Glucoamylase 유전자 *STA*를 포함한 재조합 플라스미드들의 *Saccharomyces cerevisiae*에서의 발현

박장서 · 박용준 · 이영호 · 강현삼* · 백운화
동양맥주 두산연구소 · *서울대학교 미생물학과

Expression of Recombinant Plasmids Harboring Glucoamylase Gene *STA* in *Saccharomyces cerevisiae*

Park, Chang-Seo, Yong-Joon Park, Young-Ho Lee, Hyen-Sam Kang * and Un-Hua Pek
Doosan Research Laboratories, Oriental Brewery Co. Ltd., Yoido P.O. Box 80, Seoul, Korea
**Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

ABSTRACT: *STA* gene coding glucoamylase was introduced into haploid *Saccharomyces cerevisiae* SHY3 and polyploid *Saccharomyces cerevisiae* 54. We constructed the recombinant plasmid by substituting the promoter region of alcohol dehydrogenase isoenzyme I gene for that of *STA* gene to increase the expression of *STA* gene and found that the activity of glucoamylase was increased in transformants. The plasmid stability was improved remarkably when we got the *STA* gene into the plasmid which had centromere. The activity of glucoamylase and transformation frequency of it, however, was decreased because of low copy number. Industrial polyploid strain was transformed with the recombinant plasmid having the 2μ origin of replication and *STA* gene. It produced more alcohol than host when fermented in liquefied starch media. The industrial strain, however, was not transformed with the autonomously replicating plasmid containing centromere.

KEY WORDS □ *STA* gene, *S. cerevisiae*, industrial yeast strain.

산업용 알콜 생산 효모들은 거의가 3당류 이하의 당성분을 이용한다. 그러므로 이들 효모에 의한 알콜 발효에 전분을 기질로 이용하려면 전분을 주성분으로 하는 원료를 액화 및 당화 등의 과정을 거쳐서 효모가 이용가능한 형태로 전처리해 주어야 한다. 전분 분해능을 갖는 *Saccharomyces diastaticus*는 세포외 glucoamylase를 만들어내는데 이 glucoamylase는 전분 분자의 non reducing end로부터 α-1,4-glucosidic linkage를 가수분해하므로써 포도당을 만들어낸다 (Hopkins, 1958). 최근에 와서는 이 *Saccharomyces diastaticus*로 부터 glucoamylase를 coding하는 구조 유전자인 *STA* 유전자를 cloning하여 알콜 발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*나 *Saccharomyces uvarum* 등에서 발현, 분비시키는 실험들이 진행되고 있다(Yamashita 등, 1983 ; Meaden 등, 1985 ; Erratt 등, 1986 ; Derry 등, 1987 ; Ahn 등, 1987).

STA 유전자를 산업용 효모에 도입한 후 이를 발현시켜서 이용할 수 있게 되기까지는 극복되어야 할 많은 문제점들이 있다. 첫번째는 다배체인 산업용 효모의 형질전환이 반수체인 실험실용 효모에 비해 매우 어렵다는 것이다. 이는 형질전환빈도가 매우 낮고 auxotrophic marker를 선별인자로 사용할 수 없기 때문이다. 두번째는 cloning된 *STA* 유전자가 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Saccharomyces uvarum*과 같이 종이 다른 효모에서 발현될 때 받을 수 있는 조절이다.

*Saccharomyces cerevisiae*는 *INH1*(Yamashita 등, 1984), *STA10*(Polaina 등, 1983) 등으로 알려진 *STA*

Table 1. *Yeast strains and plasmids*

Strain or plasmid	*Genotype or phenotype*	*Reference or source*
Yeast strain		
S. cerevisiae SHY3	*a, ste, ura3, trp1, leu2, his3, ade1, can1*	Dr. Kang, H.S.
S. cerevisiae 54	wild type, triploid	Bak-Hwa Co.
Plasmid		
YEp36	*CUP1, LEU2*, AP^r	Butt, T.R. *et al.*, (1985)
pMA56	*ADH1* promoter, *Trp1*, AP^r	Valenzuela, P. *et al.*, (1982)
YCp50	*CEN4, URA3*, AP^r, Tc^r	Dr. Kim, K.S.
YEpSTA	*STA, URA3*, Ap^r	Kang, H.S. *et al.* (1987)

