

## *Saccharomycopsis* 속과 *Saccharomyces* 속의 잡종형성 균주에서 생산하는 $\alpha$ -amylase의 특성

양영기 · 문명남 · 임채영 · 이영하<sup>1</sup> · 김정호<sup>2</sup> · Glenn Chambliss<sup>2</sup>

조선대학교 자연과학대학 생물과학부, <sup>1</sup>충남대학교 자연과학대학 미생물학과

<sup>2</sup>Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison

핵전이 방법을 이용하여 효모에서 전분분해능이 향상된 새로운 우수 균주를 개발하고자 하였다. *Saccharomycopsis fiburigera* KCTC 7393과 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7049에서 핵을 분리한 후 영양요구 돌연변이주인 *S. cerevisiae*의 안으로 전달시켜 잡종(MN-16)을 형성하여 전분 분해능이 증가된 잡종을 선별하였다. 세포 배양액으로 조효소 용액을 만든 후 ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephacel column chromatography, Sephacryl S-200 column chromatography 등의 정제과정을 통해 9.7%의 회수율로 약 10.6배 정제된 효소를 얻을 수 있었다. 정제된 효소는 SDS-PAGE 전기영동을 통해 단일 band를 보여 주었으며, SDS-PAGE와 Sephacryl S-200 column chromatography를 통해서 53 kDa으로 나타났다. 정제효소의 최적 활성 온도는 40°C이고, 안정성은 40~45°C로 나타났다. 최적 활성 pH는 5.5이었고, pH 5.0-7.0 정도에서 pH 안정성이 80%정도 유지되었다. 가용성 전분에 대한 Km 값은 2.5 mg/ml이었다. 또한, 정제 효소의 금속 이온의 효과로 Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, EDTA, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 첨가시 활성이 촉진되었고, Ca<sup>2+</sup>의 경우 가장 높은 반면 Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>의 경우는 오히려 활성이 감소되었다.

**Key words** □  $\alpha$ -amylase, chromatography, characterization, *Saccharomycopsis*, *Sacchchromyces*,

Amylase는 전분질의 고분자 탄수화물을 분해하는 데 관여하는 효소를 총칭하며 가수분해 기작이나 반응산물에 따라  $\alpha$ -amylase(EC 3.2.1.1)  $\beta$ -amylase(EC 3.2.1.2), glucoamylase(EC 3.2.1.3)  $\alpha$ -glucosidase(EC 3.2.1.20), plulanase(EC 3.2.1.41), isoamylase(EC 3.2.1.68) 등으로 명명되고(8)(21), 기능적 측면에서 당화형 효소와 액화형 효소로 나누어지기도 한다(25). 특히,  $\alpha$ -amylase는 전분이나 글리코겐의 주성분인 amylose와 amylopectin의  $\alpha$ -1, 4 glycoside 결합을 무작위적으로 분해하는 endo형의 가수분해 효소로서 여러 가지 형태의 소당류로 분해하는 전분 액화효소이며 maltose 생성율은 50%정도이다(3). 이러한  $\alpha$ -amylase는 열안정성에 따라 액화형 thermostable  $\alpha$ -amylase 와 당화형 thermostable  $\alpha$ -amylase로 구분할 수 있다. 대규모로 사용된 최초의 액화형  $\alpha$ -amylase는 *Bacillus amyloliquefaciens*에서 생산된 것이었으며 더욱 열 안정성이 높은 *Bacillus licheniformis*가 산업적으로 도입되었다(18). 당화형  $\alpha$ -amylase의 특징은 액화과정에 사용될 수 있을 만큼 열에 강하지 못한 반면에 thermostable  $\alpha$ -amylase에서 얻을 수 없는 저분자량의 최종산물을 생산할 수 있으므로 주로 고농도의 maltose 시럽 제조분야에서 이용된다(2). Amylase는 작용기작이 다양할 뿐만 아니라 그 효소원이 매우 다양하여 동물계, 식물계, 미생물계 등에서 광범위하게 생성되고 있다. 전분을 분해하는 미생물들 중에서 효모 종은 대략 100여종으로 알려지고 있

