

산업용 *Saccharomyces cerevisiae*에서 *Aspergillus awamori* Glucoamylase 유전자의 발현

강동명 · 이수아 · 전영현 · 진종언¹ · 이황희 · 배 석*

전남대학교 자원식물연구소 생물학과, ¹동강대학 피부미용과

전분 이용이 가능한 산업용 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 개발하기 위해 alcohol dehydrogenase 유전자 프로모터(*ADC1p*)의 조절하에 발현되는 *Aspergillus awamori* glucoamylase cDNA 유전자(*GAI*)를 산업용 *S. cerevisiae*의 염색체에 도입하였다. 산업적 이용에 적합한 효모균주를 얻기 위해 세균 ampicillin 저항성 유전자가 제거되고 *GAI* 유전자와 선별 표지유전자로 *S. cerevisiae* aureobasidin A 저항성 유전자(*AURI-C*)와 재조합 부위로 Ty retrotransposon δ -서열이 포함된 integrative cassette를 제조하였다. 이 δ -integrative cassette로 형질전환된 산업용 *S. cerevisiae*는 배지상에 glucoamylase를 생산 분비하였고 전분을 유일한 탄소원으로 하여 성장하였다. 형질전환체를 비선택배지에서 배양했을 때 삽입된 *GAI* 유전자가 100세대까지 안정되게 유지되었다.

Key words □ amylolytic *Saccharomyces cerevisiae*, δ -mediated integration, glucoamylase gene

양조 및 제빵산업에서 사용되는 산업용 *Saccharomyces cerevisiae*는 값싼 기질인 전분을 분해할 수 있는 효소를 생산하지 못하므로 *Aspergillus* glucoamylase를 생산 분비할 수 있는 재조합 *S. cerevisiae*가 제조된다면 전분으로부터 에탄올 혹은 단세포 단백질로의 직접 전환이 가능할 것이다(13, 14). 곰팡이 *Aspergillus awamori*를 비롯한 *Aspergillus* 종들의 glucoamylase [α -(1,4), (1,6)-D-glucan glucohydrolase (EC 3.2.1.3)]는 *Saccharomyces diastaticus*에서 전분의 α -1,4결합만을 분해하는 glucoamylase (9, 22)와 달리 α -1,4결합과 α -1,6결합을 모두 분해하여 포도당을 생산할 수 있으므로 산업적으로 전분의 α -amylase에 의한 액화과정과 함께 당화과정에 널리 이용되고 있다(3, 18, 25).

최근까지 많은 외래 amylase 유전자들이 *S. cerevisiae*에 도입 발현된 바 있는데 주로 선별 표지유전자의 확인이 용이한 실험실용 반수체 *S. cerevisiae*가 숙주 효모로 이용되었다(3, 22). 이들 유전자의 발현은 yeast episomal plasmid (YEp) 벡터 혹은 yeast integrating plasmid (YIp) 벡터를 이용하는데 YEp 벡터는 copy 수가 많아 유전자 발현율이 높지만 장기간 배양에 사용되는 비선택배지에서 유전적으로 불안정하고, 유전자가 염색체에 도입되는 YIp 벡터는 안정성은 양호하나 발현율이 낮은 단점이 있다(10, 19). 또한 장기간 발효배양 공정에는 돌연변이에 취약하여 불안정한 실험실용 반수체 *S. cerevisiae*보다 이배체(diploid)나 다배체(polyploid)인 산업용 효모균주가 이용되고 있다(2, 22).

산업용 야생형 다배체 효모에 외래 유전자를 도입시키고 발현시키는 데는 일반적으로 이들 효모가 항생제 혹은 항대사물질 저항성 유전자가 없으므로 특정 항생제 혹은 항대사물질에 민감

