

전사수준에서 탄소원에 따른 효모 glucoamylase의 발현

환경위생과

조 교수 김 관 천

동신전문대학 피부미용과

전임강사 진 중 언

I. 서 론

환원당에 의한 효소합성의 억제는 전분 분해 효소를 포함한 산업적으로 중요한 발효산물 생산에 걸림돌이 될 수 있다. 전분을 이용한 산업적 알코올 발효의 다원화된 공정을 단일화하기 위해서는 전분 분해효소 유전자가 도입되어 발효능력을 지닌 균주의 개발과 그 균주의 전분 발효 속도와 효율성이 중요시 된다. 효모를 이용하여 전분을 연속 발효시켰을 경우 배양기내에 환원당의 함량이 낮을 때 전분 분해 효소의 생산량이 증가한다. 즉 전분 발효 초기에 균 증식이 일어나 후기에 전분 분해 산물인 환원당의 축적에 의하여 효소 생산이 억제될 수 있다. 비록 이와 같은 효소합성 억제현상이 유용할 때도 있으나 전분 발효 산업의 경우 glucose에 의한 유전자 발현 억제와 같은 장애물을 제거하기 위해서는 환원당에 의한 효소합성 억제 기작의 이해가 필요하다.

효모나 곰팡이에 있어서 전분 분해 효소에 대한 효소합성기작에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 세균인 *Bacillus subtilis* α -amylase 유전자의 경우 유전자 수준에서 효소합성 기작이 밝혀져 있다^{1,2)}. 또 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*의 glucoamylase 유전자 STA1, STA2, 그리고 STA3의 발현도 glucose에 의해 억제되는데³⁾, 특히 STA2 유전자의 경우 glucose가 고갈된 정지기에서도 유전자의 발현이 비발효성 탄소원에서 보다 강력하게 억제되었다⁴⁾.

한편 *Kluyveromyces lactis*의 lactose-galactose regulon에서 galactose 이용 유전자 LACA4의 활성 효소를 암호하는 K1-GAL4 유전자는 glucose에 의하여 억제 받지만 균주에 따라서는 전혀 받지 않는 것도 있다. 이상과 같이 효모에서는 몇가지 효소합성억제 조절 요소가 보고되고 있지만⁵⁻¹⁰⁾, 그밖의 다른 효모류의 전분 분해 효소에 대한 관련된 연구가 없었다. 본 연구는 이와 관련하여 전분에서 보다 glucose에서 오히려 glucoamylase의 생성이 더 좋았던 *Candida tsukubaensis*¹¹⁾와 이와는 대조적으로 효소 생산이 심하게 억제 받았던 *Lipomyces kononenckoae* glucoamylase에 대한 효소 생성을 전사 수준에서 규명하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 *Candida tsukubaensis* CBS 6389와 *Lipomyces kononenckoae* CBS 5608 이었고, 사용한 액체배지는 YEPD(1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose)나 최소배지(0.67% yeast nitrogen base, w/o amino acid, 2% glucose 또는 여러 탄소원)를 사용하였으며 평판배지로는 2% Bacto agar를 첨가하여 사용 하였다. Glucoamylase활성을 측정하기 위해 *C. tsukubaensis*나 *L. kononenckoae*를 50ml 2% glucose에서 42시간 전배양한 다음 이를 여러가지 탄소원 (dextrin, maltose, starch, glucose, glycerol 1%[w/v]) 이 함유된 100ml배지에서 1%(w/v)되게 접종하여 30℃로 유지된 진탕 배양기에서 3일간 본배양하였다. 한편 총 RNA를 추출하기 위한 균의 배양은 각각 50ml 2% glucose에서 42시간 배양해 원심분리(3000rpm)로 수확한 후 150ml 1% glucose 에 1%(w/v)되게 접종하여 24시간 동안 다시 전배양하였다. 전배양한 균을 원심 분리로 모아 dextrin, maltose, starch, glucose, glycerol 1%(w/v)이 포함된 300ml 배지에 0.1%(w/v) 되도록 접종하여 30℃에서 12시간 본배양하여 원심분리로 균체를 얻었다.

2. 효소활성의 측정

Glucoamylase 활성은 Somogyi-Nelson방법에 따라 측정하였다. 효소반응은 50mM citrate 완충용액(pH 4.5)에 녹인 1% 용해성 전분 990μl에 효소용액 10μl 를 가하여 40℃에서 30분간 반응시켰다. 상기 반응액에 Somogyi 시약 1ml을 가하여 100℃에서 15분동안 열을 가하여 효소반응을 정지시킨 다음 상온에서 냉각한

후 Nelson 시약 1ml을 가하여 이를 540nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 환원당을 계산하였다. Glucoamylase 단위는 분당 1 μ M의 환원당을 생산하는 효소의 양으로 하였다.

