

## 산업용 *Saccharomyces cerevisiae*에서 Ethionine 저항성 유전자의 발현

박정남 · 이경희 · 고현미 · 서국현 · 진종언<sup>1</sup> · 이황희 · 배 석\*  
전남대학교 생명과학부, <sup>1</sup>동강대학 피부미용과

**Expression of Ethionine Resistance Conferring Gene in an Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae*.** Park, Jeong-Nam, Kyung-Hee Lee, Hyun-Mi Ko, Kook-Heon Seo, Jong-Eon Chin<sup>1</sup>, Hwanghee Blaise Lee, and Suk Bai\*. Department of Biological Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea, <sup>1</sup>Department of Cosmetology, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea – The ethionine resistance conferring gene (*ERC1*) was constitutively expressed under the control of the alcohol dehydrogenase gene promoter (*ADClp*) and introduced into the chromosomes of an industrial polyploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* by using the  $\delta$ -sequences of the Ty1 retrotransposon as the recombination site.  $\delta$ -Integrative cassette devoid of bacterial DNA sequences containing the ampicillin resistance gene was constructed that had the aureobasidin A resistance gene (*AUR1-C*) as the selection marker and *ERC1* gene. The *ERC1* gene was also employed as the selection marker in the  $\delta$ -integrative cassette lacking the *AUR1-C* gene. Industrial *Saccharomyces cerevisiae* transformed with these integrative cassettes exhibited strong resistance to DL-ethionine compared with nontransformants.

**Key words:** Ethionine resistance conferring gene, industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*, selection marker

효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 생장이 빠르고 에탄올 발효율과 내성이 높아 전통적으로 수세기 동안 알코올 음료 및 제빵산업에서 이용되어 왔으며, 연료용 알코올과 동물사료(단세포 단백질)의 생산에도 이용되고 있다. 또한 *S. cerevisiae*는 재조합산물의 발현속도 및 유전자 발현 시스템의 진핵세포모델로서 학문 연구 및 생명공학이용에도 기여하는 바가 크다[5, 24]. 인체에 안전한(GRAS, Generally Regarded As Safe) *S. cerevisiae*는 가용성 당분만을 주로 이용할 수 있고 세포외로 분비되는 다당류분해효소가 없어 값싸고 풍부한 다당류인 섬유소나 전분을 이용하지 못한다[16, 26]. 섬유소나 전분을 이용하여 성장할 수 있는 재조합 *S. cerevisiae*를 만들기 위해 여러 종류의 전분분해효소 유전자와 섬유소분해 효소유전자들이 주로 yeast episomal plasmid(YEp) 벡터 혹은 yeast integrating plasmid(YIp) 벡터를 이용하여 실험실용 반수체(haploid) *S. cerevisiae*에서 클로닝되어 발현된 바 있다[11, 19, 25]. 2 micron origin이 포함된 YEp벡터는 copy수가 많아 유전자 발현율이 높지만 산업적으로 장기간 배양에 사용되는 비선택배지에서 유전적으로 불안정하여 세대를 거듭하면 점차 상실되는 단점이 있고, 유전자가 염색체에 도입되는 YIp벡터는 안정성은 양호하나 유전자 copy수가 적어 발현율이 낮은 단점이 있다[12].

더구나 실험실용 반수체 *S. cerevisiae*는 유전자조작이 용이하나 돌연변이에 취약하여 장기간 배양에 불안정하므로 산업용 효모로는 이배체(diploid)나 다배체(polyploid) *S. cerevisiae* 균주들이 사용되고 있다[4, 13].

