

무증자 알콜발효 를 위한 유전공학 기술의 응용



신 용 철

<경상대학교 미생물학과 조교수>

■ 目 次 ■

- I. 머릿말
- II. 무증자 알콜발효의 문제와 효모의 직접알콜발효법
- III. 유전공학의 기초적 이해
- IV. 효모의 유전공학적개량에 의한 무증자 직접알콜발효
- V. 기타 발효효모의 균주개량
- VI. 맺음말
- VII. 참고문헌

I. 머릿말

무증자 알콜발효란 전분질 원료를 증자하지 않고 효소제를 사용하여 당화시킨 후 알콜발효를 행하는 것을 말한다. 이러한 무증자 알콜발효법은 기존의 방법과 비교해서 전분질 원료의 증자에 소요되는 막대한 에너지를 절감할 수 있는 장점이 있다. 이 연구는 일본 통산성에서 중요한 에너지 절감기술의 하나로 설정되어 공업화된 연구과제이다. 국내, 외에 있어 무증자 알콜발효의 기술개발 상황에 관해서는 이미 두번에 걸쳐서 본지에서 비교적 상세히 소개한 바 있으므로 참조하기 바람(9, 10) 본고에서는 지금까지 개발된 무증자 알콜발효연구에 있어서 일대 기술적 혁신이라고 생각되는 유전공학 기술에 의한 무증자 직접알콜발효법의 개발사례를 소개하고자 한다.

II. 무증자 알콜발효의 문제와 효모의 직접알콜발효법

무증자 알콜발효기술에 있어서 핵심기술은 무증자 전분을 효과적으로 분해할 수 있는 당화효소제의 개발이라고 말할 수 있을 것이다. 물론, 무증자 전분을 여러가지 방법으로 전처리하거나 효소반응시 전분입자를 잘게 부수는 반응기 등을 생각할 수 있으나 이러한 방법 역시 부수적인 에너지가 필요하고 또 시약비 등 생산가를 높일 수 있으므로 근본적인 문제의 해결은 아니라고 생각한다. 따라서 무증자 전분을 당화, 발효시키기 위해서는 무증자 전분을 증자 전분과 동일한 속도로 당화시킬 수 있는 특수한 당화효소제의 개발이 필요하다. 그러나 지난 20여년간의 연구를 통하여 이러한 당화효소는 개발되지 않았으며 또 앞으로도 발견되지 않을 것으로 보인다. 무증자 전분은 증자 전분에 비해서 당화효소가 공격할 표면적이 적으므로 효소반응속

도가 떨어지는 것은 당연한 결과라고 생각된다. 그렇다면 무증자 전분의 당화와 발효는 현실적으로 불가능한 기술인가? 본 연구자는 불가능하다고 생각하지 않는다. 그것은 최선의 효소는 아니더라도 차선의 효소는 개발될 수 있고, 또 이런 효소를 이용하여 기술개발을 어떻게 하는가에 따라 소기의 목적을 달성할 수 있기 때문이다. 지난 20여년간의 연구를 통해서 무증자 전분에 대해서 비교적 분해력이 강력한 효소들이 개발되어 왔다. 이러한 효소들은 기존의 효소들과 비교해 볼 때 무증자 전분에 대해서 몇 배, 혹은 몇 십배의 높은 효소활성을 보인다(그렇다고 해서 이 효소들이 증자 전분보다 무증자 전분을 잘 분해할 수 있는 것은 아니다. 아직도 증자 전분에 비해서 5~20배 정도 낮은 속도로 무증자 전분을 분해한다). 이러한 연구결과는 전분 분해효소중에서 무증자 전분에 대해서 특이적으로 높은 분해력을 갖는 효소가 존재한다는 것이다. 현재까지 개발된 이러한 효소들은 증자 전분과 동일한 속도로 무증자 전분을 분해할 수 있는 것들은 아니다. 그러나 이들은 기존의 효소제들 보다 무증자 전분에 대하여 월등히 분해력이 높다는 것이다. 최선의 효소는 아니나 차선의 효소는 된다고 생각한다. 이러한 효소를 사용하여 무증자 전분을 당화하는 경우 당화 시간이 길어지거나 효소제의 사용량이 늘어나야 하는 문제가 있다. 또 발효를 하는 경우에는 증자과정이 없으므로 유해미생물이 살아남게 되므로 당화 후 발효과정에서 잡균의 번식문제가 남아 있다. 그렇다면 이러한 차선의 효소제를 이용하여 어떻게 무증자 전분으로부터 알콜을 생산할 것인가? 여러가지 가능한 방법들이 있겠으나 무증자 전분의 직접발효법(direct alcohol fermentation)이 가장 타당한 방법으로 생각된다. 말하자면 무증자 전분에 당화효소제를 첨가하여 당화시킨 후 효모로 하여금 알콜발효를 일으키게 하는 것이 아니라, 효모가 직접 당화효소를 생산하여 무증자 전분을 당화시키고 동시에 알콜발효를 하게 하는 방

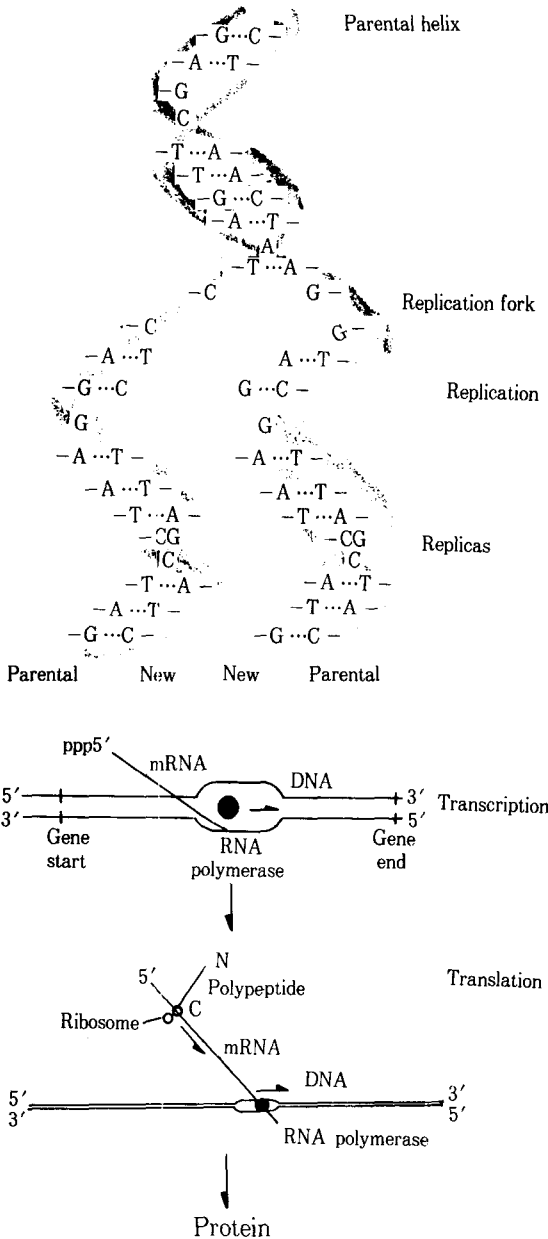
법이다. 이 경우 개량된 효모가 효소를 생산하므로 무증자 전분당화효소를 첨가해 줄 필요가 없고, 또 당화와 동시에 발효가 일어나므로 당화에 소요되는 시간도 문제가 되지 않는다. 또한 전분으로부터 생성된 당이 곧 바로 알콜로 전환되므로 잡균의 번식을 최대한 막을 수 있는 장점이 있다. 이러한 무증자 전분의 효모에 의한 직접알콜발효법을 개발하기 위해서는 유전공학기술의 도입이 필수적이다. 먼저 무증자 전분에 대하여 분해력이 큰 효소를 찾아내고, 그 효소의 유전자를 효모에 도입하여 분해효소를 생산할 수 있도록 효모를 개량하여야 할 것이다. 이렇게 개량된 효모의 알콜발효성을 검토하여 직접알콜발효법의 성공 여부가 결정된다. 본고에서는 일본의 산토리발효회사에서 개발한 무증자 전분의 직접알콜발효법의 개발 사례를 중심으로 소개하고자 한다.

