

Glucoamylase 생성효모의 분리와 효소학적 특성

박소영 · 최순영 · 민경희*

숙명여자대학교 생명과학과

Isolation of Glucoamylase Producing Yeasts and its Enzymatic Characteristics

So Young Park, Soon Young Choi and Kyung Hee Min*

Department of Biology, Research Center for Environmental Sciences, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

ABSTRACT: Ethanol is considered as one of the most suitable substitutes for the petroleum, since it offers attractive functional features at an economical cost. Glucoamylase producing yeasts were isolated and characterized. Based on the morphological character, carbon fermentations, assimilation of carbon and nitrate, growth on vitamin-free medium, and urease activity, five isolates of *Saccharomyces diastaticus*, two isolates of *Saccharomycopsis fibuligera*, and two of *Schwanniomyces occidentalis*, and each isolate of *Ambrosiozyma monospora* and *Lipomyces kononenkoae* were identified. Among 12 isolates, one of the *S. diastaticus*, E3 showed the highest activity of glucoamylase and identified as *Saccharomyces diastaticus*. The hydrolysis of starch by the E3 strain showed the release of considerable amount of reducing sugar, along with the reduction in iodine staining capacity. The product of action of glucoamylase, glucose was determined by thin-layer chromatography. The enzyme activity was found to be stable in broad pH range of 5.0~7.0 with optimal activity at pH 5.0~6.0. The enzyme showed optimal activity at 50°C~60°C. Soluble starch and glucose were better carbon sources for the enzyme production than xylose and glycerol. Na⁺ and Mg²⁺ increased the glucoamylase activity, however Hg²⁺ and Ag²⁺ inhibited the activity. Soluble starch was the best substrate for the enzyme activity.

KEYWORDS: Glucoamylase-producing yeast, Identification of yeast, Enzyme activity

인류 문명의 발달과정에서 에너지원과 화학공업 원료로서 지대한 공헌을 하여온 석탄, 석유등의 화석자원은 점차 고갈되어 가고있으므로 대체 액체 연료의 개발에 대한 연구가 점차 중요한 위치로 재평가되고 있다. 특히 우리나라와 같은 비산유국은 경제, 안보적인 차원에서 자체공급이 가능한 동력자원의 확보가 절실히 요구되고 있다.

이러한 대책의 일환으로 biomass중 전분질 원료로부터의 에탄올 생산은 대체 에너지원 및 화학 공업 원료 물질 생산이라는 관점에서 기능적으로나(Kosaric and Steward, 1980), 경제적인 면으로나(Brandt, 1981) 석유를 대체하는 수송용 에너지로서 가장 적합한 연료라 할 수 있어 활발하게 연구되고 있다(Lewis, 1984). 브라질에서는 대체연료로서 에탄올을 자동차 연료로 사용하여 그 실용성이 높이 평가되고 있다.

실질적으로 에탄올은 오랫동안 음료용으로 사용되어 왔기 때문에 그 제조공법은 이미 잘 개발되어 왔으나, 대체 에너지로서의 에탄올을 생산하기 위해서는 우수균주의 개발, 발효조건의 최적화, 새로운 효율적인 발효 공정과 에탄올 정제 기술의 개발 그리고 더욱 값싼 발효기질의 공급등을 통해 더욱 경제적으로 대량생산하는 기술의 개발이 필수적이다. 에탄올 생산에 있어서는 생산비의 50~70%를 차지하

는 발효기질의 선택이 특히 중요하여 사탕작물, 식물섬유소, 그리고 전분등이 중요한 기질들로 꼽히고 있다(Faust *et al.*, 1983). 이중 사탕작물은 우리나라와 같은 온대지방에서는 재배되지 않고, 사탕작물에서 에탄올을 생산하는 데는 에너지의 수지면에서 개선되어야 할 문제점들이 있다. 이와는 달리, 전분은 곡물, 식물의 뿌리 저장물로서, 그 재배에 있어 기후에 영향을 받지 않고, 발효당으로의 전환이 식물 섬유소에 비해 훨씬 용이하다는 장점을 가지고 있다.

전분으로부터 연료용 에탄올을 생산하는 공정은 α -amylase에 의한 전분의 액화, glucoamylase에 의한 액화된 전분의 당화, 그리고 당화된 기질의 효모에 의한 에탄올 발효 생산등의 3단계 과정을 거친다(Kim *et al.*, 1988). 이는 전통적으로 에탄올 발효에 사용되는 효모가 전분 분해력이 없기 때문인데, 전분 분해에 필요한 α -amylase와 glucoamylase 등의 효소비용과 그 공정비는 전체 에탄올 생산비의 상당부분을 차지하고 있다. 전분분해에 필요한 비용을 절감하기 위해 amylolytic yeast들을 분리동정하고 이를 개발하여 왔다(Park *et al.*, 1983; Searle and Tubb, 1981a; Takahashi, 1966). 이들 대부분이 에탄올에 내성이 약하고 당의 발효력이 약하며, 부분적으로만 발효가 되어, 에탄올 생산에는 적합하지 않다고 보고되었다(De Mot and Verachtert, 1985).

