

단 보

## 유전자 형질전환을 통한 쌀 전분 분해효소 재조합 효모균주의 개발과 발효특성조사

이자연<sup>1</sup> · 진종언<sup>2</sup> · 배 석<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>2</sup>동강대학교 뷰티미용과

### Construction of the recombinant yeast strain with transformation of rice starch-saccharification enzymes and its alcohol fermentation

Ja-Yeon Lee<sup>1</sup>, Jong-Eon Chin<sup>2</sup>, and Suk Bai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Cosmetology, Dongkang College, Gwangju 61200, Republic of Korea

(Received April 4, 2016; Revised May 9, 2016; Accepted May 10, 2016)

**ABSTRACT:** To improve antioxidant glutathione (GSH) content and saccharification ability in sake yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*, the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene (*GSH1*) from *S. cerevisiae*, glucoamylase gene (*GAM1*) and  $\alpha$ -amylase gene (*AMY*) from *Debaryomyces occidentalis* were co-expressed in sake yeasts for manufacturing a refreshing alcoholic beverage abundant in GSH from rice starch. The extracellular GSH content of the recombinant sake yeasts increased 1.5-fold relative to the parental wide-type strain. The saccharification ability by glucoamylase of the new yeast strain expressing both *GAM1* and *AMY* genes was 2-fold higher than that of the yeast strain expressing only *GAM1* gene when grown in the culture medium containing 2% (w/v) rice starch. It generated 11% (v/v) ethanol from 20% (w/v) rice starch and consumed up to 90% of the starch content after 7 days of fermentation.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, glutathione, rice starch, saccharification

곡물을 이용하는 발효주 제조공정에 널리 사용되는 공급원은 쌀을 비롯하여 밀, 보리, 감자, 고구마 등의 많은 전분 작물들이 포함된다. 이들 중 특히 쌀은 가장 선호하는 원료로서 구성성분으로는 대부분이 전분으로 되어 있다(Suresh *et al.*, 1999; Fujieda *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). 맥주효모와 와인효모, 그리고 청주효모를 포함하는 *Saccharomyces cerevisiae*는 전분을 직접 이용하는데 필요한 전분 분해효소가 결여되어 있다. 그러므로 누룩이나 다량의  $\alpha$ -amylase와 glucoamylase를 첨가하는 액화(liquefaction)와 당화(saccharification)공정으로 전분을 포도당으로 분해해야 발효에 이용할 수 있다(Eksteen *et al.*, 2003; Shigechi *et al.*, 2004; Ghang *et al.*, 2007). 이러한 많은 비용과 복잡한 과정을 줄이기 위해 많은 연구자들은 전분 분해효소능이 우수한 누룩곰팡이 *Aspergillus awamori*

를 비롯한 *Aspergillus* 종들의 glucoamylases [ $\alpha$ -(1,4), (1,6)-D-glucan glucohydrolase (EC 3.2.1.3)]와  $\alpha$ -amylase [ $\alpha$ -(1,4)-D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.1)] 유전자와 효모 *Lipomyces*, *Saccharomycopsis* 그리고 *Debaryomyces* (*Schwanniomyces*) 종들의 glucoamylases와  $\alpha$ -amylases 유전자를 발현시키는 재조합 *S. cerevisiae*를 개발하였다(Dohmen *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1998; Nieto *et al.*, 1999; Eksteen *et al.*, 2003). 이 중 *D. occidentalis*는  $\alpha$ -amylase와 함께  $\alpha$ -1,4 결합은 물론 *Aspergillus* 종들의 glucoamylases를 비롯한 타 glucoamylases보다 높은  $\alpha$ -1,6 결합의 분해활성 즉 절지(debranching) 활성을 가진 glucoamylase (GAM)를 생산하는데  $\alpha$ -1,4 결합과 함께  $\alpha$ -1,6 배당결합이 풍부한 전분 당화에 최적으로 알려져 있다(Lin *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2014). 또한, 맥주효모나 와인효모와 달리 곡물발효에 주로 이용되는 청주효모는 전분 액화의 주산물인 이당류 맥아당 자화능이 매우 낮아 액화에 필요한  $\alpha$ -amylase

