KOR. JOUR. MICROBIOL. May, 1991 p. 104-110 Vol. 29, No. 2

Schwanniomyces castellii Glucoamylase의 정제 및 성질

배 석 · 박종천 · 김동호* · 김강화** · 전순배
전남대학교 미생물학과, *생물학과, **식품영양학과

Purification and Properties of Glucoamylase from *Schwanniomyces castellii*

Bai, Suk, Jong-Chun Park, Dong-Ho Kim*, Kang-Hwa Kim and Soon-Bai Chun**
*Department of Microbiology, *Biology*
Food and Nutrition, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

ABSTRACT: The glucoamylase of *Schwanniomyces castellii* was purified to homogeneity from the culture filtrate. The purified enzyme was a glycoprotein with a molecular mass of about 145 KDa, which was monomeric protein with an isoelectric point of 4.3. The pH and temperature optima were 5.5 and 40℃, respectively. The enzyme was fairly stable up to 50℃ and at acid pH range (pH 4.5-6.0). The apparent Km of the enzyme toward soluble starch, isomaltose and pullulan were 3.84, 0.51 and 13.7 mg/ml, respectively. The analysis of amino acid composition on this enzyme was found to be acidic protein like other fungal glucoamylase. The amino acid sequence of N-terminal peptide consisted of Ala-Pro-Ala-Asp-Gly-Ile-Gly-Asp-X-Ala-X-Ala.

KEY WORDS □ ***Schwanniomyces castellii*, glucoamylase**

*Schwanniomyces castellii*는 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 자낭균류에 속하며 (Phaff와 Miller, 1984), 전분을 직접 발효할 수 있는 효모로 알려져 있다 (Ingledew, 1987). *Sch. castellii*가 분비하는 glucoamylase는 전분의 완전당화에 필수적인 debranching활성을 가지고 있어 전분이나 pullulan의 α-1.4-와 α-1.6 결합을 분해할 수 있다. 그러나 *Sch. castellii*로부터 분리정제된 효소의 분자량의 크기, subunit의 수, 탄수화물함량등에 있어서 저자들 (Oteng-Gyang등, 1981; Sills등, 1984; Deibel등, 1988; Dowhanick등, 1987; 1990) 간에 차이가 있었는데 이같은 차이를 유전자수준에서 규명 하고자 *Sch. cstellii*의 glucoamylase유전자를 cloning한 바 있다(Park등, 1990). 본 연구에서는 *Sch. castellii* glucoamylase 유전자의 구조를 밝히는 기초로써 glucoamylase를 분리정제하였으며 이 효소의 특성, 아미노산조성 및 아미노말단 부위의 아미노산서열을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

본 실험에 사용된 효모균주는 *Schwanniomyces castellii* CBS 2863(ATCC 26077)이었다. 균주 보존은 YEPD(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose, 2% Bacto agar)와 2% soluble starch를 함유한 최소배지(0.67% Yeast nitrogen base [YNB], 2% Bacto agar)에서 군체가 형성될 때까지 30℃에서 3일간 배양한 후 4℃에서 보관하였으며, 4주마다 계대배양하였다. 장기보관시에는 40% glycerol(−20℃)에서 보관하였다. 배지에 사용된 시약은 Difco Laboratories(Detroit, Michigan, U.S.A.)에서 구입하였고 단백질 분리정제, 아미노산조성 및 서열분석에 필요한 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.)제품을 사용하였다. 기타 각종 시약은 일급품을 구입, 사용하였다.

효소의 생산 및 분리

*Sch. castellii*를 2% soluble starch 함유 YNB배지에서 30℃로 후기 대수기까지 배양한 다음 10,000×g로 30분 동안 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 ultrafiltration(10,000 molecular weight cut off, Vision Scientific Co., Korea)으로 농축하고 0.04 M sodium acetate 완충용액(pH 5.5)으로 2회 투석한 다음 약 90배 농축하였다.