산업용 야생형 다배체 *S. cerevisiae*에 외래 유전자를 도입시키고 발현시키는 데는 우성 선별 표지 유전자가 필요하다. 이를 위해 야생형 효모를 특정아미노산 및 염기요구성 돌연변이 균주로 만들고 *LEU2d*, *TRP1d* 혹은 *URA3d* 같은 결손 표지 유전자가 있는 YIp벡터를 이용하는 것이다[16, 22]. 이런 경우 기존에 만들어진 영양요구성 균주가 준비되어 있어 야 된다는 제약이 따르고, 표지 유전자가 없는 일반 산업용 다배체 효모에서 이렇게 제조된 YIp벡터를 이용하여 외래 유전자도입 유무를 선별하는 것은 용이하지 않다. 일반적으로 산업용 야생형 다배체 효모들은 특정 금속저항성, 항생제저항성 혹은 항대사물질저항성 유전자가 없으므로 이들 물질에 민감하다[2, 6, 16, 18]. 그러므로 이러한 저항성 유전자를 선별 표지 유전자로 포함하는 YIp벡터를 제조하여 숙주 효모에 도입시키면 외래 유전자 산물을 생산 분비할 수 있는 야생형 *S. cerevisiae* 균주 선별이 가능하다[4, 16]. 선별 표지 유전자로는 G418 저항성 유전자(세균 *neo* 유전자)가 많이 이용되었으나[14, 27, 28], 최근 제빵효모나 양조효모의 형질전환에 이용되는 벡터에서는 세균 항생제저항성 유전자보다는 효모자체의 저항성 유전자(sufometuron-methyl 저항성과 aureobasidin A 저항성)를 이용되고 있다[8, 16, 29]. 현재까지 실험실용 반수체 효모에서만 발현된 바 있는 ethionine

\*Corresponding author  
Tel: 82-62-530-3412, Fax: 82-62-530-3409  
E-mail: sukbai@chonnam.ac.kr

저항성 유전자(ethionine resistance conferring gene, *ERC1*) [22]도 효모자체의 저항성 유전자인데 methionine의 유사체로서 항대사물질인 ethionine의 가격이 sufometuron-methyl이나 aureobasidin A에 비해 저렴하므로 형질전환체 선별배지제조에 이용하는데 부담이 적어 산업용 다배체 효모형질 전환에도 선별 표지 유전자로 이용이 가능할 것이다. 더구나 효모에 이 유전자가 multicopy로 도입되면 세포내 S-adenosylmethionine(SAM)생산이 증진된다는 보고가 있다 [23]. 한편, 유전자copy수가 적은 YIp벡터에 ribosomal DNA(rDNA) 서열이나 Ty transposon  $\delta$ -서열과 같은 반복서열을 도입하여 재조합부위로 이용하면 외래 유전자가 YEp 벡터처럼 고효율로 발현되고 multicopy로 숙주효모 염색체에 삽입되어 산업적으로 장기간 배양에 사용되는 비선택배지에서 유전적으로 안정하게 세대를 거듭해도 유지될 수 있다 [2, 7, 14, 15, 27, 28].

본 연구에서는 산업용 다배체 *S. cerevisiae*의 ethionine에 의한 감수성 농도를 조사하였고, ethionine저항성 유전자를 클로닝하여 이 유전자와  $\delta$ -서열이 포함된 YIp벡터( $\delta$ -integrative cassettes)를 제조하였다. 이 벡터로 형질전환된 산업용 다배체 *S. cerevisiae*에서 ethionine저항성 유전자가 발현되는지 유무와  $\delta$ -YIp벡터의 선별 표지 유전자로 이용할 수 있는가를 조사하였다.

*Escherichia coli* JM83[*ara*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), *rspL*,  $\Phi$ 80d, *lacZ* $\Delta$ M15]를 형질전환숙주와 플라스미드제조 및 증폭에 사용하였으며, 산업용 다배체 *S. cerevisiae* ATCC 4126[17]를 ethionine저항성 유전자의 공여균주로 이용하였다. *E. coli*효모 왕복 벡터인 pYES2(Invitrogen, U.S.A.)와 pAUR123 (TaKaRa, Japan)를 벡터제조에 골격으로 이용하였고, pGEM-T Easy 벡터(Promega, U.S.A.)는 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭된 유전자의 클로닝에 이용하였다. 본 연구에 사용한 효모 균주와 플라스미드는 Table 1에 제시하였다. *E. coli* 형질전환체는 50  $\mu$ g/ml ampicillin이 첨가된 Luria-Bertani(LB)배지에서 배양하였고, 효모 배양에는 YPD

