

## Glucoamylase 유전자 *STA*의 염색체내 삽입에 의한 *Saccharomyces diastaticus*의 glucoamylase 생성능 향상

안중석\* · 맹준호 · 강대욱 · 황인규 · 민태익

한국과학기술연구원 유전공학연구소 미생물공학연구실

*Saccharomyces diastaticus*의 glucoamylase 생성능을 증진시킬 목적으로 *STA1* 유전자를 Ylp vector를 이용하여 염색체에 도입해 주고자 하였다. *STA1* 유전자 5.8-Kb를 Ylp5 vector에 재조합하여 Ylp-*STA*를 제작하고, *S. diastaticus* GMT-11(a, *ura 3, STA1*)을 숙주균주로 하여 염색체의 *STA1* 유전자 부위에 homologous recombination되어 삽입되도록 형질전환을 실시하였다. 이렇게 하여 glucoamylase 생성능이 모균주에 비해 최대 6배까지 증대된 다양한 형질전환체들을 얻을 수 있었다. 그리고 glucoamylase 생성능이 증대된 형질전환체들의 염색체 DNA를 분리하여 Southern hybridization을 실시한 결과 Ylp-*STA*가 multi-copy integration되었음을 확인하였고, 또한 도입해 준 Ylp-*STA*는 세포분열이 30세대기간 동안 계속되어도 안정하게 유지되었음을 알았다.

**KEY WORDS** □ *Saccharomyces diastaticus*, glucoamylase productivity, multi-copy integration, *STA1*

기존의 에탄올 발효에 사용되는 *Saccharomyces cerevisiae*와 생리 및 유전적으로 매우 유사한 *S. diastaticus*는 glucoamylase를 세포외로 분비하여 전분으로부터 직접 에탄올을 생산할 수 있는 효모이다. 따라서 *S. diastaticus*를 이용한 전분의 직접발효에 의한 에탄올을 생산하고자 하는 많은 연구들이 있었다. 이때 이 균주의 glucoamylase 생성능이 전분의 직접발효에 의한 에탄올 생산성에 가장 중요한 영향을 미침이 밝혀졌다(3, 4). 그리고 Tamaki(21)와 Yamashita 등(23)에 의해 *S. diastaticus*의 glucoamylase는 polymorphic한 세가지의 *STA1, STA2, STA3* 유전자에 의해 생성됨이 확인되었다. 또한 Tamaki는 이 균주의 고차배수체를 육성하여 *STA* 유전자의 수를 증가시켜 glucoamylase 생성능을 증진시킬 수 있음을 보고하였다(20). 이에 따라 Sakai 등(15)과 Panchal 등(13)은 원형질체 융합법을 통해 *STA* 유전자 수가 증가되어 glucoamylase 생성능이 향상된 융합주를 얻을 수 있음을 보고하였다.

한편 Yamashita 등(22)과 Pretorius 등(14) 및 Meaden 등(10)의 연구자들에 의해서 *STA* 유전자가 cloning이 된 후에는 유전자 재조합 기술을 이용하여 *STA* 유전자가 cloning된 plasmid를 도입해 주어 *STA* 유전자가 증폭된 재조합 효모를 육성하여 glucoamylase 생성능을 증진시키고자 하는 연구들이 진행되었다(5, 6). 그러나 이들 연구에서 *STA* 유전자의 plasmid에 의한 증폭에 따른 glucoamylase 생성능 향상이라는 소기의 목적을 달성하는 데에 도입해준 plasmid 유지의 불안정성으로 인한 문제점이 대두

되었다(1, 2, 7).

