

재조합효모 배양에서 비이온성 계면활성제가 외래 Glucoamylase 생산 및 분비에 미치는 영향

차형준 · 유영제*^o

서울대학교 화학공학과 및 유전공학연구소

Effects of Non-Ionic Surfactants on Cloned Glucoamylase Production and Secretion in Recombinant Yeast Culture. Hyung-Joon Cha and Young-Je Yoo*^o. Department of Chemical Engineering and The Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea — The effects of non-ionic surfactants (Triton X-100 and Tween 80) on cloned glucoamylase production and secretion in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* culture were studied. Even though the extracellular glucoamylase activity was increased by addition of Tween 80 due to the increase of the cell mass, Tween 80 did not play a role in the increase of glucoamylase secretion. On the addition of Triton X-100 addition, the secretion efficiency was increased while the cell growth was inhibited. Triton X-100 was added to the culture broth after 24 hr of culture to minimize the inhibition of the cell growth, and consequently the glucoamylase activity in the culture broth was increased by 12%.

효모와 같은 진핵생물은 세포벽이 견고하기 때문에 유전자 산물의 회수가 어렵다. 따라서 최근에는 균체 내의 축적된 유전자 산물을 가능한 균체 밖의 배지 내로 분비시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 효모는 동물세포와 분비 기작이 거의 유사하기 때문에 번역후 수정(post-translational modification)이 필요한 유용한 동물세포 단백질의 대량 생산에 매우 유용한 미생물이다(1). 유전자 산물을 세포 외로 분비하게 하면 다음과 같은 장점이 있다. 첫째는 유전자 산물이 배지로 분비되므로 균체의 세포벽을 제거할 필요가 없으므로 분리와 정제 공정이 용이하게 되어 생산비가 절감된다. 둘째는 분비시 당화반응(glycosylation)과 같은 번역후 수식이 일어나므로 분비된 단백질 아미노 말단의 아미노 잔기가 원래의 단백질과 같게 되어 올바른 활성을 가지게 된다. 셋째는 균체 내에 단백질의 축적이 적어 지므로 이에 의한 미생물의 성장 저해가 감소하게 된다. 넷째는 단백질이 배지로 분비되므로 세포내에 존재할 수도 있는 endotoxin에 의한 재조합 단백질의 불순화(impurity) 문제가 적다. 단점으로는 첫째, 대부분의 분비 단백질의 농도가 수십 mg/l 정도의 수준에 그친다는 것이다. 둘째, 세포외 단백질분해 효소(protease)에 의한 분비단백질의 분해이다. 그러나 이러한 단점에도 불구하고 장점이 매우 많으므로 재조합 유전자 산물의 세포 외로의 분비 연구는 매우 중요한 분야가 되고 있다.

효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 분비되는 많은 이

종의 단백질은 그 생산수율이 대부분의 경우 매우 낮다. 몇개의 특이한 경우(2,3)를 제외하고는 재조합 단백질의 수율은 전체 단백질 양의 1~5% 정도이다. 이러한 낮은 단백질 분비효율을 향상시키기 위하여 여러 가지의 방법이 시도되고 있다. 하나의 방법으로는 숙주세포를 돌연변이시키는 것이다(4,5). 두번째 방법으로는 배지를 최적화하고 개발하는 것이다(6,7). 세번째 방법으로는 단백질의 안정성을 증가시키는 것이다(6). 직접적인 증거는 아직 없으나 세포 외의 배지나 페리플라즘(periplasm)안에 존재하는 단백질이 불안정화하므로 분비 효율이 낮게 보일 수도 있다. 그러므로 단백질을 안정화 시킴으로써 전체적인 분비 효율을 향상시킬 수 있는 것이다. 네번째 방법으로는 계면활성제와 같은 세포벽 permeabilizing agent를 첨가함으로써 분비가 효율적으로 일어나게 하는 것이다(8-14).

계면활성제는 지질과 amphipathic한 물질이다. 계면활성제에는 크게 변성화 계면활성제와 비교적 세포에 유독하지 않은 비변성화 계면활성제로 나눌 수 있다(10). 변성화 계면활성제는 그들의 polar한 부분이 전하를 띠는 이온성 계면활성제가 속하며 이는 다시 양이온성과 음이온성으로 나뉜다. 비변성화 계면활성제는 크게 비이온성, bile salt 그리고 zwitterionic type으로 나누어진다. 계면활성제를 사용하여 미생물의 세포막을 permeabilization시킴으로써 목적산물의 수율을 증대시키는 연구가 많이 이루어지고 있다. Declaire 등(9)은 *Kluyveromyces*에서 대표적인 세포내 효소인 β -galactosidase 활성을 곧바로 측정하기 위하여 여러 가지 permeabilizing agent를 넣어 실험하였다. Joshi 등(10)은 양이온성 계면활성제인 CTAB(Cetyltrimethylammonium bromide)와 비이온성 계면활성제인 Triton X-100을 이용하여 *Kluyveromyces fragilis*에서 β -galac-

*Corresponding author.