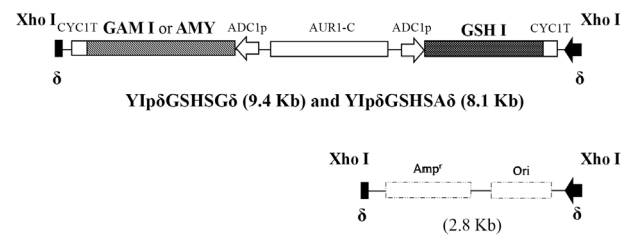
\*For correspondence. E-mail: sukbai@chonnam.ac.kr;  
Tel.: +82-62-530-3412; Fax: +82-62-530-3409

보다 전분 당화능이 우수한 glucoamylase가 전분 발효에 더 필수적이다(Baba *et al.*, 1974; Saito *et al.*, 1996; Asano *et al.*, 2001). 한편, glutathione (GSH)은 발효과정 중 중요한 방향화합물의 안전성을 증가시킴으로써 알코올음료의 풍미를 유지, 향상시킬 수 있는 주요 산화방지제로 작용한다(Wei *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2004). GSH의 합성에 중요한 효소 중 하나인  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase의 유전자(*GSH1*)를 과발현시켜 GSH 함량을 증진시킬 수 있다(Wang *et al.*, 2010a; Chen *et al.*, 2013). 본 연구에서는 누룩이나 전분 분해효소 없이 쌀 전분을 원료로 직접 효모를 이용하여 GSH가 풍부한 알코올음료의 제조를 위해, GSH 생산능이 증진되고 고효율 전분 당화능을 가진 청주효모를 개발하는 것을 목표로 하였다. 먼저, GSH 생산능을 증진시키기 위해 *S. cerevisiae*의 *GSH1* 유전자를  $\delta$ -integration system (Lee and Da Seliva, 1997; Kang *et al.*, 2003)을 이용하여 청주효모에서 발현시켰다. 다음으로 전분 당화능과 GSH 생산능의 증진을 위해 *D. occidentalis*  $\alpha$ -amylase 유전자(*AMY*)와 *GSH1* 유전자를  $\delta$ -integration system을 이용하여 *D. occidentalis* glucoamylase 유전자(*GAMI*)를 발현하는 청주효모 균주(Lee *et al.*, 2015)에 공동 발현시켰다. 제조된 여러 청주효모 균주들의 전분 분해 능력과 효소의 활성, GSH 함량 그리고 알코올 생산능을 조사하였다.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 는 형질전환 숙주와 plasmids 제조 및 증폭에 사용하였고 DNA의 조작과 *E. coli* 형질전환은 표준 프로토콜에 따라 실시하였다. 청주효모(sake yeasts)인 *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2346 (Kyokai No. 6)와 *GAMI* 유전자와 선별 유전자로 *S. cerevisiae*의 구리 저항성 유전자(*CUP1*)를 포함하고 있는 YIpSGCU2rD (Park *et al.*, 2014)로 형질전환된 재조합 균주 NBRC 2346/YIpSGCU2rD (NBRC 2346SG)를 효모형질전환의 숙주 균주로 이용하였으며, YIp $\delta$ AURSA $\delta$ , YIp $\delta$ SGSA $\delta$  그리고 YIp $\delta$ AGSG $\delta$  (Kang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011)는 본 연구에서 제작된  $\delta$ -integrative systems의 골격으로 이용하였다. 효모 형질전환은 Gietz 등(1992)의 방법에 따라 실시하였다. *GSH1* 유전자를 증폭하기 위해 *S. cerevisiae* *GSH1* 유전자(GenBank accession number: NM\_001181534)의 염기서열을 이용하여 제작한 PCR primers의 정방향 염기서열은 5'-TCAGGTACCATGGGACTCTTAGCTTTGGGC-3' 이고 역방향 서열은 5'-CGATCTAGATTAACATTTGCTTTCTATTGAAGG-3'이었다. *S. cerevisiae*의 genomic DNA로부터 위 primers를 이용하여 PCR로 증폭된 2.0 kb *GSH1* 유전자의 말단 부분을 *KpnI*과 *XbaI*로 절단하여 YIp $\delta$ AURSA $\delta$ 에서 *AMY* 유전자가 제거된 부분인 *ADC1p*의 뒤 부위에 삽입하여 YIp $\delta$ AURGSH $\delta$ 를 제조하였고, 제조된 벡터 안

