

전분발효 효모에서의 외래 α -Amylase 유전자의 세포분열시 안정성 증진

김정희^{1,2} · 김 근^{1,*} · 최영길²

¹수원대학교 유전공학연구소 ²한양대학교 유전공학과

α -Amylase와 glucoamylase를 동시에 안정하게 분비하여 전분을 일단계로 직접 에탄올로 발효시킬 수 있는 효모 균주를 개발하기 위하여 glucoamylase를 분비하는 *Saccharomyces diastaticus* hybrid 균주에 쥐의 침샘 유래의 α -amylase cDNA 유전자를 plasmid vector를 이용하여 도입하였다. 이 균주로부터 효소생산에 필요한 유전자를 잃어버림이 없이 안정하게 분비할 수 있도록 하기 위하여 α -amylase 유전자를 효모의 염색체에 삽입시키기 위한 integrating plasmid vector인 YIpMSAR (LEU2)를 제작하였다. 이 vector의 효모형질전환에 있어 원형(circular)상태와 제한 효소 XbaI로 처리된 직선화된(linearized) 상태의 두가지 형태를 비교한 결과 형질전환 효율에서나 형질전환체내의 α -amylase 유전자 보유정도가 모두 직선화된 형태의 경우가 원형상태의 경우보다 높았다. Linearized vector를 가진 효모 형질전환체에서의 유전자 발현 안정도는 세포 분열을 거듭할수록 episomal vector에 의한 효모 형질전환체에서의 발현 안정도보다 우수하게 나타났다. 또한 이 linearized vector를 가진 형질전환체는 α -amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하여 glucoamylase만 분비하는 원균주보다 2배 이상의 전분분해력을 보였다.

KEY WORDS □ starch-fermenting yeast, heterologous α -amylase, linearized integrating plasmid vector, mitotic stability

전통적으로, 에탄올 발효에는 거의 전적으로 효모에 속하는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *S. carlsbergensis*가 사용되어 왔다. 이들 효모를 사용하여 전분으로부터 연료용 혹은 산업용 에탄올을 생산하는 방법은 다음과 같이 3단계의 과정을 거친다(19). 첫째, 박테리아의 α -amylase에 의한 전분의 용액화; 둘째, glucoamylase에 의한 용액화된 전분의 발효 될 수 있는 당으로의 전환; 셋째, 발효될 수 있는 당으로부터 효모에 의한 에탄올 생산이 그것이다. 여기에서 사용되는 전분분해에 필요한 α -amylase와 glucoamylase 등의 효소의 비용 및 당화 공정에 필요한 에너지 비용 등이 전체 에탄올 생산비의 상당한 부분을 차지하고 있어 이를 절감하기 위해 최근에는 종래의 통상적인 3단계 전분 발효 대신 1단계 전분 발효를 하기 위하여 전분 분해력이 있는 효모 균주를 탐색하고 이를 이용한 전분직접발효를 위한 시도가 있어 왔다(16, 17, 33). 그러나 *Saccharomyces* 이외의 다른 속(genus)에 속하며 amylase를 분비하는 효모들은 에탄올에 내성이 없고, 발효력이 약하여 에탄올 발효에는 적합치 않다(4).

최근의 유전자 조작 기술의 발달은 사람의 침샘(30), 쥐의 침샘(32), 쥐의 췌장(7), 밀(26), 그리고 쌀(14) 등에서 유래한 α -amylase 유전자와 *Saccharomycopsis fibuligera*(34) 그리고 *S. diastaticus*(5, 11, 21, 23) 등의 glucoamylase 유전자를 클로닝 해냈고

이것을 효모인 *S. cerevisiae*에 도입시켜 이 효모형질 전환체로부터 세포외로 분비시키는데 성공하였다. 최근에 Kim and Lee(12)는 glucoamylase를 분비하는 *S. diastaticus* 균주에 쥐의 침샘 α -amylase cDNA를 도입한 형질전환체 균주를 사용하여 5일동안 4%의 전분으로부터 93.2%의 전환율로 에탄올을 생산할 수 있었다. 그러나, 이러한 유전자 재조합법으로 만들어진 고 복제수 플라스미드 벡터에 의해 생산되는 효소는 전분 분해력에서 높은 증가치를 나타내지만 이들 신크균주들이 산업적으로 이용되는 데에는 중요한 문제점을 안고 있는데 그것은 바로 벡터가 숙주 세포 내에서의 안정성이 결여되어 있다는 것이다(8, 9, 13). 즉, 새로운 유전 형질을 도입하기 위해 사용되는 플라스미드 벡터는 안정성이 없어 시간이 경과하여 균주가 번식함에 따라 그 도입된 유전 형질과 함께 점점 분실이 되어 가는 것이다. 이러한 문제의 해결방안으로 효소 생산에 필요한 유전자를 잃어버림이 없이 안정하게 분비할 수 있도록 하기 위하여 그 유전자를 숙주의 유전자(genome)속으로 삽입시키는 방안이 제안 되어졌다(6, 8, 15).

이상과 같은 배경에서 본 연구에서는 glucoamylase를 분비하고, 에탄올 발효에 가장 적합하다고 보는 효모 *S. diastaticus* 균주(4)에 α -amylase 유전자를 도입시켜 두 효소의 공동 작용에 의해 전분으로부터 직접 에탄올을 생산할 수 있는 균주를 개발하고자

하였다. 특히, 그 작용의 안정성을 높일 수 있도록 α -amylase 유전자를 효모 염색체내에 삽입시키기 위한 integrating vector를 제작하여 이 벡터를 효모 균주 내에 도입시켜 안정한 효모 형질 전환체를 만들며, 이들 형질 전환체의 안정도를 조사하였다.