이와는 달리 amylolytic yeast에 속하는 *Saccharomyces diastaticus*(Calleja *et al.*, 1987)는 에탄올에 대한 내성이 비

*Corresponding author

교적 높은편이며, 발효속도가 빠른 장점이 있다(De Mot and Verachert, 1985; Lauce and Mattoon, 1984). 아울러 *Saccharomyces diastaticus*는 에탄올 발효의 3단계를 축소 생략하여 전분으로부터 직접 발효에 의해 에탄올을 생산할 수 있는 전분분해 효소인 glucoamylase(E. C. 3. 2. 1. 3)을 분비하는 장점이 있다(Ashikari *et al.*, 1986; Mattoon and Kim, 1987; McCann and Barnett, 1986; Searle and Tubb, 1981b). Glucoamylase의 작용은 전분이나 글리코겐과 같은 다당류의 비환원 말단으로부터 연속적으로 반응하여 glucose를 생성하고, *S. diastaticus*의 경우 amylopectin의 α -1, 6 linkage를 분해하는 debranching enzyme을 생산한다고 알려져 있다(Aurandha *et al.*, 1990). Glucoamylase의 정제와 효소학적 특성에 관한 연구는 *Rhizopus* sp.(Takahashi *et al.*, 1978)나 *S. diastaticus*(Tucker *et al.*, 1984, Yamashita and Fukui, 1984; Yoshizumi, 1986; Yamashita *et al.*, 1984), *Mucor rouzianus*(Yamashita *et al.*, 1977), *Aspergillus awamori*(Yamazaki *et al.*, 1977), 그리고 *Lentinus edodes*(Yamashita and Suzuki, 1978)을 대상으로 하여 연구가 수행되었다.

*S. diastaticus*를 이용하여 전분을 직접 발효할 때 가장 문제가 되는 것은 *S. diastaticus*의 전분분해 효소인 glucoamylase 활성이 낮다는 점이다. 즉, 초기에 첨가된 전분의 30% 정도가 발효액 자체에 분해되지 않은채 존재한다는 것이다. 따라서 원형질 융합에 의한 전분발효효모를 개발하는 시도가 수행되었으며(Sakai *et al.*, 1986; Seu *et al.*, 1986) glucoamylase의 생산성을 증가시키기 위하여 glucoamylase 유전자를 클로닝하여 전분 직접 발효를 이루고자하는 연구가 진행중에 있다(Ashikari *et al.*, 1986).

본 연구에서는 전분 당화에 필요한 효소의 비용과 시간, 시설, 노동, 에너지들을 절감하기 위해 전분을 직접 발효할 수 있는 효모, 즉 glucoamylase를 많이 생성하는 효모균주를 선별하기 위하여 여러 장소로부터 시료를 채취하고 분리된 균주를 동정하고 생성하는 glucoamylase의 효소학적 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 채취

본 실험을 실시하기 위하여 전국 각지에서 감자나 고구마 전분공장의 전분박 및 전분공장의 주변 토양과 폐수에서 그리고 정미소 등의 주변과 전분 음식물 등에서 시료를 채취하였다. 시료의 채취 장소와 시료 분리주는 다음 Table 1에서 보여주는 바와 같다.

서울 지방에서 5분리주, 경기 지역에서 5분리주, 강원도 지역에서 15, 전라남도에서 12, 충북과 경상남도에서 각각 1분리주, 그리고 전분공장이 가장 많은 제주도 지방에서 25개 분리주를 얻어 도합 64개의 glucoamylase 생성 효모균주를 분리하였다.

시약 및 배지

Table 1. Yeast isolates used in this experiment

Isolate	Sampling site
A1-1, A1-2, A1-3, A1-4, A1-5	Seoul
B1, B2, C1, C2, D1	Kyunggi-do
E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 E11, E12, E13-1, E13-2, E13-3	Kangwon-do
F1-1, F1-2, F1-3, F2-1, F2-2, F2-3, F3-1 F3-2, F3-3, F4-1, F4-2, F4-3	Chunlanam-do
G1	Chungbook-do
H1	Kyungsangnam-do
J1, J2-1, J2-2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9 J10, J11, J12, J13, J14, J15, J16, J17, J18 J19, J20, J21, J22, J23, J24	Cheju-do

Bacto-peptone, Bacto-tryptone, Casamino acid, agar, Yeast extract, Yeast Nitrogen Base W/O amino acid, Yeast Carbon Base 등을 Difco에서 구입하였다.

효모의 배양에 일반적으로 사용되는 완전배지로는 YPS (Yeast extract; 1.0%, Bacto peptone; 2.0%, soluble starch; 2.0%)를 이용하였고, glucoamylase를 분비하는 효모를 분리하기 위한 배지로는 YPS I(Yeast extract; 1.0%, Bacto peptone; 2.0%, soluble starch; 2.0%, propionic acid; 1.19%, Rose Bengal; 0.003%)와 YNBS(Yeast Nitrogen Base W/O amino acid; 0.67%, soluble starch; 2.0%)를 사용하였다.

Glucoamylase 분비 효모 선별 방법

채취한 시료를 생리적 식염수에 희석하여 상등액을 YPS I 평판배지에 접종한 후 30°C에서 5일간 배양한 후 형성된 콜로니를 선별하였다. 2차 선별에서는 1차에서 선별된 이 콜로니를 YNBS 평판배지에 접종하여 30°C에 1주일간 배양한 다음 투명환(clear zone)이 형성된 콜로니를 선별하였다. 이때 형성되는 투명환은 4°C에서 1~2일간 방치하였을 때 더욱 선명하게 나타난다.

