

## 핵전이법에 의해 형성된 *Saccharomycopsis* 속과 *Saccharomyces* 속의 잡종에서 glucoamylase 생산에 관한 연구

양영기\* · 임채영 · 김종권 · 문명남 · 이영하<sup>1</sup>

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

핵전이에 의해 형성된 잡종의 유도 배양액으로부터 glucoamylase를 정제하고 몇몇의 효소 특성을 조사하였다. 효소는 76배 정제하였고, ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-150 gel permeation chromatography 그리고 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography의 순서 배양액으로부터 정제한 결과 전반적인 수율은 16%를 나타내었다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis와 Sephadex G-150 gel permeation chromatography에 의하여 정제된 glucoamylase의 분자량을 측정된 결과 57.5 kDa를 나타내었으며, 정제된 효소의 최적 pH와 온도는 각각 5.0과 40°C로 나타났다. 또한 가용성 전분에 대한 Km값은 2.6 mg/ml을 나타내었으며, 정제된 효소는 Ca<sup>2+</sup>, EDTA, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 그리고 Mn<sup>2+</sup>의 존재하에 활성이 증진됨을 알 수 있었다.

**Key words** □ glucoamylase, purification, *Saccharomyces* sp., *Saccharomycopsis* sp.

전분질 분해효소는 전분질의 고분자 탄수화물을 분해하는데 관여하는 효소를 총칭하며 가수분해 기작이나 반응 산물에 따라  $\alpha$ -amylase (1,4- $\alpha$ -D-glucanoglucanohydrolase EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amylase (1,4- $\alpha$ -D-glucan maltohydrolase EC 3.2.1.2), glucoamylase (1,4- $\alpha$ -D-glucan gluconohydrolase, exo-1,4- $\alpha$ -glucosidase EC3.2.1.3),  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ -D-glucoside glucohydrolase, trans-glucosidase, maltase EC 3.2.1.20), pullulanase (debranching enzyme, limit dextrinase, pullulan 6-glucanohydrolase EC 3.2.1.41), isoamylase (debranching enzyme, glycogen 6-glucanohydrolase EC 3.2.1.68) 등으로 명명되고(2,3,21,25,41) 기능적 측면에서 당화형 효소와, 액화형 효소로 나누어지기도 한다(3,15,41).  $\alpha$ -amylase는 전분이나 글리코겐의 주성분인 amylose와 amylopectin의  $\alpha$ -1,4 glycoside 결합을 무작위적으로 분해하는 endo형의 가수분해 효소로서 여러가지 형태의 소당류로 분해하는 전분 액화 효소이며 maltose 생성율은 50% 정도이다(4).  $\beta$ -amylase는 전분이나 글리코겐의  $\alpha$ -1,4-glucan의 비환원성 말단에서 maltose 단위로  $\alpha$ -1,4-glycoside 결합을 순차적으로 절단하여 최종 생산물로  $\beta$ -maltose와  $\beta$ -limit dextrin으로 분해하는 exo형의 가수분해 효소로서 식물계에 주로 존재하는 것으로 알려져 왔으나 최근 미생물에서도 발견되고 있다(16). Glucoamylase (EC 3.2.1.3)는  $\alpha$ -glucosidase의 일종으로 전분이나 glycogen, amylose, amylopectin 그리고 maltose등을 가수분해하여 glucose를 형성시키는 효소를 말한다.  $\alpha$ -glucosidase에 속하는 효소들은 대개 다당류에서  $\alpha$ -glucoside 결합을 끊어 glucose나 maltose, dextrin과 같은 소단위체로 분해