재료 및 방법

사용 효모균주 및 플라스미드

본 연구에서 사용한 효모 균주와 플라스미드는 Table 1 에 나타낸 바와 같다. 플라스미드 pMS12 (32)는 yeast expression vector로서 그 구성은 *E. coli*의 replication origin, pBR322의 β -lactamase gene, 효모의 replication origin을 포함하는 2 μ m DNA의 일부분, 효모의 alcohol-dehydrogenase I (ADHI) 유전자인 ADC1의 promoter, 쥐의 침샘의 α -amylase를 code 하는 cDNA 그리고 효모의 TRP1 유전자로 되어있으며 전체 크기는 10 Kb이다 (Fig 1). pMS12 Δ R (Fig. 2)은 pMS12를 제한 효소 SphI 으로 처리하여 생긴 1350 bp와 8650 bp의 DNA 절편 중에서 ADC1의 promoter의 조절 부위가 들어 있는 1350 bp 절편을 제거하고 다시 self-ligation시킨 플라스미드이다 (12). 여기에서 ADC1의 promoter의 조절부위는 에탄올이나 포도당에 의해 alcohol-

dehydrogenase의 발현을 억제하는 기능을 갖고 있다 (1). 또한 α -amylase를 효모의 염색체내에 삽입시킬 수 있는 integrating vector의 제작에 사용하기 위해 만들어진 pMS12 Δ R (LEU2)는 YEp13 (3)을 제한 효소 SalI (S)과 XhoI (Xh)으로 처리하여 얻어진 2.2 Kb의 LEU2 유전자를 포함하는 DNA 절편을 SalI 으로 처리된 pMS12 Δ R과 ligation 시켜서 얻었다 (Fig. 2).

배지 및 균의 배양

Plasmid 증폭을 위한 *E. coli* C600SF8의 배양에는 LB 배지 (1% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.5)를 사용하였으며 플라스미드 선별 배지에서는 항생물질로서 ampicillin (50 μ g/ml)를 첨가 하였고 배지의 고화를 위해서는 Bacto-agar를 2% 되도록 넣어 주었다.

효모균주 배양을 위한 완전 배지로서는 1% yeast extract (Difco Laboratories) (Y), 2% Difco peptone (P) 그리고 적당한 탄소원으로 제조 되었다. YPD 배지에서는 2% dextrose (D)를 첨가 하였고

Table 1. Yeast strains and plasmids.

Strain or plasmid	Relevant properties	Source or reference
Yeast (<i>Saccharomyces</i>)		
K81 ^a	a <i>leu2 trp1 ura3</i> Δ	Breitenbach, M. (Austria)
K94 ^a	a <i>leu2 trp1 ura3</i> Δ <i>STA</i> ^b	Mattoon, J. (USA)
K95 ^a	a <i>leu2 trp1 STA</i> ^b	"
K114 ^a	a <i>ade6 his2 trp1 ura3</i> Δ <i>STA</i> ^b	"
Plasmid		
pMS12	Ap ^r , ADC1 promoter, mouse α -amylase cDNA, TRP1, 2 μ ori	Thomsen, K.K. (1987)
pMS12 Δ R	pMS12 with the deleted regulatory site of ADC1 promoter	Kim, K. and Lee, J.-W. (1994)
pMS12 Δ R (LEU2)	pMS12 Δ R carrying LEU2 gene of YEp13 in the SalI site	"

^a A hybrid strain containing *STA* gene(s) derived from *S. diastaticus*. The genome is derived from both *S. cerevisiae* and *S. diastaticus*. K94 and K95 are derived from same mating parents.

^b Contains one or more *STA* gene of undefined genetic locus.

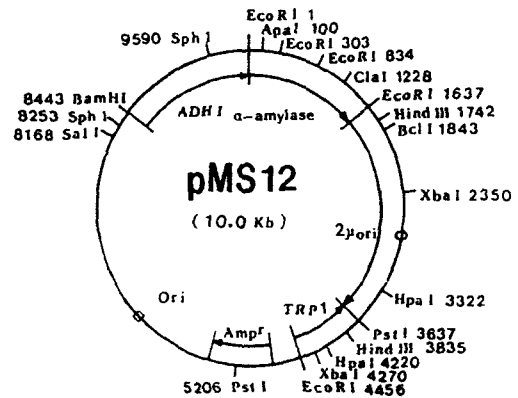


Fig. 1. Genetic and restriction map of pMS12 plasmid.

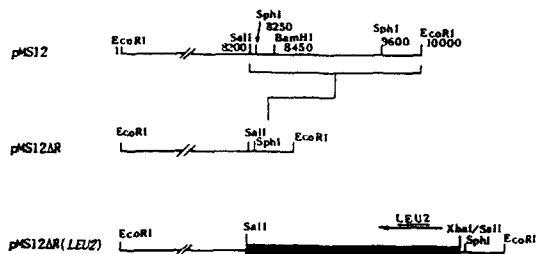


Fig. 2. Restriction maps of three different recombinant plasmids.

A 2.2 kb SalI-XhoI fragment of LEU2 gene (bold line) was transferred from YEp 13 into the unique SalI site of pMS12 Δ R, generating plasmid pMS12 Δ R (LEU2). \rightarrow , direction of transcription of the LEU2 gene.

효모 형질전환체에 의해 세포외로 분비되는 amylase의 전분분해의 결과로 colony 주위에 생기는, 환(halo)형성력을 알아보는 실험에서는 3% Lintner soluble potato starch (S) (Sigma Chemical Co.)를 첨가한 YPD1S3 (dextrose 1%, starch 3% 함유)고체 배지를 사용하였다.