3. 총 RNA의 추출

총 RNA추출은 Schmitt 등¹²⁾의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 총 RNA추출을 위한 효모배양은 1%(w/v) glucose, starch, maltose, dextrin 그리고 glycerol이 함유된 최소배지에서 각각 12시간 30 $^{\circ}$ C에서 배양한 다음 원심분리로 수확한 0.9%(dry weight)를 액체질소 존재하에 마쇄하였다. 마쇄한 균체분말에 50mM sodium acetate(pH 5.3)와 10mM EDTA로 된 완충용액 1.2ml와 10% SDS 0.1ml 그리고 물로 포화된 phenol 1.5ml를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 4분간 반응시킨 반응액을 -70 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치하였다. -70 $^{\circ}$ C에서 방치한 반응액을 원심분리(12000rpm)하여 얻어진 상등액에 동량의 phenol : chloroform(1:1) 첨가과정을 거쳐 에탄올로 침전시켜 총 RNA를 분리하였다.

4. Poly(A⁺) RNA의 분리

Poly(A⁺) RNA의 분리는 주로 Pharmacia(LKB Biotechnology, Sweden)사 mRNA 순수분리 키트의 지침서에 따라 실시하였다. 1.0g oligo(dT) cellulose(Boehringer Mannheim, Germany)으로 충전한 컬럼에 10mM Tris-HCl(pH 7.4), 1mM EDTA, 0.5M NaCl으로 조성된 high salt 완충용액 1ml로 2회 세척하였다. 10mM Tris-HCl(pH 7.4)와 1mM EDTA(sample buffer)로 조성된 완충용액 0.2ml에 용해한 10mg 총 RNA를 55 $^{\circ}$ C에서 15분간 가열한 후 이를 세척한 컬럼에 통과시켜 Poly(A⁺) RNA를 부착시켰다. 부착되지 않은 RNA는 high salt 완충용액 0.25ml로 2회, low salt 완충용액(10mM Tris-HCl(pH 7.4), 1mM EDTA, 0.1M NaCl) 0.25ml로 3회 각각 세척하여 제거하고 부착된 Poly(A⁺) RNA는 용출 완충용액(10mM Tris-HCl(pH 7.4), 1mM EDTA) 0.25ml로 4회 용출하였다. 용출된 Poly(A⁺) RNA는 분광 광도계로 260nm에서 그 양을 측정하였다.

5. Northern hybridization

Northern hybridization은 원칙적으로 Maniatis 등¹³⁾이 기술한 방법에 따라 실시하였다. *L. kononenkoae*와 *C. tsukubaensis*의 glucoamylase 유전자는 소등¹⁴⁾이 cloning한 유전자 절편을 사용하였다. Probe는 ³²P-표식 CTP를 사용하여

primer extension으로 제조하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 탄소원별 효소유도

효모 *L. kononenckoe*를 2% glucose가 함유된 최소배지에서 2일간 진탕배양한 세포를 여러 탄소원이 함유된 최소배지에 2%(w/v)되게 접종하여 96시간까지 glucoamylase 효소활성 변화양상을 조사하였다(Fig.1).

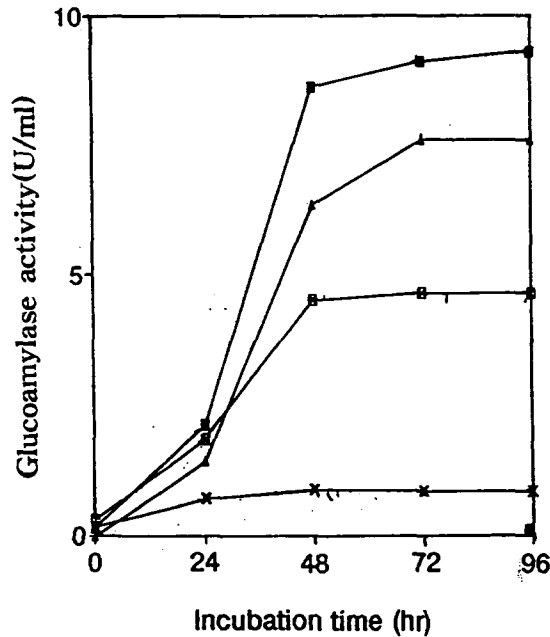


Fig 1. Time course pattern of extracellular glucoamylase activity from *L. kononenckoe* grown in different carbon sources. Yeast cell was grown in YNB medium supplemented with starch(-■-), dextrin(-▲-), maltose(-□-) and glucose(-×-) upto 96 hr. Enzyme activity was estimated by the method described in materials and methods.

