

Glycine 첨가에 의한 *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 유래 제조합 levansucrase 효소의 세포 외 분비촉진 효과

† 김 승 환 · 장 은 경 · 김 인 환 · ¹장 기 호 · ²강 순 아 · 장 병 일
(주) 리얼바이오텍, ¹삼척대학교 바이오식품공학과, ²경희대 동서의학대학원
(접수 : 2003. 6. 30. 게재승인 : 2003. 8. 27.)

Effect of Glycine Supplement on Extracellular Secretion of Levansucrase from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 in Recombinant *Escherichia coli*

Seung-Hwan Kim†, Eun-Kyung Jang, In-Hwan Kim, Ki-Hyo Jang¹, Soon Ah Kang², and Byung-il Chang
RealBioTech Co. Ltd, 6-13 Walsan-ri, Nam-myeon, Yeongi-gun, Chungnam 339-820, Korea

¹Department of Bio-Food Science and Technology, Samcheok National University, Kangwon 245-711, Korea

²Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung-Hee University, Hoeki-Dong 1,
Dongdanemooon-Ku, Seoul 130-701, Korea

(Received : 2003. 6. 30. Accepted : 2003. 8. 27.)

The addition of glycine up to 0.5% (w/v) to Luria broth (LB) media on the secretion of levansucrase in a recombinant strain *Escherichia coli* JM109/pUPLK1 was observed to enhance the release of periplasmic proteins from the cell to the broth, without significantly affecting the cell growth rate and protein productivity. However, the glycine concentration at 1% (w/v), the cell density attainable at the stationary phase fell to about 50% and the extracellular activity of levansucrase corresponded to about 80% of the total (extracellular plus intracellular) activity and increased by 2.6-fold, comparing to the cells grown in the absence of glycine. The increased pH at stationary phase accelerated the degradation of levansucrase. Maximal extracellular activity was attained when 1% glycine was supplemented at the onset of strain growth.

Key Words : glycine, levansucrase, extracellular, supplement

서 론

Levansucrase (sucrase:2,6-β-D-fructan 6-β-D-fructotransferase; EC 2.4.1.10.)는 과당전이반응을 촉매하여 자당으로부터 levan을 형성하는 효소이다. 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(1). Levan은 새로운 생물소재로 화장품 보습제, 장내세균 개선제, 식이섬유 원료, 사료첨가제 등으로 사용될 수 있으며, 나아가 의료용 신소재로서 혈장 대용제, 항

종양제, 면역증강제로 이용될 수 있음이 보고되었다(2). 그러나 기존의 미생물 발효법을 이용한 생산공정은 낮은 생산수율과 낮은 levansucrase의 발현, 부산물의 생성 등이 문제였다(3). 이런 문제를 극복하기 위해 본 연구자들은 *Z. mobilis*(4), *R. aquatilis*(5), 그리고 *Pseudomonas aurantiaca*(6)으로부터 levansucrase gene을 분리하여 대장균에서 발현시켜 효소를 생산하였으며, 이를 이용하여 레반을 생성하는 새로운 효소 공정을 개발하였다(4-6). *R. aquatilis*와 *Z. mobilis*의 wild type 균주들은 levansucrase를 세포막 (outer membrane)이나 배양액으로 분비하지만(1, 7), 이들 유전자를 *E. coli*에서 발현시켰을 때는 levansucrase는 대부분 균체 내에 존재하였다. 일반적으로, *E. coli*에서는 toxins과 hemolysins과 같은 몇몇의 단백질을 제외하면 제조합 단백질은 세포 외로 분비되지 않고 균체 내에 축적된다(4, 8, 9). 균체 내 단백질을 세포 외로 추출하기 위하여 많은 에너지를 요구하는 milling, sonication 방법으로 세포를 파쇄시키는 방법이 많이 사용되고 있다. 다른

† Corresponding Author : RealBioTech Co. Ltd, 6-13 Walsan-ri, Nam-myeon, Yeongi-gun, Chungnam 339-820, Korea
Tel & Fax : +82-41-864-3172
E-mail : rbt@realbio.com