따라서 본 연구에서는 이러한 plasmid 유지의 불안정에 의한 문제점을 극복할 수 있는 방법으로 *STA* 유전자를 Ylp vector를 이용하여 *S. diastaticus*의 염색체상의 *STA* 유전자 부위에 삽입시킴으로써 도입해준 *STA* 유전자가 안정하게 유지되도록 하였으며 이를 통해 glucoamylase 생성능이 향상된 형질전환체를 얻었기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 Plasmid

본 실험에 사용한 효모균주들은 Table 1과 같다. *S. diastaticus* YIY342는 일본 Hiroshima대학의 Yamashita 박사로부터 분양받았으며(22), *S. diastaticus* 5114-9A는 일본 Doshisha대학의 Tamaki 박사로부터 분양받았다(21). *S. diastaticus* GMT-11은 YIY342와 5114-9A로부터 mass mating법(19)에 의해 만들어진 단수체 균주이며 *STA1* 유전자를 염색체에 도입시키기 위한 숙주세포로 이용하였다.

Ylp5 vector가 들어있는 *E. coli* HB101은 KCTC에서 분양받아서 Ylp5를 분리하여 사용하였다. 본 연구실에서 cloning한 *STA1* 유전자를 포함한 재조합 plasmid pYES18(1)로부터 *STA1* 유전자를 분리하고 Ylp5에 재조합하여 Ylp-*STA*를 제작하였다.

#### 배지 및 배양조건

효모의 배양을 위해서 복합배지로는 YPD배지(yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%)와 YPD

Table 1. List of microorganisms used in this study.

Microorganisms	Genotypes	Source
<i>S. diastaticus</i>		
YIY 342	<i>a, ura3, lys7, sta, inh</i>	Yamashita <i>et al</i> (22)
5114-9A	<i>a, arg4, STA1</i>	Tamaki (21)
GMT-11	<i>a, ura3, STA1</i>	This work
GMT-11TT	Transformant of GMT-11 contain YIp-STA	This work
<i>E. coli</i>		
HB 101	<i>F<sup>-</sup>, hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), supE44, ara14, galk, lacYI, proA2 rpsL20 (str), xyl-5, mtl-1, recA13</i>	Sambrook <i>et al</i> (16)

한천배지(YPD, agar 1.8%) 또는 YPS 한천배지(yeast extract 1%, peptone 2%, soluble starch 2%, agar 1.8%)를 사용하였다. 그리고 최소배지로는 YNBD배지(yeast nitrogen base w/o amino acid 0.67%, glucose 2%)에 필요한 아미노산 및 염기를 첨가한 배지를 사용하였다(17). YIp-STA에 의해 형질전환된 효모의 선별을 위해서는 YNBDS 한천배지(YNBD, soluble starch 2%, agar 1.8%)를 사용하였다.

대장균의 배양에는 LB배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%)을 사용하였으며 대장균 형질전환체의 선별에는 ampicillin 40 µg/ml을 첨가한 LB배지를 사용하였다.

#### Plasmid의 분리 및 DNA 조작

유전자 조작에 사용된 제한효소와 DNA 변형효소들은 KOSCO, NEB 및 IBI 등에서 구입하였고 plasmid의 분리 및 유전자조작에 사용된 시약은 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

YIp5와 pYES18 등의 plasmid들은 alkaline lysis 법을 이용하여 *E. coli*로부터 분리하였으며 YIp5와 pYES18로부터 YIp-STA를 제작하는 DNA 조작은 제한효소와 DNA 변형효소의 제조회사가 명시한 기준에 준하여 Sambrook 등의 방법으로 수행하였다(16).

#### 효모의 형질전환과 형질전환체의 선별

재조합 plasmid YIp-STA를 제한효소 *KpnI*으로 절단한 후 *S. diastaticus* GMT-11을 모균주로 하여 Ito 등의 방법(8)으로 형질전환시켰다. 그리고 YNBDS 한천배지에 도말하여 30°C에서 2일간 배양한 후 4°C에서 하룻동안 방치하여 colony주위에 halo가 생기는 것을 형질전환체로 선별하였다.

#### Southern hybridization

*STA1* 유전자가 *S. diastaticus* GMT-11의 염색체 DNA에 삽입된 것을 확인하기 위하여 Southern hybridization을 실시하였다(18). 형질전환체 *S. diastaticus* GMT-11TT의 염색체 DNA를 분리하여 *BamHI*으로 절단 후 YIp5 plasmid를 *PstI*과 *SmaI*으로 절단하여 분리한 0.9-kb의 *URA3* 유전자 단편을 <sup>32</sup>P로 표식한 것을 probe로 사용하여 염색체 DNA와 hybridization시켰다.

