大 韓 衛 生 學 會 誌
KOREAN. J. SANITATION
Vol. 5, No. 1, 49~64 (1990)

*Aspergillus niger*가 生産하는 glucoamylase의 精製 및 特性에 관한 硏究

朴玲美兒　廉　錕

檀國大學校 大學院

Purification and Characterization of glucoamylase from *A. niger*

Park Young Mi A · K. Ryeom

Department of Microbiology
Graduate School Dan Kook University

Abstract

Glucoamylase from the culture filtrate of Aspergillus niger was purified by ammonium sulfate precipitation, aceton precipitation, DEAE-cellulose ion exchange chromatography and Sephadex G-50 gel filtration. Glucoamylase was secreted into the medium upon growth on glucose, sucrose or a variety of other hexose sugars or hexose sugar polymers and little or no glucoamylase activity was found when glycerol or xylose was used as the carbon source. The optimum pH and temperature for the maximum enzyme activity were found to be 5.0 and 50℃, respectively. The enzyme was considerably thermostable, for no loss of activity was observed when the enzyme was preincubated at 60℃ for 30 min. The enzyme activity was inhibited by 20 mM of Hg^{2+}, Fe^{2+}. The km value for starch was 0.045%.

Ⅰ. 서 론

glucoamylase(EC 3.2.1.3)는 α-glucosidase의 일종으로 전분이나 glycogen, amylose, amylopectin 그리고 maltose 등을 가수분해하여 glucose 생성시킨다. 이 α-glucosidase에 속하는 효소들은 대개 다당류에서 α-glucoside 결합을 끊어 glucose 나 maltose, dextrin 과 같은 소단위체로 분해시킨다. α-glucosidase 는 그 작용기작 및 작용부위에 따라 몇 종으로 나누어지며 α-amylase 나 β-amylase 가 여기에 속한다.

glucoamylase 는 starch 나 glycogen 같은 다당류의 분해시 다른 α-glucosidase 들보다 더 많은 양의 glucose 를 생성시킨다. 실례로 α-amylase 는 stach 의 가수분해시 13%의 glucose와 87%의 maltose 를 생성하는 반면 glucoamylase 는 92%의 glucose와 8%의 maltose 를 생성한다. 따라서 전분의 당화과정을 필요로 하는 발효공업이나 식품공업에서는 이전에 산처리에 의하던 당화과정이 이 α-glucosidase 를 생산하는 균주를 발효에 사용하는 것으로 대치되고 있으며, 더 높은 효소 생산능을 가지고 있는 균주의 개발에 관심이 모아지고 있다.

glucoamylase 는 세균보다는 효모나 사상균류에 널리 분포하고 있다. Aspergillus niger[4], A. orzae, A. awamori[13], penicillium oxalicum[22], Mucorrouxianus[21] 그리고 Rhizopus sp.[19] 등에서 분리된 바 있으며 이 효소의 생산능으로 인해 이 균들의 전분당화력이 크기 때문에 유기산 발효나 glucose 생산에 많이 이용되고 있다.

glucoamylase 는 전분과 같은 다당류의 비환원 말단 부위에서부터 단계적으로 가수분해하여 전분의 거의 전부를 glucose 로 분해시킬 수 있다.[14] 이 효소는 다당류의 α(1→4), α(1→6), α(1→3)-glucoside 결합에 작용하며 세 결합에서의 가수분해 속도는 차이가 있다.[16] 즉, α(1→3) glucoside 결합에서의 가수분해속도는 α(1→6)결합에서 보다는 두배가 빠르나 α(1→4) 결합에서의 가수분해속도의 단지 7%에 해당한다. 이상의 세 결합에서의 가수분해가 하나의 동일 효소에 의한다는 것이 확인되었다.[15]

많은 학자들에의해 여러 균주로부터 생산되는 glucoamylase 간의 다형성이 서술되었다.[10][13][19][20][21][29] 현재까지 알려진 바로는 A. niger 로부터 생산되는 glucoamylse 는 두 종류의 isozyme, 즉 glucoamylase I(GA I)과 glucoamylase II(GA II)로 존재한다.[10][14][15][16] 이들은 D-mammose, D-glucose 와 D-galactose 와 같은 단당류사슬을 가지고 있는 당단백질로 확인되었으며[17], 이 당들은 효소의 serin 잔기와threonine 잔기의 hyhdroxyl 기에 mannose 가 O-glycosidic 결합을 하고 있다.[11] 이 두 효소들은 적정pH 및 온도, 열안정성 그리고 항원구조면에 있어 별 차이가 없으며 단지 전기영동상의 band 위치와 등전위점 그리고 장기간 상온에 방치할 경우의 안정성면에 있어 약간의 차이를 나타낸다.[10] GA I과 GA II 는 공통의 NH_2말단 polypeptide chain 을 가지고 있으나 COOH 말단 영역에서는 차이를 나타낸다.[2] 이와 유사한 결과를 A. saitoi 로부터 생산되는 glucoamylase M1 과 M2 에서 얻었다. Rhi-

zopus sp.의 glucoamylase isozyme 들은 제한된 단백질 분해로 인하여 polypeptide chain 의 NH_2 말단부분이 다르며[19] A. awamori 의 glucoamylase isozyme 들도 이와 비슷한 경우이다.[6] 이상과 같이 대부분의 진균에서 생산되는 glucoamylase 들은 여러 종류의 isozyme 형태로 존재한다. 이들은 대개 유전자 수준에서보다는 transcription 이나 translation 후에 변형이 일어나는 것으로 알려진다. A. niger 로부터 생산되는 GA I과 GA II 는 mRNA 의 differential splicing 으로 인하며[1] 궁극적으로 이들을 coding 하고 있는 유전자는 하나로 cloning 되었다.