한편으로는 균체의 파쇄 공정없이 발효 중 배양액으로 분비시키기 위해 화학첨가제로 세포막의 투과성을 증가시켜 단백질을 분비시키는 연구가 되어왔다(10-12). 재조합 단백질의 균체 외 생산에는, glycine을 배지에 첨가하거나(13-16), *Bacillus species*의 단백질 분비시스템을 이용하는 방법(10, 17) 등이 연구되어 왔다. Glycine을 배지에 첨가하는 방법은 비교적 쉽게 적용할 수 있는 방법으로, α -amylase 등의 재조합 단백질의 균체 외 생산에 적용한 예가 있다(18). 본 연구에서는 *E. coli*에서 재조합 levansucrase의 균체 외 분비를 향상시키기 위한 glycine 첨가의 효과 및 첨가 조건에 대한 최적조건을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 실험에 사용한 균주는 *P. aurantiaca* S-4380 유래의 levansucrase를 생산하는 유전자 *lscA*를 가진 plasmid pUPLK1이 도입된 *E. coli* JM109/pUPLK1이다. *E. coli* 생육 배지로는 LB 배지를 기본 배지로 50 mg/L의 ampicillin 첨가하여 사용하였고 필요에 따라 glycine과 탄소원으로 glycerol을 첨가하였다.

배양방법

재조합 *E. coli* JM109/pUPLK1를 50 mg/L ampicillin을 함유한 LB 배지에서 37°C, 150 rpm 조건으로 진탕배양기에서 10 시간 전 배양을 하였다. 전 배양액을 500 mL baffled flask의 배양액 150 mL에 2% (v/v) 접종한 후 33°C, 150 rpm 조건으로 배양하였다. 발효조 배양은 5 L 발효조 (KF-5L, 한국발효기)를 사용하였고, 조업용량 3 L에, 전 배양액 2% 접종하였으며 공기는 1 vvm으로 공급하였다. 교반속도는 300 rpm, pH는 2N HCl과 28% NH₄OH로 6.9~7.0 범위로 유지시켰다. Antiform (Sigma, USA)을 초기에 약 50 μ L/L로 첨가하여 거품발생을 억제시켰으며, 필요에 따라 배양 중 glycine을 첨가하였다.

분석방법

Levansucrase의 활성은 O'Mullan 등의 방법(19)에 따라 서당 (sucrose) 가수분해로 생성되는 포도당 생성속도로 나타내었다. 세포 외로 분비된 효소는 원심분리한 후 상등액의 효소활성을 측정하였으며, 세포 내 효소 활성은 1 mL의 배양을 회수한 다음 원심분리하여 균체를 획득하고, 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)로 2회 세척한 다음 동량의 buffer를 채운 후 초음파 파쇄기로 균체를 파쇄하였다. 균체 파쇄액을 1000 rpm에서 원심분리 후 상등액을 효소활성측정에 사용하였다. 효소활성 측정을 위하여, 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.0), 1% 설탕용액, 균체파쇄액 등 900 μ L의 혼합액을 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응종료 후 유리된 포도당 농도는 포도당 분석 kit (510-A, Glucose, Sigma, USA)을 사용하여 분석하였다. 효소활성 1 unit은 1분 동안 1 μ mol의 포도당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질의 정량은 ovalbumin을 표준시료로 하여 시판 중인 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA)로 정량하였다.

시료 100 μ L에 Coomassie Blue 용액 5 mL을 가하여 섞어준 후 20분간 실온에 방치하고 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선과 비교하여 정량하였다. 효소의 발현량을 측정하기 위해 SDS-PAGE를 Laemmli 방법(20)에 의하여 행하였다.

결과 및 고찰

Glycine의 농도별 첨가가 균체성장에 미치는 영향

Glycine을 배지에 첨가하면 세포의 성장을 저해하는 특성은 있으나, glycine이 세포막에 작용하여 cytoplasm에 존재하는 단백질을 periplasm 또는 세포 밖으로 분비시켜주는 기능이 있다고 알려져 있다(12-16). Jang 등(6)의 선행연구에 의하면, 본 실험에 사용한 재조합 균주는, levansucrase 유전자의 promoter region과 structural region 이외에도 발현된 단백질을 분비를 촉진하는 signal peptide를 가지고 있어 균주가 생산한 효소가 배양액으로 분비가 가능하다고 보고하였다. 본 실험은 재조합된 균주의 자체 promoter를 이용하여 induction 없이 효소를 발현시켰으며, glycine농도를 0%에서 1.5%까지 첨가하여 세포 성장과 효소의 세포외 분비정도를 알아보았다.