유전자 발현의 억제유전자를 갖고 있는 것으로 알려졌으며 *Saccharomyces cerevisiae*와 거의 유사한 유전적 특성을 갖고 있는 *Saccharomyces uvarum*도 그와 같은 유전적 조절을 받을 가능성이 매우 높다. 셋째, 특히 중요한 것은 도입된 유전형질의 안정성이다. 본 실험에서는 효모의 우성 선별 인자인 Copper metallothionein 유전자(*CUP*)를 다배체인 산업용 효모의 선별인자로 이용하였으며, *STA* 유전자의 upstream regulatory region을 포함한 Promoter 부위를 치환해서 *STA*의 억제 유전자에 의한 조절을 극복하는 한편 안정성이 높은 벡터를 이용하여 도입된 *STA* 유전자의 안정성을 증가시켜 주려고 하였다.

재료 및 방법

균주와 플라스미드

실험에 사용한 대장균은 HB101 strain이며 그 밖에 사용한 효모와 플라스미드는 Table 1.와 같다.

효소 및 시약

제한 효소 및 그 밖의 효소들은 BRL Life Tech.사와 Sigma.사에서 구입하였으며, 배지용 시약은 Difco lab.의 제품을 사용하였다. 그외 시약들은 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

배지

효모를 순수배양하기 위해서 YPD 배지(yeast extract 1%, pepton 2%, glucose 2%)를 이용하였으며 glucoamylase 역가를 측정하는데 사용한 배지는 BY-PDS 배지(yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 1%, soluble starch 2%, 0.4M succinate buffer<pH 4.5>25%)이다. 플라스미드의 안정성 조사 등에 사용된 최소배지는 SD배지(yeast nitrogen base with amino acid 0.67%, glucose 2%)이며 필요에 따라 적당한 농도의 아미노산 및 $CuSO_4$를 첨가해 주었다. 한편 평판배지에서는 각각 2%의 agar를 첨가하여 사용하였다. 알콜 생산 실험에 이용된 액화액은 25% (w/v)의 나맥을 원료로 하여 호화과정을 거친 후 액화효소를 처리한 것이며 당화액은 액화액을 62℃에서 공업용 당화 효소로 당화시킨 것이다. 이 때, 전체 환원당의 양은 Miller(1959)의 방법에 따라 측정하였을 때 액화액의 경우 6.5%(w/v)이었고 당화액의 경우엔 14.5%(w/v)이었다.

플라스미드의 구성

재조합 플라스미드를 구성하는데 필요한 모든 DNA 조작기술은 주로 Maniatis 등(1982)의 방법을 따랐으며, 제한효소 및 그 밖의 DNA 변형효소들은 제조회사에서 명시한 방법에 따라 사용하였다.

효모의 구리내성 측정

YPD 액체 배지에서 대수증식말기까지 배양시킨 효모를 각각 다른 농도의 $CuSO_4$를 함유한 SD 평판배지 위에 100 μl 씩 도말 한 후 30℃에서 4일간 배양하고 이때 자라나온 colony의 수를 확인하였다.

플라스미드를 이용한 효모의 형질전환 및 형질전환체의 선별

효모의 형질전환은 Ito 등(1983)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 먼저 숙주로 쓰일 효모를 YPD 배지에서 5×10^7 cells/ml 정도가 되도록 진탕배양한 후 균체를 원심분리하고 멸균 증류수로 2회 세척한다. 세포수가 5×10^8 cells/ml이 되도록 LA 용액(0.1 M LiAc. in TE buffer of pH 7.6)에 현탁시킨 후 30℃에서 1~2시간 동안 약하게 진탕시킨다. 진탕이 끝난 세포 100 μl와 1~10 μg의 플라스미드 DNA를 섞어준 후 30℃에서 30분간 반응시키고 다시 0.7 ml의 40% PEG 용액을 첨가해 준 후 30분간 더 반응시킨다. 반응이 끝난 후 40℃에서 5분간 열충격을 가하고 원심분리해서 상등액은 버리고 동량의 YPD 배지를 넣어준 후 30℃에서 1시간 정도 정치한다. 정치가 끝난 후 적당한 선별배지에서 100 μl씩 도말하고 30℃에서 3~5일간 배양한다.