형질 전환체 분리용 배지인 최소 선택 배지 (synthetic minimal medium, SD)는 0.6% Difco yeast nitrogen base without amino acids, 2% dextrose를 넣어 준 후 그 외 필요한 영양소는 농축 저장 용액으로부터 첨가하였다(31). 세포외로 분비되는 amylase활성을 측정하기 위해서는 영양요구인자 중 leucine을 제외한 선택배지에 0.1% soluble starch를 첨가한 배지인 SD1S0.1 (dextrose 1%, starch 0.1% 함유)배지를 사용하였다.

배양온도는 세균의 경우 37°C, 효모의 경우 30°C에서 행하였으며 산소 존재하에서 균체를 배양할 때는 rotary shaking incubator (Vision Scientific Co.)에서 250 rpm 속도로 배양하였다.

균체량 측정

효모 균주의 건조균체량은 분광광도계 (Hitachi U-1100 spectrophotometer)를 사용하여 A_{570} 의 값이 0.05~0.30이 되도록 희석하여 흡광도를 측정하고 흡광도에 희석배수와 conversion factor를 곱하여 얻어졌다(16).

유전자 조작 및 전기 영동

유전자 조작과 *E. coli*로부터의 플라스미드 추출에 관련된 모든 절차들은 Sambrook *et al.* (29)에 기술된 방법들에 의하였다. 유전자 조작에 필요한 DNA 절편은 electroeluter (IBI) 혹은 Gene clean kit (BIO 101)를 사용하여 분리 정제 하였다.

형질 전환법

*E. coli*의 형질 전환은 calcium chloride법(18)을 이용하였으며, 효모의 경우에는 alkali cation법(10)에 근거 하였는데 여기서 사용된 금속 이온에 따라 0.1 M lithium acetate법, 0.2 M lithium chloride법을 각각 비교 실험하였다. 여기서 0.1 M lithium acetate법의 경우 40% PEG (MW 4000), 0.2 M lithium chloride법의 경우 75% PEG를 각각 사용하였다.

사용한 모든 효모균주들은 tryptophan의 합성에 관여하는 *TRP1* 유전자가 작동하지 않는 돌연변이체로서 tryptophan이 없는 선택배지에서 분리되었다. 그리고 *TRP1* marker를 획득하여 분리되어진 형질 전환체의 α -amylase 유전자의 발현여부를 확인하기 위하여서는 YPD1S3 고체배지에서 배양한 다음 4°C에서 보관하였을 때 전분 분해의 결과로 생기는 colony주위의 clear zone인 환(halo)의 형성 여부를 관찰하였다(16, 24).

효모의 성장곡선 및 평균 세대시간 (g)

SD 고체 배지에서 2일 동안 배양한 각 효모 균주 1/2 loop 만큼의 세포를 10 ml/ SD broth 에서 다시

2일동안 배양한 후 0.1 ml/ (105 cells/ml)을 100 ml/ YPD broth에 접종하여 30°C, 250 rpm으로 진탕 배양기에서 배양하면서 그 세포 수를 두 시간마다 haemocytometer를 사용하여 계수하였다.

계수시에는 methylene blue로 염색되지 않는 생 세포의 수 (22)만을 계수하였다.

형질전환체 안정도 측정

각 효모 형질전환체의 세포들을 SD 고체 배지에서 2일동안 활성화시킨 후 1/2 loop만큼의 세포를 다시 10 ml/ SD broth에 접종, 2일동안 배양한 후 0.1 ml/ (10^5 cells/ml)를 100 ml/ YPD broth에 접종하였다.

효모 세포분열이 10세대 (generation)만큼 분열한 후, 즉 2^{10} 혹은 1.024배의 세포 (10^6 cells/ml)가 되었을 때 0.1 ml/을 취해 새로운 100 ml/ YPD broth에 재 접종하였다. 그리고 다시 10세대 분열이 될 때까지 배양시켰다. 이 과정을 50세대 동안의 세포분열을 할 때까지 반복하였다. 그리고 매 10세대마다 그 배양액을 채취하여 적당한 배수를 멸균증류수로 희석한 다음 그 희석액 0.1 ml/를 leucine이 함유된 SD 고체 배지 (nonselective)에 도말하여 한 plate당 200~300 개의 colony가 증식되도록 하였다. 이들 plate를 삼 일에서 사일동안 배양하여 colony가 나타나면 이것을 master plate로 하여 velvet cloth를 사용하여 leucine무함유 SD고체배지 (selective)와 전분함유배지 YPD1S3 (non selective)에 replica plating하였다. 이 replica plate를 3~4일 배양한 후 나타난 colony수를 세어, 아래식에 의하여 매 10세대 세포 분열 후의 효모 형질전환체의 안정도를 산출하였다.

$LEU2$ 유전자 보유율 (%) = (colony number on SD agar plate) ÷ (colony number on YPD1S3 agar plate) × 100

α -Amylase 유전자 보유율 (%) = (colony number showing halo on YPD1S3 agar plate) ÷ (total colony number on YPD1S3 agar plate) × 100

탄수화물 정량

환원당의 측정은 Bernfeld (2)의 방법을 이용하였다. 발효액 내의 잔여 전분의 존재유무는 starch-iodine 반응 (13)에 의하여 측정하였는데, 원심분리된 배양액의 1/10 부피의 0.4% iodine-2% KI를 발효액과 섞었을때 purple color가 관찰되는 것을 잔여 전분이 존재하는 것으로 나타내었다.