2차 선별된 콜로니를 YPS 액체배지에 접종한 다음 30°C에서 3~4일간 진탕배양하여 그 배양액을 15,000 rpm에서 15분동안 원심분리한 후, 상층액을 조효소액으로 하였다. 이 조효소액 50 μ l에 2% 수용성 전분과 0.1 M Na-acetate buffer(pH 5.0)를 각각 200 μ l, 50 μ l씩 넣고, 증류수를 200 μ l 첨가하여 반응액 0.5 ml을 만든 다음, 50°C에서 1시간동안 배양하여 효소활성을 조사하였다.

Glucoamylase 활성 측정

0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.0) 50 μ l에 기질로서 2% 가용성 전분 200 μ l을 첨가하고 여기에 조효소(crude enzyme) 50 μ l을 가한 다음 증류수 200 μ l을 넣어 총 반응액을 0.5 ml로 하였다. 이 효소반응액을 50°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 100°C에서 5~10분간 끓여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 dinitrosalicylic acid(DNS) method(Miller, 1959)에 의하여 환원당(reducing sugar)량을 결정하였다.

효소 활성의 단위는 가용성 전분을 기질로 사용하여 시간당 효소액 1 ml당 1 µg의 D-glucose를 생성시킬 수 있는 양을 1 unit로 정하였다.

환원치와 요오드염색치

Glucoamylase에 의한 전분 분해시 iodine blue colour 반응과 환원치(reducing value)의 상관관계를 조사하였다. 환원치는 DNS 방법을 이용하여 측정하였으며 생성된 glucose의 농도로 표시하였다. 요오드염색치(iodine staining value)를 조사하기 위하여 위와 같은 방법으로 반응액을 만든 다음 일정한 시간 간격으로 계속 반응액을 취하여 0.1 N HCl 2 ml를 첨가한 다음 다시 5 ml iodine solution(iodine 0.05 g + KI 0.5 g/l)을 첨가하여 흡광도(660 nm)를 측정하였다. 요오드 염색치는 남아있는 녹말의 농도로 표시하였다.

TLC에 의한 glucose의 검출

효소 반응액을 silica gel 60F254(Merck)의 TLC plate에 점적(spotting)하여 상승전개법(ascending method)에 의해 실험하였다. 이때 용매는 n-butyl alcohol, pyridine과 water를 6:4:3(v/v)로 하여 사용하였고, 건조시킨 다음 silver nitrate dip 방법에 의해 생성된 glucose를 검출하였다(Cho and Han, 1970).

단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 Lowry 등(Lowry *et al.*, 1951)의 방법에 따라 정량하였다.

결과 및 고찰

Glucoamylase 생성 효모균의 선별

생전분으로부터 직접 에탄올 발효에 적합한 glucoamylase 생성효모를 선별하기 위하여 전국에서 전분공장 등지에서 64개의 시료를 채취하였다. Glucoamylase 생성효모를 분리하기 위하여 제 1차와 제 2차 선별에서 375개의 투명환이 형성된 콜로니 중 가장 큰 clear zone이 형성된 콜로니를 선별하였다(Fig. 1).

제 3차 선별과정은 glucoamylase 효소 활성 측정에 의한 방법으로 glucoamylase에 의하여 생성되는 투명환이 큰 균주를 대상으로 YPS 액체배지에서 배양하였다. 이 배양액을 DNS 방법을 사용하여 glucoamylase 활성을 측정된 결과는 Table 2에서 볼 수 있는 바와 같다. 효모분리주 E3는 480 units의 가장 높은 효소활성을 보여주었으며 J20은 400 units을 나타내었으며 F3-2는 357 units, A1-5는 340 units을 보여주었다.

효모균의 동정

분리된 glucoamylase 분비 효모를 동정하기 위하여 NCYC (National Collection for Yeast Cultures)에 의한 형태학적,

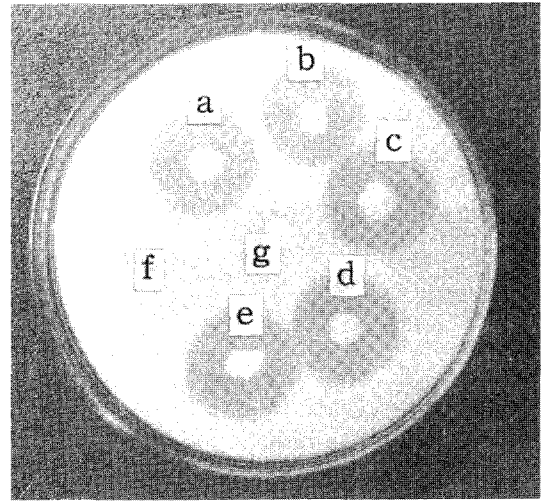


Fig. 1. Screening of glucoamylase producing yeast isolates. a-e: Glucoamylase secreting yeast isolates; (a) E3, (b) J20, (c) F3-2, (d) A1-5, (e) J8, (f) *S. cerevisiae* IFO 2044, and (g) *Rhodotorula rubra* IFO 0907.

Table 2. Comparison of glycoamylase activities from several yeast isolates

Isolate	Enzyme activity (unit)
A1-2	173
A1-5m	340
C2	116
D1	223
E3	480
E13-1	150
F3-2	357
G1	115
J8	235
J13	166
J18	113
J20	400

생화학적, 생리학적 특성을 비교 고찰하였다(Cha *et al.*, 1988; Heard & Fleet, 1990; Jeffrey & Ingledew, 1982).