선택배지에서 1차로 자라난 colony들을 soluble starch가 2% 함유된 SD 평판배지위에 picking한 후

30℃에서 1~2일간 배양하고 이를 다시 냉장고로 옮겨서 3℃일간 정치시켜 둔다. 이 때 halo를 생성하는 colony를 선별하여 SD 배지에서 5×10⁶ cells/ml이 되게 키운 후 Holm 등(1986)의 방법에 따라 전체 DNA를 회수하여 이를 다시 *E. coli*에 도입시켜서 플라스미드를 확인하고, 확인이 끝난 효모를 형질전환체로 선별하였다.

재조합 플라스미드의 안정성 조사

형질전환된 효모내에서의 재조합 플라스미드의 안정성은 다음과 같은 방법으로 조사하였다.

형질전환된 효모를 YPD 액체배지에서 약 20세대가 경과하도록 키운 후 YPD 평판배지위에 약 2×10^2개 정도 도말하고 30℃에서 2일간 배양한다. 자라나온 colony들을 2% Soluble starch가 포함된 SD 배지위에 무작위로 100개씩 picking하고 30℃에서 1~2일간 배양한 후 냉장고에 3~4일간 정치시킨다. 자라난 colony 중 halo를 형성하는 것들을 세어서 백분율로 나타내었다.

Glucoamylase 역가 측정

형질전환된 효모로 부터 분비된 glucoamylase의 역가는 다음과 같이 측정하였다. 최소배지에서 정지기까지 성장시킨 균체를 BYPDS 배지에 2%가 되게 접종하고 이를 30℃에서 진탕배양하면서 하루간격으로 상등액 일부를 회수하여 이를 효소원으로 이용하였다. 반응혼합액은 배양상등액 350 μl, 1 M acetate 완충용액(pH 4.8) 50 μl, 8% soluble starch 100 μl로 이루어져 있으며 이들을 잘 섞은 후 55℃에서 30분간 반응시키고 5분간 끓여서 효소를 불활성화시켰다. 반응이 끝난 혼합액속의 생성된 glucose의 양을 glucose 정량 kit(Sigma. Cat. No. 510-A)로 측정하였다. 효소 1 unit는 1분당 100 ng의 glucose를 생산할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

효모에 의한 알콜 생산 실험

숙주로 사용된 주정효모 및 형질전환된 주정효모의 알콜생산실험을 다음과 같이 행하였다.

SD 배지에서 효모를 완전히 증식시킨 다음 액화액 및 당화액 500 ml에 각각 5×10^6 cells/ml이 되도록 접종하고 30℃에서 5일간 정치 배양한다. 배양이 끝난 후 원심분리하여 상등액을 여과지로 여과한 후, 여과액 50 ml을 증류하여 받아낸 증류액의 알콜 함유량을 비중측정기로 측정하였다.

결과 및 고찰

STA 유전자를 보유하는 재조합 플라스미드들의 구성

효모의 발현 벡터인 pMA56에 우성 선별인자로 이용할 수 있는 *CUP1* 유전자를 도입하기 위해 YEp36을 제한효소 *Bam*HI으로 절단하여 얻어진 1.35 kb 크기의 DNA 절편을 pMA56의 *Bam*HI 인식부위에 삽입시켰다. 이렇게 얻어진 재조합 플라스미드 pAC2를 제한효소 *Sal*I으로 절단한 후 여기에 YEpSTA를 *Sal*I과 *Xho*I으로 절단했을 때 생기는 *STA* 유전자를 포함한 약 5.8 kb 크기의 DNA 절편을 삽입시켜서 재조합 플라스미드 pSTA1를 구성하였다. 한편 pAC2에 있는 alcohol dehydrogenase isoenzyme I 유전자(*ADHI* 유전자)의 promoter는 비교적 강력한 것으로 알려졌으며 탄소원이 glucose일 때에 기능이 억제되지 않는다. *STA* 유전자의 조절부위를 다른 것과 대체시키면 억제유전자의 조절을 극복할 수 있을 것이라 예상하고 *ADHI* 유전자의 promoter를 *STA* 유전자 고유의 promoter와 치환시키기로 하였다. 이를 위해 pAC2의 *ADHI* 유전자 promoter의 −14에 위치한 *Eco*RI 부위에 pSTA1을 *Stu*I 및 *Sal*I으로 동시에 절단했을 때 생기는 약 2.6 kb 크기의 DNA 절편을 Kle-