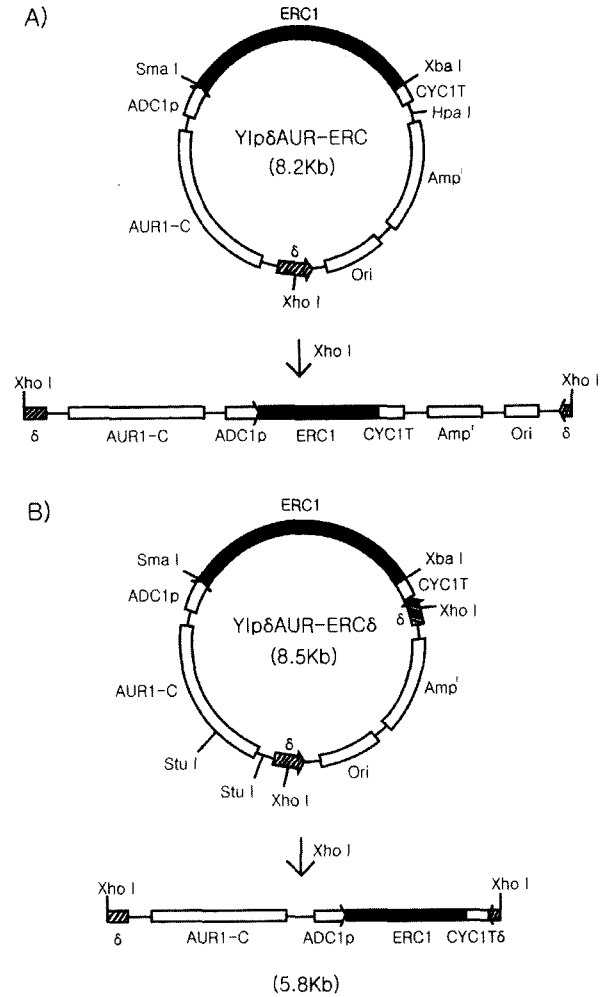
배지(1% yeast extract, 1% Bacto-peptone 그리고 2% glucose)를 사용하였다. Ethionine농도별 효모의 감수성 조사를 위한 SD최소배지(minimal selective medium)는 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 2% Bacto-agar 그리고 요구되는 영양성분과 여러 농도의 DL-ethionine(TCI, Japan)을 첨가하여 사용하였다. 또한 실험실용 반수체 효모형질전환에도 SD최소배지를 사용하였고, 산업용 다배체 효모형질전환 배지는 YPD배지에 1  $\mu$ g/ml aureobasidin A(TaKaRa, Japan)을 첨가하여 사용하였다. *E. coli*에서 plasmid DNA의 대규모 추출은 Qiagen Plasmid Maxi kit(Qiagen, U.S.A.)를 이용하여 수행하였고, PCR증폭 DNA는 QIAquick PCR purification kit와 QIAquick gel extraction kit를 이용하였다. 주형 DNA에 이용할 효모의 전체 게놈 DNA추출은 Zhu 등[30]의 방법에 의해 실시하였다. DNA조작과 형질전환은 Sambrook과 Russell[20]의 방법에 따라 실시하였다. 한편, 효모의 형질전환은 Hill 등[9]의 lithium acetate/DMSO방법에 의해 실시하였다. *S. cerevisiae* ATCC 4126의 ethionine저항성 유전자를 PCR증폭하기 위해 oligonucleotides 5'-ACCCGAATTCCTCCCGGGATGTCTAAACAATTTAGTCATAC-3'과 5'-ATCATCTAGATTATGATGTATGGGTCTCAGC-3'를 이용하였다. 이와 같은 primer들에는 ethionine저항성 유전자의 클로닝을 용이하게 하기 위해 *EcoRI* 부위(GAATTC), *SmaI*부위(CCCGGG) 그리고 *XbaI* (TCTAGA)부위를 도입하였고, *S. cerevisiae* DKD-5D-H의 ethionine저항성 유전자(*ERC1*)의 염기서열[22]을 이용하여 합성하였다. 또한 *ADC1* promoter-ethionine저항성 유전자-*CYC1* terminator를 증폭하기 위해 pAUR123(GenBank accession number ABO12284)의 염기서열을 이용하여 제작한 oligonucleotides 5'-TTGCAGATCTGCATGCAACTTCTTTTCTTTTTT-3'과 5'-GGCCAGATCTTACGTAGGCCGCAAATTAAGCCTTCG-3'를 이용하였다. 한편,  $\delta$ -서열의 증폭은 최 등[4]이 기술한 primers와 조건에 의해 실시하였다. 형질전환 배지에서 출현한 콜로니들이 ethionine저

Table 1. Yeast strains and plasmids used.