Ⅲ. 유전공학의 기초적 이해

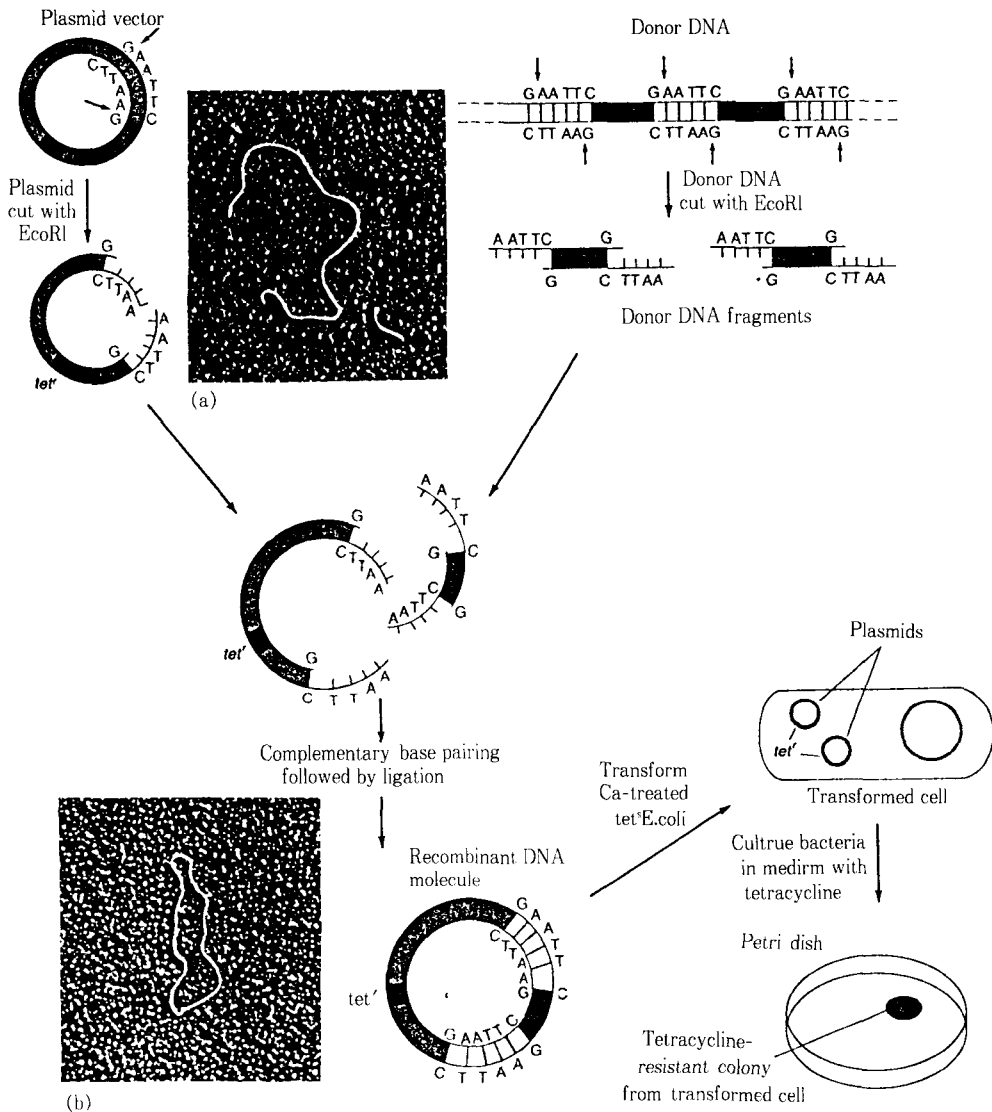
무증자 전분의 직접 알콜발효를 위한 효모의 균주개량을 소개하기 전에 먼저 유전공학의 기초적인 방법과 용어를 설명하여 이해를 돕고자 한다. 1970년대 후반부터 알려지기 시작한 유전공학은 오늘날 의약 단백질의 생산에서 부터 농업, 식품, 환경, 에너지 등에 이르기까지 광범위하게 응용되고 있는 기술이다. 이러한 유전공학은 금세기 들어 급격히 발달하기 시작한 생명과학의 소산이다. 말하자면 세포내 유전물질이 핵산이라는 사실이 밝혀지고 그 구조, 복제기작 및 유전자의 전사, 번역기작들을 비롯하여 세포내 조절기작 등이 분자수준에서 밝혀지면서 이러한 지식을 응용하여 나타난 것이 유전공학인 것이다. 유전공학이란 대상유전자를 인위적으로 조작하여 목적에 맞도록 재조합하고, 생체내에서 작동시키므로써 생물체로 하여금 새로운 특성의 유전형질을 갖도록 하는 기술을 말한다. 예를 들면 사람의 성장호르몬 유전자를 조작한 후

효소에 넣어 효소가 사람의 성장호르몬을 생산하게 한다든지, 열안정성이 낮은 효소의 유전자를 분리해서 조작한 후 세포내로 도입하므로써 열안정성이 증가된 효소를 생산하게 하는 등의 기술을 말한다.

생체내에서 유전정보는 DNA(deoxyribonucleic acid)라고 하는 물질 속에 저장되어 있는데, 유전물질인 DNA는 세포가 하나에서 둘로 분열할 때 2개로 복제(replication)되어 나누어 가지므로써 자손에게 전달된다. 유전물질인 DNA가 세포내에서 직접 여러가지 작용을 하는 것이 아니라 DNA에 들어있는 정보가 발현(expression)과정을 통하여 단백질을 만들게 되고 이 단백질이 세포내 다양한 작용을 하는 것이다. 이러한 과정을 간략히 요약하면 [그림 1]과 같다. DNA에는 하나의 단백질을 만드는데 필요한 기본단위의 정보가 있는데 이것을 유전자(gene)라고 한다. 이 유전자는 전사(transcription)라는 과정을 통해서 전령 RNA(messenger RNA, mRNA)가 만들어 지고 이 mRNA는 다시 번역(translation)과정을 거쳐서 단백질로 된다. 이러한 일련의 과정은 분자생물학(molecular biology)이라는 하나의 새로운 학문을 탄생시켰을 만큼 복잡하고 방대한 것이다. [그림 2]에서는 재조합DNA를 만들어 세포내로 도입하는 유전공학의 일면을 간략히 소개하였다. 이 과정에서 벡터(vector)가 필요한데, 벡터는 외래유전자(foreign DNA)를 세포내로 실어 나르는 운반차(vehicle)에 해당한다. 벡터는 일반적으로 플라스미드(plasmid)라는 원형의 DNA가 가장 흔히 사용되는데 이 플라스미드에 외래유전자를 실는 방법은 외래유전자를 벡터사이에 끼워 넣어 연결시키는 것이다. 말하자면 벡터를 가위로 자르고 외래유전자를 자른 양쪽에다 바느질해서 봉합시켜 다시 원형을 만드는 것과 같다. 이때 가위역할을 해서 DNA를 자르는 효소를 제한효소(restriction enzyme)라고 하고 또 잘려진 DNA조각을 연결시키는 바느질역할을 하는 것이 DNA봉합효소(DNA ligase)이다. 이렇게 만들어진 플라스미드(즉, 한 플라스미드에 외래유전자가 끼워 들어간 플라스미드)를 재조합플라스미드(recombinant plasmid)라고 부른다. 재조합플라스미드를 숙주(host)세포로



[그림 1] DNA의 복제(replication), 전사(transcription), 번역(translation).



[그림 2] 재조합플라스미드의 제조와 형질전환 (transformation).

(a) 제한 효소로절단된 플라스미드. (b) 재조합 플라스미드.

넣게 되면 숙주는 외래유전자를 갖게 되어 새로운 유전형질을 가지게 되는 것이다. 이렇게 형질전환된 숙주를 transformant라고 한다. 숙주에 들어간 외래유전자는 [그림 1]에서 설명한 대로 복제하므로써 자손으로 전달되고 또 전사와 번역단계를 거쳐 단백질로 만들어지게 되는 것이다. 이상에서 간략히 재조합DNA 기술을 소개하였으며, 구체적인 예는 다음에 계속되는 무증자 전분의 직접알콜발효