효소의 정제

모든 정제과정은 4℃로 유지된 저온실에서 실시하였고 glucoamylase활성을 soluble starch를 기질로 하여 표시하였다. 투석된 조효소 용액을 첫단계 정제과정인 Sephacryl S-200 gel filtration column(2.6×60

cm, total volume, 270 ml; 유속 0.13 ml/min)에서 분획하였다. Sephacryl S-200 용출액을 모아 ultrafiltration을 이용, 0.04 M sodium acetate완충용액 (pH 6.5)으로 투석하고 농축하여 동일완충용액으로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-50 column (1.6×35 cm; total volume, 70 ml; 유속, 0.2 ml/min)에 효소를 흡착시킨 후 0.5 M NaCl를 함유한 200 ml 동일한 완충용액과 NaCl를 함유하지않은 용액 200 ml와의 linear gradient로 용출을 실시하였다. SDS-PAGE에 의해 순도가 확인된 glucoamylase분획을 모아 ultrafiltration 방법으로 농축하고 0.04 M sodium acetate완충용액(pH 5.5)으로 교환 투석하였다.

전기영동

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 vertical slab gel apparatus (2001 vertical system: Ge 2/4, LKB, Sweden)으로 실시하였고 gel염색은 0.25% Coomassie blue R-250으로 하였다. 또한 정제된 효소의 등전점은 Giulian등 (1984)의 방법에 의해 pH 3.5-9.0 범위의 ampholites를 이용하여 slab gel상에서 측정하였다.

Gel filtration

Native glucoamylase 분자량은 β-amylase (200 KDa), alchol dehydrogenase (150 KDa), bovine serum albumin (66 KDa), carbonic anhydrase (29 KDa)를 표준단백질로 하여 0.04 M sodium acetate 완충용액 (pH 5.5)으로 평형시킨 Sephacryl S-300 gel filtration column (1.6×60 cm; total volume, 120 ml; 유속 0.25 ml/min)에서 glucoamylase 용출비로 측정하였으며 표준단백질이나 최종 정제된 glucoamylase를 각각 따로 column에 싣고 상기 완충용액으로 용출시켜 2 ml씩 분획하였다.

탄수화물함량 측정

Dubois등 (1956)의 방법에 따라 정제된 효소 단백질 100 μg이 함유된 시료 250 μl에 phenol 250 μl를 혼합한 후 황산 1.25 ml를 신속히 가하고 5분간 방치한 다음 490 nm에서 hexose양을 측정하였고 탄수화물 함량을 %로 표시하였다.

효소의 iodination과 endoglycosidase H 처리

Yamashita등(1984)의 방법에 따라, 정제된 1.0 μg 효소에 10 μCi Na ^{125}I과 20 μg chloramine T를 25℃에서 1분간 반응시킨 후 0.14 M 2-mercaptoethanol로 반응을 정지시키고 4℃에서 0.17 M Na-phosphate 완충용액(pH 7.2)으로 하루밤 투석시켰다. ^{125}I로 표지된 효소에 0.5 U/ml endoglycosidase H를 37℃에서 3시간 처리하여 탄수화물부위를 제거한 다음 SDS-PAGE (10% acrylamide)을 실시하였고 gel은 건조시킨 후 autoradiography 하였다.

효소활성 및 단백질량 측정

Glucoamylase의 활성은 효소용액 10 μl를 0.5% soluble starch가 함유된 50 mM citrate phosphate완충용액(pH 5.5) 990 μl에 가하여 40℃에서 30분간 반응시키고 끓는 물에서 5분간 처리하여 반응을 정지시킨 후 생성된 포도당의 양을 glucose oxidase reagent 5 ml를 첨가하여 450 nm에서 측정하였다. Glucoamylase의 활성 단위 (unit)는 분당 1 μmole의 포도당을 생성하는 효소양으로 결정하였다. 효소단백질의 양은 bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 하여 Lowry등 (1951)의 방법으로 측정하였고 흡광도법(280 nm)을 병행하였다.