시키는 역할을 한다. Debranching enzyme에는 isoamylase, pullulanase가 있으며  $\alpha$ -1,6 glycoside 결합을 가수분해하는 효소로서  $\beta$ -amylase와 병용하여 maltose를 생산하고, glucoamylase와 병용하여 glucose 생산에 이용되고 있다(5,12). 전분은 이러한 효소들이 glycosidic linkage에 반응하여 dextrin, oligosaccharide, maltose 및 glucose 등으로 분해된다(12). 이와 같이 amylase는 작용 기작이 다양할 뿐 만아니라 그 효소원이 매우 다양하여 동물계, 식물계, 미생물계 등에서 광범위하게 생성되고 있다. 이러한 전분분해효소는 많은 미생물에서 그 분비가 알려져 있는데 세균류로는 *Bacillus cereus*(42), 그밖에 여러 세균류 등(12,18,19)이 있고, 효모류에는 *Saccharomyces cerevisiae*(28), *Schwanniomyces castellii*(32), 그밖에 여러 효모 등(16,35,38,40)에서 연구되어 있고, 균류는 *Aspergillus terreus*(14,15), *Aspergillus niger*(2,6,27,29,30,37,39), *Scytalidium* sp.(3), *Hormoconis* sp.(11), 그밖에 여러 균류 등(1,17,23,24,26,33)에서 보고되고 있다. 그 중 glucoamylase는 세균류보다는 효모나 사상균류에 널리 분포되어 있다고 알려져 있다.

Glucoamylase는 전분이나 glycogen같은 다당류의 분해시 다른  $\alpha$ -glucosidase들 보다 더 많은 양의 glucose를 형성시킨다. 따라서 전분의 당화과정을 필요로하는 발효공업이나 식품공업에 이용되어 왔으며, 더 높은 생산능을 가지는 균주개발에 관심이 모아지고 있다. 지금까지 알려진 많은 미생물에서 glucoamylase의 다형성은 여러종류의 isozyme을 가지며 주로 D-mannose, D-glucose와 D-galactose와 같은 단당류 사슬을 가진 당단백질로 확인되었으며, 이 당들은 효소의 serine과 threonine 잔기의 hydroxyl기에 mannose가 O-glycosidic결합을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 이들 효소들은 적정 pH 및 온도, 열 안정성, 항원 구조면에 있어 두드러진 차이는 없으며, 단지 전기영동상의 band

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: (062) 230-6663, Fax: (062) 234-4326  
E-mail: ygyang@mail.chosun.ac.kr

위치와 등전점 그리고 안정성에 있어 약간의 차이가 있다고 보고하였다. 이러한 균류의 isozyme은 대개 유전자의 수준보다는 전사나 해독 후에 변형이 일어나는 것으로 알려져 있다. 과거에는 산업용 효소의 원료로 동·식물 조직을 많이 이용했으나 그 수요의 증가와 효소 자원의 확보, 발효 기술의 발전과 더불어 최근에는 미생물을 이용하여 효소의 생산, 이용 및 개발 등에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 특히 효모나 곰팡이의 amylase는 다른 효소원에 비해서 생산 원가의 저렴, 효소의 균일성 및 대량 생산 등의 조건이 유리하기 때문에 그 이용도가 높다(18,29,42).

따라서 본 연구는 amylase 우수 생산균을 개발하기 위하여 유전물질의 전달수단의 하나인 핵전이를 이용하여 얻은 *Saccharomycopsis* 속과 영양 요구성 변이주인 *Saccharomyces* 속의 잡종 중에서 glucoamylase 활성 및 단백질 함량을 측정하여 glucoamylase 고생산 균주를 선발하고 extracellular glucoamylase를 ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-150 gel permeation chromatography 및 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange column chromatography 등을 수행하여 정제하고 정제된 효소의 최적 pH, 온도, 금속 이온의 영향 및 기질 농도에 따른 효소 활성 등의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 세포외 효소용액의 제조

YPG에서 자란 형질전환체를 Sintered glass (3G-2)를 이용하여 수확하고 효소 용액을 만들기 위한 Wheat bran 최소 액체 배지 (wheat bran 10 g, yeast extract 5 g, minimal salt stock solution 20 ml, adenine stock solution 1 ml, tyrosine stock solution 1 ml)에 접종한 다음 24°C에서 48시간 진탕배양한 다음 효모를 제거하고 4°C에서 3,000×g으로 30분간 원심분리해서 얻은 상층액을 조효소 용액으로 사용하였다.

### 효소 활성도 측정

효소 활성도를 측정하기 위한 기질로는 1% 가용성 전분을 사용하고 amylose helix에 영향을 주는 iodine 방법(13)을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 1 unit는 최적 조건하에서 1분 동안 가용성 전분으로부터 glucose 1.0 mg을 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

### Ammonium sulfate 분획

세포외 조효소 용액내의 amylase를 침전시키기 위해 ammonium sulfate 각 농도별로 포화시켜 glucoamylase의 활성을 조사하였다. 비교적 활성이 좋은 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 취하고, 다시 상층액에 ammonium sulfate로 75%까지 포화시키고 30분 동안 교반시킨 후 4°C에서 10,000 rpm으로 20분간 원

심분리하여 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 적하한 다음 4°C에서 5,000 rpm으로 2분간 원심 분리하였다.

