

전분 분해성 산업용 *Saccharomyces cerevisiae*에서 *Achlya bisexualis* β -Amylase의 발현 특성 규명

이옥희¹ · 임미현¹ · 김지혜¹ · 유은혜¹ · 고현미¹ · 진종언² · 배 석^{1*}

¹전남대학교 자연과학대학 생물학과, ²동강대학 피부미용계열

β -Amylase를 생산하여 전분 분해능을 갖는 산업용 효모를 개발하기 위해 산업용 *Saccharomyces cerevisiae*에서 *Achlya bisexualis* β -amylase (*BAMY*) 유전자를 *ADCI* promoter에 연결하여 구성적으로 발현시켰다. 효모의 형질 전환은 δ -서열을 제조합 부위로 하는 integration 시스템을 이용하였다. Integration 시스템의 세균 유전자 부분은 제거되고 *BAMY* 유전자와 δ -서열을 갖고 있는 짧은 integrative cassette를 제조하였다. *BAMY* 유전자를 발현하는 제조합 *S. cerevisiae* 형질전환체는 세포의 배지로 45 kDa의 β -amylase를 분비하였고, β -amylase 활성은 *A. bisexualis*에 비해 약 18.5배 높았다. 형질전환체에 다중도입된 *BAMY* 유전자는 미선택배지에서 100세대 성장 후에도 안정되게 유지되었다. 각종 전분을 기질로 했을 때 β -amylase의 활성은 soluble starch를 기질로 했을 경우와 유사하게 높았고, 가수분해산물 분석 결과 maltose가 주 분해산물이었다.

Key words □ *Achlya bisexualis*, β -amylase, industrial *Saccharomyces cerevisiae*

전분은 발효 공정에 가장 널리 이용되고, 비교적 가격이 저렴 소 다음으로 저렴한 기질이다. 전분은 α -amylase, β -amylase, glucoamylase, 그리고 절지효소(debranching enzyme)와 같은 여러 가지 효소에 의해 가수분해 된다. 이들 효소 중 식품 및 음료산업에서는 β -amylase를 전분으로부터 맥아당(maltose)을 생산하는데 이용하고 있다. 특히 맥주 제조과정에서 β -amylase는 보리의 전분을 가수분해하는 과정에 중요한 역할을 한다(3, 5, 8). β -Amylase (1,4- α -glucan maltohydrolase, E.C. 3.2.1.2)는 주로 식물과 일부 세균에 존재하는 전분 가수분해효소로서 전분의 비환원 말단으로부터 α -1,4 배당결합을 분해하는 exo-enzyme이며 연속적으로 β -맥아당을 분리시킨다. 보리, 콩, 고구마 그리고 애기장대(*Arabidopsis*) 등의 식물에서, 그리고 *Bacillaceae* (*Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *B. circulans*, 그리고 *Clostridium thermosulfurogenes* 등)에서의 β -amylase 유전자들이 클로닝되고 그 특성이 규명되었지만(18, 19) 사상 진균류와 효모류에서는 β -amylase 유전자들에 관한 연구 보고가 없었다. 최근 난균류(Oomycota)인 물곰팡이(*Saprolegniaceae*)의 전분분해능이 β -amylase에 의한 것으로 밝혀졌고 *Saprolegnia ferax*, *Spl. parasitica*와 *Achlya bisexualis*로부터 β -amylase 유전자가 클로닝되고 실험실용 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현된 바 있는데 이들 중 *A. bisexualis*의 β -amylase 활성이 가장 높았다(11, 12, 13).

*S. cerevisiae*는 양조 및 제빵 산업에 필수적이고 세포 자체가 양질의 단백질과 비타민이 풍부한 GRAS (Generally Recognized as Safe) 미생물이므로 산업적으로 사료와 건강보조식품으로 널리

이용되고 있으나 탄소원 기질로 단당류나 이당류 같은 가용성 당분만을 이용할 수 있고 전분 같은 다당류는 이용할 수 없다(17, 21, 24). 따라서 전분을 이용할 수 있는 산업용 *S. cerevisiae* 균종개발을 위해 α -amylase나 glucoamylase 유전자를 발현하는 *S. cerevisiae*가 제조된 바 있다(4, 5, 7, 14, 24). 여기에 고효율로 β -amylase 유전자를 발현하는 산업용 *S. cerevisiae*가 개발된다면 α -amylase나 glucoamylase 생산 균주와의 공동발현을 통해 농도의 전분을 단기간에 완전분해가 가능할 것이다.