하다는 특성을 이용할 수 있다(15). 그러므로 이러한 저항성 유전자가 우성 선별 표지유전자로 포함된 YIp 벡터를 제조하고 숙주 효모에 도입시키면 외래 유전자 산물을 생산 분비하는 산업용 *S. cerevisiae* 선발이 가능할 것이다. 산업용 *S. cerevisiae* 내에 외래 유전자 도입을 위한 벡터는 geneticin (G418) 저항성 유전자, sulfometuron methyl 저항성 유전자(*SMR1*) 및 aureobasidin A 저항성 유전자(*AURI-C*)같은 항생제 저항성 유전자들이 유용하게 이용되고 있다(4, 22, 24). 50세대 이상까지 도입된 외래 유전자가 안정되게 유지되고 고효율로 발현되기 위해서는 ribosomal DNA (rDNA) 서열이나 Ty retrotransposon δ -서열과 같은 반복서열을 YIp 벡터에 삽입하여 이 서열을 재조합부위로 숙주 효모 염색체에 multicopy로 도입시키는 연구 보고가 많다(1, 8, 17, 20, 23).

본 연구에서는 *A. awamori* glucoamylase cDNA 유전자(*GAI*)를 도입하여 전분을 직접 포도당으로 전환할 수 있는 산업용 다배체 *S. cerevisiae* 개발을 목적으로, *A. awamori* glucoamylase 유전자가 염색체에 다중 도입될 수 있는 δ -YIp 벡터 시스템을 제조하였고 효모에 형질전환시켜 전분을 유일한 탄소원으로 하는 비선택배지에서 안정하게 glucoamylase를 생산하는 산업용 다배체 *S. cerevisiae* 형질전환체 균주를 선발하였다. 또한 이 균주들에 도입된 glucoamylase 활성과 유전자의 안정성을 비교, 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

Escherichia coli JM83[*ara*, Δ (*lac-proAB*), *rspL*, Φ 80d, *lacZ* Δ M15]를 형질전환숙주와 플라스미드제조 및 증폭에 사용하였으며, 실

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 062-530-3412, Fax: 062-530-3409
E-mail: sukbai@chonnam.ac.kr

험실용 반수체 *S. cerevisiae* W303-1A(7)와 산업용 다배체 *S. cerevisiae* ATCC 4126(16)를 효모 형질전환 숙주로 이용하였다. 2- μ replication origin을 가지고 있는 YEp 벡터인 pGAC9(6)에 포함된 *A. awamori* *GAI* 유전자와 pAUR123(TaKaRa, Japan)을 골격으로 이용한 YIp δ AURSA(8)에 존재하는 Ty retrotransposon 5'-말단의 δ -서열을 재조합벡터에 도입하였다. pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)는 PCR을 통해 증폭된 유전자의 클로닝에 이용하였다.

배지와 배양조건

E. coli 형질전환체는 50 μ g/ml ampicillin이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지에서 배양하였고, 효모 배양에는 YPD 배지(1% yeast extract, 1% Bacto-peptone, 2% glucose)를 사용하였다. Aureobasidin A (1 μ g/ml, TaKaRa, Japan)가 첨가된 YPD 평판배지에서 생장한 효모 형질전환체는 YPS (3% soluble starch를 함유한 YP) 평판배지에 옮겨 30°C에서 5 - 7일간 배양한 후 4°C에서 2일간 유지시켰다. Glucoamylase 활성을 측정하기 위해 효모 형질전환체를 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)이 함유된 YPS (BYPS, 2% soluble starch를 함유한 YP) 배지에서 30°C로 4 - 5일간 배양하였다. 배지의 잔존 전분함량은 Kim 등의 방법(9)에 따라 전분-요오드 반응에 의해 측정하였다.

Glucoamylase 생산 균주의 선별

YPD 평판배지에서 자란 형질전환체 중 콜로니주위로 투명환이 형성되지 않는 숙주 효모와 달리, 투명환이 형성된 클론을 1차적으로 glucoamylase를 생산하는 형질전환체로 판정하였고 glucoamylase의 세포의 분비 유무를 알기 위해 숙주 효모와 형질전환체들을 BYPS 배지에서 배양한 후 배양 상등액을 이용하여 glucoamylase 활성을 측정하였다.

유전자 추출과 *S. cerevisiae* 형질전환

*E. coli*에서 plasmid DNA의 추출은 Qiagen Plasmid Maxi kit (Qiagen, USA)를 이용하여 수행하였고, PCR 증폭 DNA는 QIAquick PCR purification kit와 QIAquick gel extraction kit를 이용하였다. 주형 DNA에 이용할 효모의 genomic DNA 추출은 Zhu 등의 방법(26)에 의해 실시하였다. DNA 분석과 형질전환은 Sambrook과 Russell 방법(21)에 따라 실시하였다. 한편, 효모의 형질전환은 Hill 등의 lithium acetate/DMSO 방법(5)에 의해 실시하였다.