으며, 56종의 효모가 자세히 연구되었다(20). 세가지 유형의 전분분해효소 즉,  $\alpha$ -amylase, glucoamylase와 debranching 효소를 모두 가지고 있는 효모종은 *S. fiburigera*(12), *Lipomyces kononenkoae*(22), *Lipomyces starkey*(23) 그리고 *Schwanniomyces occidentalis*(5) 등이 있고 그외 전분 분해능이 뛰어난 *Candida* sp.(7), *Torulopsis* sp.(19), *Trichosporon* sp.와 *Pichia* sp.(5) 등을 들 수 있다. 최근에는 단백질 공학이라는 새로운 기술의 발달로 쇠퇴하여 가고 있는 세제용 효소 산업에 재활력을 불어넣고 있는데 세제용으로도 지속적인 판매고가 예상되는 것으로 알려졌다. Amylase에 대한 관심은 동물성, 식물성, 미생물성으로 분류하여 중요한 효소원으로 연구되어지고 있는데, 특히 효모의 amylase는 대량생산 및 정제의 용이성 때문에 많이 연구되어지고 있고 공업적으로도 더 적절하게 이용할 수 있는 amylase 생성균주를 분리하는 것이 당면 과제로 대두되고 있다.

전분 분해 효소 중  $\alpha$ -amylase는 여러 연구자들에 의해 분리, 정제되어 이미 그 특성이 밝혀진 바 있다(6). 이미 보고된  $\alpha$ -amylase의 정제는 여러 단계를 거쳐 수행되어졌는데 즉, *Schwanniomyces alluvius*부터 농축, ion-exchange chromatography 그리고 gel filtration의 세 단계를 통해 정제하였고, 정제된  $\alpha$ -amylase의 최종 회수율과 정제 정도는 각각 17%와 10.8배 정도라고 하였다(24). *C. antarctica*로부터 농축 gel filtration, DEAE-Sephadex chromatography, 그리고 hydroxyapatite chromatography 3단계를 통해 정제하였고, 이 효소의 최적 pH는 4.2이며 최적온도는 50°C정도였고, 그의 활성은 EDTA에 의해 저해되었다고 보고하였다(17). *S. occidentalis*로부터 농축,

\*To whom correspondence should be addressed  
Tel: 062-230-6663, Fax: 062-230-6619  
E-mail : ygyang@mail.chosun.ac.kr.

superose 12-FPLC 그리고 Mono Q FPLC로 세단계를 통해 정제하였으며,  $\alpha$ -amylase 최종 회수율은 14%였고 정제 정도는 28배로 보고하였다(6).

따라서 본 연구에서는 *Saccharomycopsis fiburigera* KCTC 7393에서 핵을 분리한 후 영양요구 돌연변이주인 *S. cerevisiae* KCTC7049로 전이시켜 형성된, 전분분해능이 증가된 잡종인 MN-16에서 extracellular amylase를 ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephacel ion chromatography, Sephacryl S-200 gel permeation chromatography 등을 수행하여 정제하고 정제시킨 효소의 특성을 조사하기 위하여 SDS-PAGE, gel permeation chromatography에 의한 분자량 측정 및 최적온도와 온도의 변화에 따른 안정성 그리고 최적 pH와 pH 변화에 따른 안정성을 조사하고 효소활성에 미치는 금속이온의 영향과 기질 농도에 따른 효소에 활성에 대한 Km 값을 구하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 야생형 균주로서 *Saccharomycopsis fiburigera* KCTC 7393과 영양요구성 돌연변이주 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7049 (*tyr<sup>-</sup>*, *ura<sup>-</sup>*)를 생명공학 연구소 유전자 은행에서 분양받아 사용하였다. 핵전이 방법을 이용하여 *S. fiburigera*의 핵을 분리하여 *S. cerevisiae*로 전달시켜 잡종(MN-16)을 얻어 실험에 사용하였다(16).

### 세포외 조효소 용액의 제조 및 활성도의 측정

모균주와 형질전환체의 세포를  $1.0 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 완전 액체배지에 접종하여 대수가 말까지 성장시킨 후 균체를 원심분리로 수확하여 2% 가용성 전분과 영양 요구물이 첨가된 최소배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하고 원심분리(5,000×g, 15 min)하여 얻은 상층액을 세포외 조효소 용액으로 사용하였다.  $\alpha$ -amylase의 효소 활성도를 측정하기 위한 기질로는 1% 가용성 전분을 사용하여 amylase helix에 영향을 주는 iodine을 사용하는 방법(9)을 이용하였다.

즉, 기질인 1% 가용성 전분 1 ml와 0.5 M citric acid buffer (pH 5.0) 1 ml를 혼합한 후 40°C에서 10분간 방치한 다음 효소 용액 1 ml를 반응시험관에 첨가하여 30분간 반응시키고 1N HCl 1 ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액 0.1 ml를 0.2% iodine-0.4% KI 혼합액 1 ml와 증류수 2 ml를 넣어 잘 혼합한 후 실온에서 15분간 방치하였다. 그 용액을 spectrophotometer(Kontron Co.)를 사용하여 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 최적조건에서 1분동안 가용성 전분으로부터 glucose 1.0 mg을 생산하는 효소의 양으로 결정하였으며 단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 시료로 사용하여 Lowry 방법(14)으로 측정하였다.