### Sephadex G-150 gel permeation chromatography

Sephadex G-150 gel을 column (1.45×73 cm)에 충전하고 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 평형시킨 다음 Sephadex G-25로 처리한 효소 용액을 column에 적하하고 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 용출시켰다. 이때의 용출 속도는 시간당 3 ml로 하고 1.5 ml씩 분획하였다.

### DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography

DEAE-Sephadex A-50을 column (1.1×20 cm)에 충전한 뒤 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 평형시킨 다음 Sephadex G-150 column에서 amylase의 효소 활성이 높은 분획만 모은 용액을 column에 적하하고 gel에 결합되지 않는 단백질을 제거시키기 위해 50 mM acetate buffer (pH 5.4) 50 ml로 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 ml씩 분획하였다.

### 분자량 결정을 위한 전기영동 (SDS-PAGE)

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 10% polyacrylamide를 이용하였으며(20), 이 때 stacking gel에서 100 volt, separating gel에서는 200 volt의 전압으로 3시간 동안 수행한 후 0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250으로 10분 동안 염색한 다음 탈색시켰다. 분자량 측정을 위한 molecular weight size marker로는 myosin (MW 200,000), phosphorylase B (MW 97,400), bovine serum albumin (MW 68,000), ovalbumin (MW 43,000), carbonic anhydrase (MW 29,000),  $\beta$ -lactoglobulin (MW 18,400), lysozyme (MW 14,300) (GIBCO-BRL)을 사용하였다.

### Gel permeation chromatography

Native 효소의 분자량 측정을 위하여 Sephadex G-150을 column (1.45×73 cm)에 충전한 뒤 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 평형시켰다. Molecular weight size marker로는 Blue dextran (MW 2,000,000), alcohol dehydrogenase (MW 150,000), Bovine serum albumin (MW 66,000), carbonic anhydrase (MW 29,000)를 각각 1 mg씩 50 mM acetate buffer (pH 5.4) 1 ml용액에 녹인 후 Sephadex G-150 column (1.45×73 cm)에 적하하

고 50 mM acetate buffer (pH 5.4)로 용출시켰다. 이때의 용출 속도는 시간당 3 ml로 하고 1.5 ml씩 분획한 후 단백질 정량은 spectrophotometer를 사용하여 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Glucoamylase의 특성**

**효소 활성에 미치는 온도의 영향**

효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 20°C에서 70°C까지 각각의 온도에서 효소액과 기질을 반응시켜 glucoamylase 효소 활성을 측정하였다.

**효소 활성에 미치는 pH의 영향**

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 3에서 pH 10까지 각각의 완충 용액을 만들어 pH를 조절한 후 40°C에서 효소액과 기질을 반응시켜 amylase 효소 활성을 측정한다. pH 3.5~6.0 범위는 100 mM acetate buffer, pH 5.5~8.5 범위는 100 mM phosphate buffer 그리고 pH 8.5~10.0 범위는 100 mM glycine buffer를 사용하였다.

**효소의 역학**

가용성 전분 용액의 농도의 변화에 따른 반응 속도를 구한 다음 그 결과를 Lineweaver-Burk Plot을 이용하여 기질에 대한 Km값을 결정하였다.

**금속 이온의 영향**

효소 활성에 미치는 금속 이온들의 영향을 알아보기 위하여 Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, EDTA, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 등의 각 금속 염화물을 10<sup>-3</sup> M의 농도로 40°C, pH 5.4에서 효소액과 반응시킨 후 효소 활성의 변화를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**Glucoamylase의 정제**