분리 균주 12균주를 동정하기 위하여 형태적인 특징과 탄수화물 발효(Table 3), 탄수화물 이용능(Table 4), 질산염의 이용과 vitamine-free medium에서 성장여부, urease activity(Table 5)의 결과를 얻을 수 있었다.

위 결과에 의하여 A1-5, D1, E3, G1, J20은 *Saccharomyces diastaticus*로 동정되었으며, J13과 F3-2는 *Schwanniomycetes occidentalis*, 그리고 C2와 A1-2는 *Saccharomycopsis fibuligera*, E13-1은 *Ambrosiozyma monospora*, J18은 *Lipomyces kononenkoae*로 동정되었다. *S. diastaticus* 균주들은 glucoamylase를 분비하여 직접 전분으로부터 에탄올을 생산하는 능력이 있으므로 산업적으로 유용하게 활용하고 있다(Ashikari *et al.*, 1986 and Mattoon and Kim, 1987). 이 균주 이외에 여타 효모균주들은 산업적으로 활용하기에는 아직 부적합한 것으로 알려졌다(Searle and Tubb, 1981a).

Table 3. Morphology and carbohydrate fermentation of yeast isolates

Isolate	Cell morphology	Fermentation				
		Glucose	Galactose	Sucrose	Maltose	Lactose
A1-2	oval	+w	-	+s	+s	-
A1-5m	globose	+	-	+	-	-
C2	oval	+s	-	+w	+s	-
D1	subglobose	+	+	+	-	-
E3	subglobose	+	+	+	-	-
E13-1	spherical	+w	-	+w	-	-
F3-2	ovoidal	+	+s	+	-	-
G1	globose	+	+	+	+	-
J8	globose	+	+	+	+	+
J13	globose	+	+s	+	+s	-
J18	globose	-	-	-	-	-
J20	globose	+	-	-	-	-

+: Strong, with gas filling the insert tube within 1~3 days.

-: Absent.

+w: Weak, with the insert tube only partially filled.

+s: Slowly delayed, but with gas filling the insert tube.

Table 4. Assimilation of carbon compounds by yeast isolates

Carbon compound	Isolate											
	A-12	A1-5	C2	D1	E3	E13-1	F3-2	G1	J8	J13	J18	J20
Galactose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+s	-
Trehalose	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Raffinose	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Soluble strach	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+w	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	+w	-	+	+w	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Mannitol	-	-	+	-	-	+	+s	-	+	+	+	-
Succinate	-	+s	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+s
Citrate	+w	-	+w	-	-	+	-	-	+	-	+w	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+: rapid

+w: weak

+s: slow

-: no utilization

요오드염색치

일반적으로 glucoamylase에 의해 생성되는 환원당생성량인 환원력(reducing power)과 효소작용후에 남아있는 잔류 녹말인 요오드염색능(iodine staining capacity)은 반비례함을 알 수 있다(Fig. 2). 즉 E3, J20, 그리고 A1-5의 *S. diastaticus* 균주들로부터 생성된 glucoamylase에 의하여 생성된 환원당은 증가하는 반면 남아있는 기질의 녹말은 감소하는 경향을 보여주었다. 초기효소반응에서는 효소활동이 높은 균주인 *S. diastaticus* E3의 경우 요오드염색치(iodine staining value)의 감소가 환원치(reducing value)의 증가와 효소

반응이 반비례함을 알 수 있었다(Fig. 2). 그러나 J20과 A1-5 균주는 환원력이 70~80% 이상이면 더 이상 녹말 분해능이 감소되는 것으로 추정된다.

효소 생성에 대한 탄소원과 질소원의 영향

S. diastaticus E3 균주를 YNBS media에 수용성녹말대신 여러 가지 탄소원을 5% 첨가하여 30°C에서 4일간 진탕배양하여 효소활성을 조사한 결과는 Table 6과 같다. *S. diastaticus* E3의 경우 수용성 녹말, glucose, saccharose 같은 탄소원에서는 많은 양의 glucoamylase를 생성하였으나

Table 5. Assimilation of nitrate, growth on vitamin-free medium and urease activity of yeast isolates

Isolate	Nitrate assimilation	Vitamin-free medium	Urease activity	Identified as
A1-2	-	-	-	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
A1-5m	-	-	-	<i>S. fibuligera</i>
C2	-	+	-	<i>Saccharomyces diastaticus</i>
D1	-	+	-	<i>S. diastaticus</i>
E3	-	-	-	<i>S. diastaticus</i>
E13-1	-	+	-	<i>S. diastaticus</i>
F3-2	-	-	-	<i>S. diastaticus</i>
G1	-	-	-	<i>Ambrosiozyma monospora</i>
J8	-	-	-	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>
J13	-	-	-	<i>S. occidentalis</i>
J18	+	+	-	Unknown

Table 6. Effect of various carbon sources on the glucoamylase production by *S. diastaticus* E3

Carbon source (5%)	Enzyme activity (unit/ml)	Carbon source (5%)	Enzyme activity (unit/ml)
Glucose	400	Raffinose	40
Saccharose	400	Arabinose	37
Fructose	310	Sorbitol	24
Maltose	338	Na-acetate	15
Lactose	30	Na-citrate	87
Dextrin	11	Xylose	13
Soluble starch	500	Glycerol	9