### Ammonium sulfate 분획

세포외 조효소 용액내의  $\alpha$ -amylase를 첨가시키기 위해 ammonium sulfate 각 농도별로 포화시켜  $\alpha$ -amylase의 활성을

조사한 결과 55~75%에서 비교적 좋은 활성이 나타났다. 따라서 이후의 실험은 55~75% 사이의 ammonium sulfate 분획을 아래와 같은 방법으로 획득하여 사용하였다. 먼저 조효소 용액을 4°C에서 ammonium sulfate로 55%까지 서서히 포화시키고, 30분 동안 교반한 다음 침전된 균체의 잔유물을 제거하기 위해 4°C에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리시키고 상층액을 취하였다. 다시 상층액에 ammonium sulfate로 75%까지 포화시키고, 30분 동안 교반시킨 후 4°C에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 침전된 단백질을 모아 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 녹여 다음 단계에 사용하였다.

### Sephadex G-25 gel filtration

Ammonium sulfate 분획물에 들어있는 염을 제거하기 위하여 Sephadex G-25 gel을 10 ml syringe에 넣고 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 평형시킨 후 ammonium sulfate 55~75% 분획 용액을 적정한 다음 4°C에서 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다.

### DEAE-Sephacel column chromatography

DEAE-Sephacel을 column(1.6 cm×20 cm)에 충전한 뒤 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 평형시킨 다음 Sephadex G-25로 처리한 효소 용액을 column에 적하하고 gel에 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위해 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 세척한 후 0.4 M NaCl이 포함된 50 mM acetate buffer(pH 5.4) 50 ml와 동량의 50 mM acetate buffer(pH 5.4)를 사용하여 직선 농도 기울기로 용출시켰다. 용출 속도는 시간당 4.5 ml로 하고 2.25 ml 씩 분획하였다.

### Sephacryl S-200 column chromatography

Sephacryl S-200을 column(2 cm×100 cm)에 충전하고 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 평형시킨 다음 DEAE-Sephacel column에서  $\alpha$ -amylase의 효소 활성이 높은 분획만 모은 다음 농축시켜 300  $\mu$ l 단백질 시료를 적하시키고 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 용출시켰다. 이때의 용출 속도는 시간당 3 ml로 하고 1.5 ml 씩 분획하였다.

### 분자량 결정을 위한 전기영동

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 10% polyacrylamide를 이용하였으며(11), 이때 stacking gel에서 80 V, separating gel에서는 160 V의 전압으로 3시간 동안 수행한 후 0.05% Coomassie brilliant blue R-250으로 10분 동안 염색한 다음 methanol : glacial acetic acid : H<sub>2</sub>O를 1 : 1 : 8로 혼합한 용액으로 탈색시켰다.

### Gel permeation chromatography

Native 효소의 분자량 측정을 위하여 Sephacryl S-200을 column(1.45×73 cm)에 충전한 뒤 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 평형시켰다. Molecular weight size marker로는 blue dextran(2,000 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa)를 각각 1 mg씩 50 mM

acetate buffer(pH 5.4) 1 ml 용액에 녹인 후 Sephacryl S-200 column(2×100 cm)에 적하하고 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 용출시켰다. 이 때의 용출 속도는 시간당 3 ml로 하고 1.5 ml 씩 분획한 후 단백질 정량은 spectro-photometer를 사용하여 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였다

### 효소 활성에 미치는 온도의 영향과 열안정성

$\alpha$ -Amylase의 특성을 조사하기 위해 DEAE-Sephacel column에서 효소활성이 높은 분획을 모아 Centricon으로 염 제거와 농축을 시킨 후 사용하였다. 효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 20°C에서 70°C까지 각각의 온도에서 50 mM sodium acetate 완충용액(pH 5.5)에 효소액과 기질을 반응시켜 각 온도에서 30분간 정치반응 시킨 후  $\alpha$ -amylase 효소활성을 측정하였으며, 정제효소의 열안정성은 30~70°C 온도 범위에서 50 mM acetate buffer(pH 5.5) 1 ml에 1 unit의 효소를 첨가한 용액을 30분간 정치 반응시키면서 5분 간격으로 각 온도에서의 효소 잔존활성을 측정하였다.