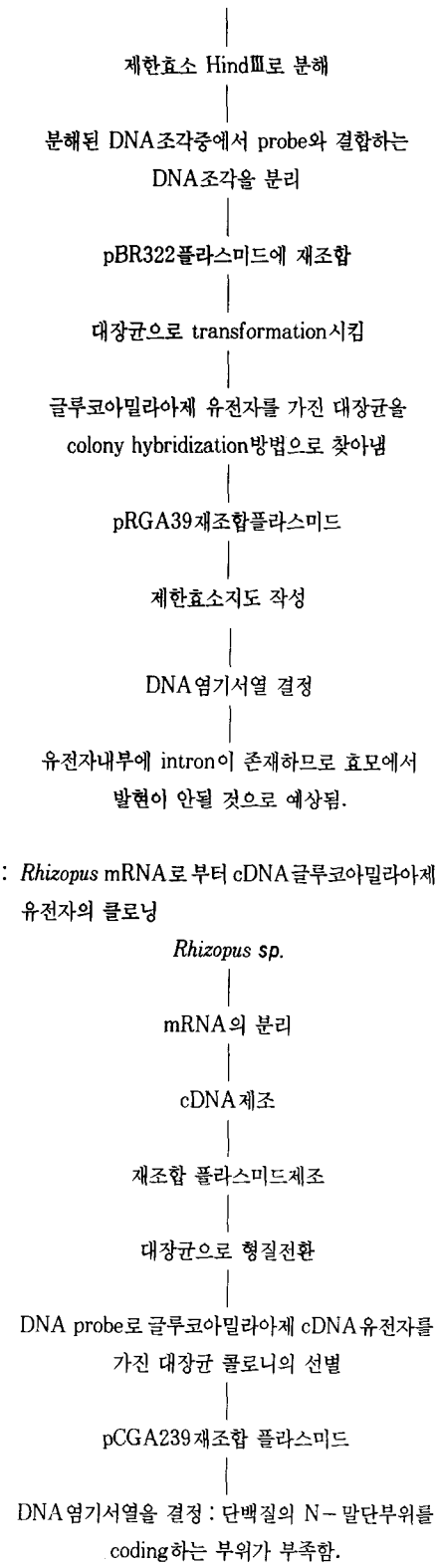
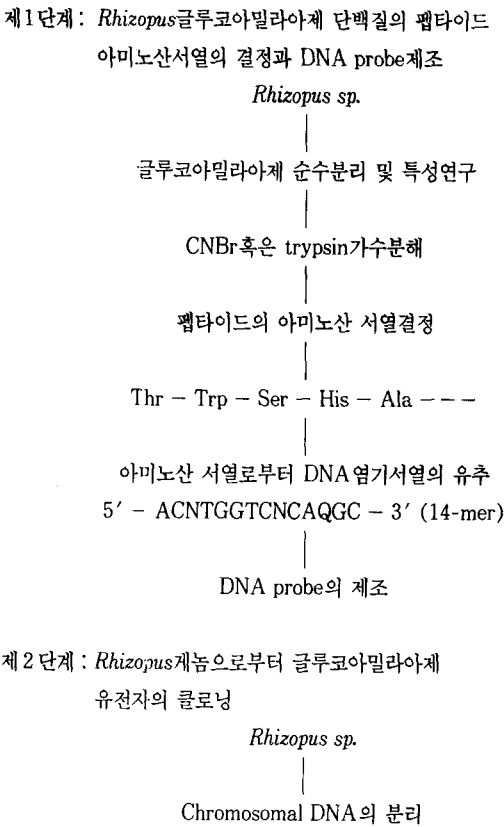
효모의 개량연구를 통하여 살펴보도록 하겠다.

IV. 효모의 유전공학적 개량에 의한 무증자 직접알콜발효 (3-8)

이 연구는 일본의 산토리발효연구소에서 이루어진 연구결과이다. 이들은 1970년대 중반 *Rhizopus sp.*에서 생산되는 글루코아밀라아제가 무증자 전분

에 대해서 분해력이 높다는 것을 발견하였다. 이 글루코아밀라아제는 전분의 α -(1,4)결합이외에도 α -(1,6)결합을 가수분해할 수 있다. *Rhizopus sp.*에서 글루코아밀라아제를 생산할 때 한가지 문제점은 고체배양(solid culture)에서는 효소의 생산성이 높지만 액체배양(submerged culture)에서는 효소생산성이 낮다는 것이다. 또한 무증자 전분을 당화시키기 위해서는 기존의 효소보다 많은 양의 효소를 사용해야 하는 문제가 있다. 이러한 배경에서 *Rhizopus sp.*의 글루코아밀라아제 유전자를 효모에 도입하므로써 무증자 전분을 직접발효하는 연구를 계획하였던 것이다. 전체적인 연구추진계획은 [그림 3]에 요약하였다.

[그림 3] 무증자전분의 직접알콜발효를 위한 효모의 유전공학적 개량 요약도.



제4 단계: pRGA39와 pCGA239로 부터 완전한 글루코아밀라아제 단백질을 만드는 유전자의 제조
pRGA39, pCGA239

site-directed mutagenesis

pCGA449 재조합 플라스미드: 완전한 글루코아밀라아제를 만들 수 있는 유전자를 가짐

제5 단계: *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자의 효모에서의 발현

pCGA449

Hind III - Pvu II DNA 조각(2-3Kb)

효모에 존재하는 pYE227 플라스미드로 재조합시킴.

pYGA201 제조

Saccharomyces cerevisiae XS-30-2B로
형질전환

S. cerevisiae(pYGA201) 균주는 전분배지에서 정상으로 자라고 0.005u/ml의 글루코아밀라아제 활성을 보임.

제6 단계: *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자의 효모에서의 고발현과 안정성 향상.

1) 프로모타의 변형

효모의 강력한 promoter인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자의 promoter를 사용한 재조합

플라스미드 제조

2) 숙주효모의 개량

3) 글루코아밀라아제 유전자의 효모 chromosome으로서의 삽입

4) gene dosage 효과

제7 단계: 여러가지 재조합 효모에 의한 알콜발효

1) 무증자 전분의 알콜발효성 검토

2) 저온증자에 의한 알콜발효성 검토

1. 제1 단계: *Rhizopus* 글루코아밀라아제 단백질의 펩타이드 아미노산 서열의 결정.

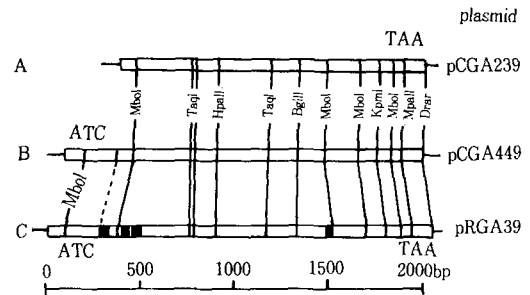
*Rhizopus*로 부터 무증자 전분의 분해력이 강한 글루코아밀라아제 I 을 순수분리하였다. 순수분리된 효소를 CNBr이나 단백분해효소 trypsin으로 분해하여 펩타이드 단편을 만들고 각 펩타이드 단편의 아미노산 서열을 결정하였다. 본 연구에서는 여러개의 펩타이드 단편중에서 Thr-Trp-Ser-His-Ala 펩타이드 아미노산서열로부터 DNA 염기서열을 유추하였다. DNA를 구성하는 기본단위인 뉴클레오타이드에는 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C), 티민(T)과 같은 4종류의 염기가 하나씩 결합되어 있는데, 이때 3개의 염기배열(이것을 유전암호, codon이라고 부른다)이 한 아미노산을 결정하기 때문에 아미노산 순서를 알면 DNA 염기서열을 역으로 추정할 수 있다. 그러나 여러개의 유전암호(codon)가 한 종류의 아미노산을 지정할 수 있기 때문에 아미노산순서를 안다고 해서 DNA의 염기서열을 정확히 알아낼 수는 없고 가능한 염기서열을 추정할 수 있는 것이다. 앞에서 나타낸 아미노산서열로부터 추정할 수 있는 염기배열은 5'-ACNTGGTCNCAQGC-3'(이때, N은 이 자리에 어떤 염기가 들어와도 상관없고, Q는 티민이나 시토신이 들어 있다는 것을 뜻한다)이다. 지금까지 *Rhizopus* 글루코아밀라아제를 순수분리하여 펩타이드 아미노산서열을 결정하고 이것으로부터 DNA 염기서열을 추정하는 것은 앞으로 *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자를 클로닝하는데 DNA 단편의 염기서열이 필요하기 때문이다. *Rhizopus*로부터 글루코아밀라아제 유전자를 대장균으로 클로닝할때(다시말하면 *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자를 벡터에 실어서 대장균으로 도입하므로써 대장균이 글루코아밀라아제 유전형질을 갖게 한다는 뜻이다) 글루코아밀라아제 유전자가 대장균에서 발현(유전자가 전사, 번역단계를 거쳐 단백질을 만드는 것을 뜻한다)되어 활성을 갖는 글루코아밀라아제

를 만들지 못한다. 따라서 *Rhizopus* DNA 단편을 가진 많은 대장균 transformant 중에서 글루코아밀라아제 활성을 조사해서는 어떤 대장균 속에 글루코아밀라아제 유전자가 들어 있는지를 알 수 없다. 알 수 있는 방법은 대장균속에 들어 있는 DNA를 끄집어 내어 글루코아밀라아제 유전자가 존재하는지를 확인하면 될 것이다. 유전자 DNA를 확인하는 방법을 colony hybridization이라고 한다. 유추된 DNA 염기서열대로 DNA 합성기계를 이용하여 화학적으로 짧은 DNA 조각(올리고뉴클레오타이드)을 합성하고 여기에 방사성동위원소 ^{32}P 로 표지(label)시킨다. 우리는 이것을 probe라고 하는데 이 probe는 염기서열이 서로 상보적인 DNA와는 결합하는 능력이 있다(이것을 hybridization이라고 한다). 따라서 글루코아밀라아제 probe를 이용하여 대장균 콜로니의 DNA를 녹인 후 결합시켜 봤을 때 결합하는 DNA가 있으면 그 대장균은 *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자를 가지는 것으로 생각할 수 있다. 이렇게 하여 *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자가 들어있는 대장균을 찾을 수 있기 때문에 제1단계로 단백질의 펩타이드 아미노산을 알아야 하는 것이다.