Key words: Recombinant yeast, non-ionic surfactant, glucoamylase, secretion

^oPresent address: Department of Chemical Engineering and Center for Agricultural Biotechnology, University of Maryland, College Park, Maryland, 20742, U.S.A.

tosidase를 분비시켰다. 이 경우 CTAB를 0.1% 첨가한 세포는 β -galactosidase 활성이 약 480배 그리고 Triton X-100을 1% 첨가한 세포는 110배 증가하였다. Gowda 등(11)은 Digitonin을 이용하여 *Kluyveromyces fragilis*에서 여러 가지의 세포내 효소들의 활성을 조사하였다. Naglak 등(12)은 Triton X-100과 guanidine hydrochloride를 첨가하여 *Escherichia coli*에서 periplasm에 축적되는 재조합 단백질을 분리하는 연구를 수행하였다. 그러나 지금까지 보인 예들은 미생물에서 세포내 효소를 분리하지 않고 세포자체를 효소축매로 사용하기 위하여 계면활성제를 이용하여 세포를 permeabilization한 것이다. 이 경우에 세포의 손상은 고려할 필요가 없으므로 이들의 경우 Triton X-100과 같은 비이온성 계면활성제를 사용하는 것보다는 이온성 계면활성제와 같은 변성화 계면활성제를 사용하는 것이 더 효과적이었다. 그러나 계면활성제를 위와 같은 생축매 시스템을 위하여 사용하지 않고 배양 중에 목적산물의 분비를 증대시키기 위하여 사용하는 경우는 달리 고려하여야 한다. 비이온성 계면활성제는 비교적 세포에 유독하지 않으므로 이러한 형태의 계면활성제가 목적산물의 분비를 위하여 사용될 수 있다. 이러한 비이온성 계면활성제에는 Tween 80과 Triton X-100이 가장 널리 사용된다. 일반적인 cellulase 생산 배지에는 Tween 80이 0.2%정도 포함되어 cellulase의 분비를 증대시키고 있다. Kruszewska 등(14)은 곰팡이의 일종인 *Trichoderma reesei* 배양에서 20 mM choline과 0.06%(w/v) Tween 80을 배지에 첨가하여 배양하면서 cellulase의 분비를 촉진시켰다. 결과로 250시간 배양시 choline의 경우 약 1.5배, Triton X-100의 경우 약 1.3배의 효소활성의 증가를 보였다.

포도당과 에탄올 생산을 위한 전분의 당화에 사용되는 Glucoamylase(E.C. 3.2.1.3)는 *S. cerevisiae*에서는 발현이 되지 않는다. 그러므로 본 연구에서는 *Saccharomyces diastaticus*의 glucoamylase 유전자인 STA 유전자(15,16)를 이용하였다. 신호서열(signal sequence)은 STA유전자의 본래의 것을 이용하였다. 이전 연구에서 본 연구팀은 SUC2-STA의 유전자를 함유하는 여러 복제수를 갖는 재조합 플라스미드를 제작하였다(17).

본 연구에서는 대표적인 비이온성 계면활성제인 Triton X-100과 Tween 80을 배양배지에 첨가하여 재조합효모 배양에서의 세포성장과 외래 glucoamylase 생산 및 분비에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

Saccharomyces cerevisiae MMY2(a, *ura3-52*, *sta*⁰, *sta10*) 균주를 숙주세포로 사용하였다. Fig. 1과 같은 STA 유전자와 SUC2 프로모터 그리고 STA 신호서열을