### 효소 활성에 미치는 pH의 영향 및 안정성

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 3에서 pH 10까지 각각의 완충 용액을 만들어 pH를 조절한 후 40°C에서 효소액과 기질을 반응시켜  $\alpha$ -amylase 효소 활성을 측정하였다. 각 pH에서 효소활성의 안정성을 조사하기 위하여 상기 완충용액 1 ml에 1 unit의 효소를 처리하고, 30°C에서 24시간 정치 시킨 후에 잔존하는 효소활성을 측정하였다. pH 3.5~6.0 범위는 100 mM acetate buffer, pH 5.5~8.5 범위에는 100 mM phosphate buffer 그리고 pH 8.5~10.0 범위에는 100 mM glycine buffer를 사용하였다.

### 효소의 역학

가용성 전분용액의 농도의 변화에 따른 반응속도를 구한 다음 그 결과를 Lineweaver-Burk plot(13)을 이용하여 기질에 대한 Km 값을 결정하였다.

### 금속 이온의 영향

효소 활성에 미치는 금속이온들의 영향을 알아보기 위하여  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , EDTA,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  등의 각 금속 염화물을  $10^{-3}M$ 의 농도로 40°C, pH 5.4에서 효소액과 반응시킨 후 효소활성의 변화를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

MN-16으로부터 얻은  $\alpha$ -amylase는 culture medium(crude-enzyme), ammonium sulfate fractionation(55~75% saturated) DEAE-Sephacel column chromatography(flow rate: 4.5 ml/hr, 2.25 ml/fraction), Sephacryl S-200 column chromatography(flow rate: 3 ml/hr)의 순서로 정제하였다. 정제 과정은 4°C 이하에서 수행하였으며 완충 용액으로는 50 mM acetate buffer (pH 5.4)를 사용하였다.

### $\alpha$ -amylase의 분리정제

Ammonium sulfate의 농도별로 침전시킨 후  $\alpha$ -amylase 활성도를 측정한 결과 55~75% 사이에서 최고의 침전물을 보임에 따라 55~75% 농도에서 침전된 단백질을 소량의 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 녹인 다음 Sephadex G-25 gel filtration 하여 염을 제거한 결과 specific activity는 50.1 units/mg 이었다. 염을 제거한 효소 용액을 DEAE-Sephacel column에 적하하고 0.4 M NaCl이 포함된 50 mM acetate buffer (pH 5.4) 50 ml와 동량의 50 mM acetate buffer(pH 5.4)를 사용하여 직선 농도 기울기로 용출시킨 결과,  $\alpha$ -amylase 활성이 No. 50~55까지의 분획에서 높았다. 따라서 본 효소는 anion exchanger에 흡착되는 음이온성 효소임을 알 수 있었고 이때 얻어진 효소의 고유 활성도는 370.0 units/mg이었다. 그런 다음 효소 활성이 높은 분획 No. 50~55를 모아 Sephacryl S-200 column에 적하하고 50 mM acetate buffer(pH 5.4)를 용출시켰다. 그 결과  $\alpha$ -amylase 활성이 No. 63~67까지 분획에서 비교적 효소 활성이 높게 나타났고 고유 활성도는 530.2 units/mg이었다. 따라서 조효소 용액 800 ml로 부터 55~75% ammonium sulfate 분획, DEAE-Sephacel column chromatography, Sephacryl S-200 column chromatography 등의 정제 과정을 통해 얻어진 결과는 Table 1과 같으며 조효소 용액과 비교하여 9.7%의 회수율로 약 10.6배 정제된 효소를 얻을 수 있었다.

### 정제 효소의 순수도 및 분자량

SDS-PAGE를 수행한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 단일 단백질 band를 확인할 수 있었으며 본 효소의 분자량은 marker protein과 비교해 본 결과 53 kDa으로 추정되었다. Sephacryl S-200 gel permeation chromatography에 의하여 분자량을 확인한 결과를 Fig. 2에 나타내었으며 분자량은 53 kDa으로 추정되었다. 따라서 본 효소는 53 kDa의 단일 단위체로 이루어진 효소임을 알 수 있었다. 이 결과는 SDS-PAGE에 의해 결정된 *Aspergillus foetidus*(14)의 분자량 41 kDa보다는 크지만, *Aspergillus* sp. (1)의 분자량 65 kDa보다는 작게 나타났으며, S.

