

*Aspergillus niger*로 부터 α -glucosidase 발현억제 형질전환체의 분리

이동건 · 이진영 · 서영배^{1*}

한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹경북대학교 미생물학과

Isolation of α -Glucosidase Suppression Transformants on *Aspergillus niger*. Dong-Gun Lee, Jin-Young Lee and Young-Bae Seu^{1*}. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-333, Korea, ¹Department of Microbiology, College of Natural Science, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea – We have already cloned an extracellular α -glucosidase gene from *Aspergillus niger* with oligonucleotide probe synthesized on the basis of the peptide sequences determined previously. The DNA sequence revealed an open reading frame of 895 amino acids split by three introns. We are attempting to construct an *A. niger* strain deficient in the α -glucosidase enzyme activity, which would be useful for the glucoamylase production without contamination by the industrially undesirable α -glucosidase. For destruction of the α -glucosidase gene, we try to make transformations. A cloned partial α -glucosidase gene was introduced into *Aspergillus niger*, and transformants with suppressed α -glucosidase activity were isolated. The transformants were cultured on YPD medium which contained Hygromycin B at 30°C. The activity of α -glucosidase of the suppressed transformants was compared to that of wild type activity. As shown by southern-hybridization, we detected that the transformant was a heterocaryon.

사상균 중 *Aspergillus niger*(흑국균)는 오래 옛날부터 우리 인간의 생활과 밀접한 연관을 맺어 왔으며 효소의 보고라고 할 정도로 일컬어지고 있으며, 의약제제, 향생제, 효소제 등의 생산에도 많이 이용되어지고 있다. 그 중 α -amylase, glucoamylase 그리고 α -glucosidase 등 산업적으로 유용한 전분가수분해효소를 많이 분비하는 균주로 오래전부터 알려져 왔다. 특히 이러한 효소들은 현재 전분을 가수분해시켜 glucose 단위로 생산하는 데 산업적으로 크게 이용되고 있으며, 그 가운데 α -glucosidase(α -D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.20)(1)는 malto-oligosaccharide를 isomaltose 또는 nigerose 등으로 이성화 시키는 trans-glucosidase 반응을 촉매하는 역할을 하고 있다(2). 이러한 생산물은 요즈음 고부가가치의 감미료 산업에 많이 이용되고 있다. 한편, *A. niger*의 glucoamylase의 경우 실제적으로 전분산업에 큰 역할을 하고 있으며, 전분으로부터 포도당을 생산하는 과정에서 glucoamylase fraction에 α -glucosidase의 오염에 의해 포도당의 순도가 급격히 줄어드는 실정에 놓여 있다. 이러한 면에서 볼 때 α -glucosidase 과잉생산 변이주의 분리와 생산저해 변이주의 분리가 필요한 실정이다. 본 보고에서는 *A. niger*로부터 α -glucosidase 생산저해 변이주를 분리 한다면 산업적으로 glucoamylase에 의한 포도당의 순도를 더 높일 수 있을 것이라는 생각에서 곰팡이의 유전자 조작법을 이용하여 α -glucosidase 생산저해 형질전환체의 분리를 시도하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

현재 glucoamylase 생산균주로 사용되고 있으며, α -glucosidase 유전자의 donor인 *A. niger* GN-3를 숙주로 사용하였으며, 배지성분은 Dextrose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5% pH 5.0인 YPD 완전배지를 사용하였다.

효소활성측정

우선 기질로 4% Methyl- α -glucoside(Wako Pure Chemical Industries, Ltd)를 50 mM Sodium acetate 완충용액(pH 5.0)에 녹인 후, 이 기질용액 0.5 ml/과 효소용액 0.1 ml를 혼합한 후, 40°C에서 30분간 반응을 시킨 후 100°C, 5분간 열처리한 다음 그 환원당을 F Kit D-glucose(Boehringer Mannheim)으로 측정하였다(3). 그리고 활성은 1분간 생성되는 1 μ mol의 glucose 양을 1 unit로 계산하였다.

Plasmid의 조제

α -Glucosidase의 coding region을 포함한 *Bam*HI에서 *Pst*I 단편 4.9 Kb(Fig. 1)를 PUC19의 *Bam*HI에서 *Pst*I site에 삽입하고 α -glucosidase의 coding region에 있는 *Eco*105I site를 *Xba*I linker를 사용하여 치환시켰다. 다음 pDH25(4) plasmid중의 Hygromycin 내성 유전자(*Eco*RI/*Sal*I-*Xba*I) 단편을 위에서 제작한 plasmid중 α -glucosidase의 coding region중 *Xba*I-*Sal*I site에 삽입시켜 pDHD1이라는 형질전환에 사용되어질 plasmid를 제작하였다.