#### Glucoamylase 활성측정

균체배양 후의 균체배양액을 원심분리하여 상등액을 효소액으로 하고, 효소액 50 µl, 200 µl의 1% soluble starch용액, 250 µl의 0.1 M Na-acetate buffer (pH 5.0)을 넣고 50°C에서 30분간 반응시킨 다음 끓는 물에 10분간 가열하여 반응을 중단시켰다. 반응액내에 생성된 glucose를 PGO enzyme kit(Sigma, kit No.510-6)를 사용하여 정량하였다(1). 1시간당 100 µg의 glucose를 생성하는 효소의 활성을 1 unit로 정의하였다.

#### 형질전환균주에서 도입된 유전자 유지의 안정성 조사

YIp-STA에 의해 형질전환된 효모균주에서 YIp-STA유지의 안정성을 Zhu 등의 방법에 따라 조사하였다(24). YPD배지에서 정지까지 배양한 중균 균체액을 YPD배지로 10<sup>8</sup>배 희석한 후 30°C에서 10<sup>6</sup> cells/ml 농도가 될 때까지 배양하고 균체를 회수하였다. 균체를 생리식염수로 세척하고 200~500 콜로니가 형성될 수 있을 정도로 희석한 후 uracil을 첨가하지 않은 YNBD agar배지와 YPD agar배지에 plating하여 생성된 콜로니 수를 조사하여 비교하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 재조합 플라스미드 YIp-STA의 제작

효모 *S. diastaticus* GMT11의 염색체 DNA에 glucoamylase 유전자(*STA1*)를 삽입하기 위하여 Fig. 1에 나타난 과정을 통해 재조합 플라스미드, YIp-STA를 제작하였다. *S. diastaticus*의 glucoamylase 유전자가 YEp 24 vector의 *BamHI*부위에 cloning된 재조합 플라스미드 pYES18을 제한효소 *BamHI*으로 부분절단한 후 *STA1* 유전자를 함유한 5.8-kb DNA 단편을 분리하여 효모의 integration vector인 YIp5의 *BamHI* 부위에 subcloning하였다.

이렇게 얻은 YIp-STA가 정확히 재조합되었는지 확인하기 위해 YIp-STA를 여러 제한효소로 절단하고 아가로스겔에서 전기영동한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Lane 2는 vector로 사용한 YIp5를 *BamHI*으로 절단한 것으로, 5.5-kb의 단일 band가 나타났다. Lane 3은 *STA1* 유전자의 공여체로 사용한 재조합 플라스미드 pYES18을 *BamHI*으로 절단한 결과로서

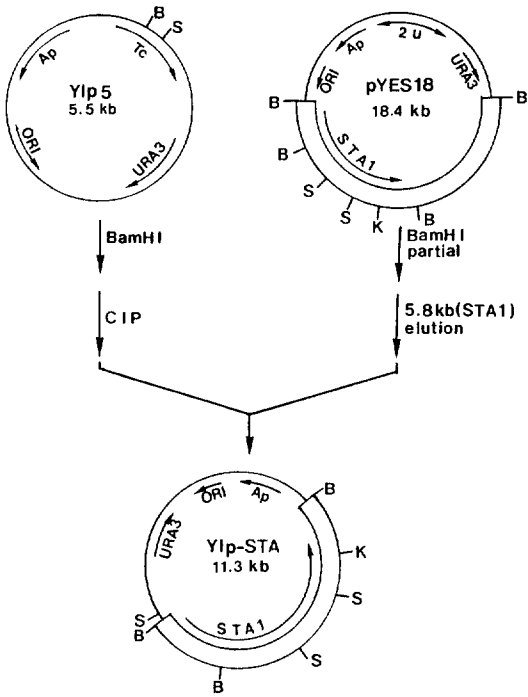


Fig. 1. Schematic diagram for construction of recombinant plasmid.