Fig. 1과 Table 1에서와 같이 glycine이 없는 배지에서는 생성된 효소활성의 일부만만이 균체 외로 분비되어, 배양 후 30 시간까지 전체 효소활성과 균체 외 효소활성이 함께 증가하고 30시간 이후에는 감소하는 경향을 나타냈다. 전체효소활성에서 차지하는 균체 외로 분비된 효소의 비율은 배양시간에 따라 약간의 차이를 보이나, 24시간에서는 42%, 30시간에서는 17%, 36시간에서는 15%, 48시간에서는 11%로 나타나, 생성된 효소의 대부분이 균체 내에 존재하였다. 이러한 결과는 *E. coli* JM109/pUPLK1에 존재하는 단백질 secretion 능력이 재조합 levansucrase의 발현량을 균체 밖으로 분비시키기에는 부족함을 나타낸다. 한편, 균체의 성장배지에 glycine을 첨가하였을 때는, 배지 내 glycine 농도가 높아질수록 농도 의존적으로 균주 성장 저해가 나타났다. 균체 배양시 균주의 최대 성장은 glycine을 첨가하지 않았을 때로, OD₆₀₀ nm에서 측정된 균체 흡광도는 3.8이지만 0.1%일 때 3.2, 0.5%일 때 2.5, 1.0%일 때는 1.5로 나타났다. Jang 등(23)은 glycine을 0.5% 농도로 첨가하였을 때 세포의 증식에는 영향이 없고 2% 이상 첨가할 때 90% 이상의 세포 증식이 억제된다고 보고하여, 본 실험의 결과와 다소 차이를 나타낸다. 이것은 실험에 사용한 host cell의 종류와 재조합된 유전자의 종류에 따라 glycine 첨가가 세포의 증식에 다르게 영향을 주는 것으로 생각되어 진다. 본 연구에서는, 균체 외로 분비된 효소 활성은 glycine 농도가 높아질수록 함께 상승하여 0%일 때는 25 U/mL, 0.1%일 때는 55 U/mL, 0.5%일 때는 60 U/mL이었고 1.0%일 때는 80 U/mL였다. 그러나 glycine이 1.0% 이상 첨가 시에는 세포가 저해를 받아 30시간 이상의 긴 lag phase을 나타낸 후 조금씩 성장하였다. 배지 내에 glycine을 첨가하지 않았을 때에 비교하여, 1.0% 첨가했을 때는 80 U/mL으로 활성이 3배 정도 증가하였으며 이 활성은 전체 효소활성의 80% 정도에 해당하였다. 위의 결과는 Aristidou 등(15)이 배지 내에 glycine 1% 이상 첨가시 periplasm에 존재하는 protein이 배양액으로 분비된다는 내용