재조합 플라스미드 제조

pGAC9의 2.1 kb *A. awamori* *GAI* 유전자를 *AMY* 유전자가 제거된 YIpAURSA (8)의 *ADC1* promoter (*ADC1p*)에 존재하는 *SmaI* 부위에 도입시켜 YIpAURG1를 제조하였다(Fig. 1A). 염색체 XI의 *Aur1* 부위에 homologous recombination에 의해 도입될 수 있도록 YIpAURG1의 aureobasidin A 저항성 유전자(*AUR1-C*)내에 있는 *Apal* 부위를 *Apal* 처리하여 선형화하였다(2).

GAI 유전자 cassette의 PCR 증폭

ADC1 promoter-*GAI* 유전자-*CYC1* terminator를 증폭하기 위해 YIpAURSA의 염기서열을 이용하여 제작한 PCR primers의 정방향 염기서열은 5'-TTGCAGATCTGCATGCAACTTCTTTTCTTTTTTTT-3'이고 역방향 서열은 5'-GGCCAGATCTTACGTAGGCCGCAAATTAAGCCTTCG-3'이었다. 한편, 재조합 플라스미드에 삽입할 δ -서열의 증폭은 Choi 등(2)이 기술한 primer와 조건을 이용하여 실시하였다.

GAI 유전자의 안정성 조사

형질전환체를 Nieto 등의 방법(17)에 따라 5 ml YPD 배지에서 계대배양하면서 20, 40, 80, 100세대 후 세포를 취하여 YPD 평판배지에 단일 콜로니들이 형성되도록 도말하고 YPS 평판배지에 옮겨 전체 콜로니 중 주위에 투명환이 형성되는 *GAI* 유전자 보유 콜로니를 백분율로 산출하여 도입된 *GAI* 유전자의 안정성을 결정하였다.

Glucoamylase 활성 측정

Glucoamylase 활성은 Steyn과 Pretorius 방법(22)으로 측정하였다. 반응기질로서 50 mM sodium acetate 완충용액(pH 4.5)이 함유된 0.5% soluble starch 950 μ l에 배양상등액 50 μ l를 첨가한 후 혼합하여 60°C에서 30분 동안 반응시켰다. 생성된 환원당은 glucose oxidase/peroxidase kit (Sigma, USA)를 이용하여 정량하였고 glucoamylase 활성 1 unit (U)는 반응기질에서 1 μ mol 포도당을 1분 동안 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

GAI 유전자 발현 증진을 위한 δ -YIp 벡터 제조

산업용 다배체 *S. cerevisiae*에서 *A. awamori* *GAI* 유전자 발현을 증진시키기 위해 δ -서열을 포함하고 있는 선형화된 YIp 벡터가 제조되었다. 산업용 다배체 *S. cerevisiae*는 실험실용 반수체 *S. cerevisiae*와 달리 선별 표지 유전자가 없으므로 우성 선별 표지 유전자가 있는 벡터에 의해서만 외래 유전자가 발현되는 형질전환체를 얻을 수 있다(15). 이 중 *AUR1-C* 유전자는 세균 항생제저항성 유전자와 달리 *S. cerevisiae* 자체의 *Aur1* 유전자에서 유래한 우성유전자이므로 식품산업용 재조합 효모의 제조에 이용할 수 있다(4). *AUR1-C* 유전자와 *GAI* 유전자가 포함된 YIpAURG1의 *BglII* 부위를 *BglII*와 Klenow fragment로 처리하고 이 부위에 δ -서열이 포함된 0.3 kb *SmaI* DNA 단편을 삽입하여 YIpAURG2를 제조하였다(Fig. 1B). YIpAURG2는 δ -서열 내에 하나의 *XhoI* 부위가 있으므로 *XhoI* 처리로 선형화시켜 형질전환에 이용하면 homologous recombination에 의해 염색체에 산재해 있는 많은 δ -서열에 다중 도입될 수 있다(2, 23). YIpAURG2의 *CYC1* terminator (*CYC1r*)에 존재하는 *HpaI* 부위에 또 하나의 δ -서열을 기존의 δ -서열과 방향성이 맞게 삽입하여 YIpAURG3를 제조하였다. 두 δ -서열을 가진 YIpAURG2를 *XhoI*