본 논문에서는 A.niger가 생산하는 extracellular glucoamylase 의 일반적인 특성에 관하여 알아보고자 하였다. 따라서 A. niger 가 생산하는 glucoamylase 를 DEAE-Cellulose ion exchange 와 Sephadex G-50 column chromatography를 통하여 부분정제한 후 정제된 효소의 최적 pH 와 온도, 열안정성, 금속ion의 효과 및 기질농도에 따른 효소활성을 조사하였다. 아울러 배지내의 탄소원이 효소유도에 미치는 영향에 관해서도 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험균주 및 배양

본 실험에서 사용한 균주는 Aspergillus niger ATCC32656으로 Sabraud dextrose broth(SDB), Sabraud dextrose agar(SDA)에서 37℃로 6~7일간 배양한 후 포자용액 제조에 사용하였다. 효소용액을 만들기위하여 SDB 20 ml에 1×10^6spore/ml 농도의 포자용액을 접종한 후 24 시간 배양한 다음 500 ml의 SDB에 옮겨 5 일간 더 배양하였다.

2. 탄소원에 따른 효소활성의 변화

Clutterbuck 의 방법[5]에 따라 최소배지를 만든 후 각각 탄소원을 다르게 첨가하였다. 여기에 균을 접종한 후 배양한 다음 배양액의 효소활성을 각각 비교하였다. 탄소원으로는 glucose, sucrose, maltose, starch, xylose 그리고 glycerol 을 각각 2% 농도로 사용하였다.

3. 효소활성도 측정

glucoamylase 의 활성도는 Somogi-Nelson method[18]와 PGO enzyme kit(Sigma)의 두 방법에 의해 측정하였다. 효소활성을 측정하기 위한 반응물의 조성은 다음과 같다. 즉, 2% 의 전분용액 200μl, 1 M acetate buffer(pH 4.6) 50 μl, 그리고 D.W 200 μl 로 이루어진다. 반응혼합물은 50℃에서 30 분간 반응시킨 후 PGO enzyme 2 ml 를 가하여 37℃에서 30 분간 반응시키거나 Somogi-Nelson reagent 를 첨가하여 반응시켰다. PGO enzyme kit 을 사용한 경우 효소활성은 450 nm 에서의 흡광도로 측정하였다. 효소활성의 단위는 가용성 전분을 분해하여 시간당 100 μg 의 glucose 를 생성시킬 수 있는 효소의 양을 1 unit 로 정하였다.

4. 단백질 정량

Bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 하여 Bradford 의 방법[3]으로 정량하였

고 column 에서 분리 용출한 각 분획 단백질의 상대적인 양은 280 nm 에서의 흡광도로 측정하였다.

5. 효소의 분리

Tamaki 의 방법[20]을 변형하여 사용하였다.

1) crude 효소용액의 준비

배양액을 여과하여 균사체는 버리고 그 여과액을 조효소용액으로 사용하였다.

2) ammonium sulfate 분획

균사체를 제거한 여과액을 ammonium sulfate 로 80%까지 포화시킨 후 하루동안 4℃에 방치하였다. 생성된 침전물은 16,000 ×g에서 10 분간 원심분리하여 상등액은 버리고 침전물은 0.01M phosphate buffer(pH 6.8) (P buffer)에 용해시킨 다음 동일 buffer 에서 하룻밤동안 투석하였다.

3) aceton 분획

2)에서 투석시킨 효소용액에 −20℃ aceton 을 aceton 의 최종농도가 70%가 되는 양만큼 천천히 가하여 준다. 생성된 침전물은 2)와 동일한 방법으로 원심분리하여 % 은 후 P buffer 에 녹여 하룻밤동안 동일 buffer 에서 투석하였다.

4) DEAE-Cellulose ion exchange chromatography

DEAE-Cellulose 를 column(1.6×40 cm)에 채운 뒤 P buffer(pH 6.8)로 평형시켰다. 3)에서 투석시킨 효소용액을 column 에 얹고 우선 gel 에 부착되지않는 단백질을 용출시키기 위하여 P buffer 를 흘려 주었다. 더이상 단백질이 용출되지 않으면 1 M 의 NaCl 을 포함하는 P buffer 와 동량의 P buffer 를 사용하여 linear gradient 를 걸어 효소용액을 용출시켰다. 용출속도는 시간당 15 ml 로 3 ml 씩 분획하였다. 효소활성이 높은 분획만 모아 −20℃ aceton 으로 침전시킨 뒤 동일 buffer 에 녹였다. 이를 동일 buffer 에서 하룻밤 투석시킨 후 다음 단계에서 사용하였다.

5) Sephadex G-50 column chromatography

Sephadex G-50 gel 을 column 에 채우고 4)와 같은 방법으로 평형시켰다. 4)에서 투석시킨 효소용액을 column 에 얹고 P buffer 로 시간당 15 ml 의 용출속도로 용출시키고 3 ml 씩 분획하여 받았다. 효소활성이 높은 분획만 모아 4)와 같은 방법으로 농축시킨 후 효소의 일반적인 특성을 조사하는데 사용하였다.

III. 결 과

1. 배양일별로 본 효소활성의 변화

A.niger 가 생산하는 glucoamylase 활성을 배양액으로부터 24 시간 간격으로 측정하였다. 배양한 지 48 시간이 지난후부터 효소활성이 나타났고 배양 5 일째에 최고 활성도(21.30 unit/ml)를 나타내었다(Fig. 1).