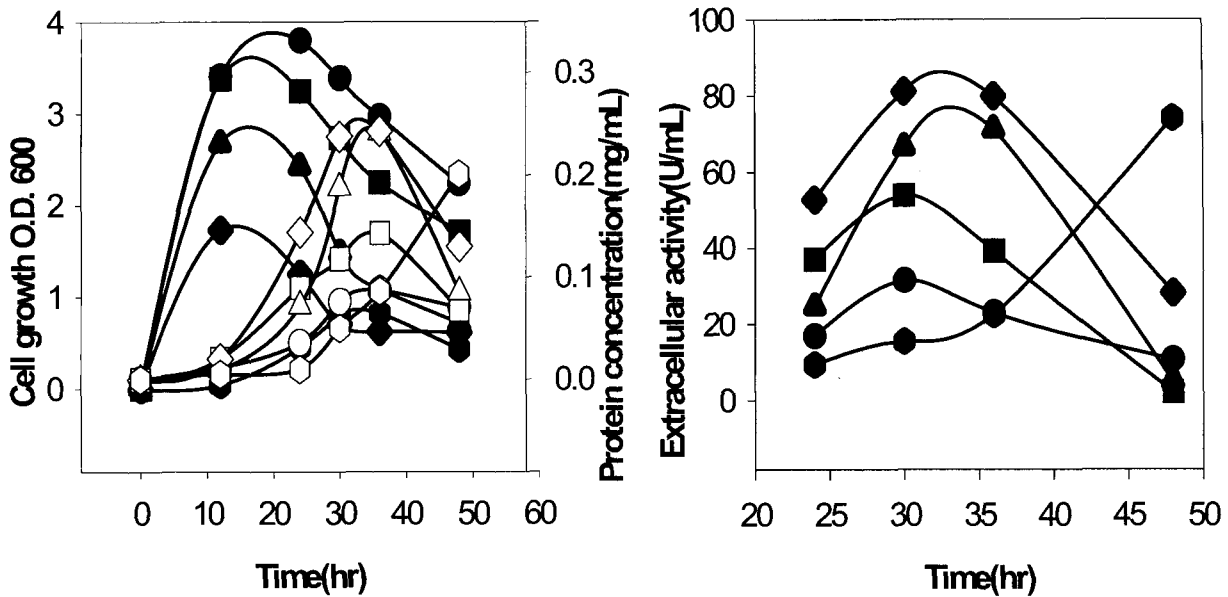


Figure 1. Effect of glycine concentration on cell growth and extracellular protein excretion. Open symbol, protein concentration; close symbol, Optical density. ○; 0%, □; 0.1%, △; 0.5%, ◇; 1.0%, ○; 1.5%

과 일치하는 결과를 나타내었다.

Levansucrase의 균체의 분비

배지에 glycine 농도를 0%에서 1.5%까지 첨가하여 효소의 세포 외 분비정도를 알아 본 결과(Table 1), glycine 농도가 1.0%까지 높아질수록 세포 외로 levansucrase 분비량이 많아지는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 glycine 첨가 농도가 낮을수록 같은 배양시간에 세포 내에 levansucrase가 축적됨을 확인하였다. 세포에 의해 생성되는 총 효소 활성도는 Table 1과 같이 glycine 첨가량이 0%일 때 189.5 U/mL, 0.5%일 때 135.6 U/mL, 1.5%일 때 97.6 U/mL로 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다. 배양 시 세포 외 levansucrase 최대 활성은 glycine을 1.0%를 첨가 시 배양 30 시간에 효소활성이 81.1 U/mL에 도달하였고, 세포 내에서는 glycine을 첨가하지 않았을 때 배양 30 시간에 158 U/mL로 최대효소 활성을 나타내었다(Table 1). 이 결과는 glycine을 첨가하지 않았을 때 균주 성장의 저해가

없어 전체적으로 세포의 증식에 따른 총 효소활성도가 증가함을 나타낸다. 효소의 세포외 분비 정도는 SDS-PAGE를 이용하여 효소가 세포 외로 분비됨을 확인하였다(Fig. 2). Glycine을 0.5% 이상 첨가 시, 배양시간이 증가하면서 세포내부에 남아있던 단백질이 배양액으로 분비됨을 알 수 있었다. Song 등(14)은 배양시간이 증가하면서 levansucrase가 응집되어 inclusion body를 형성되고, 효소활성은 감소되는 것을 보고하였다. 본 실험결과에서는 배양시간이 증가하여도 세포 내 inclusion body는 형성은 관찰할 수 없었으며, 배양시간에 따른 배양액의 pH가 알칼리성 pH를 나타내는 것을 확인하였다. Song 등(14)의 선행연구에서는 배양액의 pH에 대한 언급이 없으므로, 선행연구와 본 연구의 직접적인 비교는 어렵지만, 본 연구에서 나타난(Table 1) 배양 36시간 이후 효소의 활성이 급격히 감소하는 것은 배양액의 pH가 증가의 영향으로 기인한 것으로 사료된다.