2. 제2단계 : *Rhizopus* 게놈으로부터 글루코아밀라아제 유전자의 클로닝.

Rhizopus 게놈 DNA를 분리해서 제한효소 Hind III로 절단하면 많은 DNA 단편 조각들이 생기게 되는데 이 조각들 중에 글루코아밀라아제 유전자를 내포하는 DNA 단편이 있을 것이다. 어떤 크기의 DNA 조각에 글루코아밀라아제 유전자가 있는지를 알아보기 위해서 Southern hybridization이라는 방법을 사용한다. DNA 단편들을 아가로스 전기영동시키면 단편의 크기별로 분리시킬 수 있다. 아가로스 겔속에 크기별로 분리된 DNA 조각들이 있는데 Southern이라는 사람이 고안한 방법을 이용하여 nitrocellulose종이로 옮겨 붙일 수 있다. 이렇게 한 다음 앞에서 설명한 글루코아밀라아제 probe로

hybridization시키게 되면 방사선 동위원소로 표지된 probe는 글루코아밀라아제 유전자가 있는 DNA 단편과 결합할 것이고, 이것을 X-ray film에 감광하여 현상하므로써 글루코아밀라아제 유전자의 위치를 알 수 있는 것이다. 이 결과 4.3Kb (DNA는 두 염기쌍이 상보적으로 결합하고 있으므로 염기쌍, basepair(bp)라고 하고 1,000bp를 1Kilobasepair(Kb)라고 한다)에 해당되는 DNA 단편속에 글루코아밀라아제 유전자가 들어 있음을 알았다. 4.3Kb DNA 단편만을 분리해 내어 대장균에 적용되는 pBR322 플라스미드 벡터에 연결하여 대장균으로 형질전환(transformation)하였다. 그 결과 대장균 형질전환체(transformant)를 1,000



[그림 4] 글루코아밀라아제의 제한효소지도.

Restriction maps are presented for the glucoamylase genes derived from cDNA(A) and chromosomal DNA(C), and constructed from A and C for expression in yeast (B). The entire glucoamylase gene without intervening sequences was constructed as follows. New Sal I sites were generated in A and B at the position indicated by a dashed line by *in vitro* mutagenesis. After recombination of A and C at the Sal I site, the sequence at the Sal I site was altered to the original sequence by *in vitro* mutagenesis. ATG and TAA indicate the initiation and termination codons of glucoamylase gene, respectively. Black boxes are the intervening sequences (these will be described elsewhere).

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
 GATCTCAATT TGTGTGGA TATATTCACA TTTAAAAATT CAAACATATA TAAGACGGT TTAATTCCTC GTTTTTCAAA AATCATCACT TGTCITCAAA TTGATCTTC TCTA ATG
 MET
 120 150 180 210
 CAA CIG TTC AAT TTG CCA TTG AAA GTT TCA TTC TTT CTC GTC CTC TCT TAC TTT TCT TTG CTC GTT TCT GCT GCA AGC ATT CCT ACT AGT GCT TCT
 GLN LEU FHE ASN LEU PRO LEU LYS VAL SER PRE PHE LEU VAL LEU SER TYR PHE SER LEU LEU VAL SER ALA Ala Ser Ile Pro Ser Ser Ala Ser
 240 277 297 317
 GTC CAG CTT GAT TCA TAC AAT TAC CAT GGG TCT ACT TTT TCA GGA AAA ATT TAT gtaggttgca tataattcas acataaaaa aatattaatg ttcctgct ac
 Val Gln Leu Aap Ser Tyr Asn Tyr Asp Gly Ser Thr Phe Ser Gly Lys Ile Tyr
 341 371 401
 gctgtag GTC AAG AAC ATT GCT TAC TCC AAG AAG CTT ACT GTA ATT TAC GCC GAT GGC TCT GAC AAC TGG AAT AAT AAT GGA AAC ACC ATT GCT GCT
 Val Lys Asn Ile Ala Tyr Ser Lys Lys Val Thr Val Ile Tyr Ala Asn Gly Ser Asp Asn Trp Asn Asn Asn Gly Asn Thr Ile Ala Ala
 431 461 491
 TCT TAC TCT CCT OCT ATT TCT GGA TCA AAT TAC GAA TAC TGG ACA TTC TCT GCC TCC ATT AAT GGT ATC AAG GAG TTC TAC ATT AAG gtaacttatt tt
 Ser Tyr Ser Ala Pro Ile Ser Gly Ser Asn Tyr Glu Tyr Trp Thr Phe Ser Ala Ser Ile Asn Gly Ile Lye Glu Phe Thr Ile Lys
 523 543 563 581 611
 tactttat gatatltgcc cctatactia attaactaac cctttttct ctatag TAT GAG GTC AGT GGA AAA ACA TAC TAT CAT AAC AAC AAT TCT GCC AAT TAC
 Tyr Glu Val Ser Gly Lye Thr Tyr Tyr Asp Asn Asn Asn Ser Ala Asn Tyr
 636 656 680 710
 CAA GGT aaagntaata atatacaaat gctacaact attcacatt ttatagTA TCT ACA TCC AAG CCT ACT ACT ACT ACT GCT ACT GCT ACT ACT ACT ACC GCT
 Gln Val Ser Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala
 740 770 800
 GGT TCC ACT TCA ACC ACC ACT CCC OCC TCA AGC TCT GAG GCA GCT ACT TTC CCA ACT GGT AAC TCT ACA ATC TCC TCA TGG ATT AAG AAG CAA GAA
 Pro Ser Thr Ser Thr Thr Pro Pro Ser Ser Ser Glu Pro Ala Thr Phe Pro Thr Gly Asn Ser Thr Ile Ser Ser Trp Ile Lys Lys Gln Glu
 830 860 890
 GGT ATC AGC CGC TTT GCT ATG CTT CGA AAC ATC AAT CCT CCT GGA AGC GCT ACC GGT TTC ATT GCT GCC TCA CTC TCT ACC GCT GGT CCC GAT TAC
 Gly Ile Ser Arg Phe Ala Met Leu Arg Asn Ile Asn Pro Pro Gly Ser Ala Thr Gly Phe Ile Ala Ala Ser Asu Ser Thr Ala Gly Pro Asp Tyr
 920 950 980 1010
 TAC TAT GCT TGG ACT CGT GAT GCT GCA TTA ACC TCC AAT GTA ATT GTT TAC GAA TAC AAC ACT ACT TTG TCC GGT AAT AAG ACT ATC CAC AAC GTC
 Tyr Tyr Ala Trp Thr Arg Asp Ala Leu Thr Ser Asn Val Ile Val Tyr Glu Tyr Asn Thr Thr Leu Ser Gly Asn Lys Thr Ile Leu Asn Val
 1040 1070 1100
 CTC AAG GAC TAT GTT ACA TTC TCA GTC AAG ACC CAA TCA ACT TCT ACC GTC TGT AAC TGC CTT GGT GAG OCT AAG TTC AAT CCT CAT CGT TCT GGC
 Ley Lys Asp Tyr Val Thr Phe Ser Val Lys Thr Gln Ser Thr Ser Thr Val Cys Asn Cys Scu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Pro Asp Gly Ser Gly
 1130 1160 1190
 TAT ACT GGT GCT TGG GCA AGA CCT CAA AAT GAT GGA CCT GCT GAA CGT GCT ACT ACC TTC ATT TTG TTT GCT GAC AGT TAT CTT ACT CAA ACA AAG
 Gly Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Asn Asp Gly Pro Ala Glu Arg Ala Thr Thr Phe Ile Leu Phe Ala Ser Tyr Leu Thr Gln Thr Lys
 1220 1250 1280
 CAT GCT TCC TAT GTC ACT GGT ACA CTC AAG CCT GCT ATC TTC AAG CAC TTG GAC TAT GTC GTC AAT GTC TGG TCT AAT GGC TGT TTC CAT TTA TGG
 Asp Ala Ser Tyr Val Thr Gly Thr Pro Ala Ile Phe Lys Asp Leu Asp Tyr Val Val Asn Val Trp Ser Asn Gly Cye Phe Asp Leu Trp
 1310 1340 1370
 GAA CAA GTC AAC GGT GTT CAC TTC TAT ACT TTA ATG GTT AIG CGT AAG GGT TTG CTT CTT GGT CCA CAT TTC GCT AAA CGT AAC CCT CAC TCT ACT
 Glu Glu Val Asn Gly Val His Phe Tyr Thr Leu Met Val Met Arg Lys Gly Leu Leu Gly Ala Asp Phe Ala Lys Arg Asn Gly Asp Ser Thr
 1400 1430 1460 1490
 CGT GCA TCT ACC TAT AGC AGC ACT GCA TCC ACT ATT GCA AAC AAG ATC TCT AGC TTC TGG GTT TCT TCT AAT AAC TGG ATT CAA GTC AGT CAA AGC
 Arg Ala Ser Thr Tyr Ser Ser Thr Ala Ser Thr Ile Ala Asn Lys Ile Ser Ser Phe Trp Val Ser Ser Asn Asn Trp Ile Gln Val Ser Gln Ser
 1520 1550 1580
 GTT ACT GGT GGT GTC AGT AAA AAG GGT TTG GAT CTC TCC ACA TTG TTG GCT GCT AAC CTT GGT AGT GTT CAT GAT GGA TTC TTC ACT CCT GGC TCT
 Val Thr Gly Gly Val Ser Lys Lys Gly Leu Asp Val Ser Thr Leu Leu Ala Ala Asn Leu Gly Ser Val Asp Asp Gly Phe Phe Thr Pro Gly Ser
 1605 1625 1645 1680
 CAA AAG gtaaaataac atgcataaaa gaataagaact ataaccattc taattcecat ttctactcs g ATC CTT GCC ACT GCT GTT GCT GTT GAA GAC TCC TTC GCT
 Glu Lys Ile Leu Ala Thr Ala Val Ala Val Glu Asp Ser Phe Ala
 1710 1740 1770
 TCC TTG TAT CCT ATC AAC AAA AAC CTT CCA TCT TAC CTT GGT AAC TCT ATT GGT AGA TAT CCT CAA CAC ACT TAC AAT GGT AAC GGA AAC TCT CAA
 Ser Leu Thr Pro Ile Asn Lys Asn Leu Pro Ser Tyr Leu Gly Asn Ser Ile Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Thr Asn Gly Asn Gly Asn Ser Gln
 1800 1830 1860
 GGA AAC TCT TGG TTC TTG CCT GTA ACT GGT TAC GCT GAG CTC TAT TAC CGT GCC ATC AAG GAA TGG ATC GGC AAC GGT GGT GTC ACT GTC AGC AGC
 Gly Asn Ser Trp Phe Leu Ala Val Thr Gly Thr Ala Glu Leu Tyr Tyr Arg Ala Ile Lys Glu Trp Ile Gly Asn Gly Gly Val Thr Val Ser Ser
 1890 1920 1950 1980
 ATA AGT TTA CCC TTC TTC AAG AAG TTT GAT TCA TCT GCT ACA TCT GGA AAG AAG TAC ACT GTT GGT ACC TCC GAC TTT AAC AAC CTT GCT CAA AAT
 Ile Ser Leu Pro Phe Phe Lys Lys Phe Asp Ser Ser Ala Thr Ser Gly Lys Lys Tyr Thr val Gy Thr Ser Asp Phe Asn Asn Leu Ala Gln Asn
 2010 2040 2070
 ATT GCA CTC GCT GCT GAC CGT TTC TTG TCC ACT GTC CAG CTC CAT GCT CAC AAC AAT GGA TCT CTT GCT GAA GAG TTT GAC CGC ACC ACT GGT TTA
 Ile Ala Leu Ala Ala Asp Arg Phe Leu Ser Thr Val Gln Leu His Ala His Asn Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Phe Asp Arg Thr Thr Gly Leu
 2100 2130 2160
 TCC ACC GGT GCT AGA GAC TTG ACC TGG TCT CAC GCT TCT TTA ATC ACC GCT TCT TAC GCT AAG GCT GGT GCA CCT GCC GCT TAACCTGTA AATTTAAATG
 Ser Thr Gly Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser His Ala Ser Leu Ile Thr Ala Ser Tyr Ala Lys Ala Lly Ala Pro Ala Ala
 2190 2230 2270
 C AAAGCATTAC AGCTTATTTT CTTTTCAAA TAAAAACATA TTGATATGTT CATAACATTT TCTTGTGTG TCTACTGTAA TATGGGTAAC CACATAAGCA TAAACACAA

