

一个新葡萄糖淀粉酶基因的克隆与表达

Cloning and Expression of a New Glucoamylase Gene

杨立泉¹, 戴小军¹, 罗元明², 马春晓¹, 侯建华¹, 武志强¹, 王翠艳¹, 李明刚^{1*}

YANG Li-Quan¹, DAI Xiao-Jun¹, LUO Yuan-Ming², MA Chun-Xiao¹, HOU Jian-Hua¹, WU Zhi-Qiang¹,
WANG Cui-Yan¹ and LI Ming-Gang^{1*}

1 南开大学生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071

2 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100080

1 The Key Laboratory of Bioactive Material, Ministry of Education, Life Science College, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China

摘 要 根据已报道的米根霉葡萄糖淀粉酶基因序列, 通过 PCR 方法, 从天然少根根霉的总 DNA 中克隆到含有四个内含子的葡萄糖淀粉酶基因。通过设计引物并采取重叠 PCR 方法删除内含子, 获得了新的少根根霉葡萄糖淀粉酶 (*Rhizopus arrhizu* glucoamylase, RaGA) cDNA 序列 (Accession number: DQ903853)。该基因在毕赤酵母中成功表达, 表达产物具有较高的葡萄糖淀粉酶活性。

关键词 少根根霉, 葡萄糖淀粉酶, 克隆, 表达, 毕赤酵母

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0477-06

Abstract According to the reported gene sequence of *Rhizopus oryzae* glucoamylases, the glucoamylase gene containing four introns was cloned from the total DNA of the natural *Rhizopus arrhizu*. Specific primers were designed to delete introns by overlapping PCR and a new cDNA sequence of *Rhizopus arrhizu* glucoamylase was obtained. The accession number in gene bank is DQ903853. This gene is successfully expressed in the *Pichia pastoris*, producing a new protein with a high activity of glucoamylase.

Key words *Rhizopus arrhizu*, glucoamylase, clone, expression, *Pichia pastoris*

目前, 能源短缺和环境污染极大限制了社会的发展进步, 乙醇作为替代能源已逐步被人们所认识, 被认为是解决上述问题的有效途径之一。寻找可替代能源已经成为现代科学的一大研究热点, 受到各国政府的高度重视和大力支持。与其它石化燃料相比, 乙醇具有可再生、燃烧清洁和不产生温室气体等优点, 有可能成为替代汽油等化石能源的主要燃料能源。目前通过淀粉生产乙醇的方法包括构建分泌葡萄糖淀粉酶的工程菌株, 通过一步降解淀粉并发

酵生产乙醇以提高乙醇产率^[1]。目前酒精发酵工业中广泛应用的酶法糖化发酵一般采用来自黑曲霉 (*Aspergillus niger*)^[2]、泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)^[3]、得氏根霉 (*Rhizopus niveus*)^[4] 和臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)^[5] 等生产菌株提取的葡萄糖淀粉酶糖化淀粉, 酶制剂用量大, 生产成本高。而且, 上述来源的葡萄糖淀粉酶基本不具备糖化生淀粉的能力, 因此糖化前必须将淀粉高温蒸煮, 然后再通过 α -淀粉酶使其糊化, 能源消耗大并增加了生产成本,

Received: November 3, 2006; Accepted: November 27, 2006.

This work was supported by the grants from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. 2005AA13065).

* Corresponding author. Tel: +86-22-23508237; E-mail: mgl@nankai.edu.cn

国家 863 高技术研究与发展计划项目 (No. 2005AA13065) 资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

从而降低了企业的竞争力和用户使用成本。虽然国内外也有使用混合培养糖化和发酵菌株生产乙醇的发酵生产方式,但此工艺缺点在于菌株自身生长需要消耗大部分的淀粉底物,实际淀粉利用率和乙醇产率依然相当低^[6]。根霉葡萄糖淀粉酶能够高效降解 α -1,4- α -1,3- α -1,6-糖苷键,从淀粉非还原性末端释放葡萄糖^[7],因此具有很高的商业价值。有人通过构建分泌根霉葡萄糖淀粉酶的酿酒酵母菌株,显著提高了乙醇产率和缩短发酵所需的时间^[8]。