효소 정제의 결과를 Table 1에 요약하였다. 전반적인 과정에서 glucoamylase는 16%의 수율로 76배 정제되었다. 거의 모든 효소의 활성이 55~75% ammonium sulfate 분획내에서 나타났다. 그러므로, 55~75% ammonium sulfate 분획을 50 mM acetate buffer (pH 5.4)에 용해하고 그리고 나서 Sephadex G-25 gel

filtration에 의해서 탈염하였다. 그 조효소 용액의 고유 활성도는 212 unit/mg로 나타났다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 이러한 탈염된 glucoamylase 조효소 용액을 Sephadex G-150 column에 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 용출하였고, 54~63 분획의 효소 활성도를 측정한 결과, 고유 활성도는 454 unit/mg로 나타났다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 이러한 활성 분획은 다시 DEAE-Sephadex A-50 column에 용출한 결과 45~55 분획에서 가장 강한 효소 활성을 보였으며, 고유 활성도는 4,636 unit/mg로 나타내었다. 그러한 결과를 SDS-PAGE로 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었으며, 이러한 결과로 정제된 효소는 음이온성 효소임을 알 수 있었다(8,39).

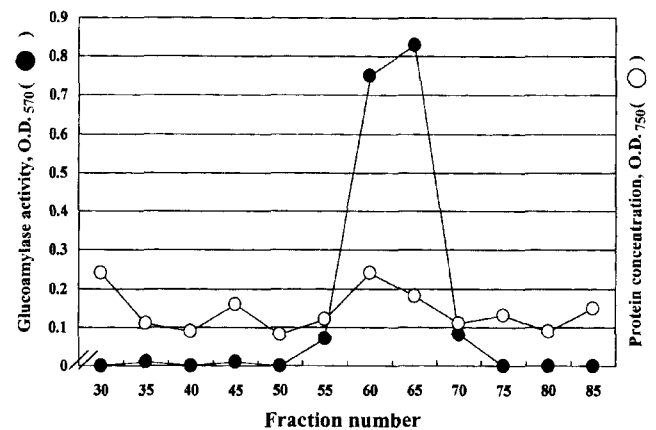


Fig. 1. Gel permeation chromatography on Sephadex G-150.

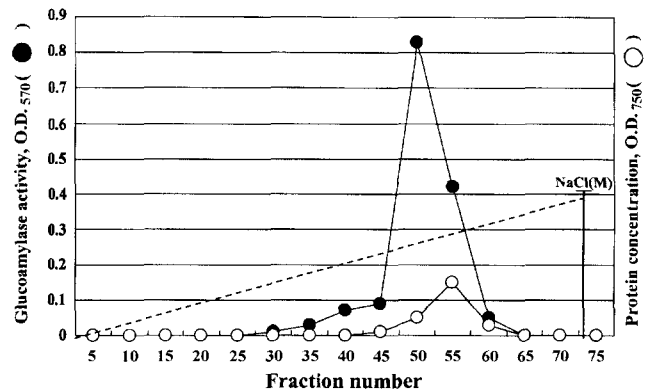
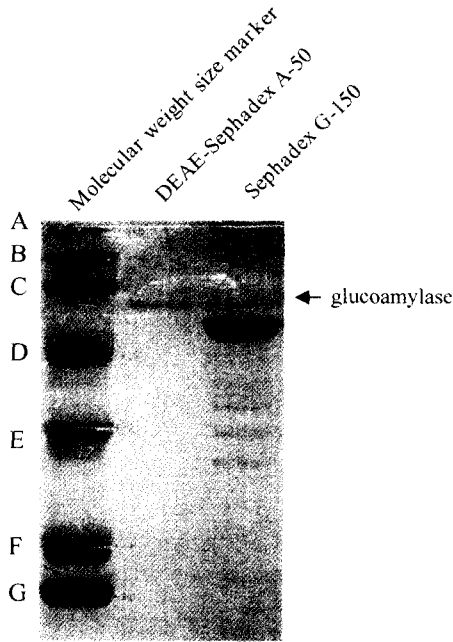


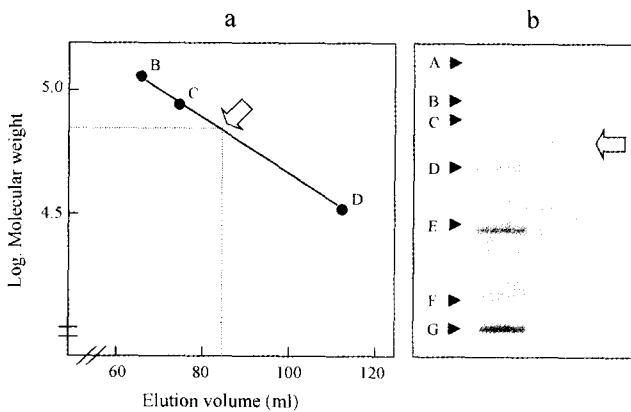
Fig. 2. Ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50

Table 1. The purification of glucoamylase from hybrid between *Saccharomycopsis* sp. and *Saccharomyces* sp.