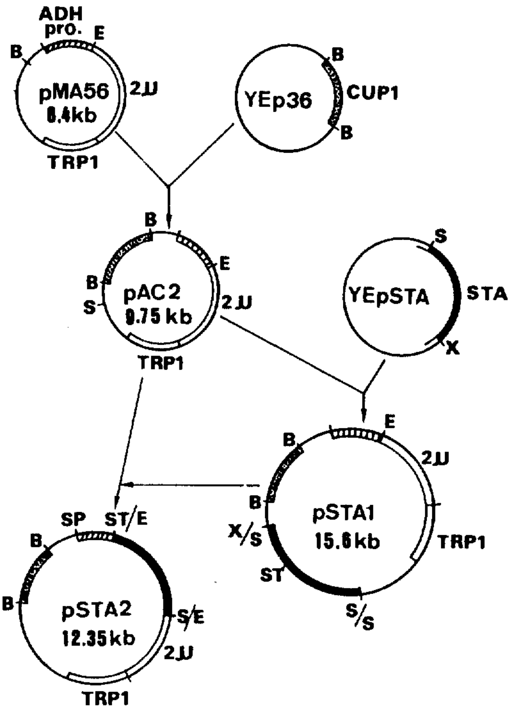

Fig. 1 *Construction strategy of the recombinant plasmid pSTA1, pSTA2.*
Construction of the recombinant plasmids are described in the test. Blackened box shows *STA* gene, hatched box shows the promoter region of *ADHI* gene and dotted box shows *CUP1* gene. Abbreviations: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; S, *Sal*I; SP, *Sph*I; ST, *Stu*I; X, *Xho*I; *ADH* pro., alcohol dehydrogenase isoenzymeI gene promoter; *TRP1*, RP-anthranilate isomerase gene.

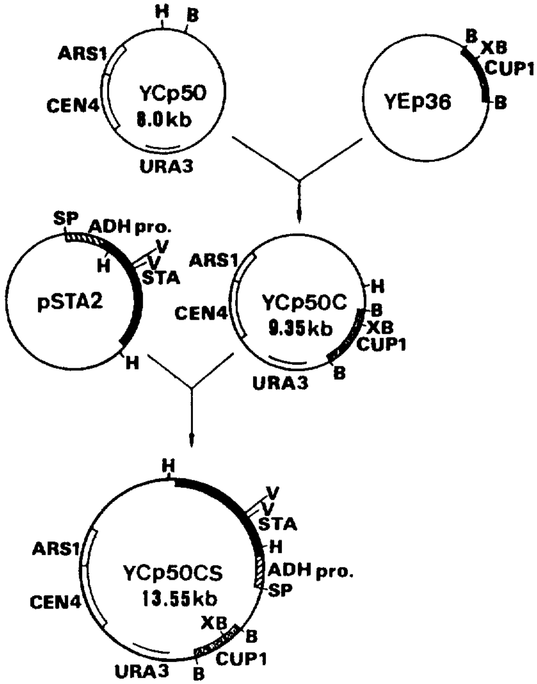

Fig. 2. *Construction strategy of the recombinant plasmid YCp50CS.*
Construction of the recombinant plasmids are described in the test. Abbreviation: *ADH* pro., alcohol dehydrogenase isoenzymeI gene promoter; *ARS1*, autonomously replicating sequence; *CEN4*, centromere of chromosome IV; *CUP1*, copper metallothionein gene; *STA*, glucoamylase gene; *URA3*, OMP decarboxylase gene B, *Bam*HI; H, *Hind*III; SP, *Sph*I; V, *Pvu*II; XB, *Xba*I.

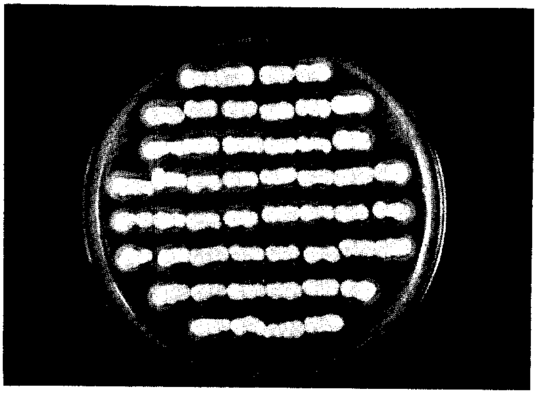

Fig. 3. *Screening of transformed cells for secretion of glucoamylase.*
Colonies from individual transformed cells were transferred to SD medium supplemented with 2% soluble starch. After incubation for 2 days in 30°C these plates were kept at −4°C for 3 days. Haloes around colonies show that they produce and excrete glucoamylase.