Table 1. Effect of glycine supplement on levansucrase production and excretion to fermentation broth

Time(hr)	Extracellular activity (U/mL)				
	0% ¹⁾	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%
24	16.9	37.0	24.6	52.7	9.45
30	31.5	54.0	66.6	81.1	15.5
36	23.0	39.2	71.2	79.9	22.5
48	10.8	2.3	5.0	28.2	74.1
Intracellular activity (U/mL)					
24	23.9	142.1	109	47.8	6.48
30	158.0	118.3	68.5	16.3	25.7
36	128.2	74.7	12.4	5.4	28.2
48	92.0	30.3	2.5	1.3	23.5

¹⁾ Cells were grown in the presence of various concentration(w/v) of glycine in the growth medium.

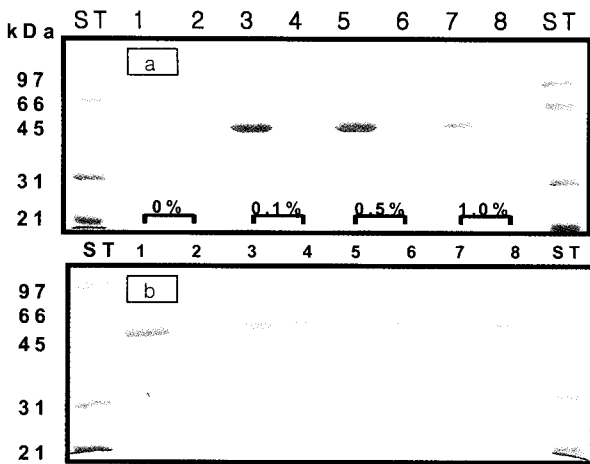


Figure 2. SDS-PAGE analysis of levansucrase expressed in *E. coli* JM109/pUPLK1 grown in glycine medium and harvested at 24 hr in incubation (a) and 38 hr in incubation (b). Lanes 1,3,5,7, intracellular fractions; lanes 2, 4, 6, 8, extracellular fractions. Lanes 1-2, 0% glycine; lanes 3-4, 0.1% glycine; lanes 5-6, 0.5% glycine; lanes 7-8, 1.0% glycine. ST : protein standard maker.

균체 성장시기에 따른 glycine 첨가 효과

Hammers 등(22)은 균주의 성장억제에 대한 glycine의 작용은 세포가 성장시 glycine이 nucleotide-activated peptidoglycan 전구체와 결합하여 세포벽의 구성성분을 변화시키고, 이러한 변화는 세포의 형태를 변화시킨다고 보고하였다. 이 점에 착안하여 glycine을 균체의 다른 세포성장시기에 따라 배지에 첨가하면서 단백질의 균체의 분비정도를 분석하였다. *E. coli* JM109/pUPLK1 균주를 LB 배지에서 배양할 때, 성장 단계인 유도기, 대수 증식기, 정지기 별로 glycine 1%를 첨가하여 효소의 세포외 분비 정도를 측정하였다. 그 결과 배양초기에 glycine을 첨가했을 때 최고 세포 성장율은 흡광도가 OD₆₀₀

1.27이며, 유도기에서 OD₆₀₀ 1.46, 대수증식기에서 OD₆₀₀ 2.12, 정지기에서 OD₆₀₀ 3.15에 도달하였으며, glycine이 균주의 성장을 크게 저해함을 알 수 있었고(Fig. 3). 세포 외효소의 분비정도는 배양 초기에 glycine을 첨가하였을 때 80 U/ml로 가장 높게 나타났다.

Induction 효과

E. coli JM109/pUPLK1은 *P. aurantiaca* 유래의 levansucrase의 유전자를 가지고 있기 때문에 IPTG나 lactose의 induction 없이도 효소를 생산된다고 보고되었다(6). 그리고 *P. aurantiaca* 유래 promoter와 plasmid 자체가 가지고 있는 lac promoter를 가지고 있기 때문에 IPTG나 lactose로 induction 했을 때 두 개의 promoter가 동시에 작동하여 효소 발현량을 증가시킬 수 있는지를 조사하였다. 균체의 성장이 OD₆₀₀ 0.6에 도달하였을 때 IPTG (0.5 mM) 또는 lactose (0.1%)를 배지에 첨가하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 세포의 배양 시간별 생육 정도는 glycine을 첨가하지 않았을 때는 흡광도가 최고 OD₆₀₀ 4.0까지 증가하였지만, 나머지 균 (glycine 1%, glycine 1% /IPTG, glycine 1% /lactose)에서는 세포생육도가 OD₆₀₀ 2.2 정도로 매우 유사한 결과를 보였다. Induction 효과는 효소의 발현량과 연관성이 없는 것으로 보아 2개의 promoter가 동시에 작동하지 않는 것으로 유추된다. 한편, glycine 첨가는 효소의 균체의 분비에 영향을 주어서, glycine을 첨가하지 않았을 때는 배양시간 60시간에 22 U/mL 정도였지만, glycine을 첨가하였을 때 배양액에서 최고 90 U/mL 효소활성도를 나타내었다.