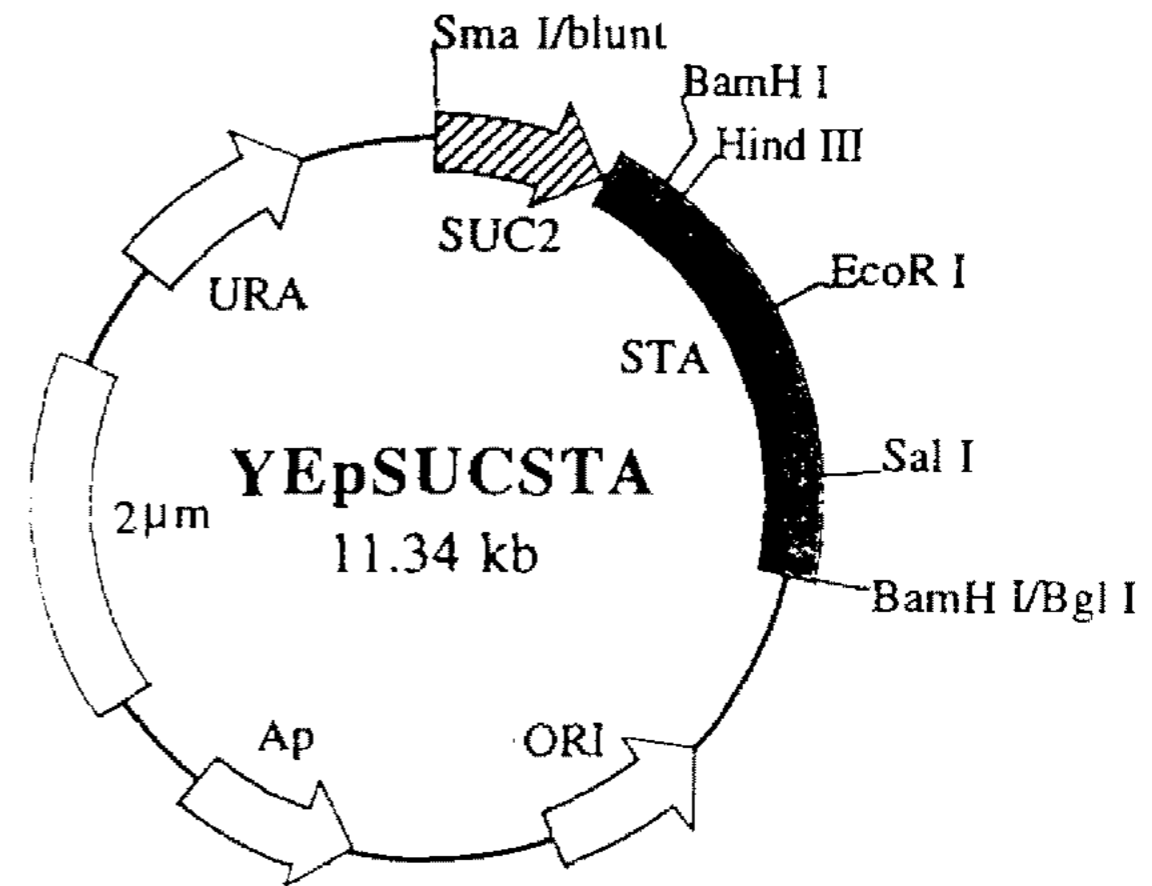


Fig. 1. Gene map for recombinant plasmid YEpSUCSTA. Abbreviations; ORI: *E. coli* replicating origin, 2 μ m: yeast replicating origin, URA: *URA3* gene, Ap: ampicillin resistance gene.

포함하는 재조합 플라스미드 YEpSUCSTA를 MMY2에 형질전환시켜 얻은 형질전환체들을 MMY2SUCSTA라고 명명하였다(17). 효모는 100 ml 배지에서 30°C로 배양하였다. 집종용 배지는 0.67% yeast nitrogen base without amino acids(Difco), 0.6% casamino acid(Sigma), 및 2% 포도당으로 만들어진 SDC 최소배지를 사용하였으며 배양배지는 0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.025% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2% yeast extract, 0.3% bacto-peptone, 1% 포도당, 1% 전분 그리고 50 mM succinate로 이루어진 SSM-S 배지를 사용하였다. 배지의 초기 pH는 6.5로 조정하였다. 전분은 glucoamylase의 생합성을 위한 탄소원으로 첨가하였다(17).

세포질량, glucoamylase 활성 및 permeabilization 효과 분석

세포질량은 600 nm 파장에서 spectrophotometer (Kontron; UVICON 930)로 측정하였다. Glucoamylase 활성을 측정하기 위하여 0.7 ml 배양액에 0.1 ml 1 M sodium acetate buffer(pH 5.0)와 0.2 ml 8% 전분용액(Junsei)을 넣어 섞은 후 50°C에서 30분 동안 반응시켰다. Glucoamylase 반응에 의하여 전분용액으로부터 생성된 포도당 농도는 glucose-diagnostic kit(Sigma, No. 510)를 사용하여 측정하였다. Glucoamylase 활성은 unit로 나타내었으며 1 unit는 위의 조건에서 1분 동안 생성되는 1 μ mol의 포도당으로 정의하였다. Permeabilization 효과는 배양액에 계면활성제를 첨가한 후 적당한 시간 간격으로 sampling하여 이 안에 들어있는 glucoamylase의 활성을 측정함으로써 수행하였다. Resting cell 조건으로 유지시키면서 permeabilization 효과를 조사하는 경우는 재조합 효모를 2일 배양한 후 수확하여 증류수로 세척하고 이들 세포를 0.2%(v/v) 계면활성제가 들어있는 sodium acetate buffer에 넣은

후 21 시간이 되었을 때 분비되는 glucoamylase의 활성을 측정하였다.