Amylase 활성 측정

효소 활성 측정은 YPD 배지에서 3일간 배양한 세포배양액의 원심분리된 상등액을 취해 세포외로 분비된 amylase활성을 측정하였다. 반응혼합물은 0.1 ml/ 배양상등액, 0.4 ml/의 증류수 그리고 0.5 ml/의 1% 호화된 Lintner potato starch 용액으로 구성하였다. 혼합물은 37°C에서 30분동안 반응시킨 후, 1 ml/의 3, 5-dinitrosalicylic acid시약을 첨가하고 이 혼합액을 넣은 시험관을 끓는 물속에 5분간 담구어 발색시켰다 (2). 여기에 10 ml/의 증류수를 첨가한 뒤 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 반응시간 동안 유리된 환원

당량을 측정하였다. 환원당 측정의 control로서는 동일 혼합내용물의 37°C, 30분 반응시키지 않은 상태의 것을 사용하였다. 효소 활성 1 unit는 1 ml의 세포배양액 내에서 1분간 1 mole의 환원당을 전분으로부터 방출시키는 효소의 양으로 정의하였다.

또, 효모 형질전환체로부터 세포외로 분비되는 amylase에 의한 전분 분해력을 고체배지상에서 조사하기 위하여 YPD1S3 고체배지에 접종한 균을 2일간 배양시키고 난뒤 다시 2일간 4°C에서 냉장시켰다. 세포외로 amylase가 분비되어 전분을 분해시켰을 경우 colony주위에는 맑고 투명한 환이 형성되게 된다.

결과 및 고찰

Integrating vector[YipMS Δ R (LEU2)]의 제작

Integrating vector YipMS Δ R (LEU2)의 기본구조는 발현 조절 부위를 제거한 ADC1 프로모터, 취의 침샘의 α -amylase 유전자, TRP1 유전자, 분리선택표지로서 LEU2 그리고 E. coli에서 대량 증폭할 수 있도록 하는 pBR322 염기 배열로 구성되어 있으면서 2 μ m DNA 부분은 제거되었다. 이 integrating vector는, 스스로 세포내에서 복제할 수 있게 하는 autonomously replicating sequence를 포함하지 않고 있어, homologous recombination에 의하여 염색체의 동형 염기배열부위에 삽입되어 진다(20).

이 integrating vector의 제작과정은 Fig. 3에 나타내었다. 즉 pMS12 Δ R (LEU2)를 HindIII로 처리하여 생긴 8.8 Kb의 DNA를 self-ligation하여 얻어진 plasmid를 YipMS Δ R (LEU2)로 명명하였는데, 이 plasmid의 TRP1 유전자는 원래 pMS12 Δ R (LEU2)에 존재하던 819 bp의 DNA 절편 중에서 끝부분 200 bp가 잘려져 나간 상태이며, 이 YipMS Δ R (LEU2)는 효모 염색체내의 동형 염기 배열부위인 LEU2 혹은 TRP1 부위에 삽입될 수 있다(20).

이 원형(circular) 상태의 YipMS Δ R (LEU2)를 vector내 제한효소 인식부위가 하나뿐인 XbaI 제한효소로 절단하여 직선화된(linearized) 형태의 YipMS Δ R (LEU2)로 제작하였는데, 이 plasmid DNA의 양말단은 highly recombinogenic한 부위로서, 형질전환시 효모 genome의 동형 염기부위에 쉽게 α -amylase 유전자를 삽입시키기 위한 것이다(25).

Integrative transformation

일반적으로 Yip 벡터를 이용한 숙주세포내의 염색체에 벡터를 삽입시키는 integrative transformation이 일어날 확률은, 세포질내에서 스스로 복제하여 존재하는 YEp 벡터에 의한 형질전환이 일어날 확률보다 훨씬 적다(8, 27). 그러나 염색체 내에 삽입된 유전자의 안정성은 episomal plasmid vector (YEp)보다 매우 높은 것으로 알려져 있다(8, 15, 27). 따라서 본 연구 목적의 하나인 외부 유전자의 염색체내로의 삽입을 위해서, "재료 및 방법"에서 언급한

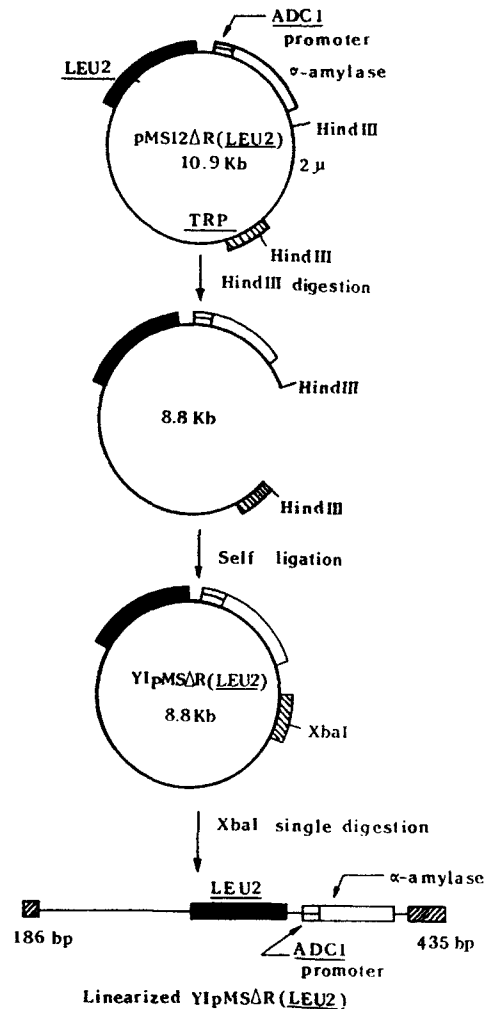


Fig. 3. Construction of YipMS Δ R (LEU2) and linearized YipMS Δ R (LEU2).

lithium acetate로 처리하거나 lithium chloride로 처리하는 형질전환 방법(10)을 비교하여 형질전환 효율이 높은 방법을 선택하여 integrative transformation이 일어날 확률을 높이고자 하였다. 그 결과 integrating plasmid나 episomal plasmid에서나 모두 lithium acetate방법이 lithium chloride방법보다 형질전환 효율이 2~3배 높았으므로 (data not shown), 나머지 효모형질전환 실험은 lithium acetate 방법을 사용하여 수행하였다.