최적 pH와 안정성

효소의 활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해서 50 mM citrate-phosphate 완충용액 (pH 3.0-7.0)과 0.1 M sodium-phosphate 완충용액 (pH 5.0-8.0)을 사용하여 효소액과 기질을 40℃에서 30분간 반응시킨 후 glucoamylase 활성을 측정하였으며 각 pH에서 효소 활성의 안정성을 조사하기 위해, 위 완충용액 1 ml에 1 unit의 효소를 처리하고 30℃에서 24시간 정치시킨 후 잔존하는 효소활성을 측정하였다.

최적 온도와 안정성

효소의 활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 50 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 5.5)에 효소와 기질을 첨가하여 20-80℃ 사이의 각 온도에서 30분간 반응시킨 후 효소의 활성을 측정하였으며 정제효소의 열 안정성을 측정하기 위해 위와같은 온도범위에서 50 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 5.5) 1 ml에 1 unit의 효소를 첨가한 용액을 30분간 정치반응시키면서 5분 간격으로 각 온도에서의 효소 잔존활성을 측정하였다.

기질특이성 및 Km값의 측정

Glucoamylase 기질인 soluble starch (0.5-6 mg/ml), isomaltose (0.5-6 mg/ml) *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside(PNPG, 0.05-1.0 mg/ml), dextrin (0.5-10 mg/ml) 그리고 pullulan(5-20 mg/ml)등을 농도별로 효소와 40℃에서 30분간 반응시킨 후, 각 농도에서 생성된 포도당 혹은 PNP의 양으로 효소활성을 측정하고 Lineweaver-Burk 방정식 (1934)에 의하여 Michaelis-Menten 상수(Km)와 최대반응속도 (V_{max})를 계산하였다.

아미노산의 조성 및 N-말단 부위의 서열

정제된 효소의 아미노산 조성은 건조된 시료를 6 N HCl로 110℃에서 24시간 처리하여 가수분해시키고 Phenylisothiocyanate(PITC) 유도체 처리과정을 거친 후 HPLC(Waters)에 Pico-Tag column(3.9×150 mm)을 이용하여 분석하였다. 한편 cysteine과 cystine을 정량하기 위해서 건조된 시료를 가수분해시키기 전에 시료에 performic oxidation reagent를 처리하여 HCl에 안정한 cysteic acid로 변환시켰으며

Table 1. *Summary of purification of glucoamylase from Sch. castellii.*

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture filtrate	950	87.4	750.5	8.5	1.0	100
Ultrafiltration	10	57.9	650.0	11.2	1.3	87
Sephacryl S-200 gel filtration	37	18.0	242.0	13.4	1.6	32
DEAE-Sephadex A-50 ion-exchange Chromatography	25	13.1	214.0	16.3	1.9	29

One unit of glucoamylase was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmole glucose/min from soluble starch.

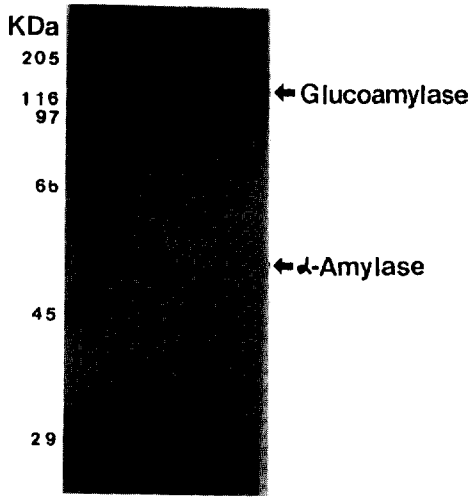

Fig. 1. *SDS-PAGE of glucoamylase from Sch. castellii. An acrylamide concentration of 10% was used and gel was stained with 0.25% Coomassie blue R-250.*
Lanes: 1. culture fitrates. (30 μg protein); 2, after DEAE-Sephadex A-50 chromatography (30 μg protein); 3. after DEAE-Sephadex A-50 chromatography(50 μg protein); S, standard proteins.