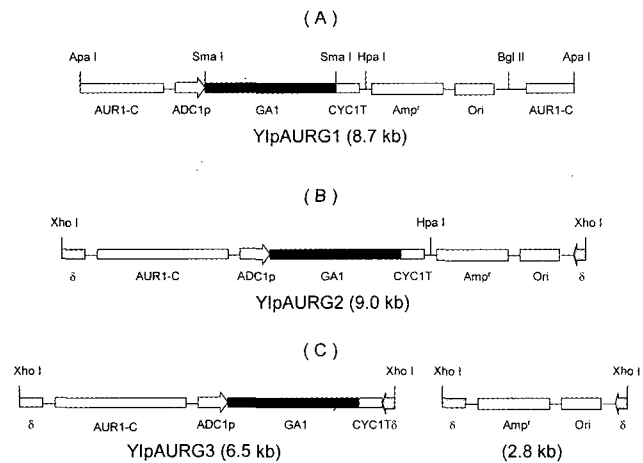


Fig. 1. Plasmid maps of linearized YIpAURG1 (A), YIpAURG2 (B) and YIpAURG3 (C) showing relative size, restriction sites, and location of insert DNA. YIpAURG1 was linearized by digesting with *Apa*I, YIpAURG2 and YIpAURG3 were linearized by digesting with *Xho*I, respectively.

으로 처리하면 ampicillin 저항성 유전자와 세균 origin을 포함한 2.8 kb DNA와 *ADC1p-GAI* cassette와 *AUR1-C* 유전자를 포함한 6.5 kb DNA로 분리되는데 6.5 kb DNA 단편을 전기영동 겔에서 회수하여 YIpAURG3로 명명하였다(Fig. 1C).

사용된 *S. cerevisiae*는 다배체 효모이므로 염색체에 도입된 *GA1* 유전자의 copy 수 측정은 할 수 없었으나 형질전환체(ATCC 4126/YIpAURG1, ATCC 4126/YIpAURG2 및 ATCC 4126/YIpAURG3) 염색체내에 이들 YIp 벡터의 도입여부를 알기 위해 *ADC1* promoter와 *CYC1* terminator의 염기서열에 의해 제작된 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, *S. cerevisiae*:ATCC 4126의 genomic DNA와 형질전환체의 genomic DNA를 주형 DNA로 이용하였을 때 형질전환체의 genomic DNA에서만 YIp 벡터내에 존재하는 *ADC1p-GAI-CYC1r*에 해당된 2.8 kb DNA 밴드가 증폭되어 형질전환체의 염색체내에 YIp 벡터가 도입되었음이 확인되었다(Fig. 2).

산업용 *S. cerevisiae*에서 Glucoamylase 발현과 분비

산업용 다배체 *S. cerevisiae*에 *GA1* 유전자를 도입하여 발현시킬 목적으로 선형화된 YIpAURG1, YIpAURG2 그리고 YIpAURG3를 이용하여 aureobasidin A 저항성(>1 µg/ml aureobasidin A)을 나타내는 형질전환체 ATCC 4126/YIpAURG1, ATCC 4126/YIpAURG2 그리고 ATCC 4126/YIpAURG3를 얻었다. 형질전환체 중 ATCC 4126/YIpAURG3는 YPS 평판배지에서 생장이 빠르고 콜로니 주위에 뚜렷한 투명환을 형성하여 glucoamylase의 생산이 가장 양호한 것으로 판단되었다(Fig. 3).