α -Amylase 유전자를 효모의 염색체에 삽입시켜, 안정하게 α -amylase를 분비하는 효모의 형질전환체를 구성하기 위해서, 두가지 형태의 YipMS Δ R (LEU2)를 사용하였는데, 이는 원형(circular) 상태의 것과 직선화된(linearized) 형태의 것으로 되어 있다(Fig.

Table 2. Transformation efficiency (T.E.) of yeast using different forms of YipMS Δ R (LEU2) and the expression rate of α -amylase gene by the cells of the transformants.

Strain	Vector form	T.E. ^a (No./ μ g DNA)	α -Amylase gene expression rate (%) ^b
K81	Circular	14	ND ^c
	Linearized	24	ND
K94	Circular	5	32.5
	Linearized	205	97.7

^aThe amount of vector DNA used for each transformation was estimated as 10 μ g.

^bEach transformant was transferred to YPD1S3 agar plate and the numbers of halo-forming colonies were counted. Forty and 306 transformants were examined for circular and linearized forms, respectively.

^cNot determined.

3).

Homologous recombination에 의해 염색체 내에 외래 유전자를 삽입시키기 위해서는 효모의 염색체 내의 일부분과 같은 동형의 DNA sequence가 플라스미드 벡터에도 존재하여야 하는데, 이 원형 YipMS Δ R (LEU2)의 경우는 LEU2 혹은 TRP1 유전자들이 동형부분이 되어 벡터가 삽입된다 (20). 직선화된 Yip의 경우는 TRP1 부분에 벡터가 삽입하게 된다 (20, 25). 이들 두가지 형태의 integrating vector들을 K81과 K94 균주에 도입시키고 그의 형질전환효율 (transformation efficiency)을 조사하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

효모 K81과 K94에 형질전환을 시킨 결과 직선화된 형태 벡터의 경우가 원형 상태의 경우보다 더 높은 형질전환효율 (T.E.)을 나타내었다. 이들 형질전환체들의 α -amylase 유전자의 발현여부를 보기 위해 YPD1S3 고체 배지에서 전분의 분해됨을 나타내는 환 (halo)형성여부 실험에서는 K94균주의 경우에 원형 상태의 경우 무작위적으로 40개의 colony를 실험해본 결과 13개의 colony에서 환이 형성되어 32.5%의 α -amylase 발현성을 보였고 직선화된 형태의 경우 306 colony에서 299 colony의 환이 형성되어 97.7%의 발현성을 보였다.

이것은 형질전환효율 (T.E.)의 수치와 α -amylase 유전자 보유율 모두에 있어 직선화된 상태에서 원형 상태의 경우보다 높음을 보여주고 있다. 이 결과는 직선형 벡터 DNA의 양 말단은 highly recombinogenic하여 높은 형질전환효율을 나타낸다는 보고 (20)와 일치하고 있다. 특히 직선화된 vector를 사용하여 효모의 염색체내의 동형부분 즉, 염색체내의 TRP1 유전자내에 homologous recombination으로 외부 유전자를 삽입시킬때 보통 300 bp 이상의 homologous DNA 단편이 요구되는데 (25) 여기에서의 직선화된 YipMS Δ R (LEU2) 경우 한쪽 끝 TRP1 유전자 단편의

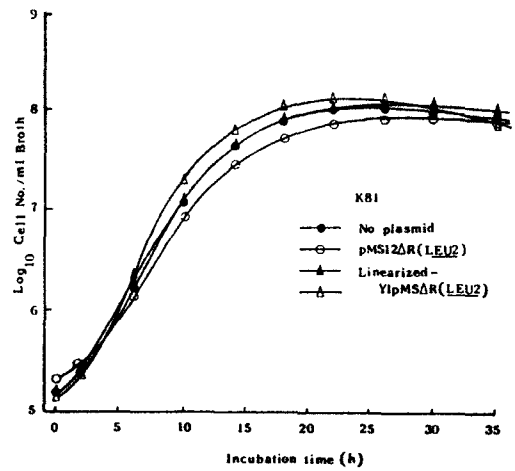


Fig. 4. Growth of yeast strain K81 and its transformant in YPD broth as a function of time of incubation at 30°C in a rotary shaker.

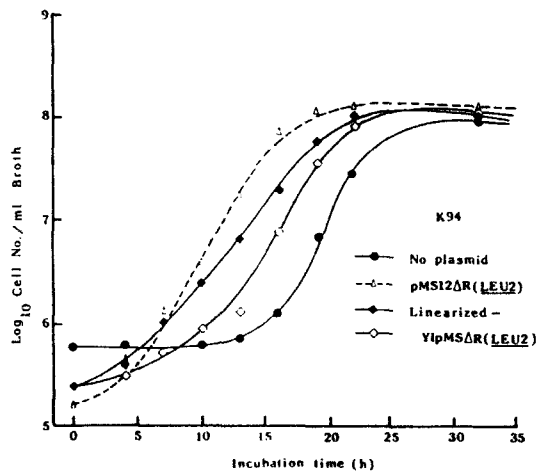


Fig. 5. Growth of yeast strain K94 and its transformant in YPD broth as a function of time of incubation at 30°C in a rotary shaker.