2. 효소활성에 미치는 탄소원의 영향

탄소원의 종류에 따라 효소활성을 비교하였다. glucose, sucrose, maltose, starch 같이 6 탄당으로 이루어진 탄소원에서는 효소활성이 나타났으나, glycerol 이나 xylose 에

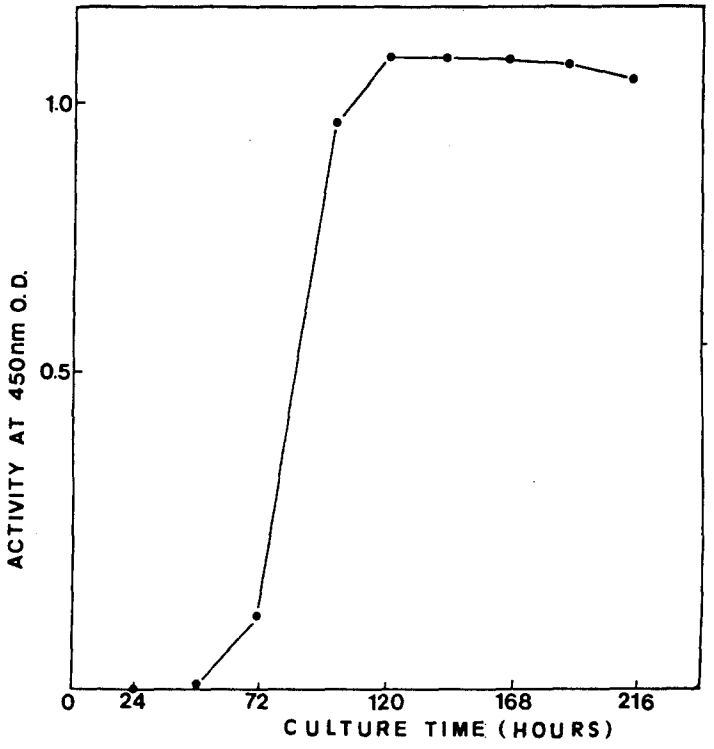

Fig. 1 Time course of the extracellular glucoamylase production

서는 효소활성이 거의 나타나지 않았다. 그러나, 활성을 나타낸 각 탄소원간의 활성도에는 차이가 없었다. 이 결과는 탄소원에 따라 glucoamylase가 유도될 수 있음을 의미한다(Fig. 2).

3. 효소의 분리

배양액을 여과한 여과액(조효소용액)을 ammonium sulfate로 80%분획한 효소용액과 aceton으로 재침전시킨 것의 specific activity는 각각 79.87(unit/mg)과 60.69(unit/mg)이었다. 그리고, DEAE-Cellulose ion exchange column chromatography 결과 NaCl gradient 0.3M에서 0.6M사이에서 효소활성이 높게 나타났다(Fig. 3). fraction

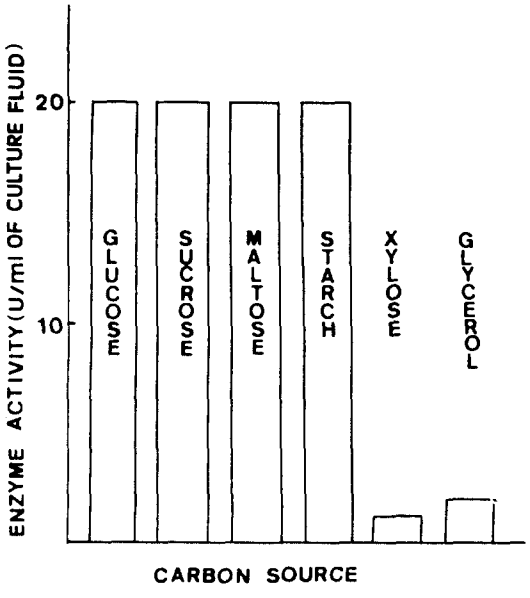

Fig. 2 Effects of carbon sources on the glucoamylase activity

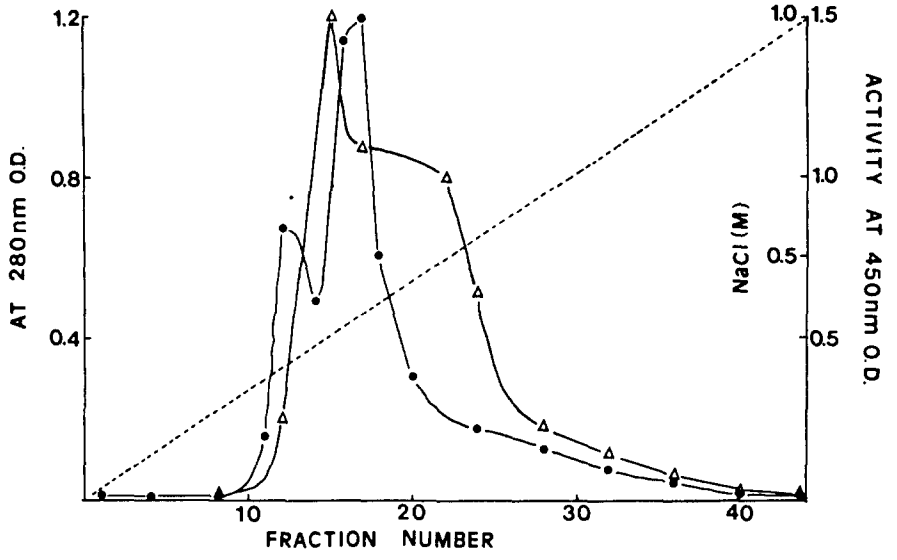

Fig. 3 DEAE-Cellulose column chromatography

The dialyzed enzyme solution obtained step 2 were applied to a column(1.6×40 cm) equilibrated with 0.01 M phosphate buffer, pH 6.8 and eluted of a linear gradient (0-1.0 M) in the same buffer at a flow rate 20 ml per hour, 3 ml being collected.