본 연구에서는 β -amylase를 생산하는 산업용 *S. cerevisiae*를 제조하기 위해 이 효모의 염색체에 널리 분포하고 있는 δ -서열(1, 2, 5, 16)에 *A. bisexualis* β -amylase 유전자(*BAMY*)를 다중도입하였고 얻어진 형질전환체들 중 전분을 이용하여 성장하면서 β -amylase를 고효율로 생산, 분비하는 산업용 *S. cerevisiae* 균주를 선발하였다. 전분분해능이 우수한 새로운 균주의 생장률, 각종 전분 이용능, 효소활성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

Escherichia coli DH5 α 는 형질전환숙주와 plasmid 제조 및 증폭에 사용되었으며, *Achlya bisexualis* CBS 102.50은 Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS, Netherlands)에서 구입하여 *BAMY* 유전자의 공여균주로 이용되었다. 실험실용 반수체 *S. cerevisiae* W303-1A (9)와 산업용 다베체 *S. cerevisiae* ATCC 9763 (20)을 효모 형질전환 숙주로 이용하였다. *E. coli* 효모 양복 벡터인 pACB (13)와 YIp δ AUR δ (22)가 벡터제조에 골격으로 이용되었고, pGEM-T Easy 벡터(Promega, USA)는 poly-

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-62-530-3412, Fax: 82-62-530-3409

E-mail: sukbai@chonnam.ac.kr

merase chain reaction (PCR)을 통해 증폭된 유전자의 클로닝에 이용되었다.

배지와 배양조건

E. coli 형질전환체는 50 μ g/ml ampicillin이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지에서 배양하였고, 효모 배양에는 YPD 배지(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone and 2% glucose)가 사용되었다. 산업용 다배체 효모형질전환 배지는 YPD 배지에 1 μ g/ml aureobasidin A (TaKaRa, Japan)을 첨가하여 사용하였다. 또한 *BAMY* 유전자가 도입된 효모형질전환체는 상기 배지에 3% soluble starch가 함유된 평판배지에서 30°C에서 2일간 배양한 후 4°C에서 2일간 유지시켰다. β -Amylase 활성능은 위 배지에서 배양한 콜로니주위의 투명화 크기로 활성 유무를 판별하였다. β -Amylase 활성능을 측정하기 위해서 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)이 함유된 Buffered YPS 액체배지인 BYPS2~BYPS6 (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, and 2~6% soluble starch)를 이용하였다. 배지의 잔존 전분 함량은 Kim 등(14)의 방법에 따라 요오드 용액(0.4% iodine, 2% KI)를 이용하여 전분-요오드 반응에 의해 측정하였다.

유전자 추출과 *Saccharomyces cerevisiae* 형질전환

*E. coli*에서 plasmid DNA의 추출은 QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 수행하였고, PCR 증폭 DNA는 QIAquick PCR Purification Kit와 QIAquick Gel Extraction Kit를 이용하였다. DNA 분석과 형질전환은 Sambrook과 Russell 방법(21)에 따라 실시하였다. 한편, 효모의 형질전환은 Gietz 등(5)의 방법에 의해 실시하였다.

β -Amylase 유전자의 PCR 증폭

β -Amylase 유전자와 *CYC1T*를 증폭하기 위해 pACB의 염기서열을 이용하여 제작한 PCR primers의 정방향 염기서열은 5'-TGCTCGCGAATGTTTGGTCAATTGGITTTG-3'이고

*Nru*I

역방향 서열은 5'-AGGGCCCGGTACGTAGAGCTCGCCGCAA
SmaI SacI

ATTAAAGCC-3'이었다. PCR 조건은 95°C에서 30초간, 55°C에서 30초간, 72°C에서 60초 동안 35 cycles로 하였다. 주형 DNA에 이용할 효모의 genomic DNA 추출은 Zhu 등(26)의 방법에 의해 실시하였다.

재조합 벡터 제조

A. bisexualis *BAMY* 유전자는 *URA3*를 선별 표지 유전자로 함유하고 있는 pACB를 이용하여 실험실용 반수체 *S. cerevisiae* W303-1A 등에서 발현된 바 있다(13). 그러나 영양요구성 표지 인자가 없는 야생형 산업용 다배체 *S. cerevisiae* ATCC 9763에서 *BAMY* 유전자의 고효율 발현을 위해서 표지인자인 aureobasidin A 저항성 유전자(*AUR1-C*)와 두 개의 δ 서열이 있는 YIp δ AUR δ (22)를 *Sma*I-*Sac*I처리하고 여기에 PCR로 증폭한

pACB 내의 *BAMY* 유전자와 *CYC1* terminator가 포함된 1.6 kb *Nru*I-*Sac*I DNA절편을 삽입하여 p δ AURAB δ 를 제조하였다(Fig. 1).