에 *GSH1* 유전자의 삽입 여부를 PCR로 확인하였다. 다음으로 *GSH1*와 *AMY* 유전자 혹은 *GSH1*와 *GAMI* 유전자의 공동발현을 목적으로 두 유전자가 포함된  $\delta$ -integration systems을 구축하기 위해, YIp $\delta$ AGSG $\delta$ 와 YIp $\delta$ SGSA $\delta$ 에서 *ApaI*과 *SacI*으로 절단하여 각각 *GAI*과 *GAMI* 유전자가 제거된 부분에 YIp $\delta$ AURGSH $\delta$ 로부터 동일한 효소들로 절단하여 얻은 *GSH1* 유전자를 도입하여 YIp $\delta$ GSHSG $\delta$ 와 YIp $\delta$ GSHSA $\delta$ 를 제조하였다(Fig. 1).

YIp $\delta$ GSHSA $\delta$ 와 YIp $\delta$ GSHSG $\delta$ 를 선형화하기 위해 *XhoI*을 처리하여 불필요한 2.8 kb 크기의 세균 유전자와 ampicillin 저항성 유전자 부분은 형질전환 전에 제거하고 나머지  $\delta$ 서열이 양쪽 말단에 존재하는 *ADC1p-GSH1*과 *ADC1p-GAMI* (9.4 kb) 혹은 *ADC1p-GSH1*과 *ADC1p-AMY* 유전자 cassettes (8.1 kb)를 *S. cerevisiae* NBRC 2346 염색체 내에 반복서열로 100 copies 이상 존재하는  $\delta$ 서열(Saito *et al.*, 1996; Lee and Da Silva, 1997)에 상동접합으로 다수 도입시켜 multicopies로 존재하는 형질전환체를 제조하였고, 이들을 각각 NBRC 2346/YIp $\delta$ GSHSA $\delta$  (NBRC 2346GSHSA)와 NBRC 2346/YIp $\delta$ GSHSG $\delta$  (NBRC 2346GSHSG)라고 명명하였다. 이러한 integration cassettes를 이용하여 효모 염색체내에 다중 도입된 후 발현되는 유전자는 비선택 배지에서 장기간 발효에도 높은 안정성을 유지해야 하고 또한, 유전자 도입 시에 원핵성 세균 유전자와 항생제저항성 유전자가 제거되어야 하는데 본 연구의 청주효모를 이용하여 안전하고 유용한 재조합 효모균주의 제조는 위의 두 가지 조건에 적합하였다(Nieto *et al.*, 1999). 한편, *S. cerevisiae* 균주들 중 청주효모는 높은 발효능과 풍미를 가지고 있으므로 곡물을 이용한 양조용 효모로 선호되고 있으나 (Lee *et al.*, 2015), 대부분의 *S. cerevisiae* 균주들과 달리 맥아당(maltose) 자화능이 매우 낮다(Baba *et al.*, 1974; Kang *et al.*, 2003). *AMY* 유전자 발현결과로 전분을 대부분 maltose로 분해시키는  $\alpha$ -amylase 활성만으로는 청주효모들이 전분을 유일



**Fig. 1.** Schematic plasmid maps of YIp $\delta$ GSHSG $\delta$  and YIp $\delta$ GSHSA $\delta$  showing the relative size, restriction sites, and locations of the insert DNA. YIp $\delta$ GSHSG $\delta$  and YIp $\delta$ GSHSA $\delta$  were linearized by digestion with *XhoI*. The bacterial vector DNA sequences (2.8 kb) were excised before transformation.

한 기질로 이용할 경우 성장 및 발효율이 매우 낮다(Lee et al., 2015). 그러므로  $\alpha$ -amylase 활성에 이어 maltose를 포도당으로 분해시키는 glucoamylase 활성이 청주효모에서는 필수적이다(Saito et al., 1996). 그러므로 *GAMI* 그리고 *AMY* 유전자 공동발현을 위해 *GAMI* 유전자를 함유한 rDNA integration cassette인 YIpSGCU2rD로 형질전환 된 균주인 NBRC 2346SG (Lee et al., 2015)의 염색체  $\delta$ 서열 부위에 이차적으로 YIp $\delta$  GSHSA $\delta$ 가 다수 도입된 형질전환체를 제조하여 *GAMI*, *AMY* 그리고 *GSHI* 유전자가 공동발현되는 이 균주를 NBRC 2346SG/YIp $\delta$ GSHSA $\delta$  (NBRC 2346GSHSGSA)라고 명명하였다.