전분을 탄소원으로 하는 배지(BYPS)에서 성장한 형질전환체의 배양 상등액을 이용하여 glucoamylase 활성을 측정하였는데 형질전환체 중에서도 상대적으로 높은 glucoamylase 활성을 가진 균주들이 선별되었다. Table 1에서 보는 바와 같이 ATCC 4126/

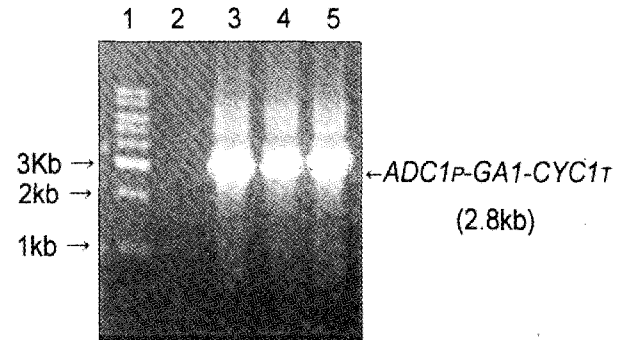


Fig. 2. Detection of DNA fragments of *ADC1p-GAI-CYC1r* amplified by PCR on the agarose gel. Lane 1, DNA size marker (1 kb ladder); Lane 2, *S. cerevisiae* ATCC 4126 genomic DNA; Lane 3, ATCC 4126/YIpAURG1 genomic DNA; Lane 4, ATCC 4126/YIpAURG2 genomic DNA; Lane 5, ATCC 4126/YIpAURG3 genomic DNA.

YIpAURG1의 glucoamylase활성은 0.15 U/ml이었다. ATCC 4126/YIpAURG2와 ATCC 4126/YIpAURG3의 glucoamylase 활성은 ATCC 4126/YIpAURG1에 비해 각각 3 - 5배 증가하였다. 재조합부위로 δ -서열이 첨가된 YIpAURG2와 YIpAURG3는 염색체내에 많은 δ -서열(425 copies)(1, 11)에 *GA1* 유전자가 도입될 수 있어 copy 수 증가에 의해 발현율이 증가된 것으로 사료되었다(2, 8, 12). 또한 세균 plasmid DNA 부분이 제거된 YIpAURG3에 의한 glucoamylase 활성이 YIpAURG2보다 높은 결과는 염색체에 도입되는 DNA크기의 축소와 δ -서열에 도입되는 copy 수의 증가와 관련이 있다는 Lee와 Da Silva의 보고(11)와 일치하였다. 또한 YIpAURG3는 세균 항생제 저항성 유전자를 포함한 원핵성 plasmid DNA가 제거되어 있으므로 이를 이용한 재조합 맥주효모나 제빵용 효모 균주개발이 가능할 것이다(15, 17).

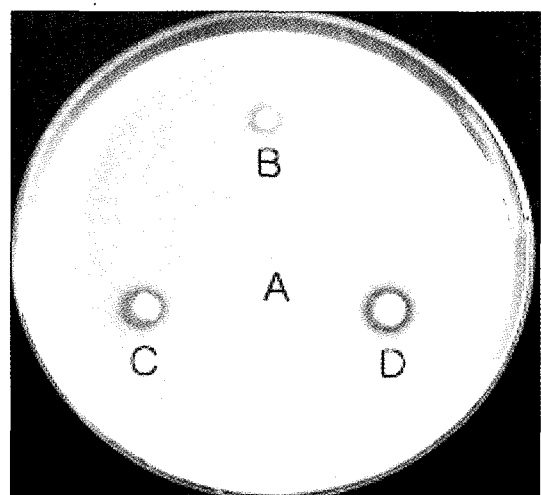


Fig. 3. Glucoamylase activities of *S. cerevisiae* transformants demonstrated on the YPS (YP containing 3% soluble starch) plate. Transformants were cultivated on the YPS plate at 30°C for 7 days. A, *S. cerevisiae* ATCC 4126; B, ATCC 4126/YIpAURG1; C, ATCC 4126/YIpAURG2; D, ATCC 4126/YIpAURG3.

Table 1. Glucoamylase activities in cell-free culture supernatants of *S. cerevisiae* transformants

Yeast strains	Glucoamylase activity ^a (U/ml)
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4126	0 ^b
ATCC 4126/YIpAURG1-1	0.12
ATCC 4126/YIpAURG1-2	0.15
ATCC 4126/YIpAURG2-1	0.38
ATCC 4126/YIpAURG2-2	0.42
ATCC 4126/YIpAURG2-3	0.45
ATCC 4126/YIpAURG3-1	0.66
ATCC 4126/YIpAURG3-2	0.72
ATCC 4126/YIpAURG3-3	0.76

^aYeast cells were cultivated in YPS media containing 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) at 30°C for 4 days.