실시간 중합 효소 연쇄반응(Real-time PCR)

실시간 중합효소 연쇄반응에 이용한 *BAMY* 유전자와 β -actin 유전자의 primers는 다음과 같다.

BAMY : 5'-TGCTCGCGAATGTTTGGTCAATTGGITTTG-3'

5'-TGACATGACCATTTGAATGGTCAAG-3'

β -actin : 5'-GATCTGGCACCACACCTTCT-3'

5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'

실시간 중합효소 연쇄반응은 *A. bisexualis* 및 *S. cerevisiae* 형질전환체들의 genomic DNA와 *BAMY* 혹은 β -actin primers, SYBR Green PCR Master Mix Reagent Kit (QIAGEN, USA) 10 μ l를 혼합한 후 95°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초간 반응시켰으며, Roter-Gene 3000 System (Corbett Research, Morklake, Australia)을 이용하여 수행하였다. 유전자 발현 정도는 C_t 값을 이용해 정량화하고, β -actin을 대조군으로 표준화하였으며, 유전자공여균주를 기준으로 증가된 fold로 표현하였다.

***BAMY* 유전자의 안정성 조사**

BAMY 유전자가 도입된 형질전환체를 Nieto 등(21)의 방법에 따라 5 ml YPD 배지에서 계대배양하면서 20, 40, 60, 80, 100 세대 후 세포를 취하여 YPD 평판배지에 단일 콜로니들이 형성 되도록 도말하고 YPS 평판배지에 옮겨 전체 콜로니 중 주위에

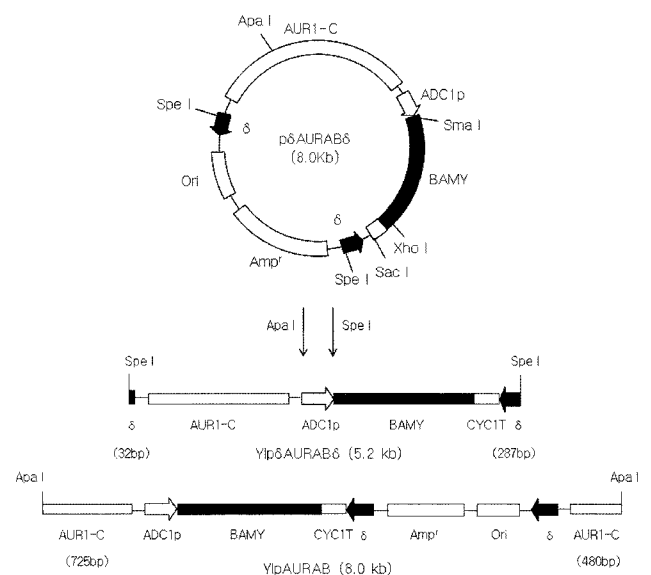


Fig. 1. Recombinant plasmid, p δ AURAB δ , for the *BAMY* gene expression in *S. cerevisiae* ATCC 9763. Plasmid maps showed relative sizes and location of insert DNA. p δ AURAB δ was linearized by the digestion of *Spe*I to generate YIp δ AURAB δ . The bacterial plasmid DNA sequences containing the ampicillin resistance gene and replication origin (2.8 kb) were excised. p δ AURAB δ was linearized by the digestion of *Apa*I, generating YIpAURAB.

투명환이 형성되는 콜로니를 백분율로 산출하여 도입된 *BAMY* 유전자의 안정성을 결정하였다.

β -Amylase 활성 측정

효소 활성 측정은 Kim 등(11)의 방법에 따라 원심분리된 배양 상등액 50 μ l을 950 μ l의 0.5% soluble starch를 포함한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0)에 가하여 50°C에서 10분간 반응시켰다. 효소 활성의 1 unit (U)는 ml당 1 μ mole 환원당을 유리시키는 효소의 양으로서 나타내었다.

단백질 전기영동(SDS-PAGE)과 Thin-layer chromatography (TLC)

Laemmli 등(15)의 방법에 따라 slab gel (10%)에서 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다. 전기영동은 vertical slab gel electrophoresis apparatus (Hoeffer Scientific Co., USA)에서 40 mA, 3시간 30분 동안 실시하였다. Gel 염색은 0.25% Coomassie brilliant blue R250을 이용하였고, 탈색은 40% ethanol과 10% acetic acid 혼합 용액을 이용하였다. 가수분해 산물의 TLC 분석은 Ghang 등(5)의 방법에 따라 실시하였다. Soluble starch 외 4종의 전분을 0.5%가 되도록 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)에 현탁시킨 기질용액 1 ml에 배양 상등액 50 μ l를 처리하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 반응액을 Silica gel plate에 전개시켰다.