*Corresponding author.

Key words: *A. niger*, hygromycin, transformation

형질전환법

A. niger 형질전환은 PEG-protoplast법(5)으로 하였으며, plasmid의 양은 20 µg을 사용 하였으며, protoplast의 재생과 형질전환체의 선택은 *Hygromycin B* 100 µg/ml이 포함된 YPD 평판배지를 사용하였다.

단포자 분리

분리한 형질전환체로부터 포자를 착생시킨 후, 그 포자를 0.01% Tween-80 계면활성제 용액을 이용해 분리한 후 그것을 3G3 glass filter로 거른 후, 희석하여 단포자 분리를 시도하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 *A. niger*로부터 분리한 α-glucosidase 유전자(6)의 restriction map을 나타내는 것으로 α-glucosidase 유전자의 coding region 사이에 *hph* 유전자(hygromycin B phosphotransferase 유전자)를 삽입시켜 pDHD1이

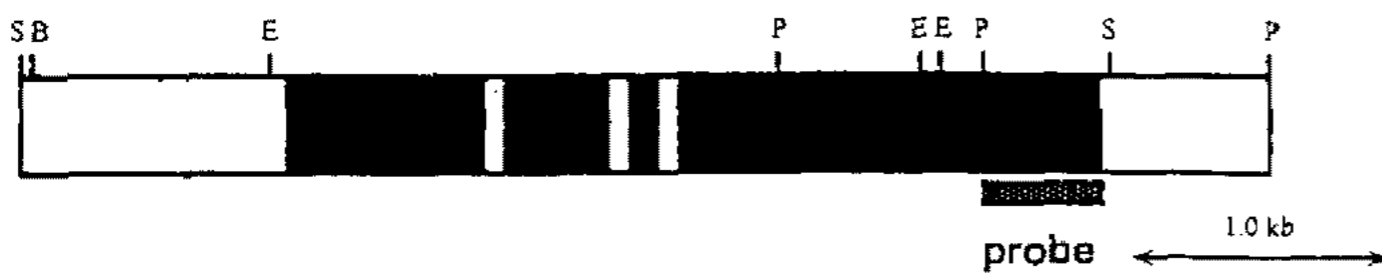


Fig. 1. The restriction Map of *A. niger* α-glucosidase gene.
B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, P: *Pst*I, S: *Sph*I

라는 plasmid를 만들었다(Fig. 2). 이 plasmid를 α-glucosidase 유전자를 분리한 *A. niger*를 숙주로 하여 형질전환을 시켰다. 일반적으로 사상균의 형질전환에 있어서, 들어가는 plasmid는 100% 숙주세포의 염색체 상으로 삽입되며 homologous recombination과 non-homologous recombination이 동시에 일어날 수 있는 것이 지금까지 알려진 사실이다. 따라서, 만약 유전자가 homologous recombination에 의해 파괴가 된다면 glucoamylase에 의한 포도당의 순도를 더 높일 수 있을 것이라는 생각으로 *Hygromycin B* 100 µg/ml이 포함된 YPD 평판배지를 사용하여 형질전환체를 선별한 후 단포자분리에 의해 4균주의 α-glucosidase 효소활성이 낮은 형질전환체 4 균주를 분리 할 수 있었다(Table 1). 그중 모균주보다 9배 정도 효소활성이 낮은 T4 형질전환체로부터 포자를 채집하여 *Hygromycin B* 100 µg/

Table 1. α-glucosidase production by *A. niger* transformants.

Strain	clone	α-glucosidase Specific Activity (mU/mg protein)
<i>A. niger</i> transformants	T1	6.1
	T2	3.8
	T3	4.2
	T4	2.0
<i>A. niger</i> GN-2		18