now fragment로 처리해서 무딘 말단으로 만든 후 연결시켰고 이를 pSTA2라고 명명하였다(Fig. 1). 제한효소 *Stu*I의 인식부위는 *STA* 유전자의 구조유전자로 부터 −28의 위치에 존재하는데 이 부위의 upstream 쪽에 transcription에 관여하는 모든 element들이 존재하고 있다. 그러므로 *Stu*I 및 *Sal*I으로 절단했을 때 생기는 약 2.6 kb 크기의 DNA 절편에는 *STA* 유전자의 Upstream promoter region이 존재하지 않는다.

보다 안정한 재조합 플라스미드를 구성하기 위해, 효모의 centromere를 보유하고 있어서 세포 분열시 매우 안정하게 유지되는(Clarke 등, 1980) 벡터인 YCp50의 *Bam*HI 인식부위에 산업용 효모의 선별인자로 이용할 수 있는 *CUP1* 유전자를 포함한 1.35 kb 크기의 DNA 절편을 YEp36으로 부터 분리하여 도입시킨다. 이렇게 구성된 재조합 플라스미드 YCp50C의 HindIII 부위에 pSTA2를 *Hind*III로 절단해서 얻어진 약 2.5 kb 크기의 DNA 절편을 원하는 방법으로 삽입시킨 후 pSTA2를 *Xba*I 및 *Pvu*II로 절단했을 때 생기는 약 2.45 kb 크기의 DNA 절편을 삽입시키고 완전한 형태의 *STA* 유전자가 도입 되도록 다시 *STA* 유전자의 *Hind*III 절편을 올바른 방향으로 삽입시켰다. 이렇게 구성된 재조합 플라스미드를 YCp50CS라고 명명하였다(Fig. 2).

효모의 형질전환 및 형질전환체의 선별

실험실용 *S. cerevisiae* 효모인 SHY3를 형질전환시킬 때에는 auxotrophic marker인 *Trp1*을 이용하여 쉽게 형질전환체를 선별할 수가 있다. 그러나 주정생산용 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 54는 어떠한 auxotrophic marker도 갖고 있지 않은 wild type의 효모이기 때문에 구리내성 유전자인 *CUP1* 유전자를 이용하였다. 먼저 54 효모의 구리이온에 대한 저항성을 알아보기 위해 여러 농도의 $CuSO_4$가 포함된 최소배지에 54 효모를 10^6 cells/m*l*의 농도로 도말시킨 후 30℃에서 배양하였다. 그 결과 0.2 mM일 때에 한 개의 colony도 자라나오지 못하는 것을 확인할 수 있었으며 이상의 결과를 토대로 54 효모의 형질전환체를 선별 할 때에는 $CuSO_4$가 0.5 mM 첨가된 배지를 이용하였다. 한편 SHY3의 경우에는 auxotrophic marker와 *CUP1* 유전자간의 선별 효과를 비교하기 위해 구리에 대한 내성을 측정해서 선별배지의 $CuSO_4$ 농도를 1.5 mM로 정하였다. 선별배지에서 1차로 선별된 colony들을 전분이 포함된 배지위에 picking을 해서 배양한 후 냉장고에서 3~4일간 방치한 결과 1차로 선별된 colony들은 거의 대부분 glucoamylase를 생

Table 2. *Efficiency of transformation by various plasmid DNAs*

Recipent strain	Plasmid DNA	Replication origin	Selection marker	No. of transformants /10 μg DNA
S. cerevisiae SHY3	pSTA1	2μ	*Trp1*	3100
S. cerevisiae SHY3	pSTA 2	2μ	*Trp1*	3300
S. cerevisiae SHY3	YCp50CS	*ARS*1	*Trp1*	850
S. cerevisiae SHY3	YCp50CS	*ARS*1	*CUP1*	10
S. cerevisiae 54	pSTA1	2μ	*CUP1*	290
S. cerevisiae 54	pSTA2	2μ	*CUP1*	310
S. cerevisiae 54	YCp50CS	*ARS*1	*CUP1*	0

Table 3. *Phenotypic stability of recombinant plasmids in yeast strains.*

Host-Yeast	Stability (%) of		
	pSTA1	pSTA2	*YCp50CS
S. cerevisiae SHY3	40	52	82
S. cerevisiae 54	61	70	—

성하여 halo를 나타내었다(Fig. 3).

