1 promoter

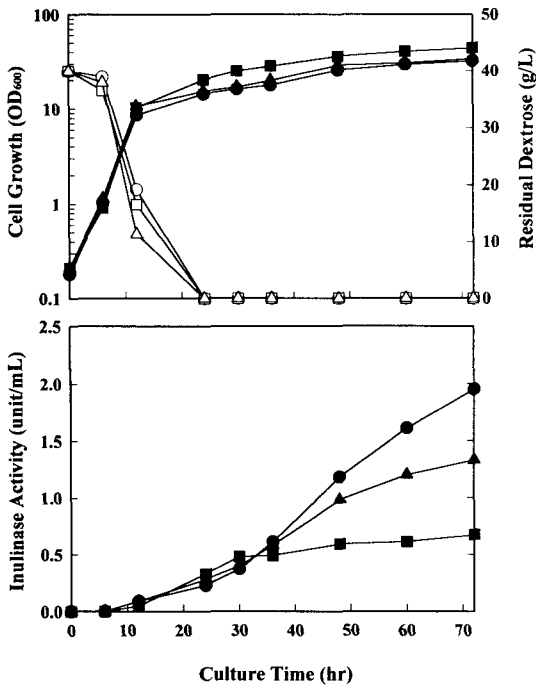


Fig. 4. Effects of constitutive promoters on cell growth and inulinase expression on YP plus 4% dextrose medium. Symbols are the same as in Fig. 3.

계의 경우 배양 후기 (정지기 이후)에서도 비활성 증가가 계속되지만 *ADH1* promoter계의 경우에는 정지기 이후 비활성 변화가 거의 없었다. 4% 포도당 농도에서 배양 40 시간 이후 비활성은 *GAPDH* promoter계에서 가장 현저하게 증가하였으며, *ADH1* promoter계의 경우는 오히려 약간 감소하였다. 이는 에탄올 소모기간에서도 *GAPDH* promoter가 가장 발현능이 우수함을 시사한다.

배양 60시간때의 결과 (Table 1과 Table 2)로 보면 *GAPDH*와 *ENO1* promoter계의 경우 포도당 농도가 2% 보다 4%일 때 약 63% 정도의 비활성 증가를 나타내었다. 하지만 *ADH1* promoter의 경우는 오히려 비활성이 약 40% 감소하였다. 이러한 결과는 promoter 특성의 차이로 *GAPDH*와 *ENO1* promoter의 경우에는 초기의 높은 포도당 농도에 따른 에탄올의 과생산이 inulinase의 발현에는 크게 영향을 미치지 않음으로 추정되며, *ADH1* promoter의 경우는 에탄올에 의한 발현능 (전사능력) 저해가 매우 심각함을 나타낸다. 실제로 *ADH1* promoter를 이용한 *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase 발현에서 에탄올 소모기간에서 *ADH1* promoter의 활성 (전사능)은 감소함이 보고되었다 [17].

이상으로 inulinase의 구성적 발현은 초기 포도당 농도에 관계없이 *GAPDH* promoter를 이용했을 때가 *ADH1*과

Table 1. Comparison of cell growth, plasmid stability, and inulinase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYIGP, SEY2102/pADH1-INU, and SEY2102/pENO-INU after 60 hr cultivation on YP plus 2% dextrose medium

Strains	Cell Growth (OD <sub>600</sub> )	Plasmid Stability (%)	Inulinase Activity (unit/mL)		Specific Activity (unit/mL/OD <sub>600</sub> )
			Medium	Cell	
SEY2102/pYIGP	29.6	35	1.09	0.02	0.037
SEY2102/pADH1-INU	32.4	98	0.82	0.06	0.025
SEY2102/pENO-INU	26.7	91	0.65	0.03	0.024

Table 2. Comparison of cell growth, plasmid stability, and inulinase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYIGP, SEY2102/pADH1-INU, and SEY2102/pENO-INU after 60 hr cultivation on YP plus 4% dextrose medium

Strains	Cell Growth (OD <sub>600</sub> )	Plasmid Stability (%)	Inulinase Activity (unit/mL)		Specific Activity (unit/mL/OD <sub>600</sub> )
			Medium	Cell	
SEY2102/pYIGP	32.1	33	1.95	0.05	0.061
SEY2102/pADH1-INU	43.9	99	0.67	0.04	0.015
SEY2102/pENO-INU	33.7	81	1.33	0.07	0.039

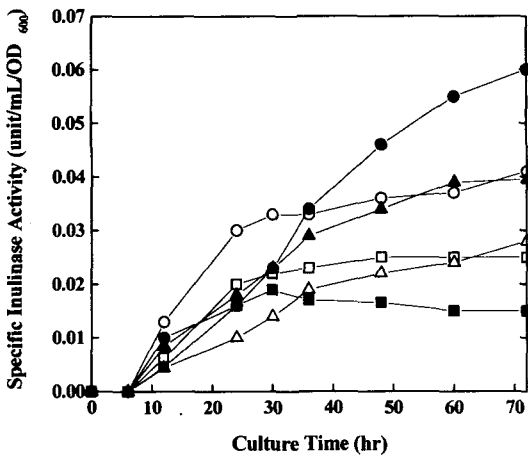


Fig. 5. Time courses of specific inulinase activity on 2% or 4% dextrose medium.  
 Symbols: (○,●), SEY2102/pYIGP; (□,■), SEY2102/pADH1-INU; (△,▲), SEY2102/pENO-INU. Open symbols, 2% dextrose; closed symbols, 4% dextrose.