^bValues were the means of results from triplicate experiments and were expressed in glucoamylase activities present in the culture supernatants.

Fig. 4에서 보는 바와 같이, 전분을 탄소원으로 하는 배지에서 전분을 이용하지 못하는 *S. cerevisiae* ATCC 4126는 성장하지 못했으나 glucoamylase를 생산하는 ATCC 4126/YIpAURG3는 전분을 분해하여 빨리 성장하였고 glucoamylase 활성이 배양 4 일에서 최대치에 이르렀으며, 배양 5일에 전분의 90%를 이용하였는데 δ -서열을 재조합 부위로 하는 다중 유전자 도입은 성장 속도에 크게 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있다(8, 11, 12). 25S ribosomal DNA (rDNA)를 재조합 부위로 포함한 YIp 벡터

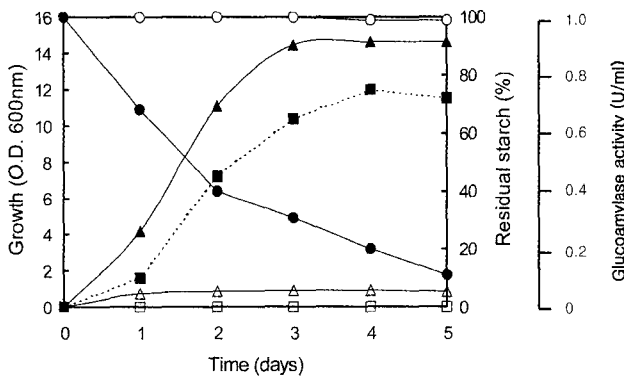


Fig. 4. Growth curves, time course of starch hydrolysis and extracellular glucoamylase activities in buffered YPS media. At different days, growth was measured by the optical density at 600 nm, and glucoamylase activity and hydrolyzed starch were measured in the culture supernatants. The residual starch results were presented as percentages taking as 100% of the starch in the uninoculated medium. Each point represented the average of triplicate measurements with a standard deviation of \pm 5%. \blacktriangle , O.D. 600 nm ATCC 4126/YIpAURG3; \triangle , O.D. 600 nm *S. cerevisiae* ATCC 4126; \blacksquare , U/ml ATCC 4126/YIpAURG3; \square , U/ml *S. cerevisiae* ATCC 4126; \bullet , starch % ATCC 4126/YIpAURG3; \circ , starch % *S. cerevisiae* ATCC 4126.

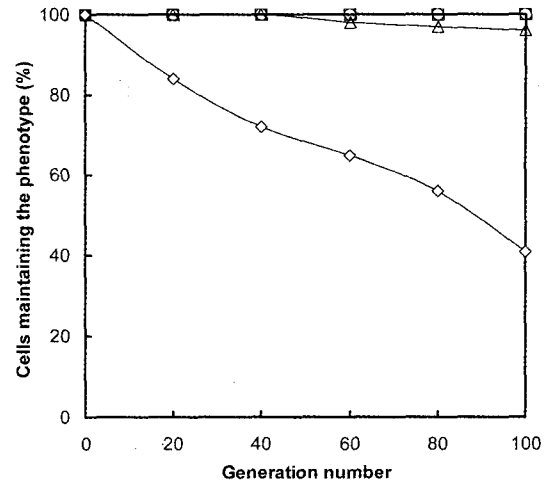


Fig. 5. Stability of the *GAI* gene in *S. cerevisiae* transformants after different numbers of generations of cell-multiplication. Maintenance of the *GAI* genes in W303-1A/pGAC9 (\diamond), ATCC 4126/YIpAURG1 (\triangle), ATCC 4126/YIpAURG2 (\square) and ATCC 4126/YIpAURG3 (\circ) represented the stability of *GAI* gene.