[그림 5] 글루코아밀라아제 유전자의 DNA 염기서열

콜로니 얻었다. 1,000콜로니를 앞에서 설명한 colony hybridization 방법으로 조사한 결과 글루코아밀라아제 probe와 반응해서 양성반응을 보이는 3개의 콜로니를 발견하였다. 이 3개의 콜로니는 모두 동일한 *Rhizopus* DNA 단편을 가지고 있었다. 그 중 pRGA39 플라스미드 DNA를 이용하여 *Rhizopus* DNA 단편의 염기서열을 결정하였다. 글루코아밀라아제 유전자라고 찾아낸 DNA 단편의 제한 효소지도(DNA 상에 어떤 제한효소절단부위가 있는가를 나타낸다)와 염기서열은 [그림 4, 5]와 같았다. 세균과는 달리 일반적으로 곰팡이 이상의 고등한 진핵세포생물체는 유전자 내부에 발견되지 않는 intron이라는 것이 존재하는데 이 부위는 유전자가 전사되어 RNA를 만든 다음 splicing이라는 과정을 통해서 제거되고 단백질 합성을 명령하는 mRNA로 바뀌게 된다. 이런 splicing 과정은 대장균에서는 나타나지 않는 것이고, 효모에서도 *Rhizopus* 처럼 정상적으로 일어날 수 없으므로 *Rhizopus* 게놈유전자가 대장균이나 효모에서 정상적인 글루코아밀라아제를 만들 수 없을 것이다. 이것을 해결하는 하나의 방법으로 *Rhizopus*에서 글루코아밀라아제를 만드는데 사용되는 mRNA를 분리하여 역으로 DNA 유전자를 만들게 되면 intron이 없는 유전자를 만들 수 있다.

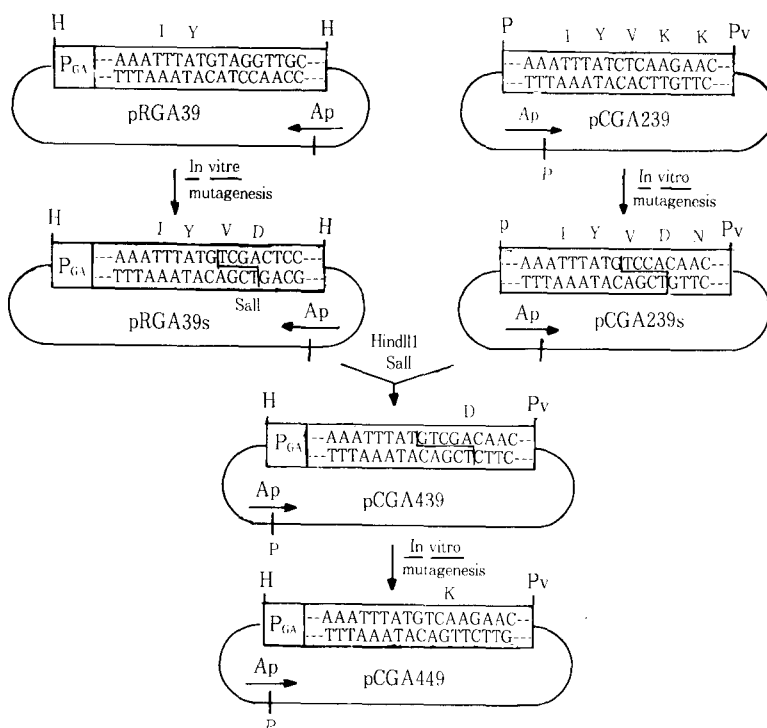
3. 제3단계 : *Rhizopus* mRNA로부터 글루코아밀라아제 cDNA 유전자의 클로닝

DNA 유전정보가 단백질로 발현되기까지 전사와 번역과정을 거치게 되는데 이때 최종적으로 단백질을 만드는 암호는 mRNA 형태로 존재한다. 앞에서 설명한 바와 같이 게놈유전자는 intron이 있으므로 대장균이나 효모에서 정상적인 단백질을 만들지 못하므로 mRNA로부터 역으로 DNA를 만들면 intron이 없는 유전자가 될 것이다. 이렇게 만들어진 DNA를 cDNA라고 하는데 이것은 mRNA로부터 역전사(reverse transcription)라는 과정을 통해서 만들어 진다. *Rhizopus*로부터 mRNA를 분

리하여 역전사효소를 이용하여 cDNA를 만든 다음 벡터에 연결하여 대장균으로 transformation하였다. 약 100,000대장균 transformant를 대상으로 하여 앞에서 설명한 hybridization 방법으로 글루코아밀라아제 cDNA를 가진 대장균을 선별한 결과 여러개의 양성반응을 보이는 콜로니를 찾았다. 그 중에서 제일 긴 cDNA를 가진 것은 pCGA239라는 플라스미드였으며, 이것으로부터 cDNA 유전자의 염기서열을 결정하였다. [그림 4, 5]에서 보는 바와 같이 pCGA239는 글루코아밀라아제 유전자의 거의 전 부분을 포함하고 있었으나, 글루코아밀라아제의 N-말단부위에 해당하는 부분이 없었다. 따라서 이 플라스미드를 이용해도 대장균이나 효모에서 완전한 *Rhizopus* 글루코아밀라아제를 만들 수 없는 것이다. 이런 상황에서 게놈유전자를 가지고 있는 pRGA39와 cDNA 유전자를 가진 pCGA239를 이용하여 완전한 글루코아밀라아제 유전자를 가진 재조합 플라스미드를 제조하기로 계획하였다.