Purification step	Total volume (ml)	Total enzyme activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	750	6,187	101	61	1	100
Ammonium sulfate	2.6	2,200	10.4	212	3.5	36
Sephadex G-150	11	1,875	4	454	7.4	30
DEAE-Sephadex A-50	3	1,020	0.22	4,636	76	16



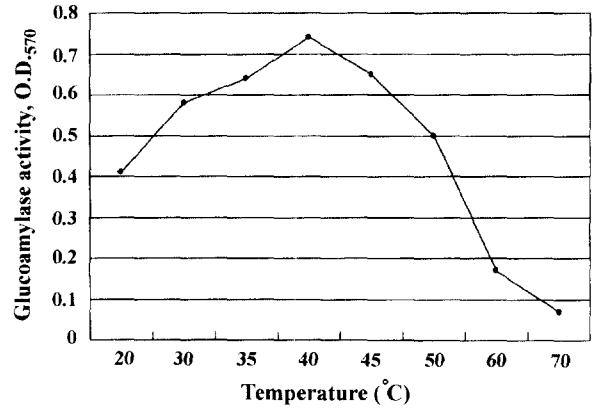
**Fig. 3.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis following purification steps. A, myosin(200,000Da); B, phosphorylase b (97,400Da); C, bovine serum albumin (68,000Da); D, ovalbumin (43,000Da); E, carbonic anhydrase (29,000Da); F, lactoglobulin (18,400Da); G, lysozme (14,300Da).



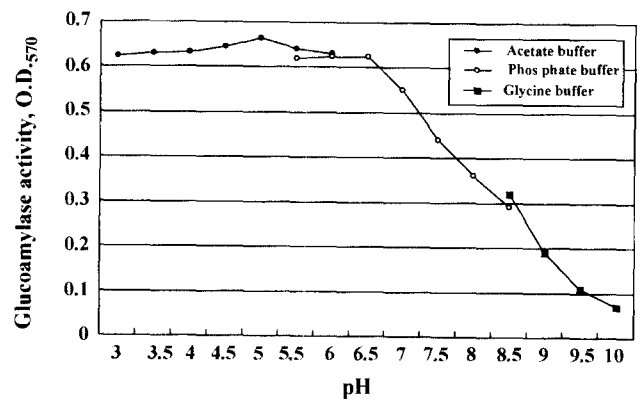
**Fig. 4.** Determination of molecular weight of glucoamylase by SDS-PAGE. A, myosin (200,000Da); B, phosphorylase b (97,400Da); C, bovine serum albumin (68,000Da); D, ovalbumin (43,000Da); E, carbonic anhydrase (29,000Da); F, lactoglobulin (18,400Da); G, lysozme (14,300Da); a, gel permeation; b, SDS-PAGE

**분자량 결정**

Fig. 4에 나타난 바와 같이 SDS-PAGE에 의하여 정제된 효소의 분자량을 측정된 결과 57 kDa의 단일 단백질임을 확인할 수 있었다. 또한, Sephadex G-150 gel permeation chromatography에 의하여 정제된 glucoamylase의 분자량을 측정된 결과 역시 57.5 kDa로 동일한 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과로 이러한 효



**Fig. 5.** Effect of temperature on glucoamylase activity.



**Fig. 6.** Effect of pH on glucoamylase activity.

소가 단일 소단위체로 이루어져 있음을 알 수 있었고 다른 효모의 정제 glucoamylase와 비교하여 볼 때 서로 다른 분자량을 나타내지만, 특히, *Saccharomyces diastaticus*의 56 kDa와는 유사함을 알 수 있었다(1,17,24,36,8,30,23).