효모 배양에는 YPD 배지[1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) Bacto-peptone 그리고 2% (w/v) glucose]를 사용하였다. 효모 형질전환체는 1  $\mu$ g/ml aureobasidin A (TaKaRa)를 첨가한 YPD 평판배지 또는 0.4 mM CuSO<sub>4</sub>를 첨가한 YNBD 평판배지[0.67% (w/v) yeast nitrogen base, 2% (w/v) glucose 그리고 2% (w/v) Bacto-agar] (Domingues et al., 2000)에서 배양하였다. 그 다음 YPDS3 배지[3% (w/v) soluble starch를 함유한 YPD]로 옮겨 30°C에서 4일간 배양한 후 4°C에서 2일간 유지시켜 콜로니 주위의 투명환으로 전분 분해효소활성을 확인하였다(Lin et al., 1998). 형질전환체의 유지 보존은 1  $\mu$ g/ml aureobasidin A과 5 mM CuSO<sub>4</sub> (Wang et al., 2010b)를 첨가한 YPDS3를 사용하였다. 효소 활성능을 측정하기 위해서 YPS 액체배지[2% (w/v) soluble starch 혹은 2% (w/v) rice starch (Sigma)를 함유한 YP]를 이용하였다. Glucoamylase와  $\alpha$ -amylase 활성 측정은 pH 6.0, 40°C에서 30분간 반응시켰고 각각 PGO assay kit (Sigma)와 dinitrosalicylic acid 방법을 이용하여 측정하였다(Ghang et al., 2007). Glucoamylase와  $\alpha$ -amylase 효소 활성 1 unit (U)는 각각 ml당 1  $\mu$ mol의 포도당과 환원당을 유리시키는 양으로 정의하였다. 배지의 잔존 전분함량은 전분-요오드반응(Kim et al., 1988)에 의해 측정하였다. 환원형 GSH의 함량 분석하기 위해 Quantichrom glutathione assay kit (BioAssay Systems)을 사용하여 YPD 배지에서 3일간 자란 효모의 배양액으로부터 세포의 GSH 함량을 분석하였다. 발효를 통한 에탄올 생산은 Ma등(2000)의 방법에 따라 *S. cerevisiae* 형질전환체의 콜로니를 5 ml YPS에 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24-48시간 호기적으로 전배양하였다. 이 배양액을 20% (w/v) 쌀 전분이 함유된 50 ml 발효액에 첨가하여 이산화탄소의 배출구가 있는 100 ml 플라스크에서 30°C, 100 rpm으로 10일간 유지하면서 발효를 수행하였다(Shigechi et al., 2004). 에탄올 함량은 Quantichrom ethanol assay kit (Bioassay Systems)를 사용하여 측정하였다.