Table 7. Effect of various nitrogen sources on the glucoamylase production by *S. diastaticus* E3

Inorganic nitrogen (0.2%)	Enzyme activity	Organic nitrogen (0.2%)	Enzyme activity
(NH ₄) ₂ SO ₄	35	Casein	49
NH ₄ NO ₃	122	Peptone	453
(NH ₄)HPO ₄	25	Casamino acid	262
NaNO ₃	53	Yeast extract	128
NH ₄ Cl	450		

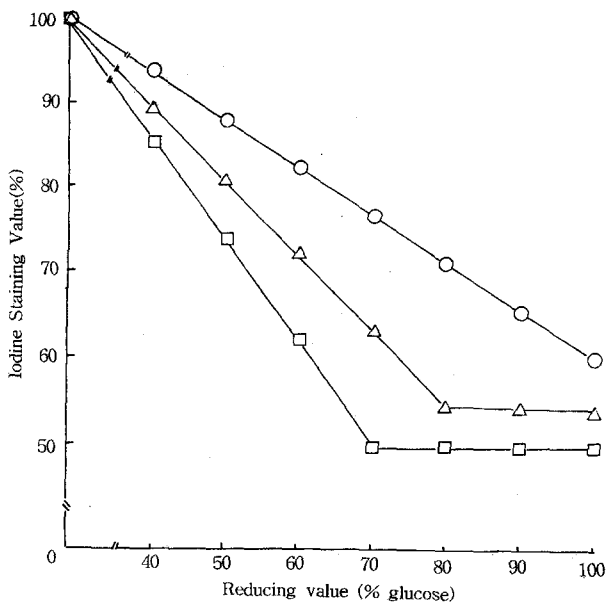


Fig. 2. Reducing value and iodine staining value curves for glucoamylase by *S. diastaticus* E3 (○-○), J20 (△-△) and A1-5 (□-□).

glycerol이나 xylose에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 이결과로부터 glucoamylase의 생성은 수용성녹말과 같은 탄소원에 의해 유도될 수 있음을 알 수 있었다.

효소 생성에 대한 질소원의 영향을 조사하기 위하여 탄소원으로 수용성녹말을 2% 첨가한 YNBS media에 여러 가지 질소원을 0.2% 첨가하고 *S. diastaticus* E3을 접종하여 30°C에서 4일간 진탕배양한 다음 효소 생성능을 비교한 결과는 Table 7과 같다. 본 실험결과 yeast extract와 peptone 첨가시에 효소의 생성이 높았으나, (NH₄)₂HPO₄나 casein 첨가시에는 효소 생성이 현저하게 감소하였다.

Glucoamylase의 생화학적 특성

배양기간에 따른 효소의 생성. YNBS media에 접종하

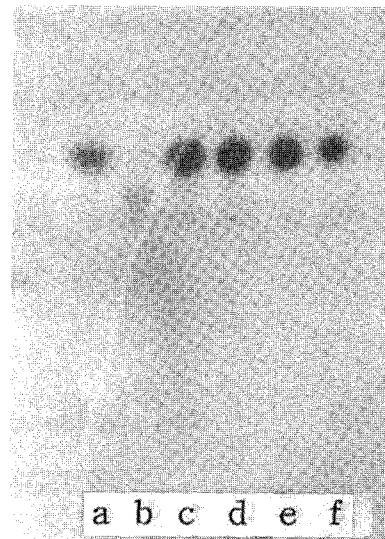


Fig. 3. Detection of glucose produced by glucoamylase activity on thin-layer chromatography. (a) Glucose, (b) Maltose, (c) A1-5, (d) D1, (e) E3, and (f) J20.

여 배양일수에 따른 효소 생성을 30°C에서 *S. diastaticus* E3, J20, A1-5를 진탕배양하면서 glucoamylases 생성을 측정하였다. 그 결과 배양 4일에 효소 생성이 급증하였으나 그 후 시간이 지나면서 효소 생성량이 더 이상 증가하지 않았다(Fig. 4). 그러나 균주간의 차이를 고찰하여 보면 E3 균주가 J20이나 A1-5 균주보다 세포외로 분비되는 glucoamylase양은 높게 나타났다.

효소 활성에 대한 pH의 영향. YNBS media에서 30°C에서 4일간 균체를 배양하여 얻은 효소액을 사용하여 glu-

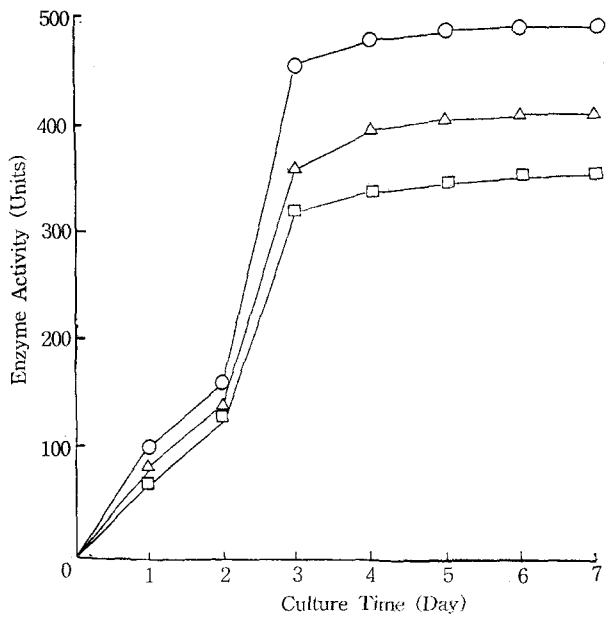


Fig. 4. Time courses of extracellular glucoamylase production by *S. diastaticus* isolates. Cells were grown at 30°C for various intervals. Glucoamylase activity of E3 (○-○), J20 (△-△) and A1-5 (□-□) was measured at 50°C for 1 hour in 0.1 M Na-acetate buffer (pH 5.0).