**Glucoamylase의 특성**

정제된 효소의 활성에 미치는 온도효과를 알아보기 위하여 20~70°C사이의 효소활성을 측정하여 Fig. 5에 나타내었는데 그 결과 40°C에서 최적의 활성을 나타내었으며 50°C이하에서는 효소활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 일반적인 균류의 최적 온도가 40~60°C임을 생각할 때, *Lactobacillus amylovorus*의 45°C와는 유사하지만 *Aspergillus flavus* 60°C, *Aspergillus niger* 60°C와는 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다(1,22,30). 또한 효소 활성에 미치는 pH의 효과를 알아보기 위하여 3.0~10.0까지의 효소활성을 비교한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 정제된 glucoamylase의 최적 pH는 5.0임을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 *Aspergillus flavus* 4.0, *Aspergillus terreus* 5.0, *Saccharomyces diastaticus* 5.1, *Rhizopus* 속 4.5~5.0, *Aspergillus niger* 4.4와 상당히 유사한 경향을 나타내었다(1,11,15,36, 22). 그리고 여러 농도의 기질에 대한 효소의 활성을

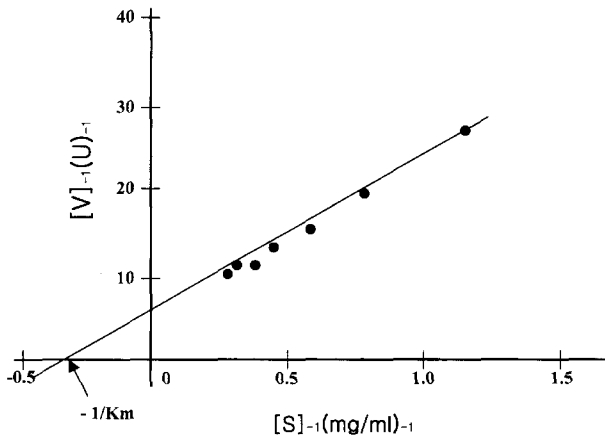


Fig. 7. Effect of substrate concentration by Lineweaver-Burk plot

Table 2. Effects of divalent metal cations on glucoamylase activity from hybrid between *Saccharomycopsis* sp. and *Saccharomyces* sp.

	None	100 (%)
Ca <sup>2+</sup>		87
Co <sup>2+</sup>		91
Cu <sup>2+</sup>		119
EDTA (1 mM)		89
Fe <sup>2+</sup>		129
Mg <sup>2+</sup>		93
Mn <sup>2+</sup>		92
Ni <sup>2+</sup>		117
Zn <sup>2+</sup>		103

측정하여 Lineweaver-Burk plot에 의하여 Km 값을 결정하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 정제효소의 가용성 전분에 대한 Km값은 2.6 mg/ml를 나타내었다. 이와 같은 결과는 *Aspergillus flavus* 2.85 mg/ml와는 유사하지만 *Aspergillus terreus* 5.9 mg/ml, *Aspergillus niger* 3.5 mg/ml 차이가 나는 것을 알 수 있었다(1,11,27). 더욱이, 정제 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사하여 Table 2에 나타내었는데 그 결과 정제된 효소는 Ca<sup>2+</sup>, EDTA, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 그리고 Mn<sup>2+</sup>의 존재 하에 활성이 증진됨을 알 수 있었다. 그러나, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에서는 오히려 효소활성이 억제되는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과에서 *Aspergillus flavus*는 Hg<sup>2+</sup>, *Rhizopus* 속은 Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, *Aspergillus niger*는 Hg<sup>2+</sup>를 억제하여 다른 양상을 보였지만, *Aspergillus niger*의 경우 Mn<sup>2+</sup>과 Fe<sup>2+</sup>는 효소활성을 촉진시켜 유사한 결과를 나타냄을 알 수 있었다(1,2,29,30,36,37).