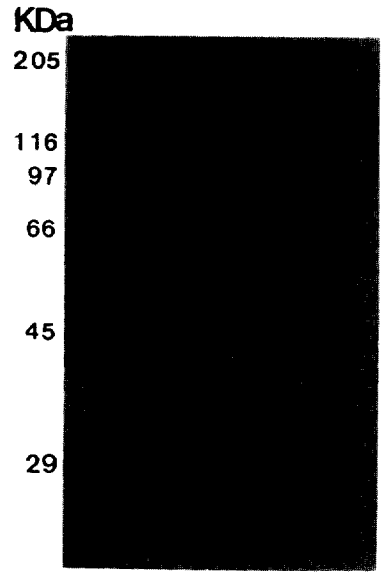

Fig. 2. *Endoglycosidase H treatment of glucoamylase from Sch. castellii.*
^{125}I-labeled enzyme was digested with endoglycosidase H and was analyzed by 10% acrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS. Lane S, standard protein.

tryptophan의 경우도 HCl에 불안정하므로 methansulfonic acid(MSA)를 건조 시료에 처리하여 가수분해 하였다. 그리고 N-말단 부위의 서열분석은 아미노산 Sequencer(Milligen Biosearch Prosequencer 6600)에서 실시하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Sch. castellii 배양 상등액 중의 glucoamylase를 ultrafiltration, gel filtration 그리고 anion exchange chromatography의 3단계를 통하여 정제하였고 (Table 1, Fig. 1), 이 때 최종 효소단백질회수율과 정제도는 각각 29%, 1.9 배이었다. Wilson과 Ingledew (1982)는 *Schwanniomyces*의 다른 strains인 *Sch. alluvius*의 glucoamylase 정제에서 본 효소와 같은 정제단계를 통해 최종 효소단백질 회수율과 정제도가 각각 17%, 6.4배이었다고 보고한 바 있다. 이와 같이 *Sch. alluvius* glucoamylase정제 과정과 비교할 때 회수율이 높은 반면 정제도가 낮은 이유는 *Sch. castellii*

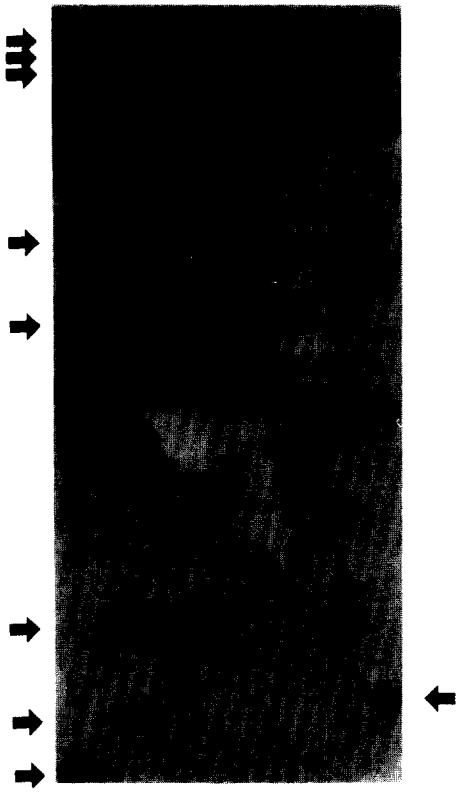

Fig. 3. *Analytical isoelectric focusing of glucoamylase from Sch. castellii.*
pI markers used were: lane 1, amyloglucosidase (pI, 3.6); 2, glucose oxidase (pI, 4.2); 3, trypsin inhibitor (pI, 4.6); 4, myoglobin (pI, 6.8 and 7.2); 5, lactic dehydrogenase (pI, 8.3, 8.4 and 8.6); 6, β-glucosidase (pI, 4.8); 7. glucoamylase.