결과 및 고찰

산업용 *S. cerevisiae*에서 *A. bisexualis* *BAMY* 유전자의 발현을 위한 δ -integrating cassette 제조

유전자 내에 *XhoI* 부위가 없는 *Debaryomyces occidentalis* glucoamylase 유전자(*GAMI*)가 포함된 벡터(5)와 달리 $p\delta$ AURAB δ 는 *BAMY* 유전자내에 *XhoI* 부위가 있으므로 두 균에 δ -서열 내에 존재하는 *XhoI* 부위를 *XhoI* 제한효소처리로 *BAMY* 유전자를 포함하는 선형화된 integrating cassette를 제조할 수 없었다. 그러므로 δ -서열 내 *XhoI* 부위 대신 5' 부위에 치우쳐 있는 *SpeI* 부위(δ -서열의 5' 절편 32 bp, 3' 절편 267 bp)를 *SpeI* 제한효소로 처리하여 $p\delta$ AURAB δ 로부터 5.2 kb $YIp\delta$ AURAB δ 절편과 2.8 kb ampicillin 저항성 유전자와 세균 복제점이 포함된 DNA 절편을 분리하였다. 5.2 kb DNA 절편은 전기영동 후 agarose gel에서 회수하여 효모 형질전환에 이용하였다. 또한, $p\delta$ AURAB δ 의 *AURI-C* 유전자에 있는 *ApaI* 부위를 *ApaI* 제한효소로 처리하여 재조합 부위가 δ -서열 대신 *AURI-C* 유전자인 8.0 kb의 선형화된 integrating 벡터(YIp AURAB)를 제조하였다(Fig. 1).

사용된 *S. cerevisiae*는 다배체 효모이므로 염색체에 도입된 *BAMY* 유전자의 정확한 copy수 측정은 할 수 없었으나 형질전환체(ATCC 9763/ $YIp\delta$ AURAB δ) 염색체 내에 *BAMY* 유전자 다중 도입여부를 알기 위해 *BAMY* 유전자의 염기서열의 5' 부분(약 0.3 kb)을 이용하여 제작된 primers로 real-time PCR을 실시한 결과, 이배체인 *A. bisexualis*에 비해 형질전환체는 *BAMY* 유전자

를 약 330배 함유하고 있어 *BAMY* 유전자가 염색체에 다중 도입되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). δ -서열내에 *BAMY* 유전자가 다중도입된 형질전환체에서는 YIp AURAB를 이용하여 도입된 *BAMY* 유전자 copy수가 낮은(15배) 형질전환체(ATCC 9763/ YIp AURAB)에 비해 β -amylase 활성이 크게 증진되었다. Endo/exo-glucanase 유전자와 β -glucosidase 유전자를 *S. cerevisiae* δ -서열 내 도입한 Cho 등(2)도 형질전환체의 효소 활성을 증진시키기 위해서는 도입되는 유전자의 copy수를 증가시켜야 한다고 보고한 바 있다.

산업용 *S. cerevisiae*에서 *BAMY* 발현과 분비

산업용 *S. cerevisiae* ATCC 9763이 β -amylase 활성과 aureobasidin A 저항성(*BAMY*⁺, *AURI-C*)을 보유하기 위해 선형화된 $YIp\delta$ AURAB δ 로 형질전환시켜 ATCC 9763/ $YIp\delta$ AURAB δ 를 얻었다. 3% soluble starch가 함유된 배지에서 *S. cerevisiae* 숙주 균주와 달리 형질전환체는 콜로니 주위에 전분 분해결과로 생긴 투명환을 형성하였다(Fig. 3). β -Amylase 활성이 우수한 ATCC 9763/ $YIp\delta$ AURAB δ 를 탄소원이 2% soluble starch가 함유된 BYPS2 배지에서 배양했을 때 전혀 생장하지 못하는 *S. cerevisiae* ATCC 9763 숙주 균주와 달리 배양 1일부터 왕성히 성장하였고 4일 배양했을 때 배양 상등액으로부터 형질전환체에서 분비된 β -amylase 활성은 22.2 U/ml이었으며(Fig. 4), 이는 *A. bisexualis* β -amylase 활성(1.2 U/ml)보다 약 18.5배 높았다(Fig. 2). Kim 등(13)의 보고에 의하면 본 연구와 같은 배양 조건에서 2 μ origin이 있는 YEp plasmid인 $pACB$ 로 형질전환된 반수체 *S. cerevisiae* 형질전환체들에서의 β -amylase 활성은 20.5~29.0 U/ml이었다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 BYPS2 배지에서 배양 1~5일째 ATCC 9763/ $YIp\delta$ AURAB δ 의 배양 상등액을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 탄소원으로 전분(BYPS2)을 이용하여 성장하지 못하