YPD 배지에서 배양 3일째에 세포 외로 분비되는 GSH의

함량은 원균주인 청주효모 *S. cerevisiae* NBRC 2346의 경우 23.5 mg/L인데 반해(Wei et al., 2003), 형질전환 청주효모들(NBRC 2346GSHSA, NBRC 2346 GSHSG 그리고 NBRC 2346GSHSGSA)의 경우 34.2-34.6 mg/L으로 1.5배 증진되었다(Table 1). Wang 등(2010a)은 맥주 제조 시 재조합 맥주효모에서 *GSHI* 유전자의 과발현으로 GSH 생산이 증진되고 이로 인해 풍미를 저해하는 화합물의 양을 감소시킴으로써 안정성을 증진시키는데 기여한다는 보고를 한 바 있는데(Wang et al., 2010b) GSH 양의 증진이 쌀 전분을 원료로 제조한 발효음료의 신선도 유지와 풍미 안정성에도 기여할 것으로 기대된다. 2% (w/v) soluble starch 배지에서 3일 동안 자란 형질전환 효모 균주들의 배양 상등액으로부터 glucoamylase 활성을 조사한 결과(Table 1), glucoamylase와  $\alpha$ -amylase를 동시에 생산 분비하는 NBRC 2346GSHSGSA에서 glucoamylase 활성이 glucoamylase만을 생산하는 NBRC 2346GSHSG, 혹은 NBRC 2346SG와 비교하여 1.9배 증진되었는데 이는 glucoamylase와 전분 액화에 필요한  $\alpha$ -amylase의 시너지 효과로 사료되었다(Kim et al., 2010; Im et al., 2013). 2% (w/v) 쌀 전분을 탄소 원료로 형질전환 청주효모들의 성장과 전분 이용을 비교 조사하였다(Fig. 2). Glucoamylase와  $\alpha$ -amylase 모두 생산 분비하는 NBRC 2346GSHSGSA는 glucoamylase만을 생산하는 7904GSHSG과 비교하였을 때 전분 분해능이 좋아 더 빠른 성장을 보였고 배양 3일째에 100% 전분을 가수분해하였다.  $\alpha$ -Amylase만을 생산 분비하는 NBRC 2346GSHSA는 전분당화능이 없어 낮은 성장을 보였다(Im et al., 2013). NBRC 2346GSHSGSA, NBRC 2346GSHSG, 그리고 NBRC 2346GSHSA를 2% (w/v) 쌀 전분 배지에서 배양했을 때 시간별로 효소활성의 증가를 비교하였다(Fig. 3). 효소활성은 성장에 비례하여 배양 3일째 최대에 이르렀는데 NBRC 2346GSHSGSA의

**Table 1. Glutathione content and glucoamylase activities in the culture broth of *S. cerevisiae* transformants**

Yeast strains	GSH content <sup>a</sup> (mg/L)	Glucoamylase activity <sup>b</sup> (U/ml)
<i>S. cerevisiae</i> NBRC 2346	23.5 ± 0.5	ND <sup>c</sup>
NBRC 2346SG	23.3 ± 0.3 <sup>d</sup>	0.38 ± 0.04
NBRC 2346GSHSA	34.5 ± 0.3	ND
NBRC 2346GSHSG	34.6 ± 0.4	0.37 ± 0.07
NBRC 2346GSHSGSA	34.2 ± 0.6	0.72 ± 0.05

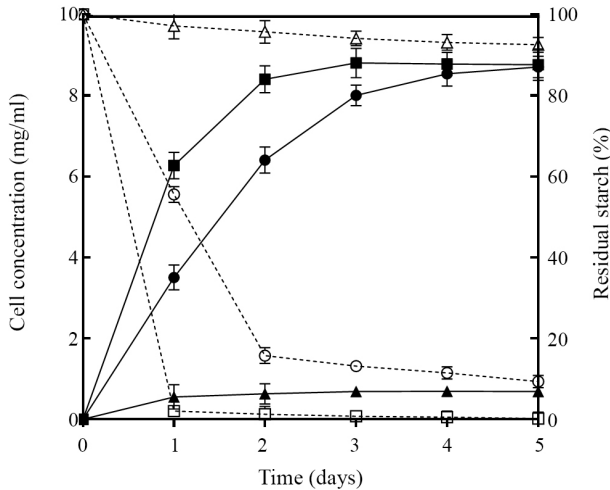
<sup>a</sup> Yeast cells were grown in the YPD at 30°C for 3 days

<sup>b</sup> Yeast cells were grown in the YP containing 2% (w/v) soluble starch at 30°C for 3 days

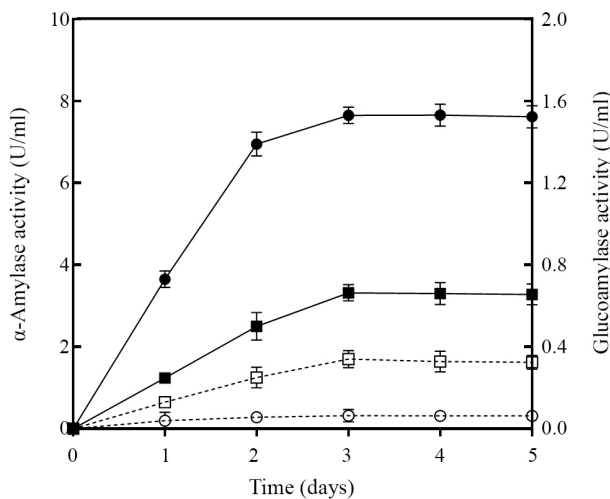
<sup>c</sup> Not detected

<sup>d</sup> Values are means of results from three independent experiments

glucoamylase 활성은 NBRC 2346GSHSG의 2배이었고,  $\alpha$ -amylase 활성은 7904GSHSGSA에 비해 24배 증가하였다. 특히  $\alpha$ -amylase 활성이 증가된 이유로는 이 균주가 glucoamylase