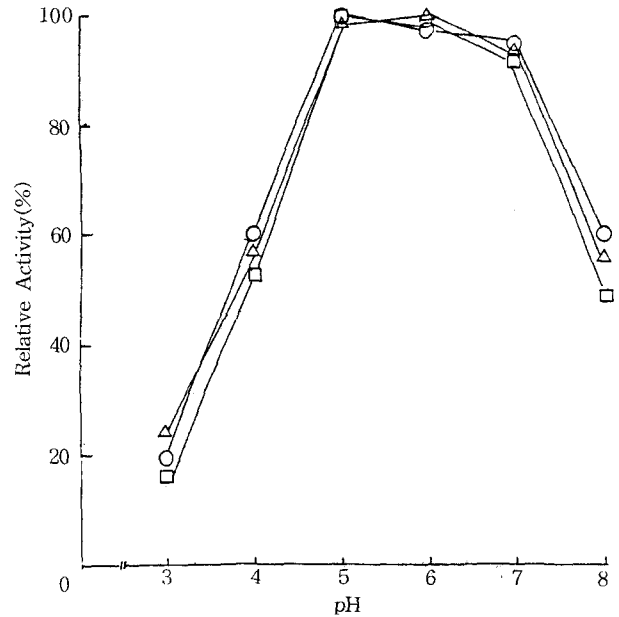


Fig. 5. Effect of pH on glucoamylase activities. The glucoamylase activities of *S. diastaticus* E3 (○-○), J20 (△-△) and A1-5 (□-□) were measured in 0.1 M Na-acetate buffer (pH 5.0) and 0.1 M phosphate buffer (pH 5~8) at 50°C for 1 hour.

coamylase의 반응 최적 pH를 검토하기 위하여 pH 2.0~5.0은 0.1 M acetate buffer를, pH 5.0~8.0은 0.1 M phosphate buffer를 사용하여 조사하였다.

S. diastaticus E3나 J20, 그리고 A1-5 유래의 glucoamylase의 최적 반응 pH는 약산성으로 pH 5.0~6.0에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 4.0 이하나 pH 7.0 이상에서는 급격히 효소활성이 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 5). 이 결과는 기존에 연구된 연구결과(Tucker *et al.*, 1984; Yamashita *et al.*, 1985a)와 일치함을 알 수 있었다. 그러나 amylolytic yeast에 속하는 *S. diastitatus*의 경우는 pH에 민감하게 활성을 나타내는 것으로 본 연구에서 분리한 균주들과는 상이한 결과를 보여주었다(Calleja *et al.*, 1987).

반응최적온도 및 효소의 열안정성. *S. diastaticus* E3, J20, 그리고 A1-5 균주를 YNBS 배지상에서 30°C에서 4일간 배양하여 얻은 조효소액으로 glucoamylase의 반응 최적 온도를 측정된 결과 40~50°C 반응 온도에서 완전한 효소 활성이 가장 높았으나 70°C 이상의 온도에서는 급격히 활성이 감소되었다. 아울러 효소의 열 안정성을 조사하기 위하여 E3균주의 효소액을 사용하여 30°C~100°C 각 온도에서 30분간 반응한 후 기질과 반응시켜 잔존하는 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 *S. diastaticus* E3 유래의 glucoamylase의 열안정성은 60°C까지는 활성에 큰 변화를 보이지 않았으나 70°C 이상에서는 급격히 활성이 감소하였다(Fig. 6). 이 같은 열안정성에 대한 결과는 나머지 두 균주인 J20과 A1-5에서 동일한 경향을 보여주었다.

*S. diastaticus*의 glucoamylase를 분리정하여 효소활성의 특성은 검정한 결과 본 연구결과와 비슷한 최적 pH와 최적

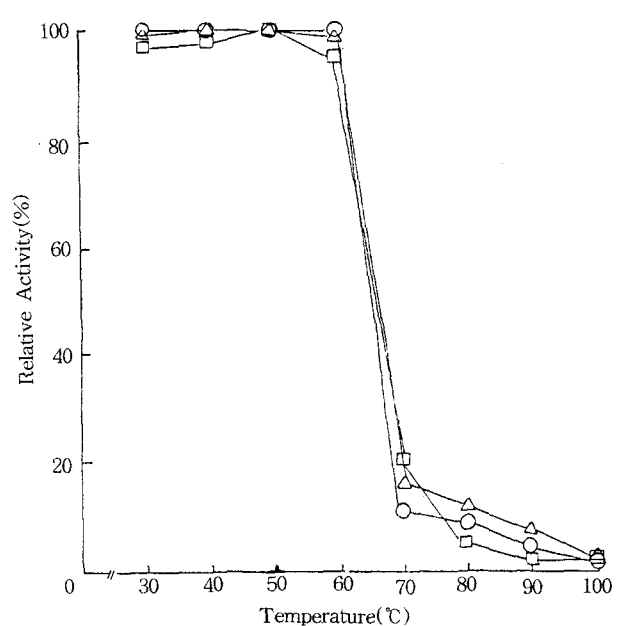


Fig. 6. Effect of thermal stability of glucoamylase activities. The glucoamylase activities of *S. diastaticus* E3 (○-○), J20 (△-△) and A1-5 (□-□) were measured in the 0.1 M Na-acetate buffer (pH 5.0) at 50 °C for 1 hour.