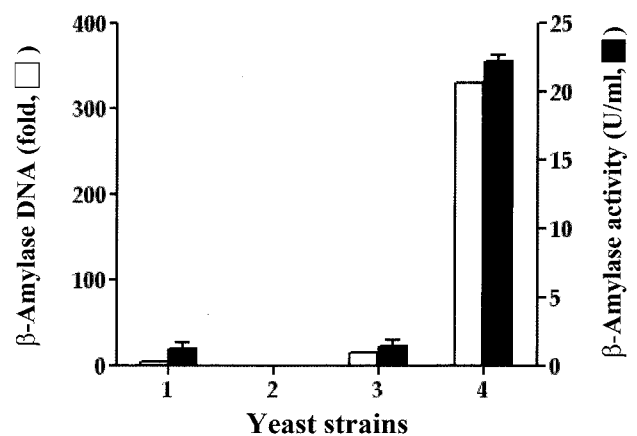


Fig. 2. Real-time PCR of *BAMY* gene integrated into *AURI-C* gene and δ -sequences of *S. cerevisiae* chromosomes and expression level (β -amylase activity). Genomic DNAs isolated from *A. bisexualis* (1), *S. cerevisiae* ATCC 9763 (2), ATCC 9763/ YIp AURAB (3) and ATCC 9763/ $YIp\delta$ AURAB δ (4). Equal quantities (0.1 μ g) of genomic DNAs were used as template DNA. Values are expressed as Means \pm SEM.

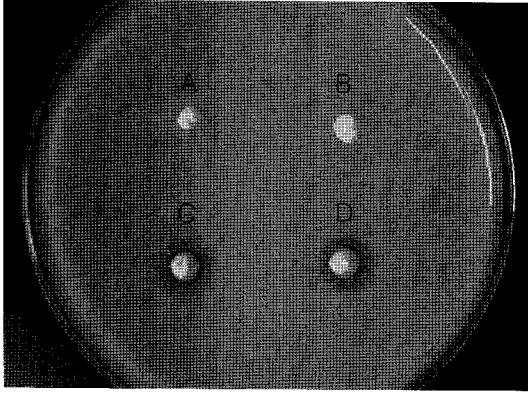


Fig. 3. Amyolytic activities of *S. cerevisiae* transformants harboring pACB and YIp δ AURAB δ on YPDS3 (YPD containing 3% soluble starch) plate. Halo only developed around colonies secreting β -amylase. A, *S. cerevisiae* W303-1A; B, *S. cerevisiae* ATCC 9763; C, W303-1A/pACB; D, ATCC 9763/YIp δ AURAB δ .

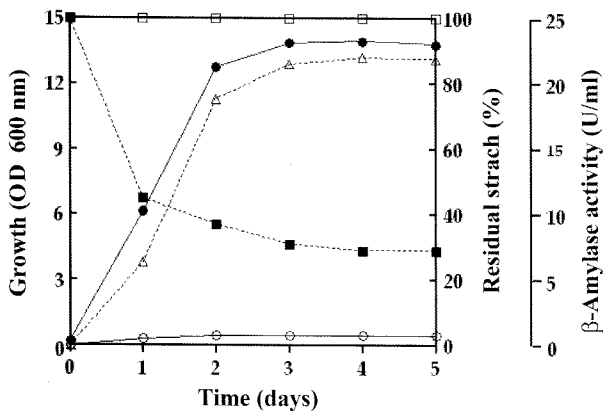


Fig. 4. Growth curve and time course of starch hydrolysis and extracellular β -amylase activities in BYPS2 medium. At different days, yeast growth was measured by the optical density at 600 nm, and β -amylase activities were measured in the culture supernatants. The remaining starch is presented as percentages, with 100% as the starch in the uninoculated medium. Each point represents the means of three independent measurements with a standard deviation of $\pm 5\%$. (O) OD 600 nm *S. cerevisiae* ATCC 9763 growth; (●) OD 600 nm ATCC 9763/YIp δ AURAB δ growth; (Δ) U/ml β -amylase activities of ATCC 9763/YIp δ AURAB δ ; (\square) starch % residual starch in *S. cerevisiae* ATCC 9763; (\blacksquare) starch % residual starch in ATCC 9763/YIp δ AURAB δ .