Table 1. Purification of  $\alpha$ -amylase from cultured supernatant of yeast hybrid strain MN-16

Purification step	Total volume (ml)	Total enzyme activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	800.0	4120.10	82.20	51.1	1.0	100.0
Ammonium sulfate	2.6	2011.21	10.00	201.1	4.0	40.8
DEAE-Sephacel	11.0	603.36	1.63	370.2	7.4	14.6
Sephacryl S-200	3.0	401.72	0.75	530.2	10.6	9.7

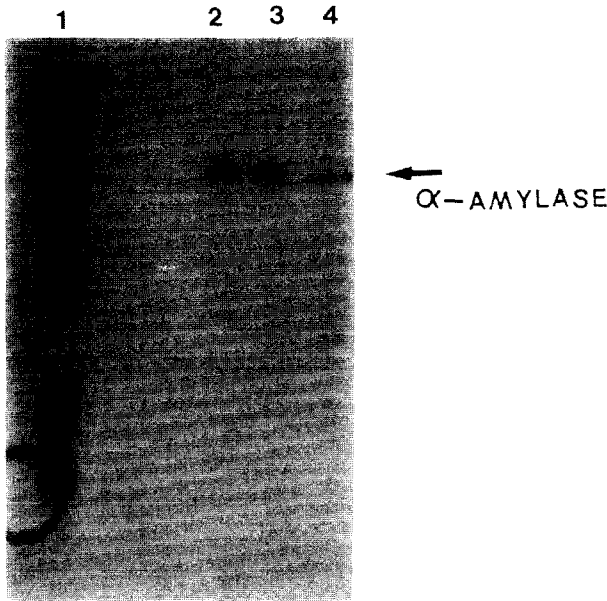


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of  $\alpha$ -amylase at each purification step. Lanes 1, Molecular weight marker; 2, Ammonium sulfate fractionation; 3, DEAE-Sephacel column chromatography; 4, Sephacryl S-200 column chromatography.

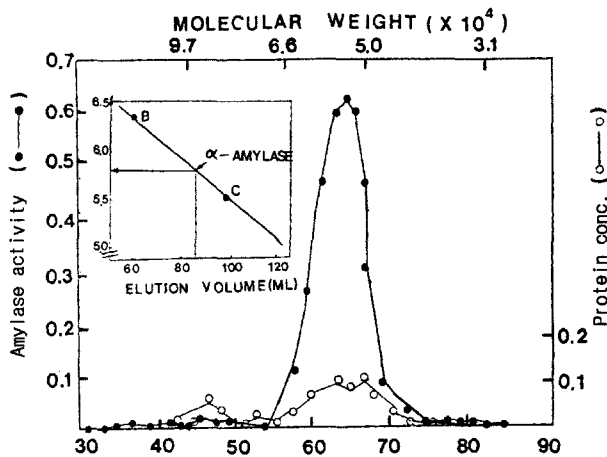


Fig. 2. Molecular weight of  $\alpha$ -amylase by gel permeation chromatography on Sephacryl S-200

*alluvius*로부터 DEAE-cellulose ion-exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration chromatography를 통해 52 kDa의 당단백질  $\alpha$ -amylase을 얻은 결과(17)와 유사하였다.

**$\alpha$ -amylase의 특성: 효소 활성에 미치는 온도의 영향**

효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 각각 20°C부터 10°C 간격으로 70°C까지의 온도에서 효소액과 기질을 반응시켜  $\alpha$ -amylase 효소 활성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 20°C에서 대략 75%의 활성을 가졌고, 40°C에서 가장 높은 활성을 보인 반면 50°C 이상에서는 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 한편, 효소의 열안정성 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 40, 50, 60 그리고 70°C에서 5-30분 동안 반응시킨 결과 60°C와 70°C에서

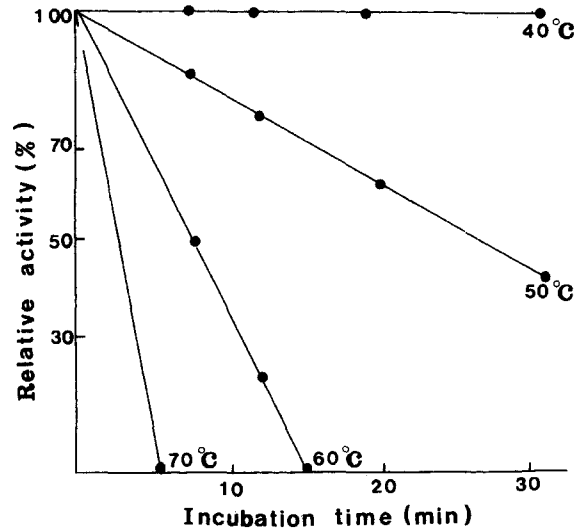


Fig. 4. Thermal inactivation of  $\alpha$ -amylase isolated from MN-16.

각각 15분과 5분에 완전히 활성을 잃었으나, 50°C에서는 30분 후 35% 정도 활성이 감소하였고, 40°C에서는 활성에 변화가 없었다.