The *Bam*HI fragment (5.8 kb) containing *S. diastaticus* *STA1* gene was obtained from pYES18 and subcloned into *Bam*HI site of Ylp5, yeast integrating plasmid. *Ap* and *Tc* represent ampicillin and tetracycline resistance genes. *URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase was used as a selectable marker. The arrows indicate the transcriptional orientation of each gene. The open box denotes the cloned *STA1* of *S. diastaticus*. The restriction endonuclease cleavage sites for *Bam*HI(B), *Kpn*I(K) and *Sall*(S) are indicated.

7.8-kb는 YEp24 vector에서 생긴 band이고 1.3-kb는 *STA1* 유전자의 promoter와 분비신호서열을 함유한 단편이다. 또한 4.5-kb는 glucoamylase 구조유전자를 함유한 단편이지만 4.8-kb의 DNA 단편은 *STA1* 유전자와는 무관한 *S. diastaticus*의 염색체 DNA에서 유래된 것이다. Lane 4, 5 및 6은 새로이 제작한 재조합 플라스미드 Ylp-STA를 *Bam*HI, *Sall* 및 *Kpn*I으로 각각 절단한 결과이다. Ylp-STA를 *Bam*HI으로 절단한 경우(lane 4) Ylp5(5.5-kb, lane 2)와 *STA1* 유전자에 해당되는 크기의 DNA 단편들(1.3-kb, 4.5-kb, lane 3)이 존재하는 사실로부터 *STA1* 유전자를 함유한 5.8-kb의 *Bam*HI 단편이 Ylp5의 *Bam*HI 부위에 재조합된 것을 확인할 수 있었다. 또한 *Sall*으로 절단한 경우(lane 5) 1.15-kb, 3.2-kb와 7.0-kb 세 중

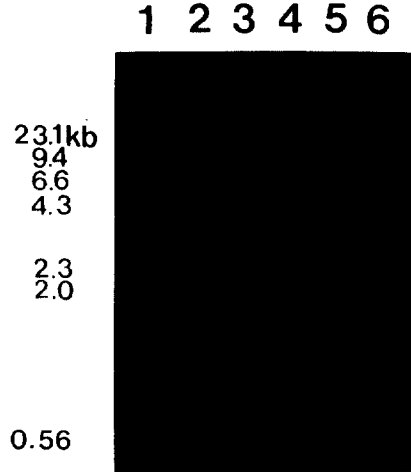


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic analysis of Ylp-STA. About 1  $\mu$ g of plasmid samples (Ylp5, pYES 18, Ylp-STA) were digested with several restriction endonucleases. And, digests were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis in TBE buffer. Lane 1:  $\lambda$ -HindIII, 2: Ylp5-*Bam*HI, 3: pYES18-*Bam*HI, 4: Ylp-STA-*Bam*HI, 5: Ylp-STA-*Sall*, 6: Ylp-STA-*Kpn*I.

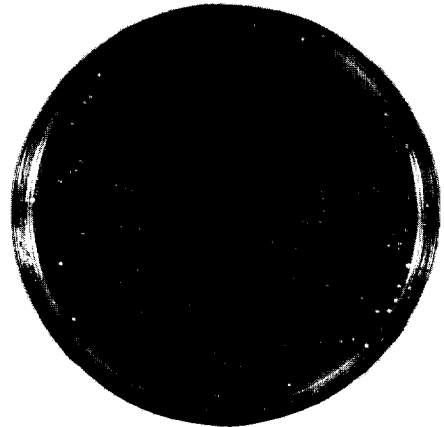
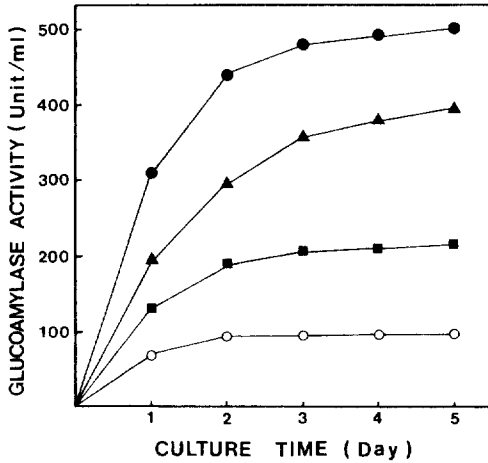


Fig. 3. Halo formation of transformants on YNBDS agar medium

류의 band가 나타난 것으로 보아 *STA1* 유전자를 함유한 5.8-kb의 *Bam*HI 단편이 Ylp5의 *URA3* 유전자와 반대방향으로 Ylp5의 *Bam*HI 부위에 subcloning된 것을 확인할 수 있었다.