少根根霉具有很高的淀粉降解能力,本研究的目的是构建分泌少根根霉葡萄糖淀粉酶的毕赤酵母菌株,用于降解淀粉、发酵生产乙醇。常规获取基因 cDNA 的方法是 RT-PCR,但我们使用购自中科院普通微生物菌种保藏管理中心的工业 *Rhizopus arrhizus* 3.2893 菌株生长速度快,其 mRNA 降解迅速,很难分离其 mRNA,故用常规 RT-PCR 方法获取 cDNA 序列没能成功。因此,我们通过基因组 DNA,获得了含有四个内含子的葡萄糖淀粉酶基因。因为酵母和少根根霉的内含子剪接机制不同,因此必须在体外通过 PCR 方法,删除基因中的 4 个内含子。通过测序分析表明 4 个内含子被精确删除,并且跟基因组 DNA 相比,没有引入新的突变位点。将 RaGA 基因构建到毕赤酵母表达载体 pPIC9 并转化毕赤酵母 GS115,得到了分泌活性葡萄糖淀粉酶的工程菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 pMD18-T 载体, *E. coli* DH5a, *Pichia pastoris* GS115 本室自存。

1.1.2 培养基和添加剂 LB 培养基用于大肠杆菌培养。YPD 培养基用于酵母培养。MD 平板(1.34% 无氮酵母氮碱,1% 葡萄糖,2% 琼脂)用于挑选重组酵母。BMGY (1% 酵母浸膏,2% 蛋白胨,100mmol/L pH 6.0 磷酸缓冲液,1.34% 酵母氮碱,1% 甘油)用于增殖细胞,BMMY (1% 酵母浸膏,2% 蛋白胨,100mmol/L pH 6.0 磷酸缓冲液,1.34% 酵母氮碱,1% 甲醇)用于诱导表达。*Pfu* DNA 聚合酶,dNTP 购自生工。T4 DNA 连接酶以及可溶性淀粉购自大连宝生物公司。DNA and Protein marker 购自北京鼎国公司。

1.1.3 用于印记的抗体 鼠源的葡萄糖淀粉酶单克隆抗体购自 Clontech 公司,辣根过氧化物酶标记的

二抗(羊抗鼠 IgG-HRP)购自北京欣经科公司。PVDF 膜购自 MILLIPORE 公司。

1.2 方法

1.2.1 内含子删除策略 内含子体外剪接根据 M13 删除诱变设计^[9]。每个内含子的删除需要两对引物,如图 1 所示。引物 2,3 互相配对,其 3' 端一部分碱基与基因组 DNA 配对。两端引物 1,4 设计有限制性内切酶位点,以便构建载体。使用 1,2,3,4 作为引物,进行两组 PCR,获得扩增片段 A、B 有一段互相配对。琼脂糖电泳和回收试剂盒纯化除去多余的引物相当重要^[10]。使用 A、B 两个片段作为模板,两端引物进行 PCR 扩增。为了在上述过程中减少突变,我们使用了高保真的 DNA 聚合酶。

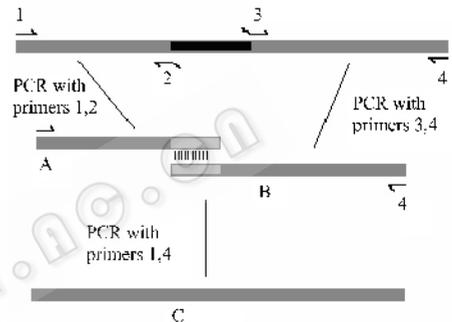


图 1 内含子删除示意图

Fig. 1 A schematic of deletion of introns

1.2.2 少根根霉葡萄糖淀粉酶内含子的删除 设计一系列引物用来删除少根根霉葡萄糖淀粉酶中的四个内含子(表 1)。引物 G12 和 G11 用于删除第一个内含子,他们是相互配对的,并且 3' 端一部分的碱基与基因组 DNA 配对。引物 N1 和 N2 设计用于删除第四个内含子,他们相互配对,且 3' 端一部分碱基与基因组 DNA 配对。第三个外显子只有 54 碱基长,设计 G21, G22 和 G23 这三个引物用来一次延伸,直接扩增该片段。G21 的设计同 G11 类似。PCR 剪接各步以及各引物的使用见图 2 所示。