세포 분획

세포를 수확한 후 10 mM sodium azide로 세척하였다. 세포를 spheroplast buffer(0.1 M sodium acetate (pH 5.0), 1 M mannitol, 10 mM sodium azide, 1 mM EDTA, and 0.1 M β -mercaptoethanol)에 넣고 TEN buffer(1 mM EDTA, 10 mM NaCl, and 10 mM Tris-Cl(pH 7.6))에 용해시킨 15 mg/ml Zymolase 20T(Seikagaku Corp.)를 첨가하여 45°C에서 1 시간동안 반응시켰다. 그후 4°C, 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 spheroplast를 제거하고 상등액을 분리하여 페리플라즈름 glucoamylase 시료로 사용하였다. 그리고 나서 이 spheroplast에 lysis buffer(0.1 M sodium acetate (pH 5.0), 10 mM sodium azide, 1 mM EDTA and 0.1% (v/v) Triton X-100)를 넣고 glass bead(Sigma, 425~600 microns)를 이용하여 물리적으로 파쇄하였다. 파쇄와 냉각을 여러 번 번갈아 수행한 후 4°C, 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 세포질 (cytoplasm) glucoamylase 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

계면활성제의 재조합효모 배양에 미치는 영향

비이온성 계면활성제 중 대표적인 Triton X-100과 Tween 80의 효모 세포막의 permeabilization 효과에 대하여 조사하였다. 재조합효모를 2일 배양한 후 수확하여 증류수로 세척하여 이들 세포를 0.2%(v/v) 계면활성제가 들어있는 sodium acetate buffer에 넣어 resting cell 조건을 유지시키면서 21시간 후 분비되는 glucoamylase의 활성을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 것과 같이 상대적으로 분비되는 glucoamylase 활성은 각