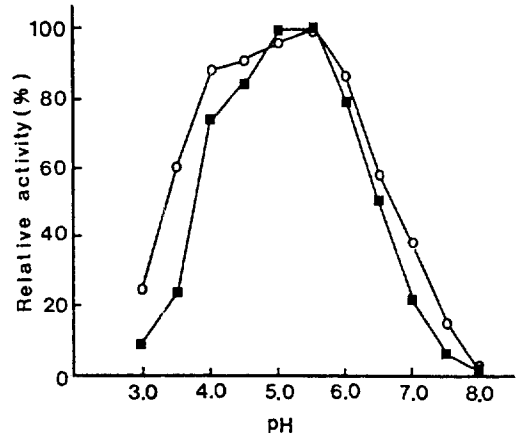

Fig. 4. *Effects of pH on activity (○—○) and stability (■—■) of glucoamylase from Sch. castellii. The enzyme activity and stability was measured under conditions described in the matericals and methods.*

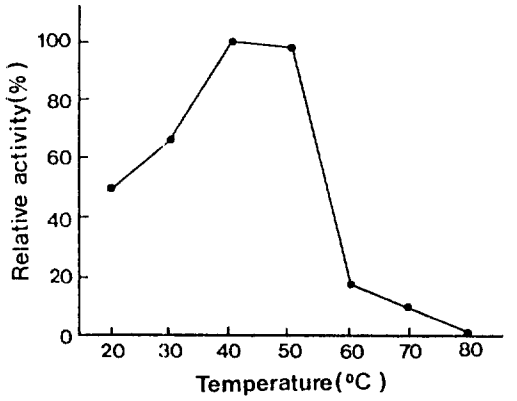

Fig. 5. *Effects of temperature on activity of glucoamylase from Sch. castellii. The enzyme activity was measured under conditions described in the Materials and Methods.*

배양상등액에 존재하는 단백질 중 glucoamylase가 거의 대부분을 차지하고 있고 α-amylase등의 단백질은 매우 소량 존재하고 있기때문이며(Fig. 1) 이로 인해 정제단계를 거쳐도 정제도의 증가가 현저하지 못했다.

분자량 측정

SDS-PAGE와 Sephacryl S-300 gel filtration column에서 정제효소의 분자량을 측정해본 결과 SDS-PAGE에서 측정된 분자량은 약 145 KDa 이었고(Fig. 1) gel filtration에 의하여 추정된 분자량의 크기는 약 130 KDa으로 단량체임을 알 수 있었다. 이같은 결과는 Deibel등 (1988)이 *Sch. occidentalis* UC7410(ATCC 26076)으로 부터 정제한 glucoamylase의 결과와 비슷하였다. 이들은 SDS-PAGE로 측정한 분자량이 143±2 KDa이었고 gel filtration에 의하여 추정된 분자량은 122±28 KDa이었다고 보고한 바 있다. 이와는 달리 Oteng-Gyang등 (1981)은 *Sch. occidentalis* 배양상등액속에는 분자량이 90 KDa과 45 KDa인 두 형의 glucoamylase가 존재한다고 보고한 바 있다. 효소를 ^{125}I로 표지시킨 후 endoglycosidase H를 이용하여 탄수화물 부위를 제거시킨 결과 (Fig. 2), 분자량이 약 145 KDa에서 약 130 KDa로 감소되어 효소내 탄수화물 함량이 약 10% 이상임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Deibel등 (1988)이 보고한 10-15(12)%와 비슷하였지만 *Sch. castellii* ATCC 26077의 glucoamylase에는 탄수화물이 전혀 함유되어 있지않다고 한 Sills등 (1984)의 결과와는 일치하지 않았다. 한편 glucoamylase의 등전점이 약 4.3으로 추정되었는데(Fig. 3)

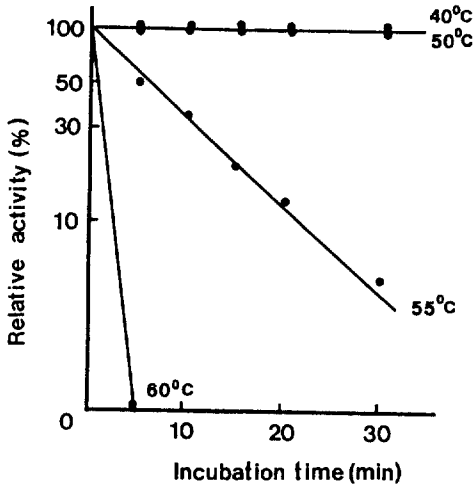

Fig. 6. *Thermal inactivation of glucoamylase from Sch. castellii. The enzyme activity was assayed under conditions described in the Materials and Methods after incubation at various temperature for 0-30 min. in the absence of substrate.*