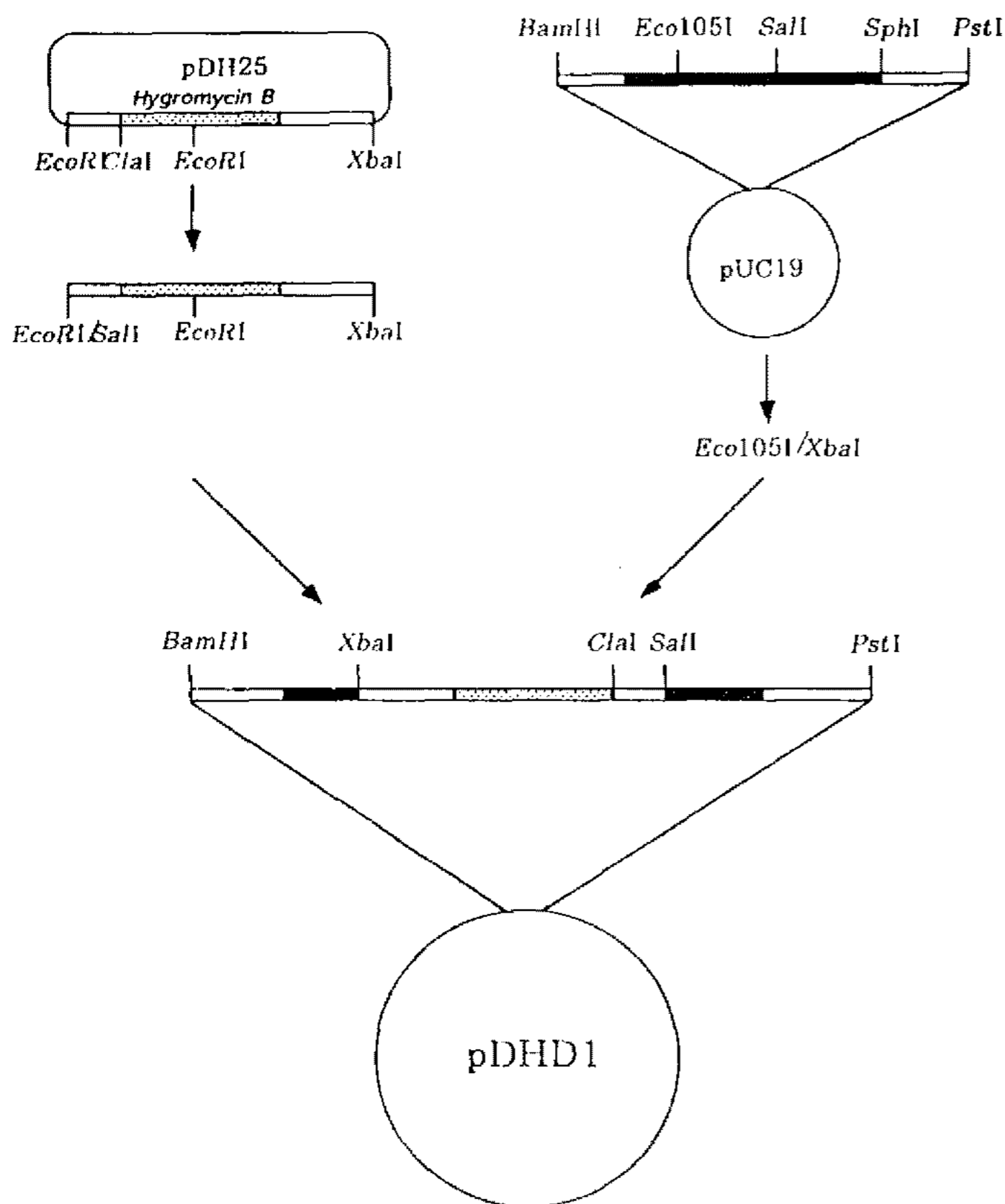


Fig. 2. Construction of *A. niger* integration vector pDHD1.