4. 제4단계 : 완전한 글루코아밀라아제 단백질을 만드는 유전자의 제조.

게놈유전자를 가진 pRGA39와 cDNA 유전자를 가진 pCGA239를 이용하여 완전한 글루코아밀라아제를 만들 수 있는 유전자를 만들고자 하였다. [그림 5]의 글루코아밀라아제 유전자는 게놈유전자의 염기서열과 cDNA 염기서열을 종합하여 *Rhizopus*에서 생산되는 글루코아밀라아제에 최적으로 맞는 염기서열을 나타낸 것이다. 이것을 두고 볼 때 cDNA 유전자를 가진 pCGA239는 단백질의 N-말단부위를 명령하는 145bp가 빠진 것으로 나타났다. 이 부위를 게놈유전자로부터 가져오기 위해 site-directed mutagenesis(유전자의 특정부위를 정해서 원하는 뉴클레오타이드로 바꾸는 기술) 방법을 사용하였다. [그림 6]에서 나타낸 바와 같이 pRGA39와 pCGA239 플라스미드의 동일한 부위에 site-directed mutagenesis 방법으로 제한효소



[그림 6] In vitro mutagenesis에 의한 완전한 글루코아밀라아제 유전자의 제조.

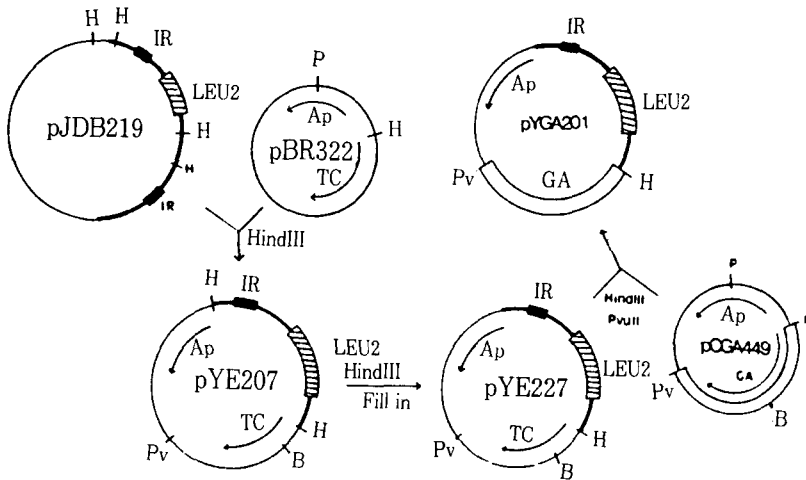
Boxes represented the fragments containing the glucoamylase genes. I, Y, K, N, and D are one letter descriptions of amino acids. SalI sites were created in pRGA39 and pCGA239 by *in vitro* mutagenesis (see MATERIALS AND METHODS) resulting in pRGA39s and pCGA239s,

respectively. pCGA439 was constructed by recombination of pRGA39s and pCGA239s at HindIII and salI sites. The altered amino acid(D) was restored to the original amino acid (K) by *in vitro* mutagenesis.

Sal I 절단자리를 만든 다음 Hind III와 Sal I 제한 효소로 각 플라스미드를 절단한 후 연결시켜 pCGA439와 같은 재조합 플라스미드를 만들었다. 이렇게 되면 원래의 lysine이 있던 자리에 aspartic acid가 들어가게 되므로 다시 site-directed mutagenesis 방법으로 lysine 잔기가 들어가도록 수정하였다. 이렇게 만들어진 재조합 플라스미드 pCGA449는 완전한 *Rhizopus* 글루코아밀라아제를 만들 수 있는 유전자를 가지게 된다.

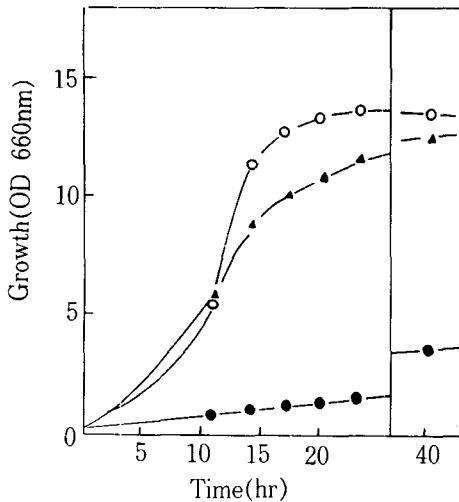
5. 제5단계 : *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자의 효모에로의 클로닝과 발현.

pCGA449 플라스미드는 글루코아밀라아제의 완전한 유전자를 가지고 있지만 효모에서 복제할 수 없으므로 세포내에서 유지될 수 없다. 따라서 효모에서 유지될 수 있는 플라스미드로 만들어야 하는데 그 과정이 [그림 7]에 나타나 있다. 우선 대장균과 효모 어느 쪽에서나 세포내에서 유지될 수 있고, 또 selective marker를 가진 shuttle 벡터 pYE207를 만들고 이 플라스미드에서 제한 효소 Hind III site를 하나 없앤 pYE227을 최종적으로 만들었다. 이 플라스미드는 효모의 플라스미드에 해당되는 2 μ m DNA의 복제시점을 가지고 있고,



[그림 7] 효모에서 발현시키기 위한 shuttle-vector의 제조.

The restriction sites used are shown. The thin line represents the pBR322 moiety and the thick line represents the yeast DNA moiety. IR indicates the inverted repeat sequence of 2μ M DNA. The restriction sites P, H, B, and Pv indicates PstI, HindIII, BamHI and PvuII, respectively.

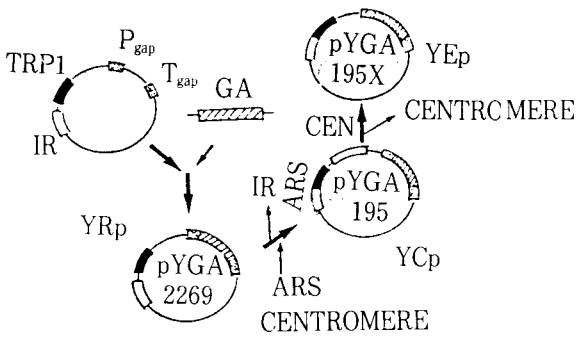


[그림 8] pYGA201플라스미드를 함유한 재조합 효모의 성장과 글루코아밀라아제 생산.

Cells were cultivated aerobically at 30° C. The growth rate of the cells was determined from the absorbance at 660nm. The yeast, XS-30-2B, harboring pYGA201 which contained the entire glucoamylase gene was grown on YPS(2%

starch, 2% polypeptone and 1% yeast extract) medium(-▲-). The control yeast, XS-30-2B, without the plasmid was grown on YPS medium (-●-) or YPD(2% glucose, 2% polypeptone and 1% yeast extract) medium(-○-).

효모에서 LEU2를 selective marker로 가지고 있는 것이다. 여기에 제4단계에서 제조한 pCGA449 플라스미드에 들어있는 글루코아밀라아제 유전자에 HindIII/PvuII로 절단하여 삽입하였다. 이렇게 만들어진 pYGA201플라스미드를 *S.cerevisiae* XS-30-2B(α , *trp1*, *leu2*, *his3*, *ura3*) 균주로 transformation시켰다. 이와 같이 만들어진 재조합 효모균주는 전분을 유일한 탄소원으로 가진 배지에서 정상적인 성장을 보였으며, 0.005U/ml의 글루코아밀라아제 활성을 보였다[그림 8]. 지금까지의 5단계 과정을 통하여 글루코아밀라아제 유전자를 효모로 클로닝하였고, 이 유전자가 효모에서 발현되어 글루코아밀라아제를 생산하는 것을 확인하였다. 이상의 연구를 통하여 전분을 전혀 이용할 수



[그림 9] 효모에서 고발현 벡터의 제조

<표 1> 효모에서의 *Rhizopus* 글루코아밀라아제 생산성 향상

Strain	Promoter	Plasmid	Activity (U/ml)	Ratio
G-2910	original	pYGA 2069	0.005	1
G-2901	GPD	pYGA 2269	0.2	40
G-3901		pYGA 195	0.5	100
G-3315	GPD	pYGA 195	0.9	180
G-5315-1		integrated	1.2	240
G-5315-2			1.5	300
G-5315-1			7.6	1,500
G-5315-3			10.0	2,000
G-5315-3*	GPD	integrated	13.0	2,600

* substituted galactose for glucose

없는 효모가 이제는 전분을 이용할 수 있는 효모로 개량된 것이다.