Table 2. *Km and V_{max} values of various substrates for glucoamylase from Sch. castellii.*

Substrate	Km (mg/ml)	V_{max} (μM/mg/min)
Soluble starch	3.84	36.6
Isomaltose	0.51	90.4
PNPG	0.08	2.1
Pullulan	13.70	6.6
Dextrin	0.59	26.9

이는 Deibel등 (1988)이 *Sch. occidentalis* ATCC 26076 glucoamylase로부터 보고한 6.2와는 일치하지 않았다.

효소에 대한 pH의 영향

정제된 효소는 pH 5.5에서 최고의 활성을 나타냈으며(Fig. 4), pH 4.5-6.0 범위에서 30℃, 24시간 정치한 후의 잔존효소활성은 80%이상이었다. 이와같은 결과는 glucoamylase를 생산하는 *Schwanniomyces*의 다른 strains인 *Sch. alluvius*(Wilson과 Ingledew, 1982)과 타 효모균종인 *Lipomyces kononenkoae*(Spencer와 van Uden, 1979), *Candida tsukubaensis* (De Mot등, 1985)에서 관찰된 pH 3.0-5.0과 비교했을때 최적 pH 범위가 약간 높았으나 안정성은 유사하였다.

효소에 대한 온도의 영향

효소반응의 최적온도를 20-80℃까지의 범위에서 조사한 결과 본 효소는 40℃에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 타 strains인 *Sch. alluvius*(Wilson과 Ingledew, 1982)와 타 효모 균종인 *L. kononenkoae*(Spencer 와 van Uden, 1979)와 *C. tsukubaensis*(De Mot등, 1985)의 glucoamylase 최적 온도인 50-55℃ 보다는 약간 낮았다. 한편, 효소의 열안정성을 조사한 결과(Fig. 6) 40-50℃에서는 30분 처리하였을 때 잔존활성이 그대로 유지되었으나 55℃에서는 급격히 잔존 활성이 떨어졌으며(5%), 60℃에서는 5분이내에 불활성화되었는데 *C. tsukubaensis*(De Mot등, 1985)에서도 이와 유사한 특성을 보여 주었다. 그러나 Sills등 (1984)에 의하면 *Sch. castellii* ATCC 26077의 glucoamylase를 60℃에서 5분 처리했을때 잔존활성이 40%라고 보고한 바 있다.

Table 3. *Amino acid composition of native glucoamylase from Sch. castellii*

Amino acid	molar %
Aspartic acid	11.6
Glutamic acid	7.3
Serine	10.9
Glycine	13.7
Histidine	1.5
Arginine	1.7
Threonine	6.4
Alanine	9.4
Proline	6.6
Tyrosine	3.1
Valine	6.7
Methionine	1.1
Cysteic acid	0.5
Isoleucine	3.9
Leucine	6.7
Phenylalanine	3.9
Lysine	3.9
Tryptophan	1.4