ENO1 promoter 경우보다 훨씬 더 우수함을 알 수 있었다. 그러나, plasmid 안정성 측면에서는 ADH1과 ENO1 promoter 발현계가 GAPDH promoter 경우의 34%보다 훨씬 뛰어난 80% 이상을 보였다. 결론적으로 높은 포도당 농도에서 구성적 promoter의 활성 (발현능)은 GAPDH, ENO1, ADH1 promoter 순으로 나타났지만, 초기 포도당 농도가 높을 때나 에탄올 생산이 심각한 유가식 배양에서는 ENO1 promoter가 inulinase의 구성적 발현·생산에 더 적합할 것으로 사료된다.

### 요 약

*S. cerevisiae*의 대표적인 구성적 promoter로 GAPDH, ADH1 및 ENO1를 사용하고 이들 promoter 하류에 INU1의 ORF를 in frame으로 연결한 각각의 plasmid pYIGP, pADH1-INU 및 pENO-INU를 구축하였다. 이들 plasmid를 함유한 재조합 *S. cerevisiae* SEY2102 균주들을 sucrose 함유 평판배지에서 선별한 후, 초기 포도당 농도가 2% 또는 4%인 배지에서 배양했을 때, 모든 균주들은 12시간 이후부터 정지기에 들어갔으며, 정지기에서도 느리지만 균체증식과 inulinase 발현은 계속되었다. 4% 포도당 배지에서 inulinase 총발현량은 ADH1 promoter 계를 제외하고

GAPDH와 ENO1 promoter의 경우 2% 포도당 배지 때 보다 약 2배 증가한 2.0 unit/mL과 1.4 unit/mL를 각각 보였다. 단위균체농도당 inulinase 활성 즉, 비활성은 GAPDH와 ENO1 promoter계의 경우 포도당 농도가 4%일 때 2% 때보다 약 63% 정도의 비활성 증가를 나타내었다. 하지만 ADH1 promoter의 경우는 오히려 비활성이 약 40% 감소하였다. 그러나, plasmid 안정성 측면에서는 ADH1과 ENO1 promoter 발현계가 GAPDH promoter 경우의 34%보다 훨씬 뛰어난 80% 이상을 보였다. 결론적으로 높은 포도당 농도에서 구성적 promoter의 활성 (발현능)은 GAPDH, ENO1, ADH1 promoter 순으로 나타났지만, 초기 포도당 농도가 높을 때나 에탄올 생산이 심각한 유가식 배양에서는 ENO1 promoter가 inulinase의 구성적 발현·생산에 더 적합할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 동의대학교의 1998년도 학술연구조성비의 지원에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Bajpai, P. K. and Bajpai, P. 1991. Cultivation and utilization of Jerusalem artichoke for ethanol, single cell protein, and high-fructose syrup production. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 359-362.
2. Brevnova, E. E., Kozlov, D. G., Efremov, B. D., and Benevolensky, S. V. 1998. Inulase-secreting strain of *Saccharomyces cerevisiae* produces fructose. *Biotechnol. Bioeng.*, **60**, 492-497.
3. Emr, S. D., Schekman, R., Flessel, M. C., and Thorner, J. 1983. An MFA1-SUC2 ( $\alpha$ -factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 7080-7084.
4. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.
5. Kim, B. W., Kim, H. W., and Nam, S. W. 1997. Continuous production of fructose-syrups from inulin by immobilized inulinase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **2**, 90-93.
6. Kim, D. H., Choi, Y. J., Song, S. K., and Yun, J. W.

1997. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 369-371.
7. Ko, J. H. 1987. Studies on the extracellular secretion of proteins in yeast. Ph.D. Thesis, The University of Tokyo.
  8. Laloux, O., Cassart, J. P., Delcour, J., Van Beeumen, J., and Vantenhaute, J. 1991. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Lett.*, **289**, 64-68.
  9. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **55**, 952-959.
  10. Nakamura, T., Ogata, Y., Shitara, A., Nakamura, A., and Ohta, K. 1995. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 164-169.
  11. Nam, S. W., Chung, D. K., and Chung, B. H. 1997. Constitutive expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 430-437.
  12. Nam, S. W., Lim, H. J., Chung, B. H., and Chang, Y. K. 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.
  13. Nam, S. W., Woo, M. H., Kim, B. M., Chung, B. H., and Park, Y. H. 1994. Expression and localization of inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 152-157.
  14. Nam, S. W., Yoda, K., and Yamasaki, M. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, **15**, 1049-1054.
  15. Park, Y. S., Shiba, S., Iijima, S., Kobayashi, T., and Hishinuma, F. 1993. Comparison of three different promoter systems for secretory  $\alpha$ -amylase production in fed-batch cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 854-861.
  16. Romanos, M. A., Scorer, C. A., and Clare, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, **8**, 423-488.
  17. Ruohonen, L., Aalto, M. K., and Keranen, S. 1995. Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *J. Biotechnol.*, **39**, 193-203.
  18. Sakurai, H., Yokota, A., Sumita, Y., Mori, Y., Matsui, H., and Tomita, F. 1997. Metabolism of DFAIII by *Arthrobacter* sp. H65-7: purification and properties of a DFAIII hydrolysis enzyme (DFAIIIase). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 989-993.
  19. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
  20. Tantirungkij, M., Nakashima, N., Seki, T., and Yoshoda, T. 1993. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 83-88.
  21. Vernet, T., Dignard, D., and Thomas, D. Y. 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene*, **52**, 225-233.