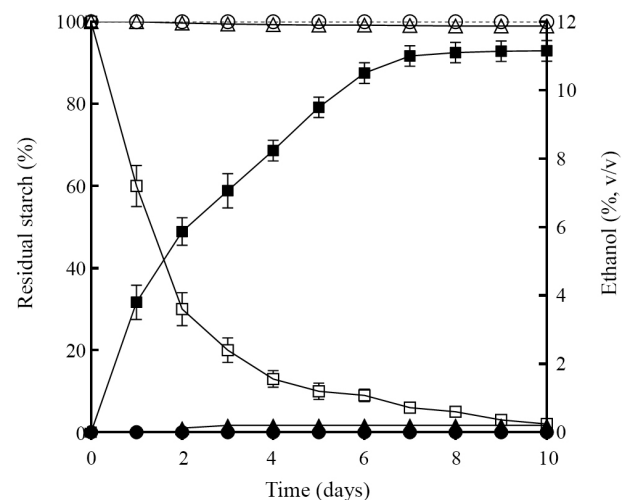
**Fig. 2.** Time courses of growth and rice starch degradation by NBRC 2346GSHSGSA (squares), NBRC 2346GSHSG or NBRC 2346SG (circles) and NBRC 2346GSHSA (triangles). Yeast cells were grown in the YP media containing 2% (w/v) rice starch at 30°C for 5 days. Growth was measured on different days based on the cell dry weight. The remaining starch values were presented as percentages considering the starch in the uninoculated medium as 100%. Filled and unfilled symbols represent cell concentration and relative residual starch content, respectively. Data (mean  $\pm$  SD) are from three independent experiments performed in triplicate.



**Fig. 3.** Extracellular glucoamylase and  $\alpha$ -amylase activities produced by NBRC 2346GSHSGSA, NBRC 2346GSHSG, and NBRC 2346GSHSA at 30°C in the YP medium containing 2% (w/v) rice starch. The graph marked with filled circles represents  $\alpha$ -amylase activities of NBRC 2346GSHSGSA; filled squares, glucoamylase activities of NBRC 2346GSHSGSA; unfilled squares, glucoamylase activities of NBRC 2346GSHSG; unfilled circles,  $\alpha$ -amylase activities of NBRC 2346GSHSA. Data (mean  $\pm$  SD) are from three independent experiments performed in triplicate.

활성으로 전분으로부터 포도당을 생성하여 성장하면서 glucoamylase는 물론  $\alpha$ -amylase 생산도 증가되었고, 다시  $\alpha$ -amylase 분해산물인 maltose, isomaltose, maltotriose 그리고 dextrin이 glucoamylase의 기질로 포도당으로 분해되어 이를 탄소원으로 청주효모의 빠른 성장에 기여하였고 그 결과  $\alpha$ -amylase 효소생산도 동시에 크게 증가되었다고 사료되었다(Eksteen *et al.*, 2003; Shigechi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2010).

20% (w/v) 쌀 전분을 함유한 발효액에 NBRC 2346GSHSGSA와 NBRC 2346GSHSG를 접종하여 에탄올 생산과 전분 감소를 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, glucoamylase만 생산하는 NBRC 2346GSHSG는 전분 당화능은 있으나, 액화능이 없어 점도가 낮은 2% (w/v) 쌀 전분을 기질로 배양한 경우 (Fig. 3)와 달리 점도가 매우 높은 20% (w/v) 쌀 전분을 가수분해하지 못해 에탄올 생산이 원균주인 *S. cerevisiae* NBRC 2346같이 거의 없었다. 반면에 glucoamylase와  $\alpha$ -amylase 모두 생산 분비하는 NBRC 2346GSHSGSA에서는 glucoamylase와  $\alpha$ -amylase에 의해 높은 점도의 쌀 전분이 액화되어 점도가 낮은 액상 발효액으로 전환되고 이어서 포도당으로 분해되어 발효에 이용됨으로써 발효 2일째에 6% (v/v) 이상 에탄올이 생산되었고 이후에도 에탄올 생산이 계속 증가하여 7일째에 거의 최대치에 이르게 되어 에탄올 함량이 11% (v/v)로 증가하였고 90% 이상의 전분이 분해되어 에탄올로 전환되었음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로 청주효모가 glucoamylase와  $\alpha$ -amylase활성을 모두 갖게 되면 누룩의 첨가 없이도 직접 쌀 전