기질의 특이성 및 Km값

정제된 효소의 soluble starch, isomaltose 그리고 PNPG등에 대한 Km과 V_{max}값은 Table 2에 나타나 있다. 조사된 기질중 PNPG의 Km값이 0.08 mg/ml로 가장 낮았고 V_{max}는 isomaltose가 90.4(μM/mg/min)로 가장 높았다. Soluble starch를 기질로 한 경우 본 효소는 Km값이 3.8 mg/ml인데 반해 Sills등 (1984)이 보고한 *Sch. castellii* ATCC 26077 glucoamylase의 Km값은 10.3 mg/ml, *Sch. alluvius*(Wilson과 Ingledew, 1982)에서는 12.7 mg/ml 그리고 *L. kononenkoae*(Spencer와 van Uden, 1979)에서는 16.2 mg/ml이었다. 따라서 이들 효소에 비해 본 효소는 soluble starch에 대한 친화력이 3-4배 높았다. 이는 균종간 혹은 사용한 기질 soluble starch제품간의 차이에 기인 된 것 같다. PNPG(P-nitrophenyl-α-*D*-glucopyranoside)의 Km 값은 *L. kononenkoae* (Spencer와 van Uden, 1979)의 경우 0.35 mg/ml로 본 효소의 PNPG에 대한 친화력이 4배이상 높았다.

아미노산 조성 및 N 말단 서열분석

정제된 효소의 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 3에 나타나 있다. 본 효소는 산성 및 극성 아미노산(Cys은 예외)이 높은 비율로 존재하였고 염기성 및 소수성 아미노산(Ala, Pro. Val, Leu은 예외) 수준은 낮았다. 따라서 본 효소는 효모인 *Saccharomyces diastaticus* (Yamashita등, 1985)의 glucoamylase나 사상곰팡이인 *Aspergillus niger, Rhizopus japonicus, Endomyces* (Manjunath등, 1983) 등의 glucoamylase와 같은 산성 단백질이었다. N- 말단 peptide의 아미노산 서열은

Ala-Pro-Ala-Asp-Gly-Ile-Gly-Asp-X-Ala-X-Ala

이었는데 *Sch. occidentalis* ATCC 26076(Dohmen등, 1990)와 *S. diastaticus*(Yamashita등, 1985)의 glucoamylase 유전자 염기서열로부터 추정된 N-말단서열과 비교했을 때

Sch. castellii CBS 2863(ATCCC 26077)	Ala-	Pro-	Ala-	Asp-	Gly-	Ile-	Gly-	Asp-	X-	Ala-	X -	Ala
Sch. occidentalis ATCC 26076	Ala-	Pro-	Ala-	Ser-	Ser-	Ile-	Gly-	Ser-	Ser-	Ala-	Ser-	Ala
S. diastaticus	Leu-	Gly-	Phe-	Pro-	Thr-	Ala-	Leu-	Val-	Pro-	Arg-	Gly-	Ser

*Schwanniomyces*두 strains간에는 높은 상동성을 보여 주었으나 *S. diastaticus*의 glucoamylase와는 상동성이 없었다. 이상과 같이 *Sch. castellii* CBS 2863(ATCC 26077)의 glucoamylase는 분자량과 탄수화물함량에 있어서 *Sch. occidentalis* ATCC 26076의 glucoamylase와 거의 차이가 없었고 N-말단 아미노산 분석결과 *Sch. occidentalis* ATCC 26076 glucoamylase 유전자 염기서열로 부터 추정한 N-말단서열과 70%의 상동성을 보여 주었지만 등전점은 각각 4.3과 6.2로 차이가 있었다. 한편 Sills등 (1984)은 *Sch. castellii* ATCC 26077의 glucoamylase는 탄수화물이 전혀 함유되어 있지 않고 열 안정성에 있어서 효소를 60℃에서 5분 처리 했을때 40% 잔존 활성이 있었다고 보고한 바 있으나 본 연구에서는 같은 strains의 효소이지만 탄수화물 함량이 10% 이상 이었고, 60℃에서 5분 이내에 불활성화 된 것으로 보아 이들의 결과와는 차이가 있었다.

적 요

*Schwanniomyces castellii*로 부터 glucoamylase를 정제하고 그 특성을 조사하였다. 이 효소의 분자량은 약 145 KDa의 당단백질로 단량체이었고 등전점은 4.3 이었다. 최적 pH와 온도는 각각 5.5와 40℃이었으며 50℃까지 열안정성을 유지하였고 pH 4.5-6.0범위에서 pH 안정성을 유지하였다. Soluble starch, isomaltose 그리고 pullulan에 대한 Km 값은 각각 3.84, 0.51 그리고 13.7 mg/ml어있다. 아미노산 조성분석 결과 본 효소는 산성단백질이었으며 N-말단 아미노산 서열은 Ala-Pro-Ala-Asp-Gly-Ile-Gly-Asp-X-Ala-X-Ala 이었다.