**형질전환체의 선별 및 glucoamylase 활성 조사**

*STA1* 유전자(5.8-kb)를 Ylp5 vector에 subcloning하여 제작한 재조합 plasmid Ylp-STA를 glucoamylase 발현에 영향을 주지 않는 *Kpn*I 제한효소로 절단하여 선형화한 후 *S. diastaticus* GMT-11을 숙주세포로 하여 형질전환을 시켰다. Uracil이 첨가되지



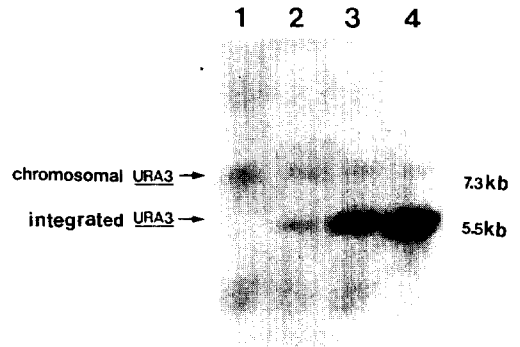
**Fig. 4.** Comparison of glucoamylase productivities of transformants with recipient strain. Symbols (○); recipient strain GMT-11, (■); transformant corresponding to lane 2 of Fig. 5, (▲); transformant corresponding to lane 3 of Fig. 5, (●); transformant corresponding to lane 4 of Fig. 5.

않은 YNBDS 한천배지에서 colony를 충분히 형성시킨 후 4°C에서 24시간 방치하여 colony주위에 투명한 환이 생기는 colony를 형질전환체로 선별하였다. 이 때에 각각의 colony들에서 환의 크기가 다양하였다(Fig. 3).

한편 환을 생성하는 형질전환 균주들을 YPD 배지에서 액체배양하면서 배양시간에 따른 배양상층액의 glucoamylase 활성을 조사하였다. 모균주인 *S. diastaticus* GMT-11의 glucoamylase 생성능과 형질전환체들의 glucoamylase 생성능을 Fig. 4에 표시하였다. 형질전환체들의 glucoamylase 생성능이 모균주에 비해 우수하였으며, 가장 우수한 형질전환체의 경우 모균주에 비해 약 6배의 glucoamylase 생성능이 증대되었다.

**형질전환체에서 Yip-STA의 염색체 DNA 삽입에 대한 확인**

Yip-STA가 염색체 DNA에 삽입되었는지를 확인하기 위하여 형질전환체에서 염색체 DNA를 분리하여 Southern hybridization을 실시하였다. 처음에는 Yip-STA의 *STA1* 유전자 단편을 probe로 하여 Southern hybridization을 시도하였으나 *S. diastaticus*의 염색체 DNA에 *STA1* homology sequence를 포함하는 부위가 다양하게 존재함으로써(10, 14, 23) 매우 복잡한 band 양상을 보였다(data 생략). 따라서 Yip-STA의 *URA3* 유전자를 probe로 하여 hybridization을 실시하였다. 그 결과 Fig. 5에서와 같은 7.3-kb와 5.5-kb의 두개의 band만이 보였다. 7.3-kb의 band는 모균주(lane 1)와 형질전환체들(lane 2, 3, 4) 모두에서



**Fig. 5.** Southern blot analysis of *Bam*HI digested chromosomal DNA from recipient strain GMT-11 (lane 1) and transformants (lane 2-4). A 0.9 kb fragment of *URA3* was used as probe and 10 µg of DNA was loaded in each lane.