●——● : absorbance at 280 nm

▲——▲ : enzyme activity

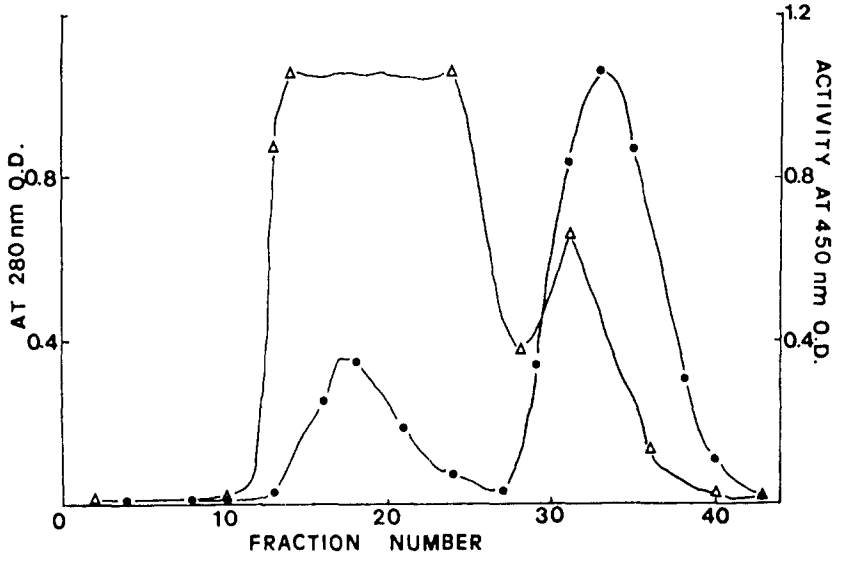

Fig. 4 Sephadex G-50 column chromatography

● ● : absorbance at 280 nm

▲ ▲ : enzyme activity

Table 1 Purification of glucoamylase from A. niger

Purification step	Total vol. (ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Fold	Yield (%)
culture filtrate	400	8070.4	101.04	79.87	1	100
ammonium sulfate	25	506.8	8.35	60.69	0.76	6.28
aceton	20	411.2	6.30	65.27	0.82	5.10
DEAE-Cellulose	10	163.5	1.33	122.93	1.54	2.03
Sephadex G-50	8	177.6	0.34	522.35	6.54	2.20

No.13 에서 24 를 모아 −20℃ aceton 으로 농축한 용액의 specific acivity 는 65.27(unit /mg)이었다. 이 농축액을 Sephadex G-50 column chromatography 하여 두개의 protein peak 을 얻었다(Fig. 4). protein 의 양이 작지만 효소활성이 높은 fraction No. 13 에서 25 를 모아 농축시킨 용액의 specific activity 는 122.93(unit/mg)으로 fold 는 6.54 이었다. 이상의 각 정제과정의 결과를 Table 1 에 요약하였다.

4. 정제 효소의 일반적인 특성

앞의 과정을 거쳐 부분 정제된 효소용액을 가지고 일반적인 특성을 검토하였다.

1) 효소의 열 안정성

효소용액을 30℃에서 100℃까지 각 온도에서 30 분간 heating 한 후 기질과 반응시켜 잔존하는 효소활성을 조사하였다. 그 결과 60℃까지는 열에 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 효소활성이 급격하게 감소하였다.(Fig.5)

2) 효소활성에 있어서 pH의 영향

효소활성에 있어서 pH 의 영향을 조사하기 위해 pH 3 에서부터 pH 10.5 까지 완충용액을 만들어 효소활성을 측정하였다. 이 효소의 적정 pH 는 5.0 이었으며 비교적 산성에서 활성이 높게 나타났다. 반면 pH 6.5 이후부터는 효소활성이 급격히 감소하였다. pH 3 에서 pH 3 까지는 acetate buffer 를, pH 6.5 에서 pH 8 까지는 phosphate buffer 를, 그리고 그 이후의 pH 에서는 borate buffer 를 사용하였다(Fig.6).

3) 반응시간 경과에 따른 효과

효소반응물을 300 분까지 매 30 분 간격으로 반응시킨 후 반응시간이 경과됨에 따른 효소활성을 비교하였다. 반응시킨지 30 분까지는 비례적으로 효소활성이 증가하였으나 그 이후부터는 변화없이 일정수준을 유지하였다(Fig.7).