크기가 186 bp이었는데도 효모 염색체 내로 삽입이 가능하였다는 점은 주시할 만한 사실이다.

K94 균주의 경우 α -amylase 유전자 발현율을 구한 YPD1S3 고체배지에서의 전분의 분해됨으로 나타나는 환 형성능 실험에서 사용된 균주 clone 중 α -amylase 유전자의 발현이 확인된 clone들 가운데서도 형성된 환의 크기에 있어 다양한 차이를 나타내었다. 이 가운데서 환의 크기가 큰, 그 발현성이 두드러진 균주를 선별하였는데 원형 vector를 사용한 형질전환체의 경우 clone 3, 직선형 vector를 사용한 형질전환체의 경우 clone 1, 194, 260, 그리고 264균주의 발현성이 두드러졌다. 선별된 이들 균주는 전분분해

Table 3. The average generation time in logarithmic phase of growth of various yeast strains and their transformants.

Yeast strain	Vector	Average generation time (min)
K81	None	81.3
	pMS12ΔR (<i>LEU2</i>) ^a	80.5
	YIpMSΔR (<i>LEU2</i>)1 ^b	98.5
	" 2	90.5
K94	None	84.5
	pMS12ΔR (<i>LEU2</i>) ^a	94.7
	YIpMSΔR (<i>LEU2</i>)1 ^b	107.9
	" 2	94.7

^a Episomal.

^b Integrating and linearized.

능이 우수하다고 판단되며, α-amylase의 발현성이 안정하게 계속 유지되는지를 알아보기 위해 그 안정도를 조사하고자 하였다.

생장곡선

효모 형질전환체의 플라스미드 보유 안정도를 조사하기 전에 먼저, 여러 효모 균주들과 각각의 형질전환체의 시간에 따른 생장의 변화를 조사하였고 그 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. K81 균주의 경우 대수증식기는 4시간에서 12시간 사이였고, 그 형질전환체와 형질전환되지 않은 원균주(untransformed strain)와의 생장곡선에 있어 큰 차이가 없었다. K94 균주의 경우는 대수증식기의 시작에 이르는 시간은, 빠른 순으로 하여 pMS12ΔR (*LEU2*), 직선화된 YIpMSΔR (*LEU2*) 형질전환체 그리고, 원균주의 순으로 나타났다.

이 생장 곡선들은 효모형질전환체의 플라스미드 보유 안정도를 조사하기 위한 기초자료로 만들어 졌는데, 세포증식이 10세대 동안 분열하는 데 걸리는 시간은 K81 균주의 형질전환체의 경우 약 20시간 그리고 K94 균주의 형질전환체의 경우도 약 20시간 정도 걸리는 것으로 판명되었다.

각 효모균주와 그 형질전환체들의 대수 증식기에서의 평균세대시간을 생장곡선에 근거하여 산출한 결과를 Table 3에 나타내었는데, 원균주의 평균 세대시간에 비해 episomal plasmid나 integrative linearized vector를 가진 형질전환체들의 평균 세대시간이 조금씩 길어지는 경향을 보이고 있다. 이것은 외래유전자를 포함하는 효모균주의 경우 이 외래 유전자의 발현과 분비작용을 위하여 세포의 에너지와 대사물이 소모되므로 원균주의 경우보다 세포분열속도가 늦어지는 것으로 보인다.

α-Amylase 분비능의 안정도

본 연구의 목적인 α-amylase의 분비능이 안정한 효모 균주의 제작을 위해, 그 유전자를 직선화된 vector를 이용하여 homologous recombination방법(20)으로 효모의 염색체에 삽입 시켰는데, 이렇게 형질

Table 4. Mitotic stability of yeast K81 transformants harboring episomal or integrating vector after ten generations of multiplication in nonselective condition.

Vector	Mitotic stability (%)	
	<i>LEU2</i> gene	α-amylase gene ^a
Episomal ^b	92.7	93.2
Integrating ^c	100.0	99.0

^a The halo-forming ability of each transformant was expressed as the presence of α-amylase gene in the cell of the transformant.

^b pMS12ΔR (*LEU2*).

^c Linearized YIpMSΔR (*LEU2*).

Table 5. Mitotic stability of yeast K94 transformant harboring episomal or integrating vector after various numbers of generation (g) of multiplication in nonselective condition.

Vector	Clone number	Mitotic stability					
		<i>LEU2</i> gene			α-amylase ^a		
		10 (g)	30	50	10 (g)	30	50
Episomal ^b	25	75	28	1.4	71	26	0.7
Integrating ^c	1	97	84	83	96	82	32
	194	100	100	100	83	49	8
	260	100	100	100	97	79	55
	264	100	100	100	100	100	99

^a The halo-forming ability of each transformant was expressed as the presence of α-amylase gene in the cell of the transformant.

^b pMS12ΔR (*LEU2*).

^c Linearized YIpMSΔR (*LEU2*).

전환된 균주로부터 α-amylase가 안정되게 오래도록 분비 되는지를 알아 보기 위하여 효모 K81과 K94의 형질 전환체의 세포분열에 따른 안정도를 조사하여 그 결과를 Table 4과 Table 5에 각각 나타내었다. K81 형질 전환체의 경우는 무작위적으로 한 균주를 선택하여 10세대까지 조사하였고, K94 형질 전환체의 경우는 환 형성 능력이 우수한 것으로 나타난 균주를 대상으로 50세대까지를 조사하였다. 각 효모 형질 전환체의 플라스미드 보유 안정도는 선택 배지에서의 *LEU2* 유전자 발현 여부와 전분 함유 배지에서의 α-amylase 발현에 따른 환 형성 여부의 경우로 나누어 조사 하였다. Table 4에서 보듯이 10세대까지의 조사에서 나타난 결과는 *LEU2* 유전자 발현 안정성, α-amylase 유전자 발현 안정성의 정도가 episomal vector와 integrating vector에서 비슷하게 나타나고 있다. 그러나 episomal vector와 integrating vector의 유전자 보유 안정성을 비교하여 보면 integrating vector쪽의 안정성이 *LEU2* 유전자와 α-amylase 유

Table 6. Amylolytic activities of transformed and untransformed yeast K94 strains.