表 1 用于少根根霉葡萄糖淀粉酶内含子删除的引物

Table 1 Primers designed for deletion of introns of *Rhizopus arrhizus*

Up	5'CTCTCGAGAAAAGAGCAAGCATTCTAGTAGTGTCTTC
Down	5'TTGAATTCCTTAAGCGGCAGGTGCACCAGC3'
G11	5'CAGGAAAAATTTATGTCAAGAACATTGC3'
G12	5'GCAATGTTCTTGACATAAAATTTTCTG3'
G21	5'TTTCCACTGACCTCATACITAAAAGTAGAACTCC3'
G22	5'GAATGTTGTTATCATAGTATGTTTTCCACTGACCTC3'
G23	5'ACCTTGGTAATTGGCAGAATTTGTTTATCATAG3'
N1	5'TCCTGGCTCTGAAAAGATCCTTGCCACTGCTG3'
N2	5'CAGCAGTGGCAAGGATCTTTTCAGAGCCAGGA3'
G32	5'TCTACATCCAAGCC3'

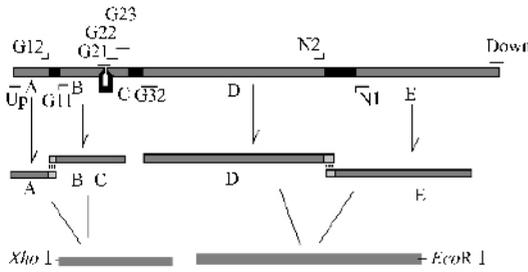


图2 内含子删除过程中 PCR 剪接以及各引物的使用示意图

Fig. 2 PCR splicing and use of primers during the process of the deletion of introns

通过 PCR 扩增出片段 A (B + C), D 和 E 后用电泳纯化回收。第一、第四个内含子的删除如图 1 所示的删除策略进行。PCR 条件:预变性 95℃ 10min,变性 95℃ 55s,退火 52℃ 55s,延伸 72℃,延伸时间取决于片段大小,每 kb 延伸时间 2min。得到含 Xho I 酶切位点和含 EcoR I 酶切位点的两个片段。

1.2.3 pUC18-RaGA 载体的构建:获得含 Xho I 酶切位点的片段(A + B + C)和含 EcoR I 酶切位点片段(D + E)后。用 EcoR I 和 Sal I 双酶切 pUC18 载体,含 Xho I 位点片段和含 EcoR I 位点片段也使用相应的限制酶消化,两个片段的另一端为平端。Sal I 和 Xho I 酶切后会产生相同的粘性末端。上述三片段于 16℃ 连接过夜(图 3)。重组载体通过电脉冲法转化大肠杆菌^[11],提取阳性转化子的质粒进行碱基测序。

1.2.4 构建 pPIC9-RaGA 表达载体:pUC18-RaGA 和 pPIC9 两个质粒通过 EcoR I 和 Xho I 双酶切消化、回收。获取目的基因片段和表达载体片段。通过 T4 DNA 连接酶联接,构建 pPIC9-RaGA 载体,转化大肠杆菌。提取阳性菌质粒,通过 Bgl II 线性化后电击法转化毕赤酵母 GS115^[12]。