Levansucrase 생성과 균체의 분비를 위한 배양조건의 최적화

Levansucrase는 Fig. 1~4의 결과와 같이 발효 말기에 도달하면 급격히 효소활성이 실행되어 최종적으로 어느 정도의

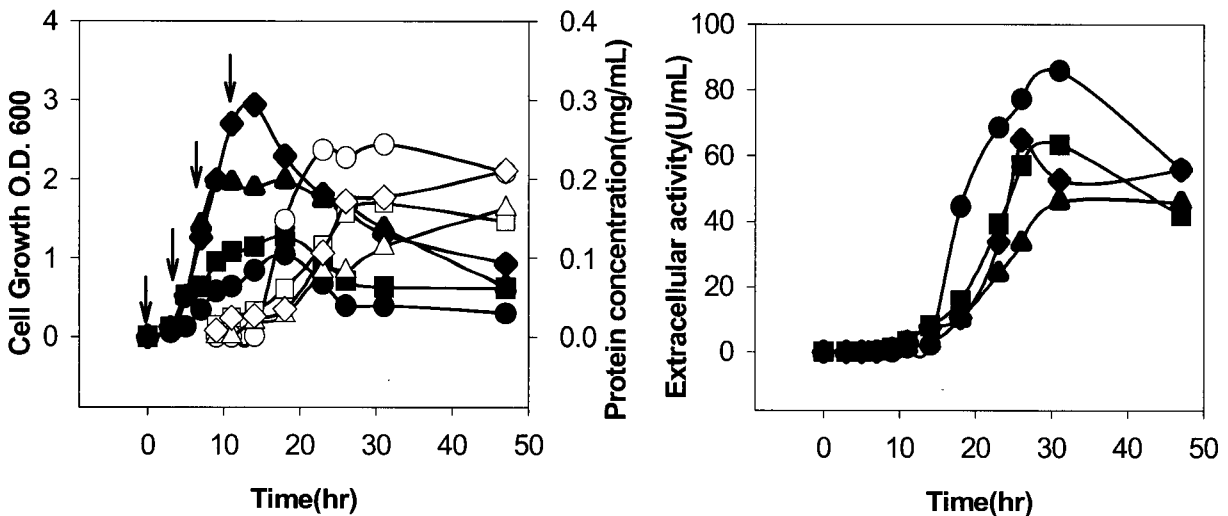


Figure 3. Effect of 1%(w/v) glycine supplement at different growth phase of cell on extracellular protein concentration and extracellular levansucrase activity. open symbol : protein concentration., close symbol : dry cell weight. ○ : Control (cells grown in the absence of glycine), △: Exponential phase, ◇ : Stationary phase, □ : Lag phase. Arrow : Time of adding glycine at different growth phase.

효소가 세포 외로 분비되는지를 알 수 없었다. 이러한 점을 조사하기 위해 levansucrase의 생산을 시간별로 조사하기 위해 LB 배지를 기본으로 하여 1% glycine을 첨가하였으며, 배양온도는 33°C, pH는 6.9-7.0, 300 rpm조건으로 5 L 발효조에서 배양하였다.