표현 형질로 일단 선별한 효모들을 배양하여 DNA를 회수한 후 이를 다시 *E. coli*에 도입한 결과 많은 수의 형질전환체를 얻을 수 있었으며 여기에서 플라스미드를 회수하여 확인해 본 결과 원래의 재조합 플라스미드들이 존재하고 있는 것으로 나타났다.

형질전환 빈도는 숙주세포의 종류와 플라스미드의 종류 그리고 선별조건에 따라 차이가 있었다. SHY3의 경우 효모 2μ 플라스미드의 replication origin을 갖고 있는 pSTA1, pSTA2에 비해 YCp50CS를 이용하였을 때 선별인자를 무엇으로 하였는가에 따라 현격한 형질전환빈도의 차이를 보여주었는데 이는 우성 선별체계에서 플라스미드 벡터의 copy수에 따른 gene dosage effect가 발생했기 때문이라고 추측된다. 주정생산용 효모인 54의 경우엔 실험실용 효모인 SHY3에 비해 비교적 낮은 형질 전환 빈도를 나타내었으며 YCp50CS의 경우에는 단 1개의 형질전환체도 얻지 못 하였다. 이와 같은 결과도 앞에서 언급한 gene dosage effect에 의한 것이라고 생각된다. 즉 YCp50CS는 그 특성상 세포내에서 1 copy 정도 밖에는 존재하지 않기 때문에 숙주세포가 원래 갖고 있는 구리에 대한 내성을 보다 강화시켜주는데 필요한 충분한 양의 *CUP1*의 유전자의 산물을 만들어 내기가 어려워 지고 그 결과 형질전환체의 선별이 쉽지 않은 것이다.

재조합 플라스미드 pSTA1, pSTA2, YCp50CS의 안정성

재조합 플라스미드 pSTA1, pSTA2가 각각 도입된 형질전환체들의 표현형질로써 숙주효모내에서의 플라스미드 안정성을 조사하였다(Table 3).

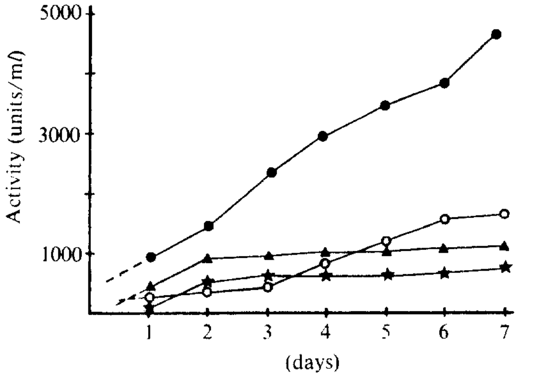

Fig. 4. *Comparison of glucoamylase activity among the transformants.*
All of the transformants showed the enzyme activity except SHY3/pSTA1 ●—●, 54/pSTA2; ○—○, 54/pSTA1; ▲—▲, SHY3/pSTA2; ★—★, SHY3/YCp50CS.

숙주효모가 SHY3인 경우, 약 20세대가 경과한 후에 플라스미드의 안정성은 pSTA1, pSTA2, 각각 40~50% 정도의 안정성을 나타냈으며, 54가 숙주효모인 경우에는 60~70% 정도의 안정성을 보여주었다. YCp50CS는 숙주효모내에서 비교적 안정하게 유지되고 있는 것으로 나타났는데 이는 벡터내에 존재하는 centromere의 특성 때문인 것으로 여겨진다(Stinchomb 등, 1982).

형질전환체의 glucoamlyase 역가

형질전환된 각각의 효모들의 glucoamylase 역가를 측정하였다(Fig. 4).

역가 측정용 배양에서는 초기의 접종량이 2%이기 때문에 정지기까지 자라기까지는 약 5 내지 6세대 정도 밖에는 세대수가 경과하지 않는다.