**효소의 활성에 미치는 pH의 영향 및 안정성**

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 측정하기 위하여 pH 3에서 pH 10까지 각각의 완충용액을 만들어 pH를 조절한 다음 효소액과 기질을 반응시켜 나타나는  $\alpha$ -amylase 효소 활성을 측정하고 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. pH 3.0에서부터 6.0까지는 100 mM acetate buffer, pH 5.5에서부터 8.5까지는 100 mM phosphate buffer 그리고 pH 8.5, 9.0, 10.0은 100 mM glycine buffer를 사용하여 효소액과 기질을 반응시켜 나타나는  $\alpha$ -amylase 효소 활성을 측정하였다. 일반적으로  $\alpha$ -amylase는 최적 pH가 5.0~6.5로 알려졌는데(3) 각각의 pH에서 반응한 효소의 가장 높은 활성은 pH 5.5로 나타났다. 한편, pH 3.0-8.0 범위에서 30°C, 24시간 정치한 후, 그 잔존 활성을 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었는데 pH 5.0-7.0 범위에서 80%이상의 효소활성을

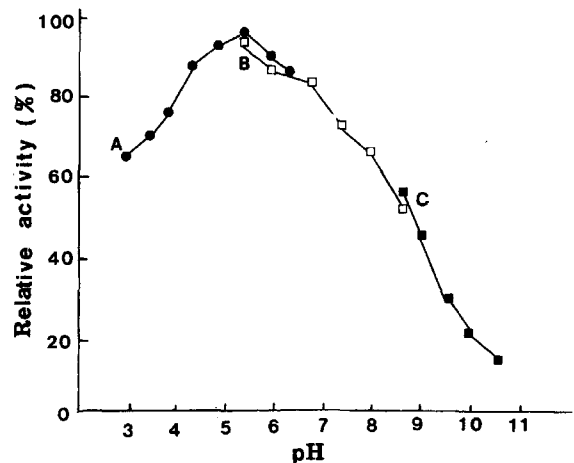


Fig. 5. Effect of pH on  $\alpha$ -amylase activity. A, 100 mM acetate buffer; B, 100 mM phosphate buffer; C, 100 mM glycine buffer.

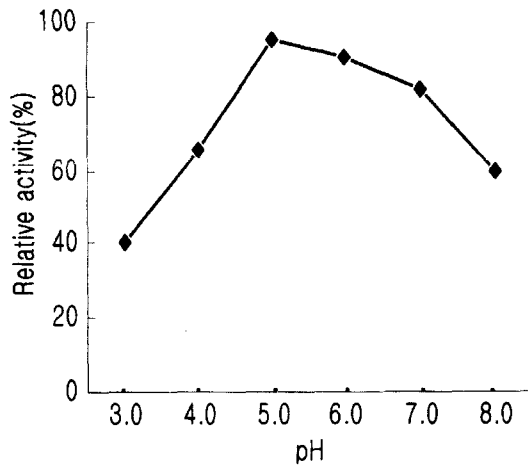


Fig. 6. Effect of pH on the stability of  $\alpha$ -amylase secreted from MN-16.

나타내었다.

**효소의 역학**

가용성 전분용액의 농도별 반응속도에 의해 본 효소의 기질에 대한 친화력 측정을 위한 실험으로 효소역학에 대한 분석은 Lineweaver-Burk plot(13)을 이용하였다. Lineweaver-Burk Plot에 의해 얻어진  $\alpha$ -amylase의 Km 값은 Fig. 7에서 보는 바와 같이 2.5 mg/ml로 나타났다.

**금속 이온의 영향**

$\alpha$ -amylase 활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위하여 각 금속 염화물을 10~3 M의 농도로 pH 5.4, 40°C에서 효소액과 반응시킨 후 효소에 대한 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 즉, 금속 이온 중  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , EDTA,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  첨가시 비교적 활성이 촉진되는 효과를 나타내었지만,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ 첨가시 활성이 저해되는 것으로 나타났다. 이 중  $Ca^{2+}$  첨가시 가장 높은 활성을 보였고  $Fe^{2+}$ 은 다른 금속 이온에 비해 저해 효과가 높았으며 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 mM 각각의 농

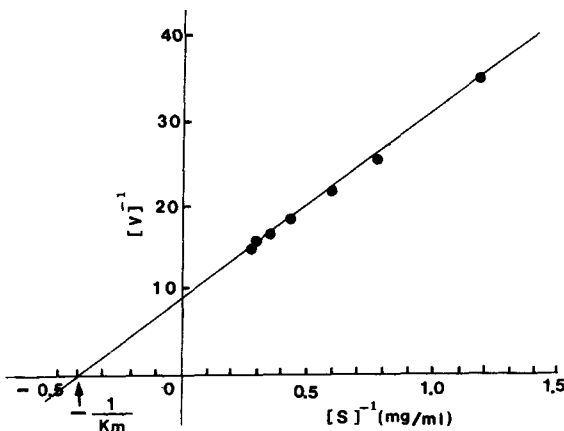


Fig. 7. Effect of substrate concentration by Lineweaver-Burk plot.