Strain and plasmid	Relevant properties	Source or reference
Strains		
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A	<i>a, leu2-3112, his3-11,15, ade2-1, ura3-1, trp1-1, can1-100</i>	[1]
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4126	Industrial polyploid yeast, distiller's yeast, amylo process yeast	[17]
Plasmids		
pYESA	pYES2 carrying <i>ADC1</i> promoter	[10]
pYESA-ERC	pYESA carrying <i>ERC1</i> gene	This work
YIp $\delta$ AUR	pAUR123 carrying Ty1 $\delta$ sequence with deleted <i>ARS1</i> and <i>CEN4</i>	[2]
YIp $\delta$ AUR-ERC	YIp $\delta$ AUR carrying <i>ERC1</i> gene	This work
YIp $\delta$ AUR $\delta$	YIp $\delta$ AUR carrying another $\delta$ sequence	This work
YIp $\delta$ AURSA $\delta$	YIp $\delta$ AUR $\delta$ carrying $\alpha$ -amylase gene	[2]
YIp $\delta$ AUR-ERC $\delta$	YIp $\delta$ AUR $\delta$ carrying <i>ERC1</i> gene	This work
YIp $\delta$ ERC $\delta$	YIp $\delta$ AUR-ERC $\delta$ with deleted <i>AUR1-C</i> gene	This work

항성을 가지고 있는지를 알기 위해 2-7 mM ethionine이 함유된 SD최소배지에 옮겨 30°C에서 4-5일간 배양하고, 생장하는 콜로니를 ethionine저항성을 획득한 형질전환체로 선별하였다. 필요에 따라 영양성분과 1 µg/ml aureobasidin A를 첨가하여 사용하였다.