SHY3/pSTA1의 경우, BYPDS 배지에서 배양 7일째에도 glucoamylase 역가는 거의 나타나지 않았으며

Table 4. *Alcohol production of yeast strains*

Yeast strains	Alcohol production (% v/v) liquefied starch medium	saccharified starch medium
S. cerevisiae 54	2.8	7.8
S. cerevisiae 54/pSTA1	6.6	8.0
S. cerevisiae 54/pSTA2	7.2	8.1

54/pSTA1의 경우엔 배양 4일째 되는 날부터 측정되기 시작해서 최고 약 2000 unit/ml의 역가가 측정되었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 *Saccharomyces cerevisiae*에서 *STA* 유전자가 효과적으로 발현되지 않는 것 같으며 이는 숙주효모가 갖고 있는 *STA10*과 같은 억제유전자에 기인했다고 보여진다. 즉 원래의 *STA* 유전자 전체가 모두 삽입되어 있는 pSTA1의 경우 *Saccharomyces cerevisiae* 안에서 숙주효모가 갖고 있는 억제유전자의 조절을 받는 부위인 upstream promoter region을 갖고 있기 때문에 그 발현이 억제되어서 유전자 고유의 역가가 충분히 나타나지 못한 것 같다.

SHY3/pSTA2는 배양 5일 후 약 1000 unit/ml의 역가를 나타내었으며 54/pSTA2의 경우엔 배양 2일째부터 1500 units/ml의 역가를 나타내기 시작하여 7일이 지난 후에는 최고 4700 units/ml의 역가를 나타내었다. 이와 같이 promoter 부위의 치환에 의해서 glucoamylase 역가가 증가된 것은, 치환된 *ADHI* 유전자의 promoter가 *STA* 유전자 원래의 promoter보다 강력했기 때문이거나 조절유전자의 영향을 받는 upstream region의 치환 때문일 것이다.

SHY3/YCp50CS는 배양 3일째에 약 610 units/ml의 역가를 보였으며 그 이후에는 더 이상의 증가가 없었다. YCp50CS의 *STA* 유전자는 pSTA2의 것과 동일한 것임에도 불구하고 약 2/3 정도 밖에는 역가가 나타나지 않았는데 이는 YCp 계열의 벡터들이 세포 내에서 1 copy 정도 밖에는 존재하지 않기 때문에 효모 2 μ 플라스미드의 replication origin을 갖고 있는 pSTA2에 비해서 낮은 역가를 나타낸 것으로 보여진다. 그러나 pSTA2에 비해 copy수가 최소 10배 이상 적음에도 불구하고 약 60% 수준의 역가를 보인 것은 YCp50CS의 높은 안정성 때문일 것이다.

형질전환체에 의한 알콜 생산

형질전환된 주정효모인 54/pSTA1과 54/pSTA2의 알콜 생산 능력을 숙주효모인 54 효모와 비교 측정하였다. 54/pSTA1이나 54/pSTA2는 *Saccharomyces diastaticus*로부터 유래된 *STA* 유전자를 갖고 있기 때문에 전분을 당화시킬 수 있는 능력을 갖고 있다. 그러므로 이들 형질전환체들은 현재 주정공장에서 흔히 쓰고 있는 주정 생산용 배지인 나맥의 액화액을 다른 공정없이 어느 정도 당화시켜서 이용할 수 있을 것이다. 54와 54/pSTA1, 54/pSTA2를 각각 액화만 시킨 액(액화액)과 액화 및 당화를 시킨 액(당화액)에 접종하고 정치 배양 후 알콜 생산량을 측정하였다 (Table 4).

당화액에서는 그 속에 들어있던 전분이 이미 대부분 glucose나 혹은 효모가 이용 가능한 3당류 이하의 당성분으로 분해가 되어 있기 때문에 숙주효모와 형질전환체의 알콜생산량에 별다른 차이가 나타나지 않았다. 다만 형질전환체의 경우가 미미 하나마 더 높게 나타난 것은 당화액을 만드는 과정에서 미처 당화되지 못하고 남아있던 다당류들이 형질전환체에서 생산되는 glucoamylase에 의해 계속 분해되어 알콜로 전환되었기 때문일 것이다. 액화액에서는 형질전환된 효모들의 알콜 생산량이 현저히 높게 나타났는데, 이는 액화된 전분을 glucoamylase로 분해시켜서 효모가 이용 가능한 당의 형태로 만들어 주었기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 액화액에서 형질전환체에 의해 생성된 알콜의 양은 당화액에서 효모에 의해 생산되는 알콜의 절대량(약 8%)에는 상대적으로 미치지 못하기 때문에 이들 형질 전환체를 산업적으로 이용하기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다.