로 대신 포도당(BYPD)을 이용하여 생장한 *S. cerevisiae* ATCC 9763 숙주 균주에서는 보이지 않는 약 45 kDa의 β -amylase를 분비하였고(11), 단백질밴드의 양상을 보면 배양 초기 1일째는 매우 약했으나 그 이후는 분비가 증가하여 β -amylase 활성이 증진됨을 알 수 있었다. ATCC 9763/YIp δ AURAB δ 는 배양 1일째에 2% soluble starch의 55%를 가수분해하여 이용하였고 배양 3일째 70% 수준까지 가수분해 하였으나 그 이후에는 완전히 분해하지 못했다. 이는 비환원 말단으로부터 α -1,4 배당결합만을 분

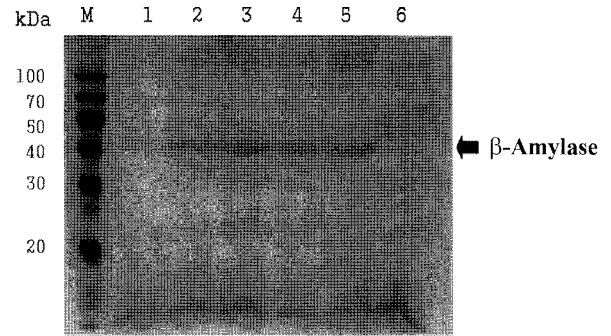


Fig. 5. SDS-PAGE of culture supernatants from *S. cerevisiae* ATCC 9763 and ATCC 9763/YIp δ AURAB δ . Culture supernatants (1~5, ATCC 9763/YIp δ AURAB δ ; 6, *S. cerevisiae* ATCC 9763) sampled at a given time were tenfold concentrated. *S. cerevisiae* ATCC 9763 was cultured in BYPD. Lanes: M, Molecular size markers, in kilodaltons (kDa); 1, 1-day growth; 2, 2-day growth; 3, 3-day growth; 4, 4-day growth; 5, 5-day growth; 6, 4-day growth.

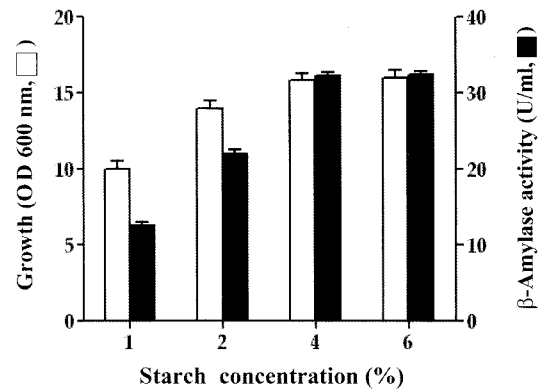


Fig. 6. Cell growths and extracellular β -amylase activities of ATCC 9763/YIp δ AURAB δ in BYPS media containing 1~6% soluble starch. Yeast cells were grown in the BYPS media containing 1~6% soluble starch at 30°C for 4 days. Values are expressed as Means \pm SEM.

해할 수 있는 β -amylase가 전분내의 α -1,6 배당결합 부분을 공격하지 못하기 때문에 전분 내부의 α -1,4 배당결합을 가수분해하는 α -amylase와 달리 가수분해가 더 이상 진행되지 못한 것으로 사료된다(5, 10, 14, 24). 따라서 이용할 수 있는 전분함량의 증가로 세포의 생장을 극대화하기 위해 ATCC 9763/YIp δ AURAB δ 를 전분이 2%이상 함유한 배지에서 배양한 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 4% 전분 함유 배지에서는 2% 전분 함유 배지에서도 세포 생장이 증가되었고 β -amylase 활성도 33.2 U/ml로 약 1.5배 증진되었으나 4% 이상 전분이 함유된 배지에서는 세포 생장과 효소 활성이 4% 전분 배지에서 얻어진 결과와 동일하였다. 이는 배지 내의 다른 성분의 고갈과 대사산물의 증가에 기인한 것으로 사료된다.

형질전환체에 도입된 *BAMY* 유전자의 안정성을 알아보기 위해서 ATCC 9763/YIp δ AURAB δ 를 비선택 YPD 배지에 100세대 동안 배양하였다. 배양 후 YPS 배지에서 자란 형질전환체들은

Table 1. Hydrolysis of several starches by the action of β -amylase from ATCC 9763/YIp δ AURAB δ grown in BYPS2 and BYPS4

Substrates	β -Amylase activities ^a (U/ml)	
	BYPS2	BYPS4
Soluble starch	22.2 ^b	33.2
Corn starch	23.7	32.6
Potato starch	22.8	31.1
Rice starch	24.7	35.6
Wheat starch	23.3	32.3

^a Yeast cells were grown in the BYPS media containing 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) for the assay of β -amylase activity at 30°C for 4 days. BYPS2 and BYPS4 mean BYP containing 2% starch and 4% soluble starch, respectively.