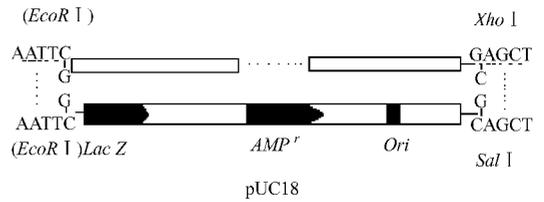


图3 pUC18-RaGA 载体的构建

Fig. 3 Construction of pUC18-RaGA

1.2.5 根霉葡萄糖淀粉酶在毕赤酵母中的诱导表达 整合有 pPIC9-RaGA 的 GS115 具备了组氨酸的合成能力,通过 MD 平板可以筛选得到阳性克隆^[13]。挑选转化子,转接到 5mL BMGY 培养基中 30℃ 振荡培养 48h 后,离心收集菌体,用 10mL BMMY 培养基重悬,在 30℃ 振荡培养 72h。第一次添加甲醇 100μL,以后每 24h 添加甲醇 75μL。3d 后 6000r/min 离心 5min,收集培养基上清。准备 SDS-PAGE 并进行酶活测定。

1.2.6 酶活性分析 (1)100μL 酶液(通过诱导培养的发酵液的离心上清)混合 700μL 50mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH5.5),200μL 10% 淀粉溶液,37℃ 反应 20min。终止液为 1mL 10% 三氯乙酸和 400μL 1mol/L 碳酸钠^[14]。通过试剂盒检测释放的葡萄糖(中生北控生物科技股份有限公司)1 个酶活力单位定义为适当条件下每分钟释放 1 μmol/L 葡萄糖的酶量。(2)使用含 2% 可溶性淀粉,2% 琼脂,0.1μmol/L, pH 5.0 醋酸盐缓冲液的平板进行酶活力分析。在平板表面上放置直径 1cm 滤纸,向其上滴入 100μL 培养基上清,37℃ 过夜后使用碘酒染色。

1.2.7 Western blotting^[15] 将经过 SDS-PAGE 的蛋白转 PVDF 膜,用牛血清白蛋白封闭。将一抗按 1:200 用 PBS 稀释 3mL,加入装有 PVDF 膜塑料袋中,排除气泡后密封袋口,于室温平缓摇动 1h,然后用 PBS

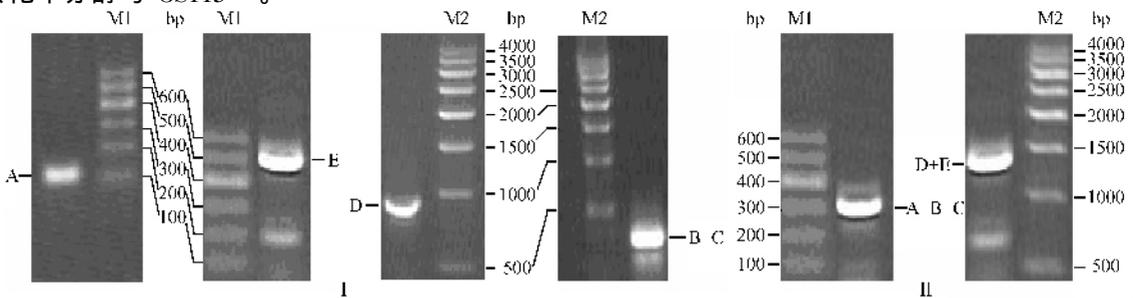


图4 根霉葡萄糖淀粉酶内含子的删除

Fig. 4 Deletion of introns of glucoamylase of *Rhizopus arrhizu*

M1 and M2 are markers. I :gel images of fragment A, E, B + C and D amplified by PCR, II :PCR product of about 1400 bp, whose templates are D and E and primers are G32 and Down,PCR product of about 300bp, whose templates are A + B + C and primers are G23 and Up.