4) 효소반응의 최적온도

효소반응물의 최적온도를 결정하기 위하여 30℃에서 80℃까지 10℃ 간격으로 반응시

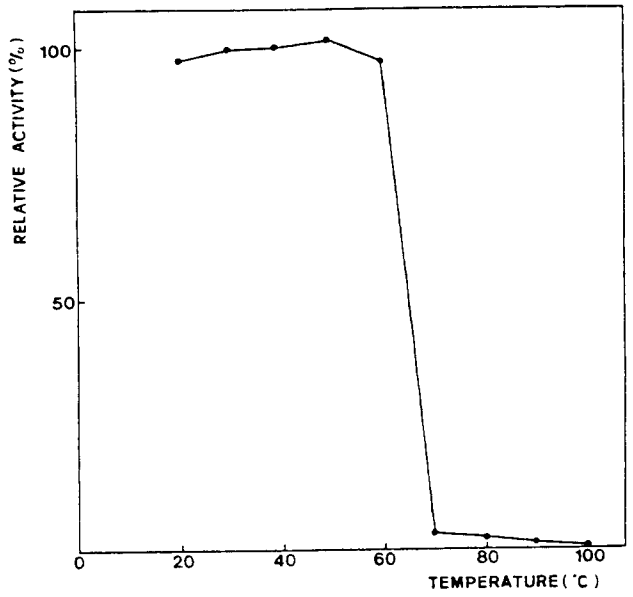

Fig. 5 Effect of temperatvre on the stabili'y of glucoamylase.

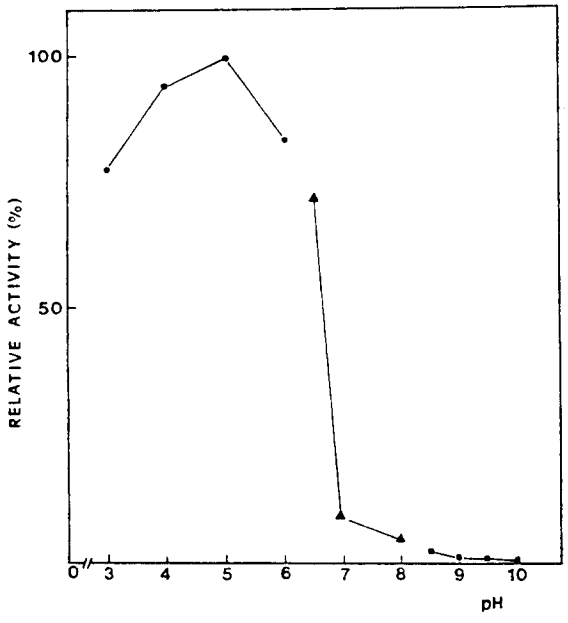

Fig. 6 Effect of pH on the glucoamylase activity on A. niger
Buffers used were 0.1 M acetate buffer for pH 3.0 to 6.0, 0.1 M phosphate buffer for pH 6.5 to 8.0 and 0.1 M borate buffer for pH 8.5 to 10.0.

●——● : 0.1 M acetate buffer

▲——▲ : 0.1 M phosphate buffer

■——■ : 0.1 M borate buffer

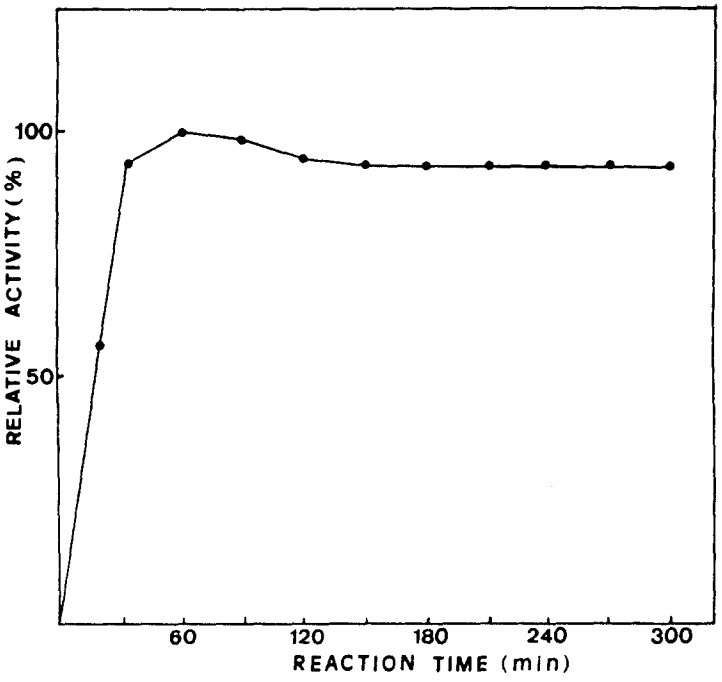

Fig. 7 The effect of time lapse on glucoamylase activity

켰다. 50℃까지 온도가 증가함에 따라 효소 활성이 점차적으로 증가하였으나 70℃이후 부터는 효소활성이 급격히 감소하였다(Fig. 8).

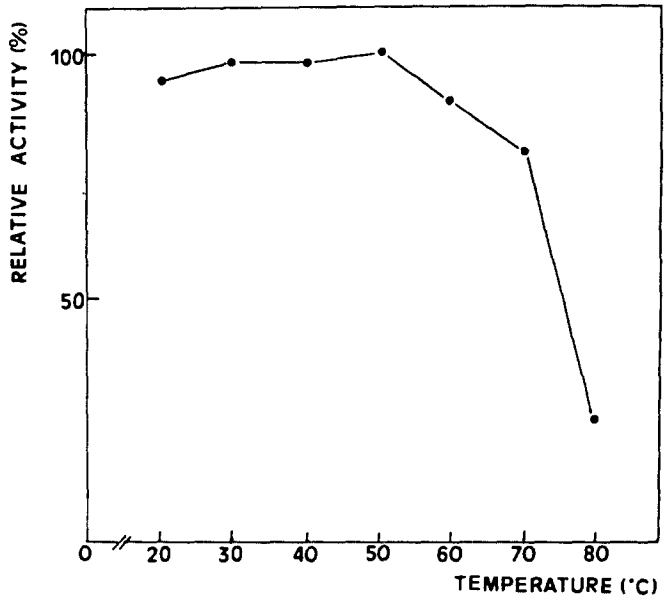

Fig. 8 The effect of incubation temperature on glucoamylase activity

5) 금속 ion의 효과

여러가지 금속이온을 20 mM 농도로 효소용액과 각각 10분과 30분씩 반응시킨 후 기질을 넣고 효소활성을 측정하였다.Fe^{2+}, Hg^{2+}에서 10분 반응시에는 각각 76.4%, 18.3%의 효소활성을, 30분 반응시에는 75.6%, 12.9%의 잔존 효소활성을 나타내 두 ion에 대해 효소활성이 크게 저해됨을 알 수 있었다. Hg^{2+}, Fe^{2+}을 제외한 다른 ion들에서는 효소활성의 변화가 없었다(Table 2).