**Fig. 4.** Time course of ethanol fermentation from 20% (w/v) rice starch by NBRC 2346GSHSGSA (squares), NBRC 2346GSHSG (triangles), and *S. cerevisiae* NBRC 2346 (circles). Filled and unfilled symbols represent ethanol concentration and relative residual starch content, respectively. Data are averages from three independent experiments.

분을 당화 발효하여 청주와 같은 알코올 음료를 제조할 수 있고 신선도 유지를 위해 GSH가 증가된 발효음료 생산이 가능할 것으로 사료되었다(Wang et al., 2010a). 현재 다수의 형질 전환을 통해 GSH 함량과 glucoamylase와  $\alpha$ -amylase 활성이 보다 증진된 청주효모 균주들을 찾는 연구가 진행 중이다.

## 적 요

쌀 전분을 원료로 효모를 직접 이용하여 항산화제 glutathione (GSH)이 풍부한 알코올 음료를 제조할 목적으로 GSH 함량과 당화능을 증진시키기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*의  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase 유전자(*GSH1*), *Debaryomyces occidentalis*의 glucoamylase 유전자(*GAMI*), 그리고  $\alpha$ -amylase 유전자(*AMY*)를 청주 효모 *S. cerevisiae*에서 공동 발현시켰다. 재조합 청주 효모의 세포의 GSH 함량은 원균주에 비해 1.5배 증가하였다. 2% (w/v) 쌀 전분이 함유된 배지에서 배양하였을 때 *GAMI*와 *AMY* 유전자 모두 발현하는 효모 균주의 glucoamylase에 의한 당화능은 *GAMI* 유전자만 발현하는 균주와 비교하여 2배 증가하였다. 이 새로운 균주는 쌀 전분이 20% (w/v) 함유된 배지에서 7일간 발효를 통해 에탄올 11% (v/v)를 생산하였고, 전분 함유량의 90% 이상을 소비하였다.