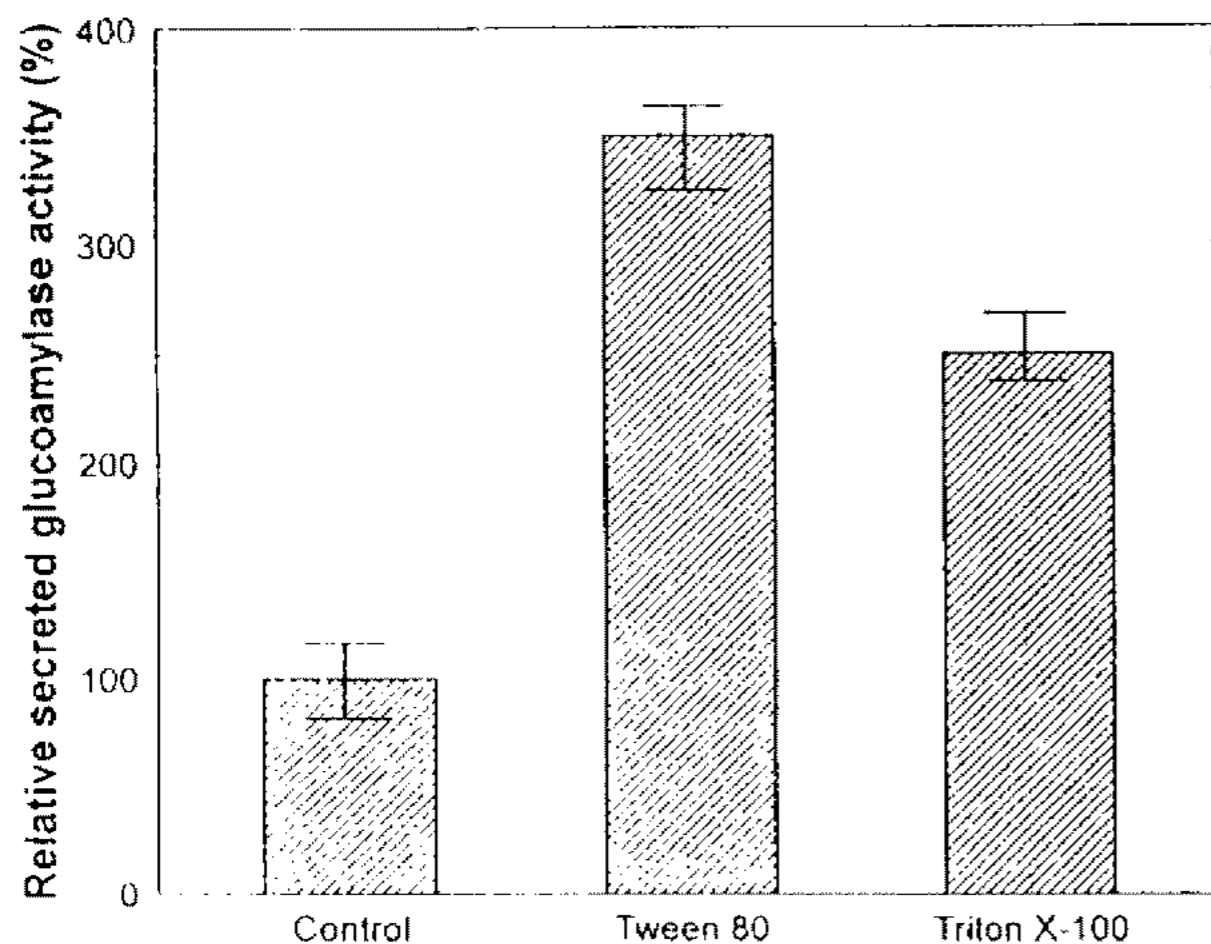


Fig. 2. Effects of non-ionic surfactants on glucoamylase secretion from resting cells of recombinant yeast MMY2SUCSTA. Surfactant concentration was 0.2% (v/v).

비이온성 계면활성제에서 높게 나타났다. 특히 Tween 80의 경우에 높은 활성을 보였다. 그러나 이러한 결과들은 세포가 자라지 않는 상태에서의 영향이므로 실제 세포배양에서의 목적단백질의 분비에 미치는 계면활성제의 영향은 어느정도 차이가 있을 것으로 추측된다.

이 두 가지 비이온성 계면활성제의 permeabilization 효과를 확인하였으므로 이를 이용하여 재조합효모 배양에서의 목적단백질의 분비 증대효과를 조사하였다. 배양초기부터 0.2%(v/v)의 계면활성제를 첨가하여 배양하면서 glucoamylase의 활성을 조사하였다. Fig. 3에서 보는 것과 같이 Tween 80의 경우 세포성장은 계면활성제를 첨가하지 않은 경우에 비하여 약간 증가하였다. 이에 따라 배양액에서 측정되는 glucoamylase 활성도 약 5% 증가하였다. 그러나 비활성(specific activity)은 계면활성제를 첨가하지 않은 것보다 도리어 약 5% 작게 나타났다. Table 1에 glucoamylase 활성분율을 나타내었다. 분비효율을 전체 glucoamylase 활성에 대한 배양액으로 분비된 glucoamylase 활성이라고 정의할 때 Tween 80을 첨가한 경우의 분비효율은 계면활성