온도를 보여주었으나(Yamashita *et al.*, 1984), *Mucor rouzianus*와 *Lentinul edodes*의 glucoamylase는 효소의 특성이 본 결과와는 상이하게 나타났다(Yamashita *et al.*, 1977; Yamashita and Suzuki, 1978).

효소 반응 산물의 검정. Glucoamylase 활성이 높은 균주

Table 8. Starch digesting ability of the glucoamylase of *S. diastaticus* E3

Starches	Relative activity (%)
Potato, soluble starch	100
Rice starch	3.1
Corn starch	2.5
Wheat starch	2.7

Table 9. Effect of metal ions on the glucoamylase activity

Metal ion (2×10^{-2} M)	Relative activity (%)	Metal ion (2×10^{-2} M)	Relative activity (%)
Control	100.0		
CoCl ₂	96.0	MnSO ₄	89.8
CaCl ₂	98.7	FeSO ₄	73.8
HgCl ₂	20.6	ZnSO ₄	70.0
BaCl ₂	65.3	MgSO ₄	104.3
NiCl ₂	93.1	AgNO ₃	33.6
MnCl ₂	96.3	NaCl	103.1
CuSO ₄	105.6	KNO ₃	99.3

중에서 *S. diastaticus*로 확인된 균주인 A1-5, D1, E3, 그리고 J20를 선택하여 thin-layer chromatograph에 의하여 생성된 효소의 산물을 검정하였다.

그 결과 최종 생산물인 glucose가 확인되었으므로 soluble starch는 α -amylase나 β -amylase가 아닌 glucoamylase에 의하여만 glucose로 분해됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

기질 특이성. *S. diastitacus* E3의 glucoamylase의 기질 특이성을 검토하였다. 효소액으로 반응액을 제조하여 1시간 동안 50°C에서 반응한 후 효소의 활성을 측정한 결과는 Table 8에서 보여주는 바와 같다. 이 결과로부터 *S. diastitacus* E3의 glucoamylase는 기질로서 감자 수용성 녹말이 가장 적합하였으나 쌀전분(rice starch), 옥수수전분(corn starch), 밀전분(wheat starch) 등은 효소활성이 대단히 낮게 나타났으므로 기질로서 적합하지 않았음을 알 수 있었다. 따라서 동일한 전분일지라도 기질로서 적합하지 않은 이유는 녹말의 함유량의 차이에서 오는 것으로 추정된다.

효소활성에 미치는 metal ion의 영향. 금속이온에 대한 glucoamylase의 효소활성을 검토하기 위하여 조효소액으로 효소활성을 조사한 결과 다음과 같은 결과를 보여주었다(Table 9). CuSO₄, MgSO₄ 그리고 NaCl에서는 효소활성이 다소 증가하였으나, Hg²⁺와 Ag²⁺에서는 현저하게 감소되는 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과는 일반적인 효소의 특성과 유사한 결과를 보여준다.

요 약

대체에너지 생산을 위한 우수발효효모를 선별하기 위하여 전국 지역에서 전분, 전분박 및 전분 공장의 주변 토양과 폐수 등 시료를 채취하여 glucoamylase를 분비하는 효모균 64분리주를 얻었으며 이중 비교적 높은 activity를 보여주는