Table 2 Effects of some metal cations on the glucoamylase activity

Metalic ions (20 mM)	Relative activity(%)	
	10min incubation	30min incubation
Fe^{2+}	76.4	75.6
Cu^{2+}	102.2	103.8
Mg^{2+}	96.9	101.4
Hg^{2+}	18.3	12.9
Ca^{2+}	97.3	96.1
Mn^{2+}	96.4	95.8
K^{+}	95.8	99.6
Na^{+}	100.0	102.1
none	100.0	100.0

* Metal salts were added to the conecntration of 20mM chloric compounds, respectively.
Enzyme activity was expressed as a percentage of that of the control.

6) 기질농도의 효과

기질농도의 증가에 따른 glucoamylase의 활성변화를 측정한 결과 약 0.04% starch

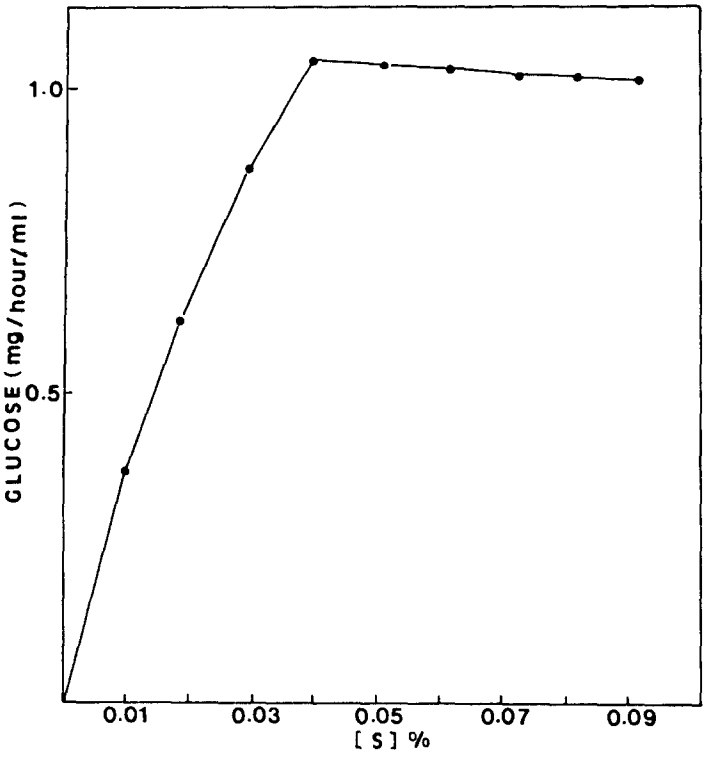

Fig. 9 Relation beween substrate concentration and glucoamylase activity

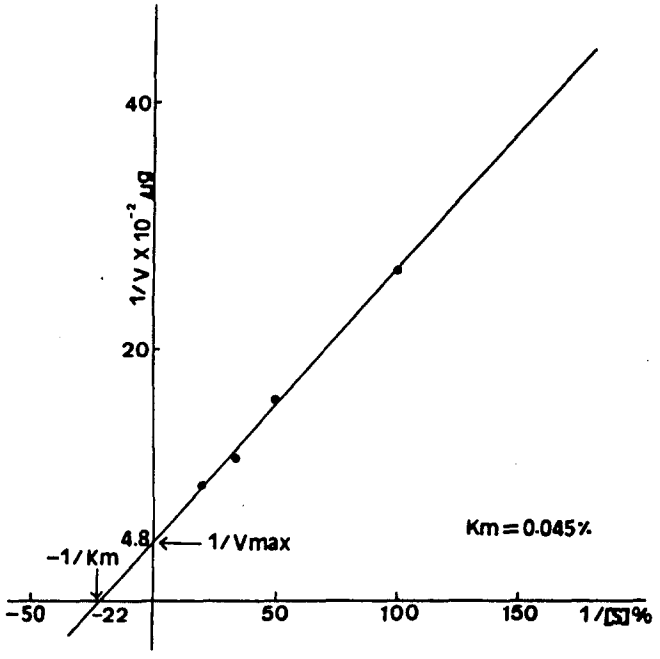

Fig. 10 Lineweaver-Burk plot of glucoamylase for starch

농도까지는 비례적으로 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 변화가 없었다(Fig. 9). Lineweaver-Burk plot에 의한 Km 값은 0.045%이었다(Fig. 10).