감사의 글

본 연구는 1999년도 조선대학교 학술연구비 지원에 의해 수행하였으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Abyad, M.S., A.R. Shanshoury, and M. Hafez. 1994. Purification and characterization of the glucoamylase produced by a strain of *Aspergillus flavus*. *Microbios*. 80, 7-15.
2. Amirul, A.A., S.L. Khoo, M.N. Nazalan, M.S. Razip, and M.N. Azizan. 1996. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 41, 165-174.
3. Aquino, A.C., J.A. Jorge, H.F. Terenzi, and M.L. Polizeli. 2001. Thermostable glucose-tolerant glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Folia Microbiol. (Praha)* 46, 11-16.
4. Augustin, J. 2000. Polysaccharide hydrolases of *Aureobasidium pullulans*. *Folia Microbiol. (Praha)* 45, 143-146.
5. Cepeda, E., M. Hermosa, and A. Ballesteros. 2001. Optimization of maltodextrin hydrolysis by glucoamylase in a batch reactor. *Biotech. Bioeng.* 76, 70-76.
6. Christensen, U. 2000. pH-dependence of the fast step of maltose hydrolysis catalysed by glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 349, 623-628.
7. De Gouveia, T. and B.V. Kilikian. 2000. Bioaffinity extraction of glucoamylase in aqueous two-phase systems using starch as free bioligand. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 743, 241-246.
8. De Mot, R. and H. Verachtert. 1985. Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast viron. *Microbiol.* 50, 1474.
9. Dubey, A.K., C. Suresh, R. Kavitha, N.G. Karanth, and S. Umesh-Kumar. 2000. Evidence that the glucoamylases and alpha-amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme. *FEBS Lett.* 471, 251-255.
10. Elder, M.T. and R.S. Montgomery. 1995. Glucoamylase activity in industrial enzyme preparations using colorimetric enzymatic method: collaborative study. *J. AOAC Int.* 78, 398-401.
11. Fagerstrom, R., A. Vainio, K. Suoranta, T. Pakula, N. Kalkkinen, and H. Torkkeli. 1990. Comparison of two glucoamylases from *Hormoconia resiniae*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 913-920.
12. Ganghofner D., J. Kellermann, W.L. Staudenbauer, and K. Bronnenmeier. 1998. Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and an alpha-glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 302-308.
13. Ge Y., Y. Wang, H. Zhou, S. Wang, Y. Tong, and W. Li. 1999. Coimmobilization of glucoamylase and glucose isomerase by molecular deposition technique for one-step conversion of dextrin to fructose. *J. Biotechnol.* 67, 33-40.
14. Ghose, A., B.S. Chatterjee, and A. Das. 1990. Characterization of glucoamylase from *Aspergillus terreus* 4. *FEMS Microbiol. Lett.* 54, 345-349.
15. Ghosh, A., B. Chatterjee, and A. Das. 1991. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 162-169.
16. Giordano, R.L., P.C. Hirano, L.R. Goncalves, and W.S. Netto. 2000. Study of biocatalyst to produce ethanol from starch. Coimmobilization of glucoamylase and yeast in gel. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 86, 643-654.
17. Goto, M., E. Kuwano, W. Kanlayakrit, and S. Hayashida. 1995. Role of the carbohydrate moiety of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* in the digestion of raw starch. *Biosci.*