6. 제6단계 : *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자의 효모에서의 고발현과 안정성 향상.

유전공학적으로 개량된 효모를 이용하여 전분을 직접 발효하기 위해서는 약 1U/ml의 글루코아밀라아제 활성이 필요하다. 그러나 지금까지 개발된 pYGA201 플라스미드를 이용해서는 효모에서 0.005U/ml밖에 효소가 생산되지 않으므로 200배 이상의 고발현화가 필요하다. 효모에서 *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자를 고발현시키기 위해서 가

능한 여러가지 방법들을 [그림 3]의 제6단계에서 소개하였다.

첫번째로 프로모터(promoter)의 개량이다. 프로모터는 유전자가 발현되기 위해서 일차적으로 RNA로 전사되어야 하는데 이 때 RNA를 만드는 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 자리를 말한다. 프로모터가 강하다는 것은 RNA 중합효소가 잘 결합해서 많은 양의 mRNA를 만든다는 것을 의미하고 약하다는 것은 이와 반대로 적은 양의 mRNA가 만들어 진다는 것을 뜻한다. 많은 양의 mRNA가 만들어지면 이들을 이용해서 단백질이 만들어지므로 단백질생산량도 늘어나게 되는 것이다. 따라서 원하는 단백질을 많이 만들려면 일차적으로 강력한 프로모터를 사용해야 한다. 효모에서는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자의 프로모터가 강력한 것으로 알려져 있는데 이 프로모터를 글루코아밀라아제 프로모터대신 치환시켜 pYGA2269와 같은 플라스미드를 만들었다 [그림 9]. <표 1>에서 나타낸 바와 같이 강력한 프로모터로 치환시키므로써 초기보다 40배 글루코아밀라아제 활성이 증가된 0.2U/ml의 효소활성을 배양액에서 측정할 수 있었다. 지금까지 만든 플라스미드는 효모세포내에서 많은 수의 copy로 존재하는 YEp형 플라스미드인데 (말하자면 플라스미드가 세포내에 여러개 존재하므로써 세포내 글루코아밀라아제 유전자가 여러개 존재하는 효과를 준다), 효모세포내에서 한 copy로만 존재하는 YCp형 플라스미드 pYGA195를 [그림 9]와 같은 방법으로 제조하였다. 이 경우 배지중으로 0.5U/ml의 글루코아밀라아제 활성을 보여 글루코아밀라아제 유전자가 여러개 존재하는 것보다 한개 존재하는 것이 더 높은 효소활성을 보였다. 이러한 결과는 mRNA수가 많다고 해서 반드시 고발현된다는 것은 아니라는 사실을 말하는 것이며, 이 경우 단백질합성의 속도조절단계(rate-limiting step)는 전사이후의 과정 즉, 번역, 분비과정이라는 것을 사

사하는 것으로 생각된다.

두번째는 숙주효모의 개량이다. 지금까지 사용된 *S. cerevisiae* XS-30-2B균주는 유전해석용 균주로서 실용효모에 비해서 증식능이나 발효능이 낮아 실제 알콜발효에 이용하는데 문제가 있다. 숙주효모를 개량하기 위해서 2배체 보존균주를 포자형성시켜 1배체 포자를 분리하고 *S. cerevisiae* XS-30-2B균주와 교배, 분리를 반복하여 trp1영양요구성을 가지고 있으면서 발효능이 높은 1배체 균주 G1315 균주를 얻었다. 이 G1315 균주에 pYGA 2269와 pYGA195를 도입한 결과 0.5, 1.0U/ml의 글루코아밀라아제 활성을 보여 XS-30-2G균주에서 보다 2배의 효소활성이 증가되었다.

세번째는 글루코아밀라아제 유전자의 염색체내로의 도입이다. 일반적으로 pYGA195, pYGA2269 플라스미드는 선택압조건(이 경우는 트립토판결손

<표 2> 각종 효모형질전환체에 의한 직접알콜 발효능 비교.

Strain	GA gene copy	GA act. U/ml	Alcohol v/v%
G-5315-1	>2	6.7	7.2
G-5315-1'	1	1.3	13.0
G-5315-2	1	2.2	13.0
pYGA195	1	0.9	12.8
pYGA2269	30~50	0.5	3.8
1-TRP	1	1.2	12.5
2-TRP	2	2.8	13.3
3-TRP	3	3.8	12.3
5-TRP	5	6.0	11.5
CONTROL	-	-	1.5

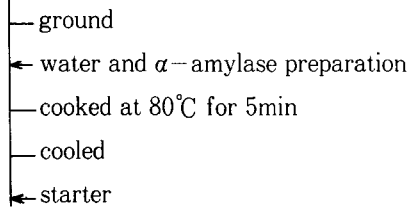
배지)에서 약 10세대 배양 후 75%, 70% 정도의 세포에만 플라스미드가 유지되고 나머지 세포에서는 플라스미드가 소실되게 된다. 따라서 글루코아밀라아제 유전자를 효모세포내에 안정하게 유지하기 위해서는 효모 염색체내로 삽입시키는 것이 더

욱 확실한 방법이다. 먼저 pYGA195에서 centromere를 제거한 pYGA195X 플라스미드를 만들고[그림 9], 이것을 G1315효모균주에 도입하였다. 이렇게 하면 쉽게 세포내 플라스미드가 소실되는데 G1315 transformant를 계속 배양하면서 트립토판 합성능을 회복한 균주를 선별하게 되면 그 세포염색체내에 pYGA195X가 재조합되어 삽입된 균주를 찾을 수 있다. 이와 같이 염색체속으로 글루코아밀라아제 유전자가 삽입된 균주들은 유전자의 삽입 위치, 삽입된 유전자 copy수 등에 따라 효소활성이 다른데 G5315-1균주는 5.2U/ml, G5315-2균주는 1.0U/ml, G5315-3균주는 10U/ml의 글루코아밀라아제 활성을 보였다<표 1>. 이들 균주를 이용하여 알콜발효성 실험을 해본 결과 G5315-2균주가 가장 좋았다<표 2>. 이 결과는 글루코아밀라아제 활성이 높다고 해서 전분의 직접발효능이 높다는 것은 아니라는 사실을 보여준다.

네번째 gene dosage효과이다. 글루코아밀라아제

1. Low Temperature Cooking Fermentation

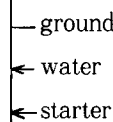
Starchy materials Corn, Cassava, Sweet potato



35°C Fermentation

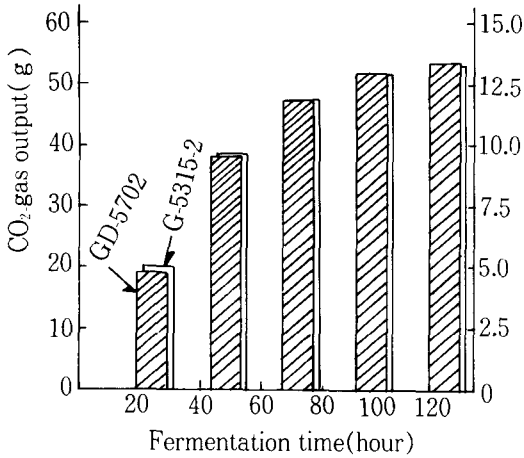
2. Noncooking Fermentation

Starchy materials (corn, cassava, sweet potato)



35°C Fermentation

[그림 10] 직접알콜발효의 개요.



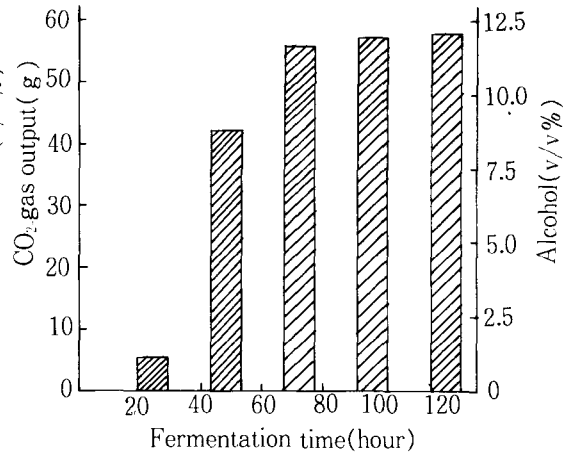
Strain	G-5315-2	GD-5702
Alcohol	13.0%	13.1%
RFE*	94.1%	94.8%
PH	4.30	4.30
Total Acid	3.9mℓ	3.9mℓ
RDS**	0.25%	0.23

RFE* : Relative Fermentation Efficiency
 RDS** : Residual Direct Sugar

[그림 11] 재조합 효모를 이용한 무증자 옥수수 전분의 직접알콜발효. GD-5702균주는 G-5315-2의 2배체 효모.