Ethionine저항성 유전자의 클로닝을 위해 *URA3*를 선별 표지 유전자로 함유하고 있는 pYES2에서 *GAL1* promoter (*GAL1p*)를 제거하고 *ADC1* promoter(*ADC1p*)로 교체한 pYESA[10]를 사용하였다. pYESA의 *ADC1* promoter와 *CYC1* terminator사이에서 PCR로 증폭시킨 ethionine저항성 유전자의 open reading frame(*ERC1*)이 포함된 1.9 kb *EcoRI*-*XbaI* DNA절편을 삽입하여 pYESA-ERC를 제조하였다. 실험실용 반수체 *S. cerevisiae*와 달리 산업용 다배체 효모는 선별 표지 유전자가 없으므로 G418저항성 유전자(*Gt<sup>r</sup>*), Sulfometuron-methyl저항성 유전자(*SMRI*) 혹은 aureobasidin A저항성 유전자(*AUR1-C*)같은 우성 선별 표지 유전자가 있는 벡터에 의해서만 형질전환체를 얻을 수 있다[8, 24, 27, 29]. 산업용 효모에서 ethionine저항성 유전자의 발현을 위해 *AUR1-C*유전자가 있는 YIpδAUR[2]에 *ERC1*유전자가 포함된 1.9 kb *SmaI*-*XbaI* DNA절편을 삽입하여 YIpδAUR-ERC를 제조하였다(Fig. 1A). YIpδAUR-ERC은 δ-서열내에 하나의 *XhoI* 부위가 있으므로 *XhoI*처리로 선형화시켜 형질전환에 이용하면 homologous recombination에 의해 염색체에 산재해 있는 여러 δ-서열에 multicopy로 도입될 수 있다[19, 27]. 다음으로 YIpδAUR의 *HpaI*부위에 δ-서열이 포함된 0.3 kb *SmaI* DNA절편을 삽입하여 δ-서열이 두 군데 존재하는 YIpδAURδ를 제조하였고, 이 벡터의 *SmaI*-*XbaI*부위에 ethionine저항성 유전자를 도입하여 YIpδAUR-ERCδ를 제조하였다(Fig. 1B). YIpδAUR-ERCδ를 *XhoI*처리하여 얻어진 *ADC1p*-*ERC1* cassette와 *AUR1-C*유전자가 포함된 5.8 kb DNA 절편을 전기영동겔에서 회수하여 형질전환에 이용하면, YIpδAUR-ERC보다 크기가 작아져서 δ-서열에 삽입되는 copy수가 YIpδAUR-ERC(8.2 kb)보다 증가될 수 있다[2, 12, 14]. 염색체에 삽입될 벡터 크기를 더욱 줄이기 위해, YIpδAUR-ERCδ의 *AUR1-C*유전자에 있는 두 군데 *StuI*부위를 *StuI*으로 처리하고 자가접합시켜 0.9 kb 줄어든 YIpδERCδ를 제조하였다(Fig. 2). 그 결과 *AUR1-C*유전자는 promoter부위가 제거되어 발현되지 않고 벡터내에는 *ERC1* 유전자만 남게 된다. 형질전환체(ATCC 4126/YIpδERCδ) 염색체내에 YIpδERCδ의 도입여부를 알기 위해 *ADC1* promoter와 *CYC1* terminator(*CYC1T*)의 염기서열에 의해 제작된 primers를 이용하여 PCR을 실시한 결과, *S. cerevisiae* ATCC 4126의 genomic DNA와 ATCC 4126/YIpδERCδ의 genomic DNA를 주형 DNA로 이용하였을 때 ATCC 4126/YIpδERCδ의 genomic DNA에서만 YIpδERCδ의 *ADC1p*-*ERC1*-*CYC1T*에 해당하는 2.5 kb DNA 밴드가 증폭되어 형질전환체의 염색체내에 YIpδERCδ가 도입되어 있음이 확인

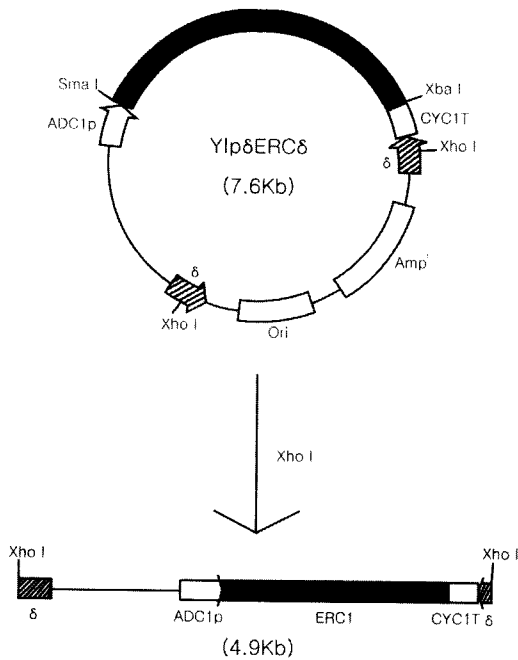


**Fig. 1. Plasmid maps of linearized YIpδAUR-ERC (A) and YIpδAUR-ERCδ (B) showing relative size, restriction sites, and location of insert DNA.** YIpδAUR-ERC and YIpδAUR-ERCδ were linearized by digesting with *XhoI*.

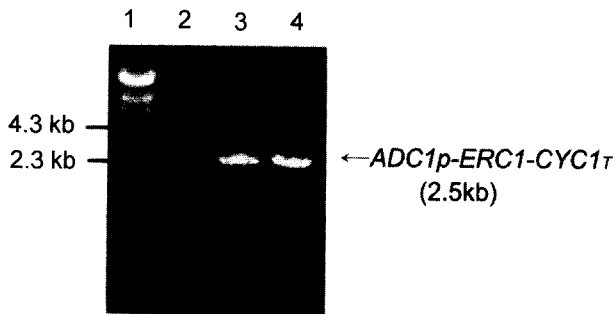
되었다(Fig. 3).