보였으며 5.5-kb의 band는 모균주에서는 보이지 않고 형질전환체들에서만 나타났다. 또한 7.3-kb의 band는 모든 균주들에서 그 농도가 같았으나, 5.5-kb의 band 경우에는 glucoamylase 생성능이 증진된 균주일수록 농도가 진해짐이 관찰된다. 각 형질전환체들에서 5.5-kb band의 농도를 7.3-kb의 band 농도를 기준으로 하여 densitometer로 비교한 결과 가장 glucoamylase 생성능이 증대된 균주(lane 4)의 경우 5~6배의 농도가 진함을 알았다. 그러므로 7.3-kb의 band는 *S. diastaticus*의 염색체 DNA를 *Bam*HI으로 절단했을 때 생성되는 *URA3* 유전자를 포함하는 단편이고, 5.5-kb의 band는 Yip-STA가 염색체 DNA에 삽입되어서 *Bam*HI으로 절단할 때 생기는 *URA3*를 포함하고 있는 Yip5 vector(5.5-kb)라고 할 수 있다.

Orr-Weaver와 Szostak(11)가 선형화한 외래유전자를 integration vector를 이용한 효모의 형질전환에서, 도입해주고자 한 염색체 DNA 부위에 tandemly repeat integration에 의해 multi-copy로 삽입되는 현상을 밝혔다. 그 후 많은 연구자들에 의해 같은 현상 및 결과들을 보고하였으며 multi-copy 삽입에 의한 유전자 발현양의 증가를 보고하였다(9, 12, 24). 따라서 본 연구에서도 glucoamylase 생성능이 각각 다른 형질전환체를 얻을 수 있음과 glucoamylase 생성능이 우수한 형질전환체의 경우 Yip-STA가 multi-copy로 *STA1* 유전자 부위에 반복해서 삽입되었다고 해석할 수 있다.

이상의 결과를 Fig. 6에서와 같이 도식적으로 설명할 수 있다. Yip-STA는 11.3-kb로 5.5-kb의 Yip5는 *URA3*를 포함하고 1개의 *Bam*HI site를 갖고 있으며 이 *Bam*HI site에 5.8-kb의 *STA1*을 subcloning하여 제작하였다. 5.8-kb의 *STA1*은 내부에 또 다른 *Bam*HI site를 가지고 있으므로 Yip-STA를 *Bam*HI으로 절

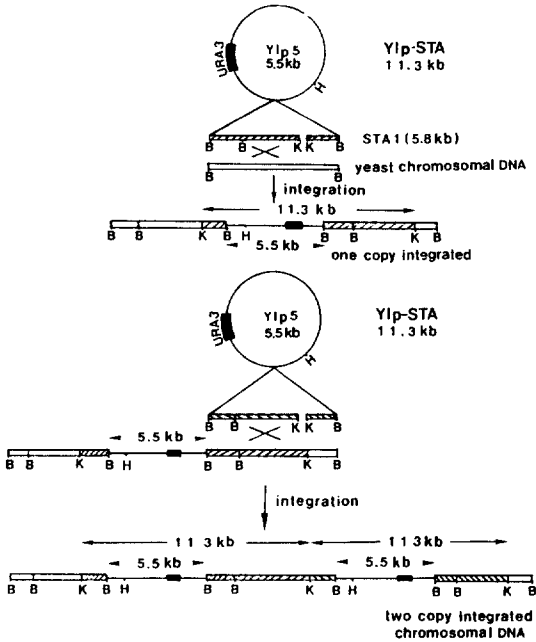


Fig. 6. Model for tandemly repeat integration of Ylp-STA into STA1 of chromosomal DNA.

The line indicates Ylp5 vector, the black box indicates URA3 gene of Ylp5 vector, the hatched box indicates the cloned STA1 (5.8 kb) and the blank box indicates chromosomal STA1 (5.8 kb). B; BamHI, H; HindIII, K; KpnI.