인 pRUG (10.2 kb)를 이용하여 *S. cerevisiae*에서 *A. awamori* *GAI* 유전자를 발현시킨 Lin 등의 결과(13)에서는 배양 후 5일에 전분의 75%를 이용하였고, 또한 *GAI* 유전자와 iso-amylase 유전자를 동시에 발현시켰을 때(14) 전분의 90%를 이용하였는데, 이는 염색체에 삽입되는 DNA 크기에 있어서 본 연구의 YIpAURG3 (6.5 kb)가 pRUG보다 작아 *GAI* 유전자 copy 수가 증가할 수 있으므로 발현을 증진과 함께 전분 이용을 증진에 기여한 것으로 판단되었다(11, 12).

형질전환체에 도입된 *GAI* 유전자의 안정성

형질전환체를 비선택 YPD 배지에서 100세대 동안 배양하면서 형질전환체에 도입된 YIp 벡터의 *GAI* 유전자 안정성을 YEp 벡터인 pGAC9과 비교하여 조사하였다(Fig. 5). 형질전환체 W303-1A/pGAC9에서는 배양이 지속되면서 pGAC9의 안정성은 급격히 감소했지만, 형질전환체 ATCC 4126/YIpAURG1에서는 YIpAURG1의 안정성이 95%이상 유지되었고 δ -서열이 도입된 YIpAURG2와 YIpAURG3의 안정성이 증가하여 100% 유지되었다(2, 8). 이러한 결과는 rDNA 중개 다중 도입에 의한 *GAI* 유전자 안정성이 50세대까지 유지되었다는 Lin 등의 보고(13)와 비교하여 볼 때 δ -서열이 rDNA 서열보다 염색체에 존재하는 copy 수가 많고 δ -서열 중개 다중 도입이 rDNA 중개 다중 도입보다 nontandem한 염색체 도입가능성이 크므로 도입 유전자의 안정성에 더 크게 기여할 수 있다는 보고(1, 11, 23)와 일치하였다. 현재 maltose 발효능이 낮은 제빵효모에 YIpAURG3를 도입하여 glucoamylase 활성이 있는 제빵효모 균주개발(20)을 진행하고 있으며 전분 가수분해율을 증진시키기 위해 *GAI* 유전자 외에도 pullulanase 혹은 isoamylase 유전자가 추가로 염색체에 도입된 재조합 균주 개발이 진행되고 있다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 전남대학교 특별연구사업비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Cho, K.M., Y.J. Yoo, and H.S. Kang. 1999. δ -Integration of endo/exo-glucanase and β -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. *Enzyme Microbiol. Technol.* 25, 22-30.
2. Choi, E.Y., J.N. Park, H.O. Kim, D.J. Shin, Y.H. Chun, S.Y. Im, S.B. Chun, and S. Bai. 2002. Construction of an industrial polyploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing *Saprolegnia ferax* β -amylase gene and secreting β -amylase. *Biotechnol. Lett.* 24, 1785-1790.
3. Dohmen, R.J., A.W.M. Strasser, U.M. Dahlems, and C.P. Hollenberg. 1990. Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (*GAMI*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 95, 111-121.
4. Hashida-Okado, T., A. Ogawa, M. Endo, R. Yasumoto, K. Takesako, and I. Kato. 1996. *AUR1*, a novel gene conferring aureobasidin resistance on *Saccharomyces cerevisiae*: A study of defective morphologies in Aurlp-depleted cells. *Mol. Gen. Genet.* 251, 236-244.
5. Hill, J., K.A. Ian, G. Donald, and D.E. Griffiths. 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 19, 5791.
6. Innis, M.A., M.J. Holland, P.C. McCabe, G.E. Cole, V.P. Wattman, R. Tal, K.W.K. Watt, D.H. Gelfand, J.P. Holland, and J.H. Meade. 1985. Expression, glycosylation, and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 228, 21-26.
7. Kang, H.A. and J.W.B. Hershey. 1994. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 3934-3940.
8. Kang, N.Y., J.N. Park, J.E. Chin, H.B. Lee, S.Y. Im, and S. Bai. 2003. Construction of an amyolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene. *Biotechnol. Lett.* 25, 1847-1851.
9. Kim, K., C.S. Park, and J.R. Mattoon. 1988. High-efficiency, one-step utilization by transformed *Saccharomyces* cells which secrete both yeast glucoamylase and mouse α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 966-971.
10. Kim, M.D., Y.J. Yoo, S.K. Rhee, and J.H. Seo. 2001. Enhanced transformation efficiency of an anticoagulant hirudin gene into *Saccharomyces cerevisiae* by a double δ -sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 61-64.
11. Lee, F.W.F. and N.A. Da Silva. 1997. Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 339-345.
12. Lee, F.W.F. and N.A. Da Silva. 1997. Sequential δ -integration for the regulated insertion of cloned genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 13, 368-373.
13. Lin, L.L., Y.J. Ma, H.R. Chien, and W.H. Hsu. 1998. Construction of an amyolytic yeast by multiple integration of the *Aspergillus awamori* glucoamylase gene into a *Saccharomyces cerevisiae* chromosome. *Enzyme Microbiol. Technol.* 23, 360-365.