분리주를 선별하였다. 분리주를 동정한 결과 A1-5, D1, E3, G1과 J20은 *Saccharomyces diastaticus*로 동정되었으며 *Saccharomycopsis fibuligera*와 *Schwanniomyces occidentalis*는 각각 두 분리주, *Ambrosiozyma monospora*와 *Lypomyces kononenkoae*로 각각 한 분리주씩 동정되었다. 그 중 높은 효소활성을 보여주는 *S. diastaticus* A1-5, J20과 E3을 선택하여 분비되는 glucoamylase의 일반적인 특성을 조사하였다. 배양액내의 효소의 생성을 측정한 결과 glucose나 saccharose, 그리고 4탄당과 3탄당보다 수용성녹말에 의하여 현저하게 증가하였다. Glucoamylase활성의 반응 최적 온도는 50~60°C였고, 최적 pH는 5~6이었으며, 열에 대해서는 60°C 이상에서는 불안정한 활성을 보여주었다. 금속이온에 따른 효소의 활성은 Na⁺, Mg²⁺에 의해 약간 증가하였으나, Hg²⁺, Ag²⁺에 의해 현저하게 감소되는 현상을 보여주었다. 효소의 기질 특이성은 수용성녹말이 쌀전분, 옥수수전분과 밀전분에 비하여 현저하게 좋은 기질임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 KISTEP 여자대학 연구기반 확충 사업(99-N6-02-01-B-03)의 연구비의 지원으로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Anuradha, G., Chatterjee, B. S. and Das, A. 1990. Characterization of glucoamylase from *Aspergillus terreus* 4. *FEMS Microbiology Letters* **66**: 345-350.
- Ashikari, T., Nakamura, N., Tanaka, Y., Kiuchi, N., Shibano, Y., Tanaka, T., Amach, T. and Yoshizumi, H. 1986. *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase; Its cloning and expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.* **50**(4): 947-964.
- Brandt, D. 1981. Ethanol production by fermentation. In "Biomass conversion Processes for Energy and Fuels," Sofer, S. S. and Zaborsky, O. R. (Ed.), 357-373. Plenum Press, New York.
- Cho, S. H. and Han, Y. B. 1970. Gas chromatographische Überprüfung der Zuckerverwertungsfähigkeit der Hefe. *Kor. J. Microbiol.* **6**: 163-172.
- Cha, S. K., Lee, H. S., Kim, Y. B. and Kho, Y. H. 1988. Identification of yeast strains with computer system. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**(6): 443-449.
- Calleja, G. B., Levy-Rick, S. R., Nasim, A. and Lusena, C. V. 1987. Extracellular amylases of starch-fermenting yeast. pH effect on export and residence time in the periplasm. *CRC Critical Rev. Biotech.* **5**(3): 177-184.
- De Mot, Rene and Verachtert, H. 1985. Secretion of α -amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. *Can. J. Microbiol.*, **32**: 47-51.
- Faust, U., Prave, P. and Schlingmann, M. 1983. An integral approach to power alcohol. *Proc. Biochem.* **18**(3): 31-37.
- Heard, G. M. and Fleet, G. H. 1990. A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. *Jour. Appl. Bacteriol.*

- 68: 447-451.
- Jeffrey, W. J. and Ingledew, W. M. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amyolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**(2): 303-307.
- Kim, K., Park, C. S. and Mattoon, J. R. 1988. High-efficiency, one-step starch utilization by transformed *Saccharomyces* cells which secrete both yeast glucoamylase and mouse α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(4): 966-971.
- Kosaric, N., N, D. C. M. and Steward, G. S. 1980. Ethanol production by fermentation : An alternative liquid fuel. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 147-227.
- Laluze, C. and Mattoon, J. R. 1984. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrin fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(10): 2447-2451.
- Lewis, D. 1984. Energy relationships of fuel from biomass. *Process Biochem.* **11**: 29.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mattoon, J. R. and Kim, K. 1987. The application of genetics to the development of starch-fermenting yeasts. *CRC Critical Review. Biotech.* **5**(3): 195-204.
- McCann, K. and Barnett, J. A. 1986. The utilization of starch by yeast. *Yeast* **2**: 109-115.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**(3): 426-428.
- Park, W. S., Koo, Y. J., Shin, D. H. and Suh, K. B. 1983. Isolation and identification of starch utilizing yeast. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **15**(1): 46-55.
- Sakai, T., Koo, K. and Saitoh, K. 1986. Use of protoplast fusion for the development of rapid starch-fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**(2): 297-306.
- Searle, B. A. and Tubb, R. S. 1981a. A rapid method for recognising strains of yeast able to hydrolyse starch or dextrin. *FEMS Microbiology Letters.* **111**: 231-212.
- Searle, B. A. and Tubb, R. S. 1981b. Regulation of amyloglucosidase production by *Saccharomyces diastaticus*. *J. Inst. Brew.* **87**: 244-247.
- Seu, J. H., Kim, Y. H., Jun, D. Y. and Lee, J. T. 1986. A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**(4): 311-318a.
- Takahashi, T. 1966. A newly isolated strain of *Saccharomyces diastaticus* I. taxonomic studies. *Bull. Brew. Sci.* **12**: 9-14.
- Takahashi, T., Tsuchida, T. and Irie, M. 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* species. *J. Biochem.* **84**: 1183-1194.
- Tucker, M., Grohmann, K. and Himmel, M. 1984. Isolation and characterization of glucoamylase from *Saccharomyces diastaticus*. *Biotech. Bioeng. Symp.* **14**: 279-293.
- Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, J. 1977. Three forms of α -glucosidase and a glucoamylase from *Apergillus awamori*. *Agric. Biol. Chem.* **41**(11): 2149-2161.
- Yamashita, Y., Tsuboi, A. and Suzuki, Y. 1977. Two forms of glucoamylase from *Mucor rouzianus*; II. Properties of the two glucoamylases. *Agric. Biol. Chem.* **41**(11): 2139-2148.
- Yamashita, I. and Fukui, S. 1984. Isolation of glucoamylase-non-producing mutants in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.* **48**(1): 131-135.
- Yamashita, I., Maemura, T., Hatano, T. and Fukui, S. 1985. Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* **161**: 574-582.
- Yamashita, Y. and Suzuki, Y. 1978. Purification and properties of α -glucosidase and glucoamylase from *Lentinus edodes* (Berk.). *Agric. Biol. Chem.* **42**(5): 971-980.
- Yamashita, I., Hatano, T. and Fukui, S. 1984. Subunit structure of glucoamylase of *Saccharomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.* **48**(6): 1611-1616.
- Yoshizumi. 1986. Comparison of amino acid sequences of three glucoamylase and their structure-function relationships. *Agric. Biol. Chem.* **50**(4): 964-969.