Fig. 1에서 보여준 바와 같이 starch와 dextrin, maltose에서는 24시간때부터 증가하기 시작하여 48시간때에 최대치에 도달한 후 96시간까지 그 수준을 유지하였다. 이와는 반대로 glucose에서는 효소활성이 검출되지 않았다. 한편 *C. tsukubaensis* glucoamylase활성의 시간별 변화양상은 *L. kononenckoe* glucoamylase에서와 비슷하였지만 효소유도는 glucose, maltose, starch순으로 높은 활성을 보였으나 대체적으로 탄소원에 관계가 없었으며, Starch보다는 오히려

glucose에서 더 좋게 나타났다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 *L. kononenckoe* *glucoamylase*는 glucose에 의하여 심한 효소합성억제를 받고 있으나 *C. tsukubaensis* *glucoamylase*는 효소합성억제를 거의 받지 않고 있음을 보여주었다.

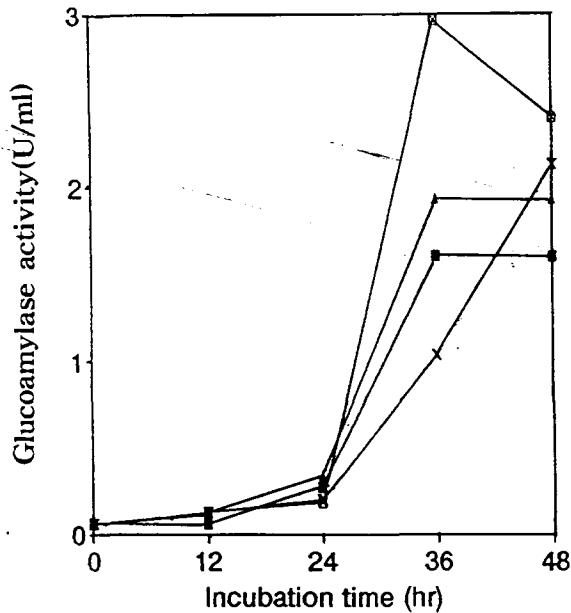


Fig 2. Time course pattern of extracellular *glucoamylase* activity from *C. tsukubaensis* grown in different carbon sources. Yeast cell was grown in YNB medium supplemented with starch(-■-), dextrin(-▲-), glycerol(-×-) and glucose(-□-) upto 48hr. Enzyme activity was estimated by the method described in materials and methods.

2. 전사수준에서 *glucoamylase*의 생성

Cloning된 *L. kononenckoe*와 *C. tsukubaensis* *glucoamylase* 유전자 절편을 probe로 하여 전사수준에서 *glucoamylase* 유전자의 전사체를 Northern hybridization으로 조사하였다. Fig. 3에서 보여준 바와 같이 dextrin, maltose, starch 그리고 glycerol에서 12시간 배양한 세포에서는 매우 근접한 위치에 1.5kb와 1.6kb의 시그널과 약 3.0kb 위치에 회미한 하나의 시그널이 보였다. 그러나 glucose에서 배양한 세포로부터는 시그널이 전혀 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 효소활성에서와 같이 전사수준에서도 glucose에서 심한 효소합성 억제를 받고 있음을 보여 주었으며, 상호상동성이 있는 두가지형의 *glucoamylase*의 존재 가능성을 보여 주었다. 이들 *glucoamylase*중의 하나는 길이가 약간 차이가 있는 이량체로 구성된 것 같다. 한편 *C. tsukubaensis* *glucoamylase* 유전자 전사체를

maltose, starch, glycerol, glucose에서 배양한 세포로부터 추출한 결과 전사체의 시그날은 약 1.8kb 위치에서 탄소원과 무관하게 나타났다(Fig.4). 이 같은 결과는 효소활성의 결과와 일치하였으며, glucose에 의하여 효소합성 억제를 받지 않음이 전사수준에서도 확인되었다.

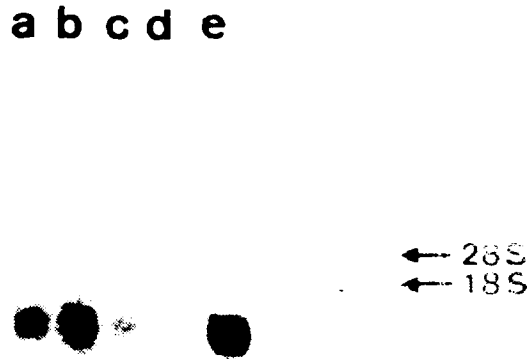


Fig 3. Northern hybridization of a putative 0.4kb 5'-EcoR1-EcoRV-3' gene fragment of glucoamylase with poly(A⁺)RNA extracted from *Lipomyces kononenkoae* CBS 5068 grown in dextrin(a), maltose(b), starch(c), glucose(d) and glycerol(e). S : size marker.