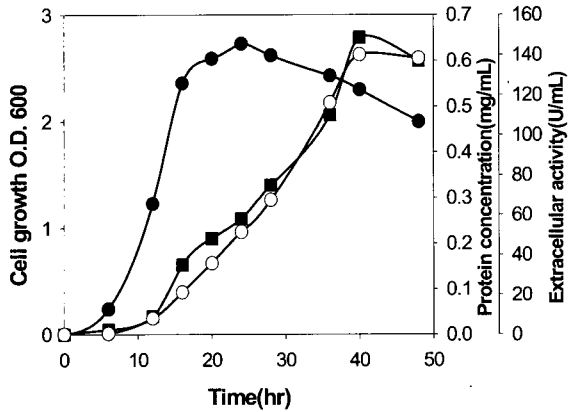


Figure 5. Production of levansucrase in batch culture using 5 L fermentor. Conditions: Temperature, 33°C; pH 6.9~7.0; agitation, 300 rpm; airtion, 1vvm. Symbol : ●: cell growth, ■: protein concentration, ○: extracellular levansucrase activity

그 결과 Fig. 5와 같이 배양시간에 따른 균주의 흡광도는 배양 18시간에 OD₆₀₀ 2.7로 최고에 도달하였으며, 배양액으로 단백질의 분비는 20시간 이후에 급격한 증가를 보였으며, 효소활성도 배양 40시간에 145 U/mL을 나타내었다. 배양말기에 효소활성도가 급격히 떨어지지 않고 유지되는 것을 알 수 있었으며. 이는 배양의 pH를 조절하여 배양말기에 pH가 상승되는 것을 막아 효소의 불활성화를 방지한 결과로 생각된다. Jang 등(23)은 native levansucrase 활성은 pH가 5 정도에서 최고이고, 7.5 이상이면 효소활성이 실패 된다고 보고한 결과하였으며, Aristidou 등(15)은 glycine 첨가에 의한 불안정

한 pH 조건은 세포의 성장과 단백질의 발현에 나쁜 영향을 주고 pH 민감성 단백질의 실패를 촉진시킨다고 보고하였다. 결론적으로, levansucrase의 생산을 위해서는 pH 조절이 필수적이라는 결과를 얻을 수 있었다.

요약

Glycine의 배양액 첨가에 의해 *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 유래 재조합 levansucrase의 세포 외 분비가 촉진되는 것을 알 수 있었다. 배지액에 존재하는 glycine 농도에 비해 의존적으로 균체 내에서 발현된 효소의 분비량이 증가되었고, 세포의 성장은 억제됨을 알 수 있었다. SDS-PAGE 분석 결과 0.5%, 1.0% glycine 첨가로 배양시간이 증가하면서 세포 내의 단백질 배양액으로 분비됨을 알 수 있었다. Levansucrase를 분비시키기 위한 최적화된 조건은 pH를 6.9-7.0으로 조절하면서 1.0% glycine을 배양초기 첨가하였을 때 배양말기에 단백질의 급격한 분해 없이 145 U/mL의 효소 활성도를 나타내었다.

감사

본 연구는 산자부의 공동기술개발사업 (과제번호 00013583)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ohtsuka, K., S. Hino, T. Fukusshima, O. Ozawa, T. Kanematsu, and T. Uchida (1992), Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683, *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1373-1377.
- Han, Y. W. (1990), Microbial levan, *Adv. Appl. Microbiol.* **35**, 171-194.
- Johns, M. R., P. F. Greenfield, and H. W. Doell (1991),