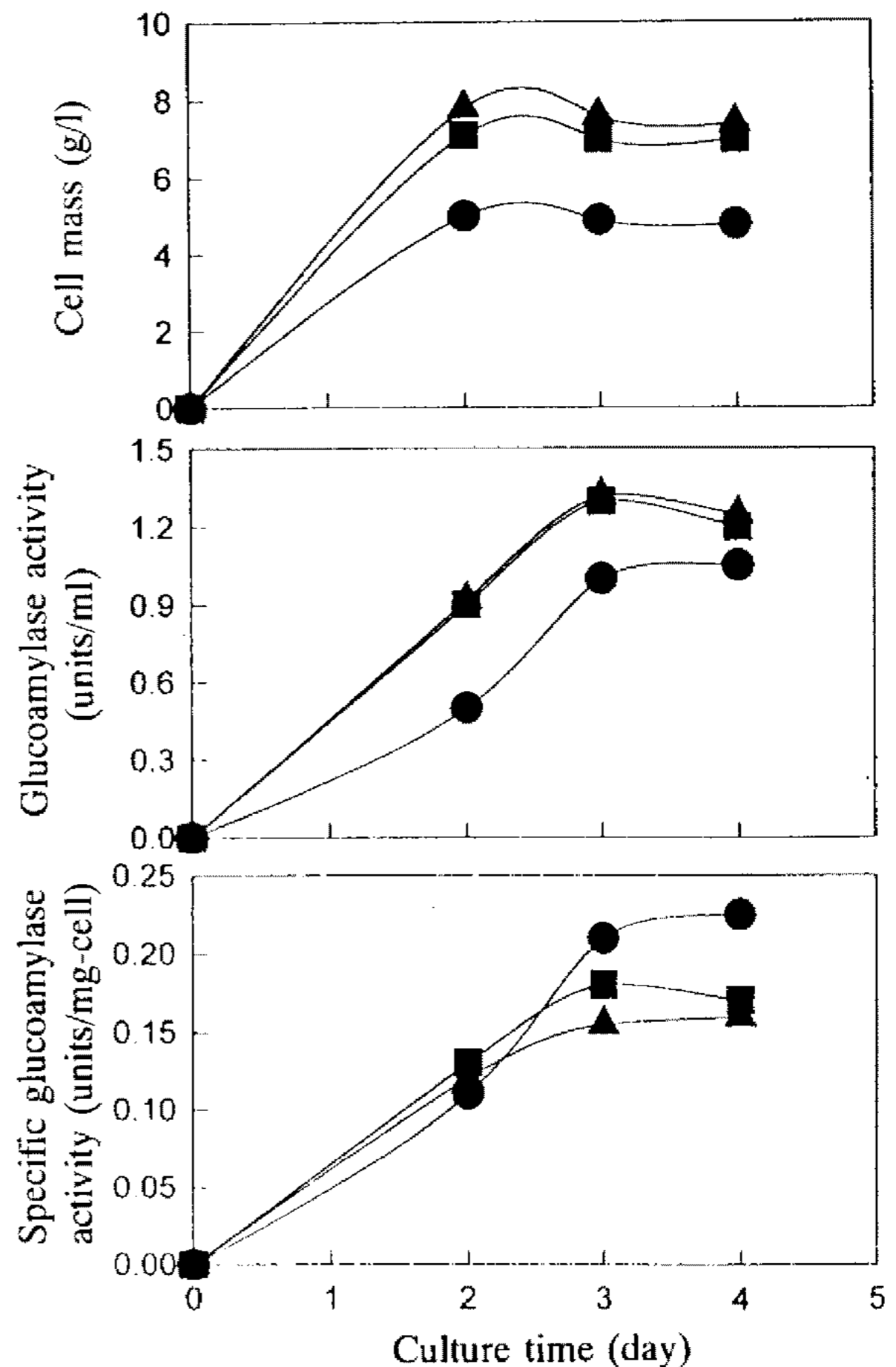


Fig. 3. Effects of non-ionic surfactants on cell growth and glucoamylase production from recombinant yeast MMY2 SUCSTA culture. 0.2% (v/v) surfactant was added in culture broth in the initial stage. Yeast was grown in 100 ml SSM-S medium for 4 days. Symbol; ■: control, ▲: Tween 80, ●: Triton X-100.

Table 1. Localization of glucoamylase from recombinant yeast MMY2SUCSTA culture with or without addition of non-ionic surfactants.

Surfactant	Fraction of glucoamylase activity (%)		
	Culture broth	Periplasm	Cytoplasm
Control	71.9	6.3	21.8
Tween 80	71.9	6.9	21.2
Triton X-100	78.4	10.6	11.0

Surfactant concentration was 0.2% (v/v). Yeast was grown in 100 ml SSM-S medium for 4 days.

제를 첨가하지 않은 경우와 같은 약 71.9%로 나타났다. 그러므로 배양조건에서의 Tween 80은 glucoamylase의 분비를 증대시키는 역할을 수행하지는 않음을 알 수 있었다. Tween 80은 지질을 기본으로 하기 때문에 탄소원으로 이용될 수 있다고 보고되고 있으므로(18) 배양조건에서는 Tween 80이 세포성장을 위한 탄소원으로 사용된 것으로 생각된다. 이 경우 Tween 80은 탄소원으로 사용되어 세포 농도를 증가시켰으나 이에 따른 배지 내에서의 농도 감소로 permeabilizing agent의 역할을 수행하지 못한 것으로 생각된다. Fig. 2의 resting cell 조건의 경우는 세포가 성장을 하지 않기 때문에 Tween 80은 탄소원으로 사용되지 못하고 배지에 계속 남아 permeabilizing agent의 역할을 수행할 수 있었던 것으로 생각할 수 있다. Tween 80의 경우에 반하여 Triton X-100의 경우에는 세포성장의 저해를 가져오는 것을 알 수 있었다. Triton X-100이 비이온성 계면활성제로 비교적 세포에 무해하다고는 하나 본 연구시스템에서는 어느 정도의 세포성장의 저해를 나타내었다. 이에 의하여 배양액으로 발현, 분비되는 glucoamylase의 활성은 작게 측정되었다. 그러나 비활성은 Triton X-100을 첨가한 경우가 계면활성제를 첨가하지 않은 경우에 비하여 높은 수치로 나타나는 것을 알 수 있었다 (약 26.5% 증가). 또한 Triton X-100을 첨가한 경우 분비효율은 Table 1에서 보는 것과 같이 약 78.4%로 계면활성제를 첨가하지 않은 경우에 비하여 약 6.5% 정도 증가한 수치로 나타났다. 세포질의 분율은 21.8%에서 11.0%로 Triton X-100 첨가에 의하여 약 반정도의 감소를 보였다. 이에 따라 Triton X-100이 재조합효모 배양에서 세포성장의 저해를 일으키는 반면에 목적산물인 glucoamylase의 분비를 증대시키는 역할을 수행함을 알 수 있었다.