漂洗 3 次,每次 5min。将羊抗鼠 HRP 标记抗体按 1:2000 用 PBS 稀释 3mL,加入装有 PVDF 膜塑料袋中,排除气泡后密封,于室温平缓摇动 1h,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5min。最后用 DBA 显色。

2 结果

2.1 内含子删除

PCR 扩增出 A, (B+C), D 和 E 四个片段后琼脂糖电泳,对照 DNA markers 进行鉴定(图 4 I)。A, (B+C), D 和 E 的大小为 129bp, 193 bp, 937 bp 以及 514bp。含 *Eco*R I 位点片段(D+E)约 1400bp 和含 *Xho* I 位点片段(A+B+C)约 300bp 电泳结果见图 4 II。

2.2 基因序列分析

RaGA 基因序列与其基因组 DNA 序列比较后发现 4 个内含子被精确删除。4 个内含子原来所在位置为 99, 276, 333 和 1254。与米根霉葡萄糖淀粉酶基因序列比较发现,有五个碱基不同,导致四个氨基酸残改变:米根霉的 Ile⁵⁴, Gly²⁴⁷, Tyr²⁵⁰, Ser²⁷⁵ 和 Phe³¹⁰ 在少根根霉中为 Val, Gly, Tyr, Gly 和 Leu。RaGA 基因在 GeneBank 的接收序列号为 DQ903853 (gi:114453260)。

2.3 pPIC9-RaGA 表达载体的构建

我们使用 pPIC9 酵母表达载体进行表达,首先对载体和 RaGA 进行双酶切,然后连接转化大肠杆菌 *DH5a* 构建成 pPIC9-RaGA 表达载体。图 5 所示为 pPIC9-RaGA 载体 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定的结果。凝胶电泳结果显示载体上切下 1.7 kb 片段,表明基因成功连入载体。

2.4 根霉葡萄糖淀粉酶在毕赤酵母中的表达

重组毕赤酵母诱导表达后,培养基上清在 12% SDS-PAGE 结果如图 6 所示。跟 GS115 空白对照相比,重组子多了一条约 65kD 的蛋白条带。

从图中可以看出,跟对照相比,转化子多了一条 65kD 的蛋白条带,与理论蛋白大小相符。通过印记进一步得到验证,表明葡萄糖淀粉酶基因在毕赤酵母中进行了表达。其大小比通过氨基酸计算的结果大些,是由于它存在部分糖基化现象。糖基化现象因不同的表达宿主而有差异,即使同一宿主也会因培养条件的改变而略有不同。

2.5 淀粉圈法酶活分析

淀粉平板在重组子培养基上清作用后,碘染色的结果见图 7。从形成的亮斑看,1-1 活力较高。水和缓冲液和空滤纸都没有亮斑出现。GS115 稍有些

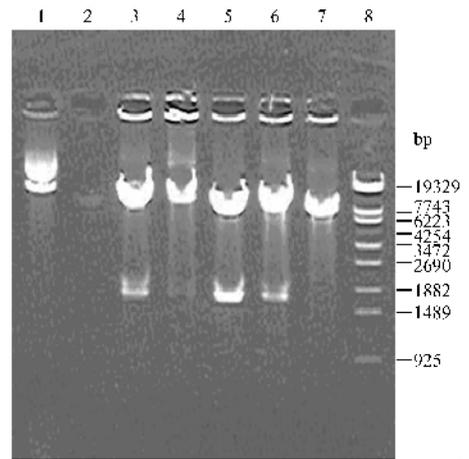


图 5 pPIC9-RaGA 载体酶切鉴定的电泳结果

Fig. 5 Restriction fragment analysis of PIC9-RaGA
1: vector pPIC9 control; 2: restriction fragments of pPIC9; 3~7: different clones transformed with pPIC9-RaGA; 8: DNA marker.

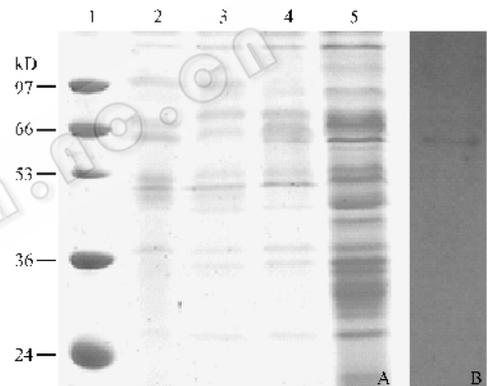


图 6 重组毕赤酵母培养上清 12% SDS-PAGE 结果

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of supernatant of cultured recombinant *Pichia pastoris*

1: low molecular weight marker; 2: GS115 control; 3~5: supernatants of different recombinants. Arrow indicates the band of glucoamylase (A) and Western-blotting of lane 5 (B).