단하였을 때 5.5-kb의 Ylp5 단일절편과 1.3-kb와 4.5-kb 두개의 STA1 절편이 생성된다(Fig. 1). 따라서 0.9-kb의 URA3 부분 절편을 probe로 하여 hybridization을 시키면 5.5-kb의 Ylp5 절편만이 hybridization 된다. 그리고 Ylp-STA가 염색체의 STA1에 한 copy가 삽입되면 염색체 DNA를 분리하여 BamHI 으로 절단했을 때 0.9-kb의 URA3 부분절편에 hybridization되는 것은 Ylp-STA의 삽입으로 인한 5.5-kb의 Ylp5와 원래 염색체에 존재하는 URA3를 포함하는 BamHI 절편으로 7.3-kb의 band 뿐이다. 그리고 Ylp-STA가 반복해서 삽입될 경우에는 5.5-kb의 Ylp5에 해당하는 band의 농도만 진해지고 7.3-kb의 band 농도는 변함이 없다(11).

**도입된 유전자 유지의 안정성**

Ylp-STA가 염색체에 삽입된 형질전환체에서 세포 분열에 따른 Ylp-STA 유지의 안정성을 비선택 복합배지인 YPD 배지에서 약 30세대기간을 배양한 후 조사하였다(24). 형질전환체는 Ylp-STA의 URA3가 존재하므로 uracil 비요구주(ura<sup>+</sup>)이며, Ylp-STA가 소실되면 모균주와 같은 uracil 요구주(ura<sup>-</sup>)가 된다. 그러므로 30세대기간 배양 후 총세포수에서 ura<sup>-</sup> 세포수의 비를 조사하여 유전자 유지의 안정성을 평

Table 2. Genetic stability of the integrated Ylp-STA in transformants.

Strains	Ratio of Ura cells <sup>a</sup> (%)
GMT-11T2 <sup>b</sup>	99.2
GMT-11T3 <sup>c</sup>	99.0
GMT-11T4 <sup>d</sup>	99.0
GMT-11	0

a: The ratio of Ura cells was measured after 30 generations in YPD medium.

b: Transformant corresponding to land 2 of Fig. 5.

c: Transformant corresponding to land 3 of Fig. 5.

d: Transformant corresponding to land 4 of Fig. 5.

가하였다. Table 2에서 알 수 있듯이 glucoamylase 생성능이 다른 형질전환체들에서 모두 99% 이상 안정하게 유지되는 결과를 얻었다. Ylp-STA가 염색체에 삽입되지 않고 plasmid로 존재할 때는 비선택배지인 YPD배지에서 배양할 경우 세포분열에 따른 급격한 plasmid 손실로 ura<sup>-</sup> 세포수가 증대할 것이므로 Ylp-STA가 염색체에 삽입되었다는 간접적 증거로 제시할 수 있다.

**감사의 말**

본 연구는 동력자원부의 대체에너지기술개발 사업비의 지원(연구과제 관리번호 C201-101 FG)을 받아 수행되었음을 밝히며, 연구비 지원에 대한 동력자원부 및 에너지관리공단 대체에너지기술개발센터의 관계자 여러분에게 감사함을 드립니다.

**참 고 문 헌**

- Ahn, J.S., I.K. Hwang, M.S. Jeong and T.I. Mheen, 1989. Effect of plasmid stability on the glucoamylase productivity of *Saccharomyces diastaticus* harboring recombinant plasmid containing STA1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 606-610.
- Caunt, P., A. Impoolsup and P.F. Greenfield, 1988. Stability of recombinant plasmid in yeast. *J. Biotechnol.* **8**, 173-192.
- De Mot, R., K. Van Dijck, A. Donkers and H. Verachtert, 1985. Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starchy material with amyolytic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 222-226.
- Erratt, A.J., G.G. Stewart, 1981. Fermentation studies using *Saccharomyces diastaticus* yeast strains, p. 577-587. In L.A. Underkofler and M.L. Wulf(eds.), *Developments in industrial microbiology* Vol. 22. Society for Industrial Microbiology, Washington, U.S.A.
- Erratt, A.J. and A. Nasim, 1986. Cloning and expression of a *Saccharomyces diastaticus* gluco-