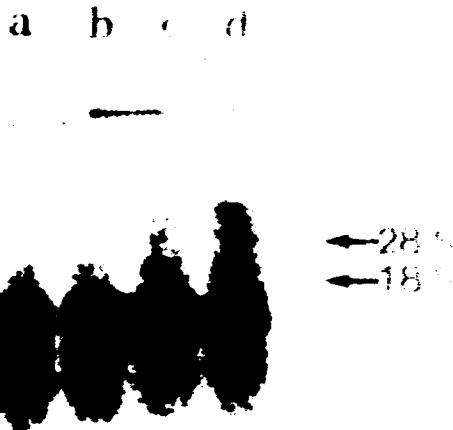


Fig 4. Northern hybridization of a putative 1.8kb 5'-EcoRV-EcoR1-3' gene fragment of glucoamylase with poly(A⁺)RNA extracted from *Candida tsukubaensis* CBS 6389 grown in maltose(a), starch(b), glucose(c) and glycerol(d). S : size marker.

IV. 결 론

몇종류의 탄소원상에서 *Lipomyces kononenkoae*의 glucoamylase와 *Candida tsukubaensis* glucoamylase 유전자 절편을 가지고 이들 효소의 합성을 전사 수준에서 조사한 결과 *L. kononenkoae*의 glucoamylase는 glucose에 의하여 심한 효소합성억제를 받았지만 *C. tsukubaensis* glucoamylase 유전자의 전사체는 탄소원에 관계없이 생성되었으며 전사체의 시그날이 오히려 glucose상에서 더 강한 것 같았다. 이와 같은 결과는 단백질 수준에서의 결과와 일치하였다.

참고문헌

1. Won, M. S., G. L. Chambless and K. B. Song, The regulation of α -amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 256 (1991)
2. Won, M. S., G. L. Chambless and K. B. Song, Characterization of the amyl protein involved in the catabolite repression of α -amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *Korean. Biochem. J.*, **25**, 128 (1992)
3. Erratt, J. A., and A. Nasim, Cloning and expression of a *saccharomyces diastaticus* glucoamylase gene in *saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.*, **166**, 484 (1986)
4. Suntsov, N. I., S. V. Kuchin, M. A. Neystat, S. V. Mashko and S. V. Benevolensky, Production of the STA2-encoded glucoamylase in *Saccharomyces cerevisiae* is subject to feedback control. *Yeast*, **7**, 119 (1991)
5. Inui, M., S. Fukui, and S. Yamashita, Genetic controls of STA1 gene expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 741 (1989)
6. Kuchim, S. V., N. N. Kartasheva, and S. V. Benevolensky, Gene required for derepression of an extracellular glucoamylase gene STA2, in the yeast *Saccharomyces*. *Yeast*, **9**, 533 (1993)
7. Laurent, B. C., M. A. Treited, and M. Carlson, Functional independence of the yeast SNF2, SNF5 and SNF6 proteins in transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2687 (1991)
8. Okimoto, Y., H. Yoshimoto, H. Shima, R. Akada, O. Nimi and I.

- Yamashita, Gene required for transcription of STA1 encoding an extracellular glucoamylase in the yeast *Saccharomyces*, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2792 (1989)
9. Yamashita, I. and S. Fukui, Genetic background of glucoamylase production in the *Sacchromyces*. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 137 (1984)
 10. Yoshimoto, H. and I. Yamashita, The GAM1/SNF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoded a highly charged nuclear protein required for transcription of the STA1 gene. *Mol. Gen. Genet.*, **28**, 270 (1991)
 11. Kim, S. M., S. Bai, H. Y. Chung, J. C. Park, J. J. Lee, D. H. Kim, M. H. Song and S. B. Chun, Purification and properties of glucoamylase from yeast *C. tsukubaensis*. *Kor. J. Microbiol.*, **30**, 519(1992)
 12. Schmitt, M. E., T. A. Brown, and B. L. Trumpower, A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic acid Res.*, **18**, 3091 (1990)
 13. Sambrook, E., F. Fritisch, and T. Maniatis, Extracellular purification and analysis messenger RNA from eukaryotic cells, Molecular cloning:a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Lab.* **7**, 46 (1989)
 14. Chun, S. B. and J. J. Lee, Purification of *Lipomyces kononenckoeae* glucoamylase and its gene cloning, (1994)

Expression of Yeast glucoamylase with carbon sources on transcription level

Kim, Kwan-chun

Dept. of Environmental Hygiene

Kwangju Health College

Chin, Jong-eon

Dept. of Skin Beauty Art

Dong Shin Junior College

> Abstract <

Northern hybridization of putative gene fragments of glucoamylase from *Lipomyces kononenkoae* or *Candida tsukubaensis* glucoamylase with poly(A⁺)RNA extracted from its cells grown in several carbon sources was carried out. The synthesis of *L. kononenkoae* glucoamylase was several repressed by glucose while that of *C. tsukubaensis* glucoamylase was better in glucose than in starch. This result was consistent with that of enzyme activity.