실험실용 반수체 *S. cerevisiae* W303-1A와 산업용 다배체 *S. cerevisiae* ATCC 4126를 *ERC1*유전자발현을 위한 숙주로 사용하기 위해 두 효모생장에 미치는 ethionine농도효과를 조사하였다. 실험실용 반수체 *S. cerevisiae* DKD-5D-H에서 0.3 mM ethionine첨가로 생장이 완전 억제되었는데 반해 [21], *S. cerevisiae* W303-1A에서는 1 mM ethionine첨가로 생장이 완전히 억제를 받았고 *S. cerevisiae* ATCC 4126에서는 3 mM ethionine첨가로 생장이 완전히 억제를 받았다 (Table 2). 이 결과에 따라 두 효모 균주로부터 얻어진 ethionine저항성 형질전환체의 선별배지에는 상기 농도이상의 ethionine이 첨가되었다.

*S. cerevisiae* W303-1A를 형질전환시키는데 pYESA-ERC를 이용하였고 Ura<sup>+</sup>를 나타내는 형질전환체 W303-1A/pYESA-ERC를 얻었다. *ADC1p*와 *CYC1T*사이에서 삽입된 유



**Fig. 2. Plasmid maps of linearized YIpδERCδ showing relative size, restriction sites, and location of insert DNA.** Linear construct after *XhoI* digestion of YIpδERCδ represents the *ADC1p-ERC1* integrative cassette lacking *AUR1-C* and ampicillin resistance genes.



**Fig. 3. Agarose gel electrophoresis showing PCR-amplified fragments for *ADC1p-ERC1-CYC1T*.** Lane 1, λDNA-*Hind* III size marker; Lane 2, *S. cerevisiae* ATCC 4126 genomic DNA; Lane 3, ATCC 4126/YIpδAUR-ERCδ genomic DNA; Lane 4, ATCC 4126/YIpδERCδ genomic DNA.

전자가 없는 pYESA로 형질전환된 W303-1A/pYESA도 Ura<sup>+</sup>를 나타내지만 1 mM ethionine에서 성장하지 못했다. 이와 달리 W303-1A/pYESA-ERC는 2 mM이상의 ethionine이 첨가된 배지에서도 성장하였다. 이로써 삽입된 유전자가 ethionine저항성 유전자(*ERC1*)임을 확인할 수 있었다[22]. 산업용 다배체 *S. cerevisiae*에 이 유전자를 도입하여 발현시킬 목적으로 YIpδAUR-ERC를 이용하여 aureobasidin A저항성을 나타내는 형질전환체 ATCC 4126/YIpδAUR-ERC를 얻었다. *ERC1*유전자가 없는 YIpδAUR로 형질전환된 ATCC 4126/YIpδAUR은 aureobasidin A저항성은 있으나 *S.*

**Table 2. Effect of ethionine on *Saccharomyces cerevisiae* growth in minimal medium.**

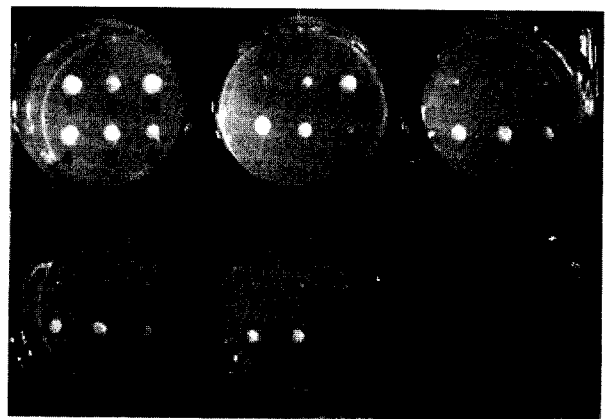
Ethionine (mM)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	W303-1A	ATCC 4126
0.3	++++ <sup>a</sup>	++++
0.5	++ <sup>b</sup>	++++
1.0	- <sup>c</sup>	++++
2.0	-	++
3.0	-	-

<sup>a</sup> Cells grow very well.

<sup>b</sup> Very few cells can grow.

<sup>c</sup> No cell can grow for more than 7 days.