- amylase gene in *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **166**, 484-490.
6. Fukui, S. and I. Yamashita, 1989. Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nippon Nogekagaku Kaishi* **63**, 1023-1027.
  7. Hjortso, M.A., E.K. Dennis and E.J. Bailey, 1985. Quantitative characterization of plasmid instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **7**, 21-24.
  8. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura, 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
  9. Lopes, S.T., G.A. J. Hakkaart, B.L. Koerts, H.A. Raue and R.J. Planta, 1991. Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **105**, 83-90.
  10. Meaden, P., K. Ogden, H. Bussey, R.S. Tubb, 1985. A *DEX* gene conferring production of extracellular amyloglucosidase on yeast. *Gene* **34**, 325-334.
  11. Orr-Weaver, L.T., J.W. Szostak and R.J. Rothstein, 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 6354-6358.
  12. Orr-Weaver, L.T. and J.W. Szostak, 1983. Multiple tandem plasmid integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 747-749.
  13. Panchal, J.C., A. Harbison, I. Russell and G.G. Stewart, 1982. Ethanol production by genetically modified strains of *Saccharomyces*. *Biotechnol. Letters* **4**, 33-38.
  14. Pretorius, I.S., T. Chow, D. Modena and J. Marmur, 1986. Molecular cloning and characterization of the *STA2* glucoamylase gene of *Saccharomyces diastaticus*. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 29-35.
  15. Sakai, T., K.I. Koo, K. Saitoh and T. Katsuragi, 1986. Use of protoplast fusion for the development of rapid starch fermenting strain of *Saccharomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 297-306.
  16. Sambrook, J., T., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
  17. Sherman, F., G.R. Fink and J.B. Hicks, 1986. *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
  18. Southern, E., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-512.
  19. Sepencer, F.T.J. and D.M. Spencer, 1988. Yeast genetics, p. 65-106. In I. Campbell and J.H. Duffus(eds.), *Yeast a practical approach*. IRL Press, Oxford.
  20. Tamaki, H., 1968. Breeding of alcohol yeast having rapid starch ferment ability. *Jpn. Seiken Ziho* **20**, 69-76.
  21. Tamaki, H., 1978. Genetic studies of ability to ferment starch in *Saccharomyces*: gene polymorphism. *Mol. Gen. Genet.* **164**, 205-209.
  22. Yamashita, I. and S. Fukui, 1983. Molecular cloning of a glucoamylase producing gene in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2689-2692.
  23. Yamashita, I., T. Maemura, T. Hatano and S. Fukui, 1985. Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* **161**, 574-582.
  24. Zhu, J., R. Contreras and W. Fiers, 1986. Construction of stable laboratory and industrial yeast strains expressing a foreign gene by integrative transformation using a dominant selection system. *Gene* **50**, 225-237.

(Received December 23, 1992)

(Accepted January 4, 1993)

**ABSTRACT: Improvement of Glucoamylase Productivity of *Saccharomyces diastaticus* by Integration of Glucoamylase Gene, *STA*, into Chromosomal DNA**

Ahn, Jong-Seog\*, Jun-Ho Maeng, Dae-Ook Kang, In-kyu Hwang and Tae-Ick Mheen (Genetic Engineering Research Institute, KIST, Daejeon 305-606, Korea)

For the purpose to improve the glucoamylase productivity of *Saccharomyces diastaticus*, we integrated *STA1* gene into chromosomal DNA of *S. diastaticus* using YIp vector. After construction of YIp-*STA* by the subcloning of *STA1* (5.3 kb) into YIp5 vector, *S. diastaticus* GMT-11(a, *ura3*, *STA1*) was transformed by YIp-*STA* through homologous recombination at the chromosomal *STA1* gene. So we obtained the transformants that glucoamylase productivity was increased maximum six fold. These strains transformed by the multi-copy integration of YIp-*STA* in chromosomal DNA were confirmed by Southern hybridization. And the integrated YIp-*STA* was maintained stably during 30 mitotic divisions.