사 사

본 연구는 1989-1990년도 교육부 학술연구조성비 지원에 의해 수행된 연구의 일부분이며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. **Deibel, M.R., R.R. Hiebsch and R.D. Klein,** 1988. Secreted amylolytic enzymes from *Schwanniomyces occidentalis*: Purification of FPLC and preliminary characterization. *Preparative Biochemistry.* **18**, 77-120.
2. **De Mot, R., E. Van Oudendijck and H. Verachtert,** 1985. Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the yeast *Candida tsukubaensis* CBS6389. *Antonie van Leeuwenhoek,* **51**, 275-287.
3. **Dohmen, R.J., A.W.M. Strasser, U.M. Dahlems and C.P. Hollenberg,** 1990. Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase(GAM 1) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae. Gene,* **95**, 111-121.
4. **Dowhanick, T.M., S.W. Scherer, G. Willick, I. Russell, G.G. Stewart and V.L. Seligy,** 1987. Differential glucoamylase expression in *Schwanniomyces castellii* induced by maltose. *Can. J. Microbiol.,* **34**, 262-270.
5. **Dowhanick, T.M., I. Russell, S.W. Scherer, G.G. Stewart and V.L. Seligy,** 1990. Expression and regulation of glucoamylase from the yeast *Schwanniomyces castellii. J. Bacteriol.,* **172**, 2360-2366.
6. **Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith,** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.

Anal. Chem., **28**, 350-356.
7. **Giulian, G.B., R.L. Moso and M. Greaser,** 1984. Analytical isoelectric focusing using a high voltage vertical slab polyacrylamide gel system. *Anal. Biochem.*, **142**, 421-436.
8. **Ingledew, W.M.,** 1987. *Schwanniomyces*: a potential super yeast? *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, **5**, 159-176.
9. **Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. *Nature* (London), **227**, 680-685.
10. **Lineweaver, H. and D. Burk,** 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658-666.
11. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall,** 1951. Protein estimation with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
12. **Manjunath, P., B.C. Shenoy and M.R.R. Rao,** 1983. Fungal glucoamylases. *J. Appl. Biochem.*, **5**, 235-260.
13. **Oteng-Gyang, K.G. Moulin and P. Galzy,** 1981. A study of the amylolytic system of *Schwanniomyces castelliii. Z. Allg. Mikrobiol.*, **21**, 537-544.
14. **Park, J.C., S. Bai and S.B. Chun,** 1990. Cloning and expression of *Schwanniomyces castellii* starch gene. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 653-659.
15. **Phaff, H.J., and M.W. Miller,** 1984. *Schwanniomyces kloecker.* In: The Yeast. a taxanomic study. N.J. W. Kreger-van Rij (ed.), Elsevier Publisher B.V. Amsterdam. p. 233-234.
16. **Sills, A.M., M.E. Sauder and G.G. Stewart,** 1984. Isolation and characterization of the amylolytic system of *Schwanniomyces castellii. J. Inst. Brew.*, **90**, 311-314.
17. **Spencer-M. and N. van Uden,** 1979. Extracellular amylolytic system of the yeast *Lipomyces kononenkoae. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 241-250.
18. **Wilson, J.J. and W.M. Ingledew,** 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 301-307.
19. **Yamashita, I., T. Hatano and S. Fukui,** 1984. Subunit structure of glucoamylase of *Saccharomyces diastaticus. Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1611-1616.
20. **Yamashita, I., K. Suzuki, and S. Fukui,** 1985. Nucleotide sequence of the extracellular glucoamylase gene STA1 in the yeast *Saccharomyces diastaticus. J. Bacteriol.*, **161**, 567-573.

(Received May 1, 1991)
(Accepted May 24, 1991)