- Biotechnol. Biochem.* 59, 16-20.
18. James, J.A. and B.H. Lee. 1995. Cultural conditions for production of glucoamylase from *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33621. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 499-505.
  19. James J.A., J.L. Berger, and B.H. Lee. 1997. Purification of glucoamylase from *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33621. *Curr. Microbiol.* 34, 186-191.
  20. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
  21. Manjunath, P. and B.C. Shenoy, MR. Raghavendra Rao. 1983. Fungal glucoamylases. *J. Appl. Biochem.* 5, 235-260.
  22. Minami, N.M. and B.V. Kilikian, 1998. Separation and purification of glucoamylase in aqueous two-phase systems by a two-step extraction. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 711, 309-312.
  23. Nagasaka, Y., K. Kurosawa, A. Yokota, and F. Tomita, 1998. Purification and properties of the raw-starch-digesting glucoamylases from *Corticium roffsii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 323-330.
  24. Natarajan, S.K. and M.R. Sierks, 1996. Identification of enzyme-substrate and enzyme-product complexes in the catalytic mechanism of glucoamylase from *Aspergillus awamori*. *Biochemistry* 35, 15269-15279.
  25. Pandey, A., P. Nigam, C.R. Soccol, V.T. Soccol, D. Singh, and R. Mohan. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 135-52. Review.
  26. Park, I.S. and Y.H. Chung, 1989. Some factors affecting glucoamylase production from *Aspergillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17, 519-523.
  27. Pedersen, H., M. Beyer, and J. Nielsen. 2000. Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivations by an industrial strain of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 272-7.
  28. Porro, D., M. Venturini, L. Brambilla, L. Alberghina, and M. Vanoni. 2000. Relating growth dynamics and glucoamylase excretion of individual *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Microbiol. Methods* 42, 49-55.
  29. Sauer J., T. Christensen, T.P. Frandsen, E. Mirgorodskaya, K.A. McGuire, H. Driguez, P. Roepstorff, B.W. Sigurskjold, and B. Svensson. 2001. Stability and function of interdomain linker variants of glucoamylase I from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* 40, 9336-9346.
  30. Selvakumar P., L. Ashakumary, A. Helen, and A. Pandey, 1996. Purification and characterization of glucoamylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 403-406.
  31. Sierks M.R., C. Sico, and M. Zaw, 1997. Solvent and viscosity effects on the rate-limiting product release step of glucoamylase during maltose hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 13, 601-608.
  32. Sills, A.M., M.E. Sauder and G.G. Stewart. 1984. Isolation and characterization of the amylolytic system of *Schwanniomyces castellii*. *J. Inst. Brew.* 90, 311-314.
  33. Singh, D., J.S. Dahiya, and P. Nigam. 1995. Simultaneous raw starch hydrolysis and ethanol fermentation by glucoamylase from *Rhizoctonia solani* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Basic Microbiol.* 35, 117-121.
  34. Southall, S. M., P. J. Simpson, H. J. Gilbert, G. Williamson, and M. P. Williamson. 1999. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett.* 447, 58-60.
  35. Suresh C., A. K. Dubey, R. Kini, S. Umesh-Kumar, and N. G. Karanth. 1999. Separation and direct detection of raw and gelatinized starch hydrolyzing activities of glucoamylase on isoelectric focusing gels. *Electrophoresis* 20, 483-485.
  36. Takahashi, T., Y. Tsuchida, and M. Irie, 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* species. *J. Biochem.* 84, 1183-1194.
  37. Tanaka A., S. Karita, Y. Kosuge, K. Senoo, H. Obata, and N. Kitamoto, 1998. Thermal unfolding of the starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2127-2132.
  38. Ueda, S. and B.C. Saba. 1983. Behaviour of *Endomycopsis fiburigera* glucoamylase towards raw starch. *Enzyme Microbiol. Technol.* 5, 196-198.
  39. Wallis, G.L., R.J. Swift, R. Atterbury, S. Trappe, U. Rinas, F.W. Hemming, M.G. Wiebe, A.P. Trinci, and J.F. Peberdy. 2001. The effect of pH on glucoamylase production, glycosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys. Acta.* 1527, 112-122.
  40. Wilson, J.J. and W.M. Ingledew. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces allivius* amylolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 301-307.
  41. Yamamoto, T., 1988. Handbook of amylase and related enzymes, their sources isolation methods, properties and applications. The Amylase Research Society of Japan. Osaka.
  42. Yoshigi, N., J. Chikano, and M. Kamimura, 1985. Purification and properties of an amylase from *Bacillus cereus* NY-14. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3369-3376.

(Received August 16, 2001/Accepted September 12, 2001)

---

**ABSTRACT : Production of Glucoamylase from Hybrid Constructed by Intergenic Nuclear Transfer between *Saccharomycopsis* sp. and *Saccharomyces* sp.**

**Young Ki Yang\***, Chae Young Lim, Jong Kwun Kim, Myeng Nim Moon, and Young Ha Rhee<sup>1</sup> (Department of Biological Sciences, Chosun University, Gwangju 501-759, <sup>1</sup>Department of Microbiology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

The glucoamylase was purified from the induced culture filtrate of hybrid between *Saccharomycopsis* sp. and *Saccharomyces* sp. made by nuclear transfer and characterized for some enzyme properties. The enzyme was purified 76-fold in an overall yield of 16% from the culture medium by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-150 gel permeation chromatography and DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography. The molecular weight of the purified glucoamylase was estimated to be 57.5 KDa on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Sephadex G-150 gel permeation chromatography. The purified enzyme was active at pH 5.0 and 40°C. The *K<sub>m</sub>* value for soluble starch was 2.6 mg/ml. The enzymatic activity was stimulated in the presence of Ca<sup>2+</sup>, EDTA, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>.