透明,可能是酵母本身具有降解特殊结构的淀粉能力所至。

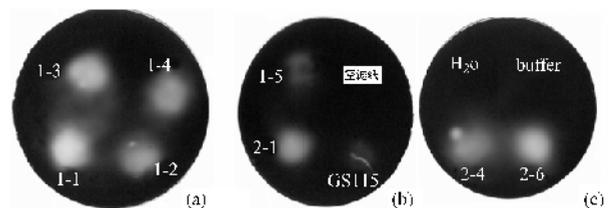


图 7 淀粉板在培养基上清作用后碘染色结果

Fig. 7 Iodine dye result of the starch plate after treatment by medium supernatant

The number in the figure indicates the transparent disc made by the digestion of starch.

2.6 酶活力测定

中国相对酶活性测试刊我们选取几个阳性菌株进行

诱导表达。然后将菌液离心,取其上清进行活性测试。选择了8个转化菌进行诱导表达,其中5个表现出葡萄糖淀粉酶的活性,最大的为11.5u/mL,与同类产品的酶活力相当。

3 讨论

根霉葡萄糖淀粉酶在发酵工业中具有十分重要的应用价值。我们试图利用根霉葡萄糖淀粉酶的同源性,根据发表的米根根霉葡萄糖淀粉酶基因序列设计两端引物,通过RT-PCR方法克隆少根根霉的葡萄糖淀粉酶基因,但是多次试验没有获得成功。其原因可能是所选的 *R. arrhizus* 3.2893 是酒厂工业用菌,其生长速度快,mRNA 降解迅速,在有限的条件下难以提取完整的总RNA。获取该酶的全基因序列,在体外剪接除去四个内含子。

来源于少根根霉的葡萄糖淀粉酶基因还没有报道过,测序结果表明,少根根霉葡萄糖淀粉酶基因全长1740bp,与发表的米根根霉葡萄糖淀粉酶长度相同。使用DNASIS软件v2.5进行同源分析,少根根霉葡萄糖淀粉酶与米根根霉葡萄糖淀粉酶基因同源性99%,米根根霉葡萄糖淀粉酶基因中脱氧核苷酸A174在少根根霉葡萄糖淀粉酶中为G174,此外C254在少根根霉中为G,T264为C,A837为G,T924为C。它们的变化导致三个氨基酸残改变:米根根霉的Ile54在少根根霉中为Val,它们同属非极性氨基酸,分子量相当。米根根霉葡萄糖淀粉酶Ser275在少根根霉中为Gly,它们同为极性氨基酸,而且报道的米根根霉葡萄糖淀粉酶可能的空间结构与羟基无关,活性位点的作用也与羟基没有直接关系,因此该氨基酸的改变对于酶的活性可能没有多大影响;米根根霉的Phe310在少根根霉中为Leu,它们同为非极性氨基酸,并且未见报道Phe310与酶活性相关。这些氨基酸残基发生改变,但所在位置的极性并没有变化。报道称米根根霉葡萄糖淀粉酶中与淀粉结合相关的氨基酸可能为Trp47,Tyr94,Ser63,Thr71,Ser73,与催化相关的氨基酸可能为Asp336,Glu339,Trp279。

测序还发现,其中一个拼接产物pUC-RaGA-2第二个外显子缺失了147个碱基(108-254),缺失第32-80共49个氨基酸。预测的米根根霉葡萄糖淀粉酶淀粉结合域位点I两个氨基酸丢失一个,仅剩Tyr94。位点II三个氨基酸全部丢失,因此,II号菌与淀粉的结合能力会受到影响。丢失碱基的原因可能是这几步的PCR过程中一些偶然因素造成的。