Condition	Plasmid	Clone no.	Amylolytic activity (U/ml)
Untransformed ^a	None		0.063
Transformed	Circular ^b	3	0.140
	Linearized ^b	194	0.085
	Linearized ^b	264	0.143

^a The untransformed K94 strain secretes glucoamylase.

^b YIpMS Δ R (LEU2)

전자 모두에 있어서 6~7% 더 높게 유지되는 것으로 나타났다.

Table 5의 결과에서는 이 현상이 더욱 뚜렷이 나타나는데 세대를 거듭 할수록 episomal vector의 안정성에 비해 integrating vector의 안정성이 월등히 우수함을 알 수 있다. 그런데 같은 integrating vector쪽이라 하더라도 clone마다 그 안정성의 정도가 서로 차이가 있음을 보였다. 이 가운데 특히 두드러진 것은 clone 264의 경우인데 이 균주는 50세대 정도가 지난후에라도 플라스미드를 잃어버림이 없이 아주 안정하게 그 형질을 발현하고 있다는 사실이다. 또, K94 균주의 integrative transformation의 경우 LEU 2 유전자와 α -amylase 유전자의 안정성의 정도가 서로 다른 것도 특이할만한 사실이다. 즉 integrating vector의 경우 LEU2 유전자는 그 안정성을 계속 유지하고 있는데 반해 α -amylase 유전자 발현율은 4 clone중 3 clone의 경우 시간이 지날수록 감소하는 경향을 보이고 있다. 효모 염색체내에 삽입된 외래 유전자가 세대가 거듭될수록 유실되어져 버리는 현상은 homologous recombination의 역반응으로 삽입된 plasmid전체가 유실되는 것으로 설명할 수 있다 (8). 그러나 본 실험에서의 결과에서와 같이 삽입된 plasmid의 일부인 LEU 유전자의 잃어버림이 없이 α -amylase 유전자만이 유실되는 이유는 현재로서는 명확히 설명할 수가 없다. 다만 효모는 자신의 증식에 필수적인 LEU2 유전자는 계속 보유하고 증식에 필수적이 아닌 α -amylase는 잃어 버리는 경향이 있지 않나 생각된다. 결국 integrating vector의 사용이 episomal vector보다 α -amylase 보유에 있어 훨씬 효과적이거나 그 integrated transformant들 중에서도 안정성에 있어 차이를 보이므로 다시 이들 transformant 중에서 안정성이 높은 clone을 선택할 필요가 있는 것이다.

Sakai and Yamamoto (28)은 원형의 YIp vector를 10세대 후의 효모 증식 다음에 조사하였는데 그 안정도는 67%이었음을 비교하여 볼 때, 본 연구에서 제작한 효모 균주의 안정도가 같은 세대 만큼의 분열에서 비교해 훨씬 높은 것은 직선화된 vector를 사용하여 효모의 염색체내에 삽입시키는 형질 전환법이 매우 안정성이 높은 것임을 보여 주는 것이다.

효모형질 전환체의 전분 분해력 (amylolytic activity)

K94 균주의 integrating vector의 도입에 의해 형질전환된 균주와 원균주와의 전분 분해력을 측정하고 그 결과를 Table 6에 나타내었다. K94 원균주의 경우 glucoamylase만이 분비되기 때문에 그 전분 분해력은 아주 미미한데 비하여, α -amylase가 glucoamylase와 공동작용하고있는 integrating vector에 의해 형질전환된 균주에서의 전분 분해력은 훨씬 높게 나타나고 있다. 그러나 같은 linearized integrating vector의 경우라 하더라도 서로 다른 clone에서는 다른 전분 분해력을 보이고 있다. 즉 clone 264는 clone 194보다 훨씬 높은 α -amylase 유전자 보유도를 나타내어 (Table 5) 그 전분분해력에 있어서도 clone 264가 clone 194보다 높게 나타났다(Table 6).

감사의 말씀

pMS12 plasmid를 제공해주신 Karl K. Thomsen 박사에게 감사드립니다. 본연구는 대한민국 상공자원부의 대체에너지 개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Beier, D.R. and E.T. Young, 1982. Characterization of a regulatory region upstream of the *ADR2* locus of *S. cerevisiae*. *Nature* 300, 724-727.
2. Bernfeld, P., 1955. Amylases. α and β . *Methods Enzymol.* 1, 149-158.
3. Broach, J.R., J.N. Strathern, and J.B. Hicks, 1979. Transformation in yeast: Development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN1* gene. *Gene* 8, 121-133.
4. De Mot, R., K. Van Dijkck, A. Donkers, and H. Verachfert, 1985. Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentations of starch material with amylolytic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 222-226.
5. Erratt, J.A. and A. Nasim, 1986. Allelism within the *DEX* and *STA* genes families in *Saccharomyces diastaticus*. *Mol. Gen. Genet.* 202, 255-256.
6. Fahnestock, S.R., C.W. Saunders, M.S. Guyer, S. Lofdahl, B. Guss, M. Uhlen, and M. Lindberg, 1986. Expression of the staphylococcal protein A gene in *Bacillus subtilis* by integration of the intact gene into the *B. subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.* 165, 1011-1014.
7. Filho, S.A., E.V. Galembeck, J.B. Faria, and A.C. S. Franscino, 1986. Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Bio/Technology* 4, 311-315.
8. Fujii, T., K. Kondo, F. Shimizu, H. Sone, J. Tanaka, and T. Inoue, 1990. Application of a ribosomal DNA integration vector in the construction of a brewer's yeast having α -