Table 2. Effect of divalent metal cations on  $\alpha$ -amylase activity from MN-16

Metal ions	Relative activity (%)
None	100.0
$Ca^{2+}$	112.4
$Co^{2+}$	107.6
$Cu^{2+}$	79.1
EDTA	109.5
$Fe^{2+}$	59.1
$Mg^{2+}$	105.7
$Mn^{2+}$	107.0
$Ni^{2+}$	78.1
$Zn^{2+}$	103.8

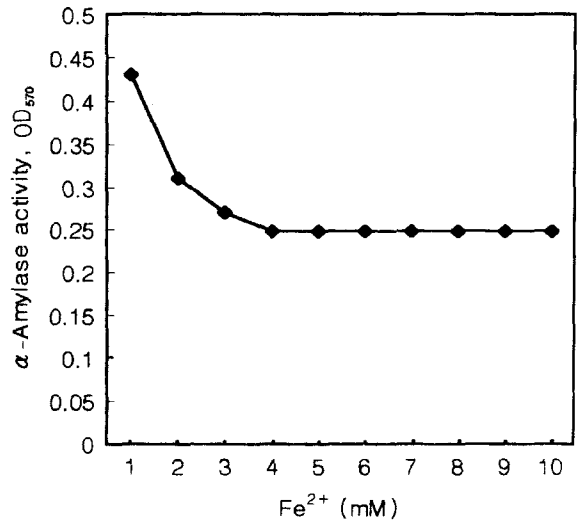


Fig. 8. Effect of  $Fe^{2+}$  on  $\alpha$ -amylase activity.

도별로  $Fe^{2+}$ 의 저해 효과를 조사한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이  $Fe^{2+}$  2.5 mM이상의 농도에서는 큰 변화가 없었다. 이와 같은 결과는 *Aspergillus sp.*(10)에서는  $Al^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  첨가시 활성이 촉진되었으며,  $Hg^{2+}$  첨가시에는 활성이 억제되었다는 보고를 비교해 볼 때 대부분  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ 이 활성을 촉진한 것은 유사하지만  $Fe^{2+}$  첨가시 활성이 억제되었다는 것은 본 효소의 특이점이라고 할 수 있었다. 또한, *S. alluvius*(17)의 경우 EDTA에 의해 저해되었다는 보고와는 차이가 있었다. 본 효소는 균류와 효모류에서  $\alpha$ -amylase 활성에  $Ca^{2+}$ 이 cofactor로 작용한다는 보고(8)와 일치하였다. 금속 이온 중  $Ca^{2+}$ 은 효소 구조 중에 포함되어 있어 disulfide bridge를 강화하고 전체적인 효소 구조의 안정성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(3).