Triton X-100 첨가에 의한 glucoamylase 생산 및 분비 향상

Triton X-100의 첨가에 의하여 재조합효모 배양에서 외래 glucoamylase의 분비를 증대시키는 하였으나 세포성장에 저해를 주어 실제적인 생산량은 감소를 나타내었다. 그러므로 이러한 문제를 해결하기 위하여서는

Table 2. Effects of Triton X-100 on glucoamylase production and secretion from recombinant yeast MMY2SUCSTA.

	Cell mass (g/l)	Glucoamylase activity (units/ml)		
		Culture broth	Periplasm	Cytoplasm
Control	6.40	1.16(71.6%)	0.10(6.2%)	0.36(22.2%)
Triton X-100	6.39	1.30(78.8%)	0.11(6.7%)	0.24(14.5%)

0.2% (v/v) Triton X-100 was added in culture broth after 1 day culture. Yeast was grown in 100 ml SSM-S medium for 4 days.

세포성장에의 저해를 막는 방법이 필요하였다. 이에 따라 배양 초기부터 계면활성제를 첨가하지 않고 배양 1일 후에 첨가하는 방식을 이용하였다. Table 2에서 보는 것과 같이 배양 1일 후에 Triton X-100을 첨가하는 경우 세포성장에 저해를 주지 않음을 알 수 있었다. 이는 계면활성제의 첨가없이 1일 배양에 의하여 효모 세포가 어느 정도의 세포량에 도달하였고 세포벽이 어느 정도 두터워졌으므로 계면활성제에 의한 저해를 최소화시킬 수 있었던 것으로 추측된다(19). Triton X-100의 첨가에 의하여 분비효율은 78.8%로 첨가하지 않은 경우보다 약 7.2% 증가하였고 배양액으로 발현, 분비된 glucoamylase 활성은 1.30 units/ml로 약 12.1% 증가하였다. 계면활성제를 첨가하지 않은 경우에도 분비는 약 70%(페리플라즘의 것과 합한다면 약 80%) 이상이 되므로 계면활성제 첨가에 의하여 매우 커다란 분비효율의 증가를 기대하기란 어렵다. 그러나 최적의 Triton X-100의 첨가농도와 첨가시기를 결정한다면 이 이상의 어느 정도의 분비 증가를 기대할 수는 있을 것이다. 그러므로 목적산물의 분비에 대한 비이온성 계면활성제의 농도 및 첨가시기 영향의 연구가 수행중에 있다.

막용해(membrane solubilization)에 대한 계면활성제의 기작에 대한 연구는 많이 이루어져 왔다(8,21). 그러나 미생물 배양에서 목적산물의 분비를 촉진시키는 비이온성 계면활성제의 기작은 아직 정확히 이해되고 있지는 않다. 다만 비이온성 계면활성제의 기작은 세포막을 leaky하게 하여주는 것과 비활성화(inactivation)로부터 효소를 방어하는 두가지로 크게 생각되어지고 있으나 다른 기작에 의한 것으로 보고되는 경우(14)도 있다. Wittenberger 등(21)에 의하면 박테리아에서는 이러한 계면활성제들이 막의 유동성(fluidity)을 변형시킨다고 보고하였다. 그러나 이러한 영향은 filamentous fungi에서는 거의 나타나지 않았다(22). 본 연구에서는 비이온성 계면활성제 중의 하나인 Triton X-100의 배양첨가시 목적산물인 glucoamylase의 세포질내 분율은 감소하고 페리플라즘과 배양액으로의 분율이 늘어나는 것으로부터 Triton X-100이 효모 세포막을 leaky하게 하여 주어 세포질내의 glucoamylase의 페리플라즘이나 배양액내로의 분비를 도와주는 것으로 추측할 수 있다.

계면활성제가 미생물에 의하여 생산되는 단백질의 분비를 촉진하는 기작에 대한 연구는 아직 미흡하며 비이온성 계면활성제와 같은 계면활성제가 단백질 분비에 미치는 영향 및 기작은 단백질생산 연구차원에서 중요하다.

요 약

비이온성 계면활성제인 Triton X-100과 Tween 80의 재조합효모 배양에서의 외래 glucoamylase 생산과 분비에 대한 영향에 대하여 조사하였다. Tween 80을 첨가한 경우 분비에의 증대 역할은 수행하지 못하였다. Triton X-100 첨가의 경우에는 세포성장에 저해가 있는 반면에 분비효율의 증대가 일어났다. Triton X-100의 세포성장 저해 효과를 방지하기 위하여 배양 1일 후에 첨가한 결과 세포성장은 저해를 받지 않았으며 분비가 증가하여 배양액으로 분비된 glucoamylase 활성이 약 12% 증가하였다.