在实验中发现使用2号基因构建的重组毕赤酵母工程菌同样分泌了具有活性的葡萄糖淀粉酶,它们在降解可溶性淀粉的能力差别不是很大。但是,经过淀粉结合实验后,1号菌发酵上清中糖化酶活力下降幅度大于2号菌,这一实验结果证实了147位碱基的缺失部位处于葡萄糖淀粉酶的淀粉结合域,其缺失虽然对可溶性淀粉活力影响不大,但对生淀粉的结合能力影响显著。Toshihiko在克隆米根根霉葡萄糖淀粉酶时发现,从米根根霉发酵提取液中得到三种葡萄糖淀粉酶区别在于N长度,并且只有全长的Glu1具有生淀粉的降解能力,因此他认为根霉葡萄糖淀粉酶的淀粉结合域位于酶蛋白的N末端^[6]。

构建能够连续水解淀粉(糖化)和进行酒精发酵并具备高密度发酵优点的酿酒酵母工程菌株,对于开发利用可再生生物能源有积极意义。发酵工程上减少工艺流程不但减少成本消耗,而且有利于提高原料利用率和最终产量。随着酒精这种清洁燃料正逐步成为缓解环境污染的替代燃料。我们拟构建能够表达葡萄糖淀粉酶的酿酒酵母工程菌,使淀粉糖化和发酵一次完成。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang FY(张凤英), Dong KF(董开发), Tu J(涂瑾). Research the ferment specific of *Rhizopus*. *Food Science of China* (食品科学) 2002, 23(8):158-159.
- [2] Li WQ(李文清), He M(何明), Luo JX(罗进贤). Expression and secretion of *Aspergillus niger* glucoamylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science in China Series B* (中国科学 B 辑), 1994, 2(38):195-201.
- [3] Nunberg JH, Meade JH, Cole G, et al. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol Cell Biol*, 1984, 4:2306-2315.
- [4] Inokuchi R. Carboxyl groups and tryptophan residues in the active site of *Rhizopus niveus* glucoamylase. *J Basic Microbiol*, 1999, 39:311-323.
- [5] Underkoffler LA. "Chapter 21: Development of a Commercial Enzyme Process: Glucoamylase." In: *Cellulases and Their Applications*. Advances in Chemistry Series No. 95(Hajny, G.J.; Reese, E.T., Eds). American Chemical Society, Washington, D. C., 1969, pp 343-358.
- [6] Wang HN(王怀能), Wang H(王辉). Research on saccharifying enzyme for uncooked starch. *Liquor Making Science & Technology* (酿酒科技), 2000, 3(3):32-34.
- [7] Takahashi T, Kawauchi G, Suzuki K. Bindability and digestibility of high-pressure-treated starch with glucoamylases from *Rhizopus* sp. *J Biochem*, 1994, 6:1251-1256.
- [8] LiuZR(刘增然), HeXP(何秀萍), LongZF(龙章富) et al.

- Sacchromyces cerevisiae* free of bacterial or viral sequence. *Communication of High technology* (高技术通讯), 2004, 7: 20 - 24.
- [9] Tannich E, Tummler M, Arnold HH. Deletion mutagenesis in M13 by polymerase chain reaction using universal sequencing primers. *Anal Biochem.* 1990, **188**: 255 - 258.
- [10] Shuldiner AR, Scott LA, Roth J. PCR-induced (ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**: 1920 - 1920.
- [11] Xue GP, Johnson JF, Dalrymple BP. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J Microbiol Methods*, 1999, **34**: 183 - 191.
- [12] Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 2004, **36**(1): 152 - 154.
- [13] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**: 45 - 66.
- [14] Sumitani J, Tottori T, Kawaguchi T. New type of starch-binding domain: the direct repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus* sp. no. 195 alpha-amylase contributes to starch binding and raw starch degrading. *Biochem J*, 2000, **350**(2): 477 - 484.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 888 - 898.
- [16] Ashikari T, Nakamura N, Tanaka Y. *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agric Biol Chem*, 1986, **50**(4): 957 - 964.