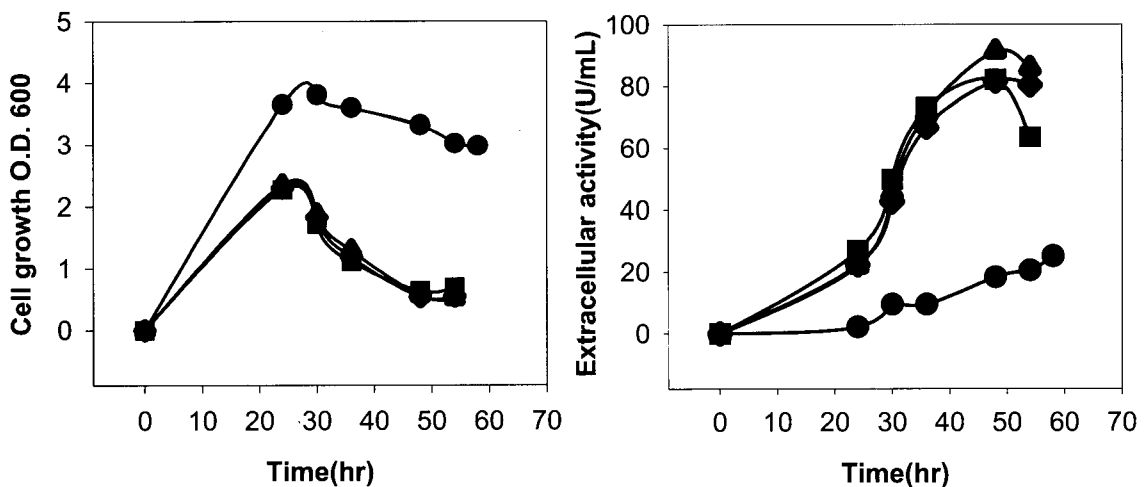


Figure 4. Effect of glycine supplement and induction on cell growth and extracellular levansucrase activity. Symbol : ●: Control (cells grown in the absence of glycine), ■: 1% glycine, ▲: 1% glycine+IPTG, ◆: 1% glycine+lactose.

- Byproducts from *Zymomonas mobilis*, *Advances in Biochem. Eng. Biotech.* **44**, 97-121.
4. 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.
 5. 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**, 106-511.
 6. Jang, E. K., K. H. Jang, I. S. 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.
 7. Kondo, Y., A. Toyoda, H. Fukushi, H. Yanase, K. Tonomura, H. Kawasaki, and T. Sakai (1994), Cloning and characterization of a pair of genes that stimulate the production and secretion of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase and invertase, *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 526-530.
 8. Blight, M. A., C. Chervaux, and I. B. Holland (1994), Protein secretion pathways in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 468-474.
 9. Goebel, W. and J. Hedgpeth (1982), Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **151**, 290-298.
 10. Miyashiro, S., H. Enai, Y. Hirose, and S. Udaka (1980), Effect of glycine and L-isoleucine on protein production by *Bacillus brevis* no 47, *Agric. Biol. Chem.* **44**, 105-112.
 11. Ikura, Y. (1986), Effect of glycine and its derivatives on production and release of β -galactosidase by *Escherichia coli*, *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2747-2753.
 12. Hettwer, D. and H. Wang (1989), Protein release from *Escherichia coli* cells permeabilized with guanidine-HCl and Triton X-100, *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 886-895.
 13. Ariga, O., T. Watari, Y. Andoh, Y. Fujishita, and Y. Sano (1989), Release of thermophilic α -amylase from transformed *Escherichia coli* by addition of glycine, *J. Ferment. Biotechnol.* **25**, 507-512.
 14. Peng, Y., A. Aristos, and K. San (1991), Synergistic effect of glycine and bacteriocin release protein in the release of periplasmic protein in recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* **13**, 311-316.
 15. Aristidou, O., A. Aristos, Y. Peng, and K. San (1993), Effects of glycine supplement on production and release in recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* **15**, 331-336.
 16. Kaderbhai, N., A. Karim, W. Hankey, G. Jenkins, L. Venning, and M. A. Kaderbhai (1997), Glycine-induced extracellular secretion of a recombinant cytochrome expressed in *Echerichia coli*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **25**, 53-61.
 17. Hara, T., Y. Fujio, and S. Ueda (1983), Effect of glycine on extracellular protein production by *Bacillus mesentericus niger*, *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2237-2242.
 18. Zhang, Q., N. Tsukagoshi, S. Miyashiro, and S. Udaka (1983), Increased production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine, *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 293-295.
 19. Song, K. B., H. K. Joo, and S. K. Rhee (1993), Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988), *Biochem. Biophys. Acta.* **1173**, 320-324.
 20. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
 21. Jang, K. H., J. W. Seo, K. B. Song, C. H. Kim, and S. K. Rhee (1999), Extracellular secretion of levansucrase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*, *Bioprocess Eng.* **21**, 453-458.
 22. Hammes, W., K. H. Schleifer, and O. Kandler (1973), Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan, *J. Bacteriol.* **116**, 1029-1053.
 23. Jang, K. H., J. S. Kim, K. B. Song, C. H. Kim, B. H. Chung, and S. H. Rhee (2000), Producton of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite, *Bioprocess Eng.* **153**, 449-453.