Ⅳ. 고 찰

Aspergillus sp.로부터의 glucoamylase가 전분의 당화과정이 필요한 공업에서 특히 많이 사용되고 있는데 이 효소에 의하여 생성되는 glucose는 fructose syrup의 제조나 여러가지 균을 이용한 발효과정의 원료로써 사용되게 된다. 따라서 Aspergillus로부터의 glucoamylase 생산에 관해서 발효학 분야에서 많은 논문이 나왔으며 최근에는 glucoamylase의 유전자 구조와 조절에 관하여 분자적인 수준에서 연구가 진행되고 있다.[13]

배지내의 탄소원을 달리하여 키운 후 배양액으로부터 glucoamylase의 축적을 조사한 결과 glucose나 starch같은 hexose sugar나 hexose sugar polymer를 첨가시킨 배지에서 키운 것에서는 효소활성이 나타났으나 glycerol이나 xylose에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 2). 이와 유사한 결과를 A. awamori에서도 얻었다.[13] 탄소원에 의존한 glucoamylase 축적의 분자적인 기초를 알아보기 위하여 mRNA 수준에서 조사한 결과 starch에서 키운 cell의 glucoamylase mRNA는 단백질로 해독 가능한 기능적인 것이었고, xylose에서 키운 cell에서의 mRNA는 그렇지 못했다. 이것은

이들 균에서 발견되는 glucoamylase의 농도가 200배 이상이나 차이가 나는 원인이며 이로부터 mRNA 수준에서의 조절 기작을 예측할 수 있다. 그리고 starch에서 키운 것의 glucoamylase mRNA가 증가했다는 사실로부터 glucoamylase의 유전자로부터의 전사과정의 증가를 짐작할 수 있으나 이를 뒷받침해 주는 직접적인 자료는 없다. 더 나아가서 A. awamori나 A. niger의 glucoamylase가 하나의 유전자에 coding되어 있음이 연구결과 밝혀졌는데 이렇게 하나의 유전자로부터 다양한 형태의 단백질이 생겨날 수 있는것은 post-translational processing이나 differential mRNA splicing으로 설명 가능하다. Boel 등[1]에 의해 A. niger의 두 glucoamylase isozyme은 differential mRNA splicing에 기인함이 밝혀졌다.

여러 사람들에 의해 A. niger로부터의 glucoamylase가 DEAE-Cellulose ion exchange column chromatography를 통하여 분리된 바 있으며[10)14)] 본 논문에서는 정제된 효소의 일반적인 특성에 관하여 알아보고자 시도한것이다. 염과 유기산에 의한 단백질 침전과 column chromatography 결과 yield는 2.2%로 아주 낮았지만 fold는 culture fluid보다 6.5배 높게 나왔다. 이와같이 yield가 낮게 나온 원인중의 하나는 culture fluld를 ammonium sulfate로 침전시킨 후 침전물을 너무 소량의 buffer에 녹인 결과 급격한 volume 감소로 인해 protein이 유실된 것이 아닌가 생각한다. column chromatography 후의 protein의 순수도를 확인하기 위해서 전기영동을 한 결과 최종단계에서 두개의 protein band를 얻었다. 두 protein band 모두 효소활성을 나타내었으므로 isozyme으로 추정할 수 있으며 이것은 이전에 알려진 논문과 일치한다.[10)11)]

glucoamylase의 반응 최적조건은 pH가 5.0일때, 온도가 50℃일 때로 나타났는데 이것 역시 이전의 연구결과와 일치할 뿐만 아니라 Saccharomyces로부터의 glucoamylase와도 일치한다.[5)15)] 그리고 glucoamylase가 산에는 pH 2까지도 안정하지만 알칼리에 아주 약한 특성을 가지는데 이것은 amylase와 상반되는 성질로서 특히 다른 carbohydrase와 glucoamylase가 혼재하는 경우 이 효소의 분리에 중요한 조건이 된다. Saccharomyces diastaticus를 aerobic상태와 anaerobic상태로 배양한 후 각각의 배양액으로부터 분리한 glucoamylase사이에 차이가 있다는 것이 보고된 바 있다.[14)15)] 이 사실로부터 균을 배양할 때의 조건이 glucoamylase의 구조 및 특성에 영향을 줄 것으로 추정되므로 배영조건에 대한 연구가 선행되어야함이 바람직하다.

금속 ion에 의한 효소활성의 증감을 조사한 결과 Hg^{2+}에 대해 control의 12.9%에 해당하는 효소활성을 나타내었으며 이는 대부분의 효소가 이 Hg^{2+}에 활성저해를 받는 것과 같다. 또 Cu^{2+}에 대해서도 약간의 저해를 나타낸 반면 다른 금속 ion들에 대해서는 변화가 없었다. 금속 ion에 대한 효소활성의 증감은 특히 이 효소의 구조와 밀접한 관계가 있으므로 여기서 조사된 것 이외의 다른 여러가지 factor에 대해서도 연구해 볼 만하다.

glucoamylase에 관한 연구는 그 작용기작에서부터 gene cloning까지 심도있게 발전해 왔다. 그 이유중의 하나가 이 효소의 산업적 이용가치에 기인하리라 생각된다. 그러나 실험실 상태에서가 아닌 효소의 공업적 생산 및 개발이 이러한 미생물 효소제품의 경우 문제가 된다. glucoamyase의 경우 이미 국내외 효소공업에 있어 주요한 위치를 차지하고 있다. 앞으로는 mutagenesis를 통한 yield가 높은 균주의 개발이나 열에 대한 안정성이나 지속성, 편리성이 높은 효소로 변형 개발하는 것이 필요할 것이다. 그리고 효소의 생산이 어떠한 유전적 기작에 의해 조절되는지에 관한 연구는 eucaryote의 gene expression이나 regulation을 이해하는데 도움이 되리라 생각된다.