^b Values are means of results from triplicate experiments, expressed in β -amylase activities present in the culture supernatants.

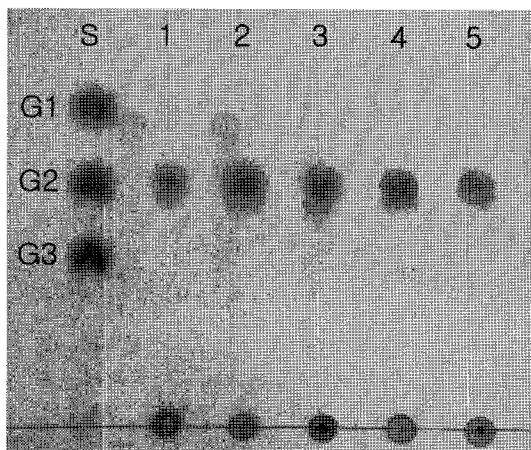


Fig. 7. Thin-layer chromatography of the enzymatic products from various starches by β -amylase of ATCC 9763/YIp δ AURAB δ . Lanes: S, standards (G1, glucose; G2, maltose; G3, maltotriose); 1, enzyme plus soluble starch; 2, enzyme plus corn starch; 3, enzyme plus potato starch; 4, enzyme plus rice starch; 5, enzyme plus wheat starch.

100% 모두 콜로니 주위에 투명환을 나타내었다. 이것은 δ -도입된 *BAMY* 유전자가 형질전환체의 염색체에 존재하고 있다는 것을 알 수 있었다(2, 5). *BAMY* 유전자를 포함한 순수 효모 유래 DNA만의 염색체 내 안정적 도입은 식품과 음료산업에서 안전한 재조합 DNA 기술의 상업적 활용을 가능하게 할 것으로 사료된다(17, 21).

Table 1에서 보는 바와 같이 soluble starch를 기질로 했을 때와 유사하게 타 전분(corn starch 외 3종)에 대한 *A. bisexualis* β -amylase의 활성이 높았다. 또한 rice starch의 경우 생전분을 기질로 했을 때도 β -amylase의 활성이 16 U/ml로 높았다. 각종 전분에 대한 β -amylase의 가수분해 산물을 TLC로 분석한 결과(Fig. 7) 맥아당(maltose)이 주산물임을 알 수 있었고(13) 포도당과 올리고당은 존재하지 않았다. 이런 결과로 본연구의 β -amylase는 각종 식물유래 전분을 이용하여 효율적으로 빠른 시

간 내에 maltose syrup을 생산하는데 이용할 수 있을 것이다. 또한 β -amylase를 생산하는 본 연구의 산업용 *S. cerevisiae*는 신속한 전분의 완전 당화를 위해 α -amylase 및 glucoamylase를 생산하는 산업용 *S. cerevisiae*와 함께 전분 발효 산업에 이용이 기대된다.

감사의 말

본 연구에 참여한 이옥희, 임미현은 2단계 BK21 사업의 지원을 받았으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Choi, E.Y., J.N. Park, H.O. Kim, D.J. Shin, Y.H. Chun, S.Y. Im, S.B. Chun, and S. Bai. 2002. Construction of an industrial polyploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing *Saprolegnia ferax* β -amylase gene and secreting β -amylase. *Biotechnol. Lett.* 24, 1785-1790.
- Cho, K.M., Y.J. Yoo, and H.S. Kang. 1999. δ -Integration of endo/exo-glucanase and β -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. *Enzyme Microbiol. Technol.* 25, 23-30.
- Dohmen, R.J., A.W.M. Strasser, U.M. Dahlemsand, and C.P. Hollenberg. 1990. Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (*GAMI*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 95, 111-121.
- Eksteen, J.M., P. Van Renseburg, R.R. Cordero Otero, and I.S. Pretorius. 2003. Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the α -amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 639-646.
- Ghang, D.M., L. Yu, M.H. Lim, H.M. Ko, S.Y. Im, H.B. Lee, and S. Bai. 2007. Efficient one-step starch utilization by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucoamylase and α -amylase genes from *Debaryomyces occidentalis*. *Biotechnol. Lett.* 29, 1203-1208.
- Gietz, D., A. St. Jean, R.A. Woods, and R.H. Schiestl. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.
- Janse, B.J.H. and I.S. Pretorius. 1995. One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing α -amylase, glucoamylase and pullulanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 876-883.
- Jeong, T.H., H.O. Kim, J.N. Park, H.J. Lee, D.J. Shin, H.B. Lee, S.B. Chun, and S. Bai. 2001. Cloning and sequencing of the β -amylase gene from *Paenibacillus* sp. and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 65-71.
- Kang, H.A. and J.W.B. Hershey. 1994. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 3934-3940.
- Kang, N.Y., J.N. Park, J.E. Chin, H.B. Lee, S.Y. Im, and S. Bai. 2003. Construction of an amyolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene. *Biotechnol. Lett.* 25, 1847-1851.
- Kim, H.O., J.N. Park, H.J. Shon, D.J. Shin, C. Choi, S.Y. Im, H.B. Lee, S.B. Chun, and S. Bai. 2000. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a β -amylase gene from the oomycete