참고문헌

1. Kingsman, S.M., A.J. Kingsman, and J. Mellor. 1987. The Production of mammalian proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biotechnol.* **5**: 53-57.
2. Hallewell, R.A., R. Mills, P. Tekamp-Olson, R. Blacher, S. Rosenberg, F. Otting, F.R. Masiarz, and C.J. Scandella. 1987. Amino terminal acetylation of authentic human Cu, Zu superoxide dismutase produced in yeast. *Bio/Technology*. **5**: 363-366.
3. Smith, R.A., M.J. Duncan, and D.T. Moir. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* **229**: 1219-1223.
4. Rudolph, H.K., A. Antebi, G.R. Fink, C.M. Buckley, T.E. Dorman, J. Le Vitre, L.S. Davidson, J. Mao, and D.T. Moir. 1989. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMRI, a member of a Ca^{2+} ATPase Family. *Cell* **58**: 133-145.
5. Turner, B.G., G.C. Avgerinos, L.M. Melnick, and D.T. Moir. 1991. Optimization of pro-urokinase secretion from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 869-875.
6. Castilho-Valavicius, B. and A.C. Schenberg. 1989. Characterization of secretion of mouse pancreatic -amylase secreted by *S. cerevisiae*. poster presented at The Annual Meeting of the Genetic Society of America, Atlanta, GA.
7. Kleinman, M., I.H. Evans, and E.A. Bevan. 1988. Sodium phosphate enhancement of starch hydrolysis by a diastatic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Lett.* **10**: 825-828.
8. Helenius, A. and K. Simons. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 29-79.
9. Declaire, M., W. De Cat, and N.V. Huynh. 1987. Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining in situ β -galactosidase activity. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 300-302.
10. Joshi, M.S., L.R. Gowda, and S.G. Bhat. 1987. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide. *Biotechnol. Lett.* **9**: 549-554.
11. Gowda, L.R., M.S. Joshi, and S.G. Bhat. 1988. In situ assay of intracellular enzymes of yeast (*Kluyveromyces fragilis*) by digitonin permeabilization of cell membrane. *Anal. Biochem.* **175**: 531-536.
12. Naglak, T.J. and H.Y. Wang. 1990. Recovery of a foreign protein from the periplasm of *Escherichia coli* by chemical permeabilization. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 603-611.
13. Gowda, L.R., N. Bachhawat, and S.G. Bhat. 1991. Permeabilization of bakers' yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 154-157.
14. Kruszewska, J., G. Palamarczyk, and C.P. Kubicek. 1990. Stimulation of exoprotein by choline and Tween 80 in *Trichoderma reesei* QM 9414 correlates with increased activities of dolichol phosphate mannose synthase. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1293-1298.
15. Yamashita, I., K. Suzuki, and S. Fukui. 1985. Nucleotide sequence of the extracellular glucoamylase gene *STA1* in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* **1613**: 567-573.
16. Pretorius, I.S., T. Chow, D. Modena, and J. Marmur. 1986. Molecular cloning and characterization of the STA 2 glucoamylase gene in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 29-35.
17. Cha, H.J., Y.J. Yoo, J.H. Ahn, and H.S. Kang. 1992. Expression of glucoamylase gene using *SUC2* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Lett.* **14**: 747-752.
18. Papaparaskevas, D., P. Christakopoulos, D. Kekos, and B.J. Macris. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotech. Lett.* **14**: 397-402.
19. Cid, V.J., A. Duran, and M. Sanchez. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews.* **59**: 345-386.
20. De Foresta, B., M. Le Maire, S. Orłowski, P. Champeil, S. Lund, J.V. Moller, F. Michelangeli, and A.G. Lee. 1989. Membrane solubilization by detergent: Use of brominated phospholipids to evaluate the detergent-induced changes in Ca^{2+} -ATPase/lipid interaction. *Biochemistry* **28**: 2558-2567.
21. Wittenberger, C.L., A.L. Beaman, and L.N. Lee. 1978. Tween 80 Effect on glucosyltransferase by *Streptococcus salivarius*. *J. Bacteriol.* **133**: 231-239.
22. Panda, T., H. Gruber, and C.P. Kubicek. 1987. Stimulation of protein secretion in *Trichoderma reesei* by Tween surfactants in not correlated with changes in enzyme localization or membrane fatty acid composition. *FEMS Microbiology Letters* **41**: 85-90.

(Received 30 August 1996)