참고문헌

1. Boel, E., I. Hjort, B. Svensson, F. Norris K.E. Norris and N.P.Fiil, : Glucoamylases G1 and G2 from Aspergillus niger are synthesized form two different but closely related mRNA, EMBO.J.3-1097~1102, 1984.
2. Boel, E., M.T. Hansen, I. Hjort, I. Hoegh and N.P. Fiil : Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from Aspergillus niger, EMBO.J. 3-1581~1585, 1984.
3. Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72-248~251, 1976.
4. Chong, D.S. and Y. Tsujisaka : Amylase components and crystallization of α-amylase of Aspergilluse niger grown on wheat bran, J. Ferment. Technol. 54-264~266, 1976.
5. Clutterbuck, A.J. : A mutational analysis of conidial development in Aspergillus nidulans, Genetics. 63-317~327, 1969.
6. Hayashida, S., T. Nomura, E. Yoshino and M. Hongo : The formation and propertise of subtilisin-modified glucoamylase, Agric. Biol. Chem. 40-141~146, 1976.
7. Innis, M.A., M.J. Holland, P.C. MacCabe, G.E. Cole, V.P. Wittman, R. Tal, K.W.K. Watt, D.H. Gelfand, J.P. Holland and J.H. Meade : Expression, glycosylation and secretion of an Aspergillus glucoamylase by Saccharomyces cerevisiae, Science. 228-21~26, 1985.
8. Itoh, T., I. Ohtsuki, I. Yamashita and S. Fukui : Nucleotide sequence of the glcoamylase gene GLU1 in the yeast Sacchromycepsis fibuligera. J. Bacteriol. 169-4171~4176, 1987.
9. Kerr, R.W., F.C. Cleveland and W.J. Katzbeck : The action of amyloglucosidase on amylose and amylopectin, J. Am. Chem. Soc. 73-3916~3921, 1951.
10. Lineback, D.R., I.J. Russell and C. Ras-

mussen : Two forms of the glucoamylase of Aspergillus niger, Arch. Biochem. Biophysic. 134-539~553, 1969.

11. Lineback, D.R. and L.A. Aira : Structural characterization of the two forms of glucoamylase from Aspergillus niger, Cereal. Chem. 49-283~299, 1972.
12. Meaden, P., K. Ogden, H. Bussey and R.S. Tubb : A DEX gene conferring production of extracellular amyloglucosidase on Yeast, Gene.34-325~334, 1984.
13. Nunberg, J.H., J.H. Meade, G. Cole, F.C. Lawyer, P. McCabe, V. Schweickart, R. Tal, V.P. Wittman, J.E. Flatgaard and M.A. Innis : Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of Aspergillus awamori, Mol. Cell. Biol. 4-2306~2315, 1984.
14 Pazur, J.H. and T. Ando : The action of an amyloglucosidase of Aspergillus niger on starch and malto-oligosaccharides, J. Biol. Chem. 234-1966~1970, 1959.
15. Pazur, J.H. and T. Ando : The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with α-D-(1→4) and α-D-(1→6) bonds by fungal amyloglucosidase, J. Biol. Chem. 235-297~302, 1960.
16. Pazur, J.H., H.P. Knall and A. Cupure : Glycoenzymes- Structure and properties of the two forms of glucoamylase from Aspergillus niger, Carbohyd. Res. 20-83~96, 1971.
17. Somogi, M. : Notes on sugar determination, J. Biol. Chem. 195-19~23, 1951.
18. Takahashi, T., Y. Tsuchida and M. Irie : Isolation of two inactive fragments of a Rhizopus sp. glucoamylase- Relationship among three forms of the enzyme and the isolatedfragments, J. Biochem. 92-1623~1633, 1982.
19. Takami, H. : Purification of glucoamylase isozyme produced by Saccharomyces diastaticus, Mol. gen. Genet. 164-205, 1978.
20. Tsubboi. A., Y. Yamasaki and Y. Suzuki : Two forms of glucoamylase from Mucor rouxianus, Agric. Biol. Chem. 38-543~550, 1974.
21. Yamasaki, Y., Y. Suzuki and J. Dzawa : Properties of two forms of glucoamylase from Penicillium oxalicum, Agric. Biol. Chem. 41-1443~1449, 1977.
22. Yamshita, I. and S. Fukui : Molecular cloning of a glucoamylase producing gene in the yeast Saccharomyces, Agric. Biol. Chem. 47-2689~2692, 1983.
23. Yamashita, I. and S. Fukui : Isolation of glucoamylase-non-producing mutants in the yeast Saccharomyces diastaticus, Agric. Biol. Chem. 48-131~135, 1984.
24. Yamashita, I. and S. Fukui : Genetic background of glucoamylase production in the yeast Saccharomyces, Agric. Biol. Chem. 48-137~141, 1984.

25. Yamashita, I. and S. Fukui : Secretion of Saccharomyces diastaticus glucoamylase from Schizosaccharomyces pombe, Agric. Biol. Chem. 48-1931~1933, 1984.
26. Yamashita, I., K. Suzuki and S. Fukui : Nucleotide sequence of the extracellular glucoamylase gene STA in the yeast Saccharomyces diastaticus, J. Bacteriol. 161-567~573, 1985.
27. Yamashita, I., T. Maemura, T. Hatano and S. Fukui : Polymorphic extracellular glycoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast Saccharomyces diastaticys, J. Bacteriol. 161-574~582, 1985.
28. Yamashita, I., K. Suzuki and S. Fukui : Proteolytic processing of glucoamylase in the yeast Saccharomyces diastaticus, Agric. Biol. Chem. 350-475~482, 1986.