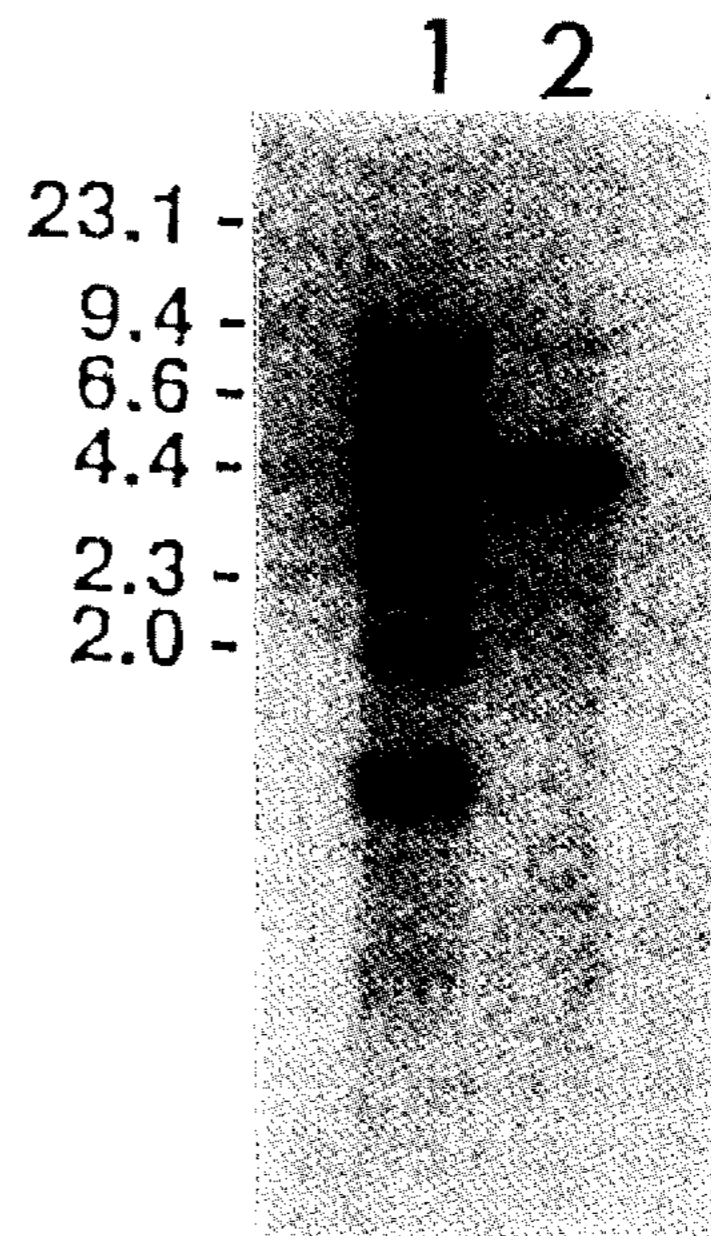


Fig. 3. Southern-blot analysis of DNA from the *A. niger* transformant.

Southern hybridization of the chromosome DNA of *A. niger* transformant. Lane 1, *A. niger* T4 transformant DNA digested with *Sph*I. Lane 2, *A. niger* DNA digested with *Sph*I. The numbers in the left show the positions of the molecular standards (λ -*Hind*III) in Kb.

ml이 포함된 YPD 액체배지에 접종후 30°C에서 진탕 배양을 한 후 형질전환체의 염색체를 분리하여 제한효소 *SphI*으로 절단한 후 α -glucosidase 3'-말단쪽의 *PstI*-*SphI* 단편을 probe로 사용하여 Southern hybridization으로 확인한 결과, pDHD1 plasmid가 여러 가지 형태로 모균주의 염색체상에 삽입된 것을 알 수가 있었지만, *A. niger*의 *SphI* 단편 4.3 Kb와 비교해 볼 때 size가 제각기 다른 것을 확인할 수가 있었다(Fig. 3). 분리한 형질전환체로부터 homocaryon의 분리를 하기 위해 점점 계대배양하여 확인 중에 있으며, 한편 분리한 형질전환체의 생리화학적 특징도 조사가 진행 중에 있다.

참고문헌

Barman, T.E. 1969. Enzyme Handbook, vol. II. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 564-576.

Iwano, K., K. Shibata, K. Mitsunaga, and Y. Nuno-

kawa. 1977a. Enzyme in sake making. IX. Properties of fungal transglucosidase. *J. Brew. Soc. Japan.* **72**: 517-520.

3. Iwano, K., M. Sato, K. Shibata, K. Mitsunaga, and Y. Nunokawa. 1977b. Enzyme in sake making. VII. Estimation of transglucosidase in the presence of α -amylase and glucoamylase. *J. Brew. Soc. Japan.* **72**: 459-462.
4. Cullen, D., S.A. Leong, L.J. Wilson, and D.J. Henner. 1987. Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin resistance gene. *Gene* **57**: 21-26.
5. Gomi, K., Y. Iimura, and S. Hara. 1987. Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2549-2555.
6. Nakamura, A., I. Nishimura, A. Yokoyama, D.G. Lee, M. Hidaka, H. Masaki, A. Kimura, S. Chiba, and T. Uozumi. 1996. Cloning and sequencing of an α -glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A. nidulans*. *J. Biotechnol.* In press.

(Received 9 February 1996)