유전자를 효모의 염색체내로 삽입시킬때 TRP1 구조유전자중에 글루코아밀라아제 유전자를 세포당 1,2,3,5 copy 삽입시켰을 때 <표 2>에서 보듯이 1-TRP, 2-TRP, 3-TRP, 5-TRP 균주는 각각 1.2, 2.8, 3.8, 6.8U/ml의 글루코아밀라아제를 생산하였다. 실험결과에 의하면 10copy까지는 gene dosage 효과(유전자 부과효과, 즉 세포당 유전자 수가 많아지면 발현단백질량도 증가되는 효과)가 나타났으나, 그 이상에서는 오히려 효소활성이 감소하였다. 이러한 결과는 외부유전자의 발현에 있어 copy 수 이외에도 다른 요인들이 복합적으로 관여된다는 것을 시사해 준다.

이상과 같은 방법으로 *Rhizopus* 글루코아밀라아제 유전자의 효모에서의 발현극대화를 연구하였다. 이러한 연구를 통하여 초기 pYGA201 플라스미드에서 0.005U/ml였던 것이 현재 약 13U/ml의 글



Alcohol	12.1
RFE*	100
PH	4.90
Total Acid	3.1mℓ
RDS**	0.16

RFE* : Relative Fermentation Efficiency
 RDS** : Residual Direct Sugar

[그림 12] 재조합 효모 G-5315를 이용한 카사바 전분의 저온증자법에 의한 알콜의 직접 발효.

루코아밀라아제를 생산할 수 있어 약 2,600배로 효소생산성을 증가시킬 수 있었다. 이 결과는 효모균체 단백질의 8%가 글루코아밀라아제로 분비된다는 것을 나타내고 있다.

7. 제7단계 : 여러가지 재조합 효모균주를 이용한 알콜발효성 검토.

지금까지 개발한 여러가지 재조합 효모들의 알콜 발효성 실험을 해본 결과 G5315-2균주가 가장 좋았다. 이 균주를 옥수수전분의 무증자 직접알콜 발효와 카사바전분의 저온직접알콜발효[그림 10]에 적용시킨 결과가 [그림 11, 12]에 나타나 있다. 옥수수전분의 경우 글루코아밀라아제 첨가없이 무증자 전분을 직접발효할 때 13.1%의 알콜을 생산하였다. 또한 카사바전분을 직접발효할 때 저온증자법으로 12.1%의 알콜을 생산할 수 있었다. 이러한 결과는 글루코아밀라아제를 충분히 첨가하여

알콜발효 한것을 100으로 했을 때 95%, 100%를 나타내고 있어 형질전환된 효모를 사용하는 경우 글루코아밀라아제의 첨가없이 전분질 원료의 종류에 따라 무증자 직접발효나 저온증자 직접발효법이 가능하다는 것을 보여준다.

V. 기타 발효효모의 균주개량

앞에서 소개한 연구와 별도로 곰팡이 글루코아밀라아제 유전자에 관한 연구는 덴마크의 노보연구소에서 *Aspergillus niger*에 대한 것(1), 미국의 세투스그룹에서 *Asp. awamori*의 것(2)에 관하여 발표한 바 있다. 이들은 무증자 전분의 당화와는 상관없이 전분의 당화효소 개발의 일환으로 이루어진 연구라고 보여진다. 최근에는 일본에서 청주효모에 국균(*Asp.oryzae*)의 α -아밀라아제 유전자를 도입한 바 있고, 계속해서 글루코아밀라아제 유전자를 도입하여 청주제조시 국균을 첨가할 필요 없이 청주효모만으로 청주를 제조한다는 계획을 세우고 있다(11). 또 한편으로는 일본에서 소주를 만드는데 사용되는 *Asp.shirousanii*에서 α -아밀라아제와 글루코아밀라아제의 유전자를 클로닝하여 효모에서 발현시킨 바 있다(13). 이들은 여기에서 한 걸음 더 나아가 두 유전자를 헵쳐서 하나의 융합유전자(fusion gene)를 만들었고 이것을 효모에서 발현시켜 한 단백질이 알파아밀라아제 활성과 글루코아밀라아제 활성을 갖는 두가지 작용을 하는 효소(bifunctional enzyme)를 만드는데 성공하였다(14). 이러한 연구결과는 알콜발효에 있어서 유전공학적인 접근방법이 어떻게 이용되고 있는가를 보여주는 좋은 사례라고 생각이 되며, 앞으로 계속된 연구를 통하여 유전공학적인 방법으로 개량된 효모들이 다양한 알콜발효에 있어서 적용될 것으로 기대된다.

VI. 맺음말

이상의 연구를 통하여 전분을 증자과정없이 또 글루코아밀라아제의 첨가없이 유전공학적방법으로 개량된 효모를 이용하여 직접발효하므로써 기존의 방법과 거의 동등한 발효수율을 얻을 수 있었다. 또한 연구과정을 통하여 무증자 전분의 분해에 관한 많은 분자생물학적 사실을 발견하였고, 외부유전자의 효모에서의 발현과 분비 등에 관하여도 많은 과학적 사실도 발견을 할 수 있었다. 이러한 연구결과를 토대로 앞으로 보다 완벽한 무증자 전분의 직접알콜발효법이 개발될 것이다. 한편으로는 단백질화학과 유전공학의 결합으로 볼 수 있는 단백질공학(protein engineering) 기술을 이용하게 되면 무증자 전분을 더욱 효과적으로 분해할 수 있는 글루코아밀라아제를 고안하여 만들 수 있을 것으로 보인다. 앞으로 무증자 알콜발효는 보다 효과적인 방법의 개발과 함께 원유가격 등과 같은 사회적 흐름을 고려하여 실용화될 것으로 예측된다.

VII. 참고문헌

1. Boel,E., I.Hjort, B.Svensson, F.Norris, K. E. Norris, and N.P.Fill. 1984. Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. EMBO J. 3 : 1097-1102.
2. Nunberg,J.H., J.H.Meade, G.Cole, F.C. Lawyer, P.McCabc, V.Schweickart, R.Tal, V.P. Wittman, J.E.Flatgaard, and M.A. Innis. 1984. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. Mol.Cell.Biol. 4 : 2306-2315.
3. Ashikari,T., N.Nakarmura, Y.Tanaka, N. Kiuchi, Y.Shibano, T.Tanaka, T.Amachi, and H. Yoshizumi. 1985. Cloning and expression of

- the *Rhizopus* glucoamylase gene in yeast. Agric. Biol. Chem. 49 : 2521 - 2523.
4. Ashikari, T., N. Nakamura, Y. Tanaka, N. Kiuchi, Y. Shibano, T. Tanaka, T. Amachi, and H. Yoshizumi. 1986. *Rhizopus* Raw - starch - degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. Agric. Biol. Chem. 50 : 957 - 964.
 5. Tanaka, Y., T. Ashikari, N. Nakamura, N. Kiuchi, Y. Shibano, T. Amachi, and H. Yoshizumi. 1985. Comparison of amino acid sequences of three glucoamylases and their structure - function relationships. Agric. Biol. Chem. 50 : 965 - 969.
 6. Tanaka, Y., T. Ashikari, N. Nakamura, N. Kiuchi, Y. Shibano, T. Amachi, and H. Yoshizumi. 1986. Glucoamylase produced by *Rhizopus* and by a recombinant yeast containing the *Rhizopus* glucoamylase gene. Agric. Biol. Chem. 50 : 1737 - 1742.
 7. Yoshizumi, E., T. Ashikari, N. Nakamura, S. Kunisaki, Y. Tanaka, N. Kiuchi, and Y. Shibano. 1987. Expression of *Rhizopus* glucoamylase gene in yeast and its application. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 34 : 148 - 154.
 8. Yoshizumi, H. 1987. 글루코아밀라아제 생산효모의 육종과 전분직접 발효. 발효와 공업, 46 : 579 - 585.
 9. 변시명, 신용철. 1990. 무증자 알콜발효의 개발 현황과 향후 전망. 주류공업, 10(1) : 32 - 44.
 10. 신용철. 1991. 무증자 알콜발효를 위한 생전분 분해효소의 개발동향과 주류공업에의 이용방향. 주류공업, 11(1) : 43 - 57.
 11. 北本勝. 1991. 국균의 알파-아밀라아제를 생산하는 청주효모. 화학과 생물. 29 : 11 - 12.
 12. Fukuda, K., Y. Teramoto, and S. Hayashida. 1992. The hyperdigestion of raw starch by a carbohydrate - rich glucoamylase from a protease - and glycosidase - Negative mutant of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* F - 2035. Biosci. Biotech. Biochem. 56 : 8 - 12.
 13. Shibuya, I., G. Tamura, T. Ishikawa and S. Hara. 1992. Cloning of the α -amylase cDNA of *Aspergillus shirousamii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem. 56 : 174 - 179.
 14. Shibuya, I., G. Tamura, H. Shima, T. Ishikawa, and S. Hara. 1992. Construction of an α -amylase/glucoamylase fusion gene and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem. 56 : 884 - 889.