*cerevisiae* ATCC 4126처럼 3 mM ethionine에서 성장하지 못했으나 ATCC 4126/YIpδAUR-ERC는 6 mM 이상의 ethionine이 첨가된 배지에서도 성장에 영향을 받지 않았다 (Fig. 4). YIpδAUR-ERC는 두 δ-서열의 위치가 ampicillin 저항성 유전자의 양쪽에 존재하므로 형질전환전에 δ-서열을 *XhoI*처리하여 ampicillin저항성 유전자를 포함한 세균성 plasmid DNA 염기서열(2.7 kb)을 제거한 후 선형화된 벡터를 숙주 효모 염색체에 도입시킬 수 있다[2, 18]. 형질전환체 ATCC 4126/YIpδAUR-ERCδ도 ATCC 4126/YIpδAUR-ERC와 같이 6 mM 이상의 ethionine첨가에서 생장이 일어났다(Fig. 4). 효모형질전환에 불필요한 세균성 DNA의 제거로 벡터의 크기가 축소된 이중 δ시스템(YIpδAUR-ERCδ)은 단일 δ시스템(YIpδAUR-ERC)과 비교하여 염색체에 더 많이 삽입 될 수 있다[14, 16]. 이와 같은 세균 항생제 저항성 유전자가 제거되고 효모자체의 항생제저항성 유전자를 선별 표지 유전자로 하는 벡터를 이용하여 형질전환된 재조합 제



**Fig. 4. Growth of *S. cerevisiae* ATCC 4126 and its transformants in different minimal media.** A, minimal medium; B, minimal medium with aureobasidin A (1 μg/ml); C, minimal medium with 3 mM ethionine; D, minimal medium with 6 mM ethionine; E, minimal medium with aureobasidin A (1 μg/ml) and 6 mM ethionine. 1, *S. cerevisiae* ATCC 4126; 2, ATCC 4126/YIpδAUR; 3, ATCC 4126/YIpδAURSAδ; 4, ATCC 4126/YIpδAUR-ERC; 5, ATCC 4126/YIpδAUR-ERCδ; 6, ATCC 4126/YIpδERCδ.

빵효모 및 양조효모가 최근 보고되고 있다[16, 18].

Ethionine저항성 유전자가 산업용 효모의 형질전환에 선별 표지 유전자로 이용될 수 있는지를 알아보기 위해, YIp $\delta$ AUR-ERC $\delta$ 내의 AURI-C유전자기능이 제거된 YIp $\delta$ ERC $\delta$ 로 형질 전환된 ATCC 4126/YIp $\delta$ ERC $\delta$ 의 ethionine저항성과 aureobasidin A저항성을 조사하였다. 형질전환배지의 ethionine농도가 3 mM에서 6 mM로 증가함에 따라 의존적으로 YIp $\delta$ ERC $\delta$ 의 형질전환 효율이 감소되었지만(data not shown) 각 농도에서 얻어진 ethionine저항성 형질전환체들(ATCC 4126/YIp $\delta$ ERC $\delta$ )은 ATCC 4126/YIp $\delta$ AUR-ERC $\delta$ 와 같이 6 mM 이상의 ethionine이 첨가된 배지에서 성장하였다. 그러나 aureobasidin A가 1  $\mu$ g/ml 첨가된 배지에서는 성장하지 못했다(Fig. 4). AURI-C유전자 없이 ERC1유전자만 있는 YIp $\delta$ ERC $\delta$ 로 형질전환된 효모가 성장저해 농도(3 mM)이상의 ethionine이 첨가된 배지에서 성장할 수 있고 ethionine저항성 유전자가 도입되지 않은 비형질전환체는 성장하지 못하므로 산업용 효모의 형질전환체 일차 선별에 ethionine저항성 유전자가 선별 표지 유전자로 이용 가능하다[19, 27]. Methionine이 일정농도 외부에서 공급되면 ethionine저항성을 나타내는 재조합효모는 ethionine감수성 효모에 비해 세포내 S-adenosylmethionine(SAM)생산이 증진된다는 보고가 있으므로[21, 23], 지금까지 얻어진 ethionine저항성 형질전환체들의 세포내 S-adenosylmethionine(SAM) 농도를 측정하고 생산량이 증진된 재조합 효모를 찾는 연구가 진행 중이다.