- acetolactate de-carboxylase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 997-1003.
9. Harington, A., T.G. Watson, M.E. Louw, J.E. Rodel, and J.A. Thomsen, 1988. Stability during fermentation of a recombinant α -amylase plasmid in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 521-527.
 10. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura, 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
 11. Kim, K., G. Bajszar, S.Y. Lee, F. Knudsen, and J.R. Mattoon, 1994. Cloning of a new allelic variant of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase gene and its introduction into industrial yeasts. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **44**, 161-185.
 12. Kim, K. and J-W. Lee, 1994. Construction of a transformed yeast strain secreting both α -amylase and glucoamylase for direct starch-fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 7-12.
 13. Kim, K., C.S. Park, and J.R. Mattoon, 1988. High-efficiency, one-step starch utilization by transformed *Saccharomyces* cells which secrete both yeast glucoamylase and mouse α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 966-971.
 14. Kumagai, M., G.G. Sverlow, G. della-Cioppa, and L.K. Grill, 1993. Conversion of starch to ethanol in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing rice α -amylase from a novel *Pichia pastoris* alcohol oxidase promoter. *Bio/Technology*. **11**, 606-610.
 15. Laan, J., G. Gerritse, L. Mulleners, R. Hoek, and W. Quax, 1991. Cloning, characterization, and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 901-909.
 16. Laluce, C. and J.R. Mattoon, 1984. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 17-25.
 17. Laluce, C., M.C. Bertolini, J.R. Ernandes, A.V. Martini, and A. Martini, 1988. New amylolytic yeast strains for starch and dextrin fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2447-2451.
 18. Mandel, M. and A. Higa, 1970. Calcium dependant bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 153.
 19. Murtagh, J., 1986. Fuel ethanol production-the US experience. *Process Biochem.* **4**, 61-65.
 20. Orr-Weaver, T.L., 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.
 21. Pardo J.M., J. Polaina, and A. Jimenez, 1986. Cloning of the *STA2* and *SGA* genes encoding glucoamylase in yeast and regulation of their expression by the *STA10* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **14**, 4701-4718.
 22. Pierce, J.S., 1988. Analysis committee: Measurement of yeast viability. *J. Inst. Brew.* **76**, 442-443.
 23. Pretorius, I.S., T. Chow, and J. Marmur, 1986. Identification and physical characterization of yeast glucoamylase structural gene. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 29-35.
 24. Pretorius, I.S., E. Laing, G.H.J. Pretorius, and J. Marmur, 1988. Expression of a *Bacillus* α -amylase gene in yeast. *Curr. Genet.* **14**, 1-8.
 25. Rothstein, R.J., 1983. One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202-211.
 26. Rothstein, S.C., M. Lazarus, W.E. Smith, D.C. Baulcombe, and A.A. Gatenby, 1984. Secretion of wheat α -amylase expressed in yeast. *Nature (London)* **308**, 662-665.
 27. Rothstein, R., 1986. Cloning in yeast, p. 45-46. In D.M. Glover (ed.), DNA cloning vol II: A practical approach. IRI Press. Oxford.
 28. Sakai, K. and M. Yamamoto, 1986. Transformation of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*, using an antibiotic resistance marker. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1177-1182.
 29. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
 30. Sata T., S. Tsunasawa, Y. Nakamura, M. Emi, F. Saklyama, and K. Mastubara, 1986. Expression of the human salivary protein. *Gene* **50**, 247-257.
 31. Sherman, F., G. Fink, and J.B. Hicks, 1986. Methods in yeast genetics: Laboratory course manual. Cold spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
 32. Thomsen, K.K., 1987. Production of α -amylase by yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* **5**, 205-215.
 33. Wilson, J.J., G.G. Khachatourians, and W.M. Ingledew, 1982. *Schwanniomyces*: SCP and ethanol from starch. *Biotechnol. Lett.* **4**, 333-338.
 34. Yamashita, I., T. Maemura, T. Hitano, and S. Fukui, 1985. Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* **161**, 574-582.

(Received May 10, 1994)

(Accepted June 17, 1994)

ABSTRACT: Mitotic Stability of Heterologous α -Amylase Gene in Starch-Fermenting Yeast

Kim, Jung-hee^{1,2}, Keun Kim¹, and Yong-Keel Choi² (¹Center for Genetic Engineering Research, The University of Suwon, Suwon 445-743, and ²Department of Genetic Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

To develop a yeast strain which stably secretes both α -amylase and glucoamylase and therefore is able to convert starch directly to ethanol, a mouse salivary α -amylase cDNA gene with a yeast alcohol dehydrogenase I promoter has been introduced into the cell of a *Saccharomyces diastaticus* hybrid strain secreting only glucoamylase. To secrete both enzymes more stably without loss of the α -amylase gene during a cell-multiplication, an integrating plasmid vector containing α -amylase gene was constructed and introduced into the yeast cell. The results showed that the linearized form of the integrating vector was superior in the transformation efficiency and the rate of the expression of the α -amylase gene than the circular type of the vector. The yeast transformant having a linearized plasmid vector exhibited higher mitotic stability than the yeast transformant harbouring episomal plasmid vector. The transformant containing the linearized vector producing both α -amylase and glucoamylase exhibited 2~3 times more amylolytic activity than the original untransformed strain secreting only glucoamylase.