적 요

전분 분해능력을 갖는 알콜생산용 효모를 만들기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*에 glucoamylase 유전자인 *STA*를 도입하였다. 도입된 형질의 발현증대를 위해 *STA*유전자의 promoter 부위를 alcohol dehydrogenase isoenzyme I 유전자의 promoter 부위와 치환 시켜준 재조합 플라스미드를 재조하였으며 안정성을 증진시키기 위해 centromere를 보유하고 있는 운반용 플라스미드에 *STA* 유전자를 삽입하여서 또 다른 재조합 플라스미드를 제조하였다. Promoter 부위를 치환시킨 결과 glucoamylase의 발현이 증가하였으며, *STA* 유전자와 centromere를 갖고 있는 재조합 플라스미드는 여러 세대가 거듭되어도 비교적 안정하게 유지되었으나 낮은 copy 수로 인해 형질전환체의 효소 역가와 형질전환 빈도는 낮아졌다. *STA* 유전자가 도입되어 형질전환된 다배체 산업용 효모는 액화 과정만을 거친 주정생산 배지(액화액)에서 원래의 알콜 생산용 효모에 비해 훨씬 많은 양의 알콜을 생산해 내었다. 그러나 centromere를 보유하는 플라스미드에 의한 산업용 효모의 형질전환에는 실패하였다.

사 사

본 연구는 과학기술처의 특정연구 개발 과제 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. **Ahn, J.S., I.G. Hwang, M.S. Jung and T.I. Mheen,** 1987. A study on the development of industrial ethanol fermentation process (IV). Report for Ministry of Science and Technology, KAIST, Genetic Engineering Center
2. **Butt, T.R., S. Edmud, H. Jan and S.T. Crooke,** 1984. Cloning and expression of a yeast copper metallothionein gene. *Gene,* **27,** 23-33.
3. **Clarke, L. and J. Carbon,** 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosome. *Nature* **287,** 504-509.
4. **Erratt, T.A. and Nasim,** 1986. Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe. J. Bacteriol.* **166,** 484-490.
5. **Holm, C.W. Douglas, Meeks-Wagner, W.L. Fangman and D. Bostein,** 1986. A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene,* **42,** 169-173.
6. **Hopkins, R.H.,** 1958. Amylase system in culture and wild yeast. *Wallerstein Lab. Commmun.,* **21,** 309-319.
7. **Ito, H., Fukua, Y., Murata, K. and Kimura, A.,** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153,** 163-168.
8. **Kang, H.S., J.S. Park, Y.H. Song and Y.H. Lee,** 1987. Studies on the improvement of Yeast strains and Alcohol Fermentation. Report for Ministry of Science and Technology, KGERA.
9. **Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook,** 1982. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
10. **Meaden, P., K. Ogden, H. Bussey, R. Tubb,** 1985. A DEX gene confering production of extracellular-amyloglucosidase on yeast. *Gene* **34,** 325-334.
11. **Miller, G.L.,** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31,** 426-428.
12. **Perry, C. and P. Meaden,** 1987. Properties of a genetically-engineered dextrin-fermentaing strain of brewers' *J. Inst. Brew.* **94,** 64-67.
13. **Polaina, J. and M.Y. Wiggs,** 1983. STA10; A gene involved in the control of starch utilization by Saccharomyces. *Curent Genetics,* **7,** 109-112.
14. **Yamashita, I. and Fukui, S.,** 1983. Molecular cloning of a glucoamylase-producing gene in the yeast *Saccharomyces. Agric. Biol. Chem.,* **47,** 2689-2696.
15. **Yamashita, I. and Fukui, S.,** 1984. Isolation of glucoamylase-nonproducing mutants in the yeast *Saccharomyces diastaticus. Agric. Biol. Chem.* **48,** 131-135.
16. **Valenxuela, P., A Medina, W.J. Rutter,** 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* (London) **298,** 347.

(Received July 21, 1990)
(Accepted August 30, 1990)