**감사의 글**

이 논문은 1996년도 조선대학교 교수해외 파견 연구비 지원 받아 수행되었음에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Abe, J. I., K. Nakajima, H. Nagano, S. Hizukuri, and K. Obata. 1988. Properties of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus* sp. K-27: A synergistic action of glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. *Carbohydrate Research*, **175**, 85-92.
2. Allen, W. G. and J. E. Spradlin. 1974. Amylases and their properties. *Brew. Dig.*, **49**(7), 48-50, 52-53, 65.
3. Biotechnology Dictionary Compilation Committee. 1986. Biotechnology Dictionary. Anastatic Printing Co. Tokyo.
4. De Mot, R. and H. Verachtert. 1985. Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast viron. *Microbiol.*, **50**, 1474.
5. De Mot, R., M. Demeersman, and H. Verachtert. 1984. Comparative study of starch degradation and amylase production by non-ascomycetous yeast species. *Appl. Microbiol.*, **5**, 421-432.
6. Deibel, M.R., R.R. Hiebsch, and R.D. Klein. 1988. Secreted amylolytic enzymes from *Schwanniomyces occidentalis*: Purification by fast protein liquid chromatography (FPLC) and preliminary characterization. *Prep. Biochem.*, **18**, 77-120.
7. Evertova, H. 1966. Study of the formation and properties of the amylolytic system of *Candida japonica*. *Folia Microbiologica.*, **11**, 422.
8. Filho, A.S., E.V. Galembeck, J.B. Faria, A.C. Schenberg, E.H. Fisher, and E.A. Stein. 1960. In: The enzymes. 2nd ed., (Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrback, K., ed.) vol. 4, p. 313-343, Academic Press, New York.
9. Hernandez E., and D. J. Pilt. 1975. *J. Appl. Chem. and Biotech.* **25**, 297-304
10. Kim, Y.S. 1983. Studies on the amylase produced by *Aspergillus* sp. M.S. thesis, Jungang University.
11. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 608-685.
12. Lemmel, S.A., R.C. Heimsch, and R.A. Korus. 1980. Kinetics of growth and amylase production of *Saccharomycopsis fiburigera* on potato wastewater. *Appl. Environ. Microbio.*, **39**, 387-393.
13. Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am Chem. Soc.* **56**, 658-666.
14. Lowry, O.H., N.J. Rosevroung, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275
15. Michelena, W. and F.J. Castillo. 1984. Production of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flour medium and characterization of the enzyme. *J. Appl. Bacteriol.* **56**, **3**, 395-407.
16. Moon, M.N. 1998. Characterization of  $\alpha$ -amylase producing hybrid constructed by intergenic nuclear transfer between *Saccharomycopsis fiburigera* and *Saccharomyces cerevisiae*. ph.D. thesis. Chosun University
17. Moranelli, F., M. Yanguchi, G. B. Calleja, and A. Nasim. 1987. Purification and characterization of the extracellular  $\alpha$ -amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem. Cell. Biol.*, **65**, 899-908.
18. Morgan F.J. and F.G. Priest. 1981. Characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 107-114.
19. Moulin, G. and P. Galzy. 1978. Amylase activity of *Torulopsis ingenosa* Di Menna. *Folio Microbiol.*, **23**, 423-427.
20. Sa-Correia, I. and N. van Uden. 1981. Production of biomass and amylase by the yeast *Lipomyces kononenkoae* in starch-limited continuous culture. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 24-28.
21. Schomburg, D. and M. Salzmann. 1991. In: Enzyme Hand book Vol. 4, Springer-verlag.
22. Spencer-Martin, S. and N. van Uden. 1977. Extracellular amylolytic system of the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 241 - 250.
23. Toyzi, A.J., P. Prebois, G. Moulin, F. Deschamps, and P. Galzy. 1982. Production of food yeast from starch substrates. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 232-236.
24. Wilson, J.J. and W.M. Ingledew. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 301-307.
25. Yamamoto, T. 1988. Handbook of amylase and related enzymes, their sources isolation methods, properties and applications. *The Amylase Research Society of Japan Osaka*.

(Received November 11, 1999/Accepted November 24, 1999)

---

**ABSTRACT : Characterization of  $\alpha$ -amylase Producing Hybrid Constructed between *Saccharomycopsis* and *Saccharomyces***

**Young-Ki Yang<sup>\*</sup>, Myeng-Nim Moon, Chae-Young Lim, Young-Ha Rhee<sup>1</sup>, Jeong-Ho, Kim<sup>2</sup>, and Glenn Chambliss<sup>2</sup>**(Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chosun University, Kwangju 501-759, <sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, <sup>2</sup>Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, 1550 Linden Drive Madison Wisconsin 53706, U.S.A)

This study has been performed to develop a yeast strain having high  $\alpha$ -amylase production ability using nuclear transfer method. Hybrids formed between the strains of *Saccharomyces fiburiger* KCTC 7393 and *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7049 (*tyr*-, *ura*-) were obtained by nuclear transfer technique. Nuclei isolated from the wild type *S. fiburiger* strain were transferred into auxotrophic mutants *S. cerevisiae* and selected the hybrids showing an increased starch degrading capability were selected (MN-16). This transformant grew best and produced maximal  $\alpha$ -amylase activity on the medium containing 2% (V/V) soluble starch.  $\alpha$ -Amylase from MN-16 was purified electrophoretically homogeneity and its properties were investigated. The enzyme was purified about 10.6 fold with an overall yield 9.7% from the culture medium by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephacel column chromatography, and Sephacryl S-200 column chromatography. The purified enzyme showed a single band on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the  $\alpha$ -amylase was estimated to be 53,000 daltons by SDS-PAGE and by gel permeation chromatography on Sephacryl S-200. The purified enzyme showed the maximum activity at pH 5.5 and 40°C. The  $K_m$  value for soluble starch was 2.5 mg/ml. The enzyme activity increased in the presence of  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , EDTA,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$ , but inhibited by  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , and  $Ni^{2+}$ .