### 감사의 글

이 논문은 2003년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- 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.
- 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*  $\alpha$ -amylase gene. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1847-1851.
- Cho, K. M., Y. J. Yoo, and H. S. Kang. 1999.  $\delta$ -Integration of endo/exo-glucanase and  $\beta$ -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. *Enz. Microb. Technol.* **25**: 22-30.
- 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*  $\beta$ -amylase gene and secreting  $\beta$ -amylase. *Biotechnol. Lett.* **24**: 1785-1790.
- 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.
- Domingues, L., M. L. Onnela, J. A. Teixeira, N. Lima, and M. Penttila. 2000. Construction of a flocculent brewer's yeast strain secreting *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 97-103.
- Fujii, T., K. Kondo, F. Shimizu, H. Sone, J. I. Tanaka, and T. Inoue. 1990. Application of a ribosomal DNA intergration vector in the construction of a brewer's yeast having  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 997-1003.
- Hashida-Okado, T., A. Ogawa, M. Endo, R. Yasumoto, K. Takesako, and I. Kato. 1996. AURI, a novel gene conferring aureobasidin resistance on *Saccharomyces cerevisiae*: A study of defective morphologies in Aurlp-depleted cells. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 236-244.
- Hill, J., K. A. Ian, G. Donald, and D. E. Griffiths. 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5791.
- Kim, H.-O., J.-N. Park, H.-J. Sohn, D.-J. Shin, C. Choi, S.-Y. Im, H. B. Lee, S.-B. Chun, and S. Bai. 2000. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of  $\beta$ -amylase gene from the oomycete *Saprolegnia ferax*. *Biotechnol. Lett.* **22**: 1493-1498.
- Kim, H.-O., J.-N. Park, D.-J. Shin, H. B. Lee, S.-B. Chun, and S. Bai. 2001. A gene encoding *Achlya bisexualis*  $\beta$ -amylase and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1101-1107.
- 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  $\delta$ -sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 61-64.
- Kim, T. G. and K. Kim. 1996. The construction of a stable starch-fermenting yeast strain using genetic engineering and rare-mating. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **59**: 39-51.
- Lee, F. W. F. and N. A. Da Silva. 1997. Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the  $\delta$  sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 339-345.
- Lopes, T. S., 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 ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **105**: 83-90.
- 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.
- 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.
- Nieto, A., J. A. Prieto, and P. Sanz. 1999. Stable high-copy-

- number integration of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol. Prog.* **15**: 459-466.
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 $\delta$  sites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **12**: 16-21.
  20. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  21. Shiomi, N., H. Fukuda, H. Morikawa, Y. Fukuda, and A. Kimura. 1988. Cloning of a gene for S-adenosylmethionine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 302-304.
  22. Shiomi, N., H. Fukuda, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1991. Nucleotide sequence and characterization of a gene conferring resistance to ethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 211-215.
  23. Shiomi, N., H. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1995. Improvement of S-adenosylmethionine production by integration of the ethionine-resistance gene into chromosomes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 730-733.
  24. Steyn, A, J. C. and I. S. Pretorius. 1991. Co-expression of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase-encoding gene and a *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **100**: 85-93.
  25. Van Rensburg, P., W. H. Van Zyl, and I. S. Pretorius. 1996. Co-expression of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase gene and a *Butyrovibrio fibrisoivens* endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **30**: 246-250.
  26. Van Rensburg, P., W. H. Van Zyl, and I. S. Pretorius. 1998. Engineering yeast for efficient cellulose degradation. *Yeast* **14**: 67-76.
  27. Wang, X., Z. Wang, and N. A. Da Silva. 1996. G418 selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal  $\delta$  sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 45-51.
  28. Wery, J., D. Gutker, A. C. H. M. Renniers, J. C. Verdoes, and A. J. J. van Ooyen. 1997. High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene* **184**: 89-97.
  29. 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.
  30. 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 Oct. 5, 2004/Accepted Dec. 4, 2004)