14. Ma, Y.J., L.L. Lin, H.R. Chien, and W.H. Hsu. 2000. Efficient utilization of starch by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase and isoamylase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 55-59.
15. Marin, D., M. Jimenez, and L. Fernandez. 2001. Construction of an efficient amyolytic industrial yeast strain containing DNA exclusively from yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 249-253.
16. Ness, F., F. Lavallee, D. Dubourdiou, M. Aigle, and L. Dulau. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62, 89-94.
17. Nieto, A., J.A. Prieto, and P. Sanz. 1999. Stable high-copy-number integration of *Aspergillus oryzae* α -amylase cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol. Prog.* 15, 459-466.
18. Nunberg, J.H., J.H. Meade, G. Cole, F.C. Lawyer, P. McCabe, V. Schweickart, R. Tal, V.P. Wattman, J.E. Flatgaard, and M.A. Innis. 1984. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2306-2315.
19. Parekh, R.N., M.R. Shaw, and K.D. Wittrup. 1996. An integration vector for tunable, high-copy, stable integration in the dispersed Ty δ sites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 12, 16-21.
20. Saito, S., Y. Mieno, T. Nagashima, C. Kumagai, and K. Kitamoto. 1996. Breeding of a new type of baker's yeast by δ -integration for overproduction of glucoamylase using a homothallic yeast. *J. Ferment. Bioeng.* 81, 978-103.
21. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, New York.
22. Steyn, A.J.C. and I.S. Pretorius. 1991. Co-expression of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase-encoding gene and a *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 100, 85-93.
23. Wang, X., Z. Wang, and N.A. Da Silva. 1996. G418 selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 45-51.
24. Xie, Q. and A. Jimenez. 1996. Molecular cloning of a novel allele of *SMR1* which determines sulfometuron methyl resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 137, 165-168.
25. Yamasaki, Y., Y. Suzuki, and J. Ozawa. 1977. Three forms of α -glucosidase and a glucoamylase from *Aspergillus awamori*. *Agric. Biol. Chem.* 41, 2149-2161.
26. Zhu, H., F. Qu, and L. H. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plant, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucl. Acids Res.* 21, 5279-5280.

(Received February 15, 2005/Accepted April 11, 2005)

ABSTRACT: Expression of *Aspergillus awamori* Glucoamylase Gene in an Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Dong-Myeong Ghang, Su-A Lee, Young-Hyun Chun, Jong-Eon Chin¹, Hwanghee Blaise Lee, and Suk Bai* (Department of Biological Sciences, Institute of Resources Plant, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea, ¹Department of Cosmetology, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea)

To construct an amylolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*, the glucoamylase cDNA gene (*GAI*) from *Aspergillus awamori* was expressed under the control of the alcohol dehydrogenase gene promoter (*ADC1p*) and integrated into the chromosomes of industrial *S. cerevisiae*. An integrative cassette lacking bacterial ampicillin resistance gene but containing the *GAI* gene, δ sequences of Ty1 retrotransposon as target sites for homologous recombination and *S. cerevisiae* aureobasidin A resistance gene (*AUR1-C*) as the selection marker was constructed to obtain a strain eligible for commercial use. Industrial *S. cerevisiae* transformed with this δ -integrative cassette efficiently secreted glucoamylase into the medium and grew on starch as the sole carbon source. The transformants were mitotically stable for 100 generations in nonselective medium.