- Saprolegnia ferax*. *Biotechnol. Lett.* 22, 1493-1498.
12. Kim, H.O., J.N. Park, D.J. Shin, H.B. Lee, S.B. Chun, and S. Bai. 2001. A gene encoding β -amylase from *Saprolegnia parasitica* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 529-533.
 13. Kim, H.O., J.N. Park, D.J. Shin, H.B. Lee, S.B. Chun, and S. Bai. 2001. A gene encoding *Achlya bisexualis* β -amylase and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 23, 1101-1107.
 14. Kim, K., C.S. Park, and J.R. Mattoon. 1988. High-efficiency, one-step utilization by transformed *Saccharomyces* cells which secrete both yeast glucoamylase and mouse α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 966-971.
 15. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* 227, 680-685.
 16. Lee, F.W.F. and N.A. Da Silva. 1997. Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 339-345.
 17. Marin, D., A. Jimenez, and M.F. Lobato. 2001. Construction of an efficient amyolytic industrial yeast strain containing DNA exclusively derived from yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 249-253.
 18. Monroe, J.D., M.D. Salminen, and J. Preiss. 1991. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a β -amylase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 97, 1599-1601.
 19. Nanmori, T., M. Nagai, Y. Shimizu, R. Shinke, and B. Mikami. 1993. Cloning of the β -amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 623-627.
 20. Ness, F., F. Lavallee, D. Dubourdiou, M. Aigle, and L. Dulau. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62, 89-94.
 21. Nieto, A., J.A. Prieto, and P. Sanz. 1999. Stable high-copy number integration of *Aspergillus oryzae* α -amylase cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol. Prog.* 15, 459-466.
 22. Park, J.N., K.H. Lee, H.M. Ko, K.H. Seo, J.E. Chin, H.B. Lee, and S. Bai. 2004. Expression of ethionine resistance conferring gene in an industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 356-361.
 23. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
 24. Steyn, A.J.C. and I.S. Pretorius. 1991. Co-expression of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase-encoding gene and a *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 100, 85-93.
 25. Wang, X., Z. Wang, and N.A. Da Silva. 1996. G418 selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 45-51.
 26. Zhu, H., F. Qu, and L.H. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plant, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21, 5279-5280.

(Received July 29, 2008/Accepted August 25, 2008)

ABSTRACT : Characterization of *Achlya bisexualis* β -Amylase Expression in an Amyolytic Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Ok-Hee Lee¹, Mi-Hyeon Lim¹, Ji-Hye Kim¹, Eun-Hye Ryu¹, Hyun-Mi Ko¹, Jong-Eon Chin², and Suk Bai^{1*} (¹Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea, ²Department of Cosmetology, Dongkang College University, Gwangju 500-714, Republic of Korea)

To develop an amyolytic industrial yeast strain producing β -amylase, the *BAMY* gene encoding *Achlya bisexualis* β -amylase was constitutively expressed under the control of the alcohol dehydrogenase gene promoter (*ADCIp*) in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast transformation was carried out by an integration system containing δ -sequences as the recombination site. The integrative cassette devoid of bacterial DNA sequences was constructed that contains the *BAMY* gene and δ -sequences. Industrial *S. cerevisiae* transformed with this integrative cassette secreted 45 kDa β -amylase into the culture medium. The β -amylase activity of the transformant was approximately 18.5-times higher than that of *A. bisexualis*. The multi-integrated *BAMY* genes in the transformant were stable after 100 generations of growth in nonselective medium. Hydrolysis of soluble starch and various starches with the enzyme released maltose but not glucose or oligosaccharides.