## References

- Asano, T., Kurose, N., and Tarumi, S. 2001. Isolation of high-malate-producing sake yeasts from low-maltose-assimilating mutants. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 429–433.
- Baba, S., Oguri, I., Fukuzawa, M., Moriyama, K., Lida, T., Kobayashi, I., and Imai, K. 1974. Maltose assimilation by *Saccharomyces sake*. *J. Brew. Soc. Jpn.* **69**, 453–455.
- Chen, J.L., Xie, L., Cai, J.J., Yang, C.S., and Duan, X.H. 2013. Enzymatic synthesis of glutathione using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **35**, 1259–1264.
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Dahlems, U.M., and Hollenberg, C.P. 1990. Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (*GAMI*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **95**, 111–121.
- Domingues, L., Onnela, M.L., Teixeira, J.A., Lima, N., and Penttilä, M. 2000. Construction of a flocculent brewer's yeast strain secreting *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 97–103.
- Eksteen, J.M., van Rensburg, P., Cordero Otero, R.R., and Pretorius, I.S. 2003. Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the  $\alpha$ -amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 639–646.
- Fan, X., He, X., Guo, X., Qu, N., Wang, C., and Zhang, B. 2004. Increasing glutathione formation by functional expression of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **26**, 415–417.
- Fujieda, T., Kitamura, Y., Yamasaki, H., Furuishi, A., and Motobayashi, K. 2012. An experimental study on whole paddy saccharification and fermentation for rice ethanol production. *Biomass Bioeng.* **44**, 135–141.
- Ghang, D.M., Yu, L., Lim, M.H., Ko, H.M., Im, S.Y., Lee, H.B., and Bai, S. 2007. Efficient one-step starch utilization by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucoamylase and  $\alpha$ -amylase genes from *Debaryomyces occidentalis*. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1203–1208.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R., and Schiestl, R.H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425.
- Im, Y.K., Park, J.Y., Lee, J.Y., Choi, S.H., Chin, J.E., Ko, H.M., Kim, I.C., and Bai, S. 2013. Construction of amylolytic industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol production from raw starch. *Korean J. Microbiol.* **40**, 200–204.
- Kang, N.Y., Park, J.N., Chin, J.E., Lee, H.B., Im, S.Y., and Bai, S. 2003. Construction of an amylolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis*  $\alpha$ -amylase gene. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1847–1851.
- Kim, H.R., Im, Y.K., Ko, H.M., Chin, J.E., Kim, I.C., Lee, H.B., and Bai, S. 2011. Raw starch fermentation to ethanol by an industrial distiller's strain of *Saccharomyces cerevisiae* expressing glucoamylase and  $\alpha$ -amylase genes. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1643–1648.
- Kim, J.H., Kim, H.R., Lim, M.H., Ko, H.M., Chin, J.E., Lee, H.B., Kim, I.C., and Bai, S. 2010. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase,  $\alpha$ -amylase and debranching enzyme. *Biotechnol. Lett.* **32**, 713–719.
- Kim, K., Park, C.S., Mattoon, J.R. 1988. High-efficiency, one-step utilization by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells which secrete both yeast glucoamylase and mouse  $\alpha$ -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 966–971.
- Lee, F.W. and Da Silva, N.A. 1997. Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the  $\delta$  sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 339–345.
- Lee, J.Y., Im, Y.K., Ko, H.M., Chin, J.E., Kim, I.C., Lee, H.B., and Bai, S. 2015. Direct utilization of purple sweet potato by sake yeasts to produce an anthocyanin-rich alcoholic beverage. *Biotechnol. Lett.* **37**, 1439–1445.
- Lin, L.L., Ma, Y.J., Chien, H.R., and Hsu, W.H. 1998. Construction of an amylolytic yeast by multiple integration of the *Aspergillus awamori* glucoamylase gene into a *Saccharomyces cerevisiae* chromosome. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 360–365.

- Ma, Y., Lin, L.L., Chien, H.R., and Hsu, W.H.** 2000. Efficient utilization of starch by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase and isoamylase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 55–59.
- Nieto, A., Prieto, J.A., and Sanz, P.** 1999. Stable high-copy number integration of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol. Prog.* **15**, 459–466.
- Park, J.Y., Lee, J.Y., Choi, S.H., Ko, H.M., Chin, J.E., Kim, I.C., Lee, H.B., and Bai, S.** 2014. Construction of dextrin and isomaltose-assimilating brewer's yeasts for production of low-carbohydrate beer. *Biotechnol. Lett.* **36**, 1693–1699.
- Saito, S., Mieno, Y., Nagashima, T., Kumagai, C., and Kitamoto, K.** 1996. Breeding of a new type of baker's yeast by  $\delta$ -integration for overproduction of glucoamylase using a homothallic yeast. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 98–103.
- Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, Y., Ueda, M., Satoh, E., Fukuda, H., and Kondo, A.** 2004. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5037–5040.
- Suresh, K., Kiran sree, N., and Rao, V.** 1999. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour. Technol.* **68**, 301–304.
- Wang, Q.J., Sun, D., Jeong, S., Yeo, S., Choi, J., and Choi, H.** 2014. Screening of rice cultivars for brewing high quality turbid rice wine. *LWT-Food Sci. Technol.* **56**, 145–152.
- Wang, J.J., Wang, Z.Y., He, X.P., and Zhang, B.R.** 2010a. Construction of amyolytic industrial brewing yeast strain with high glutathione content for manufacturing beer with improved anti-staling capability and flavor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1539–1545.
- Wang, J.J., Wang, Z.Y., Liu, X.F., Guo, X.N., He, X.P., Wensel, P.C., and Zhang, B.R.** 2010b. Construction of an industrial brewing yeast strain to manufacture beer with low caloric content and improved flavor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 767–774.
- Wei, G., Li, Y., Du, G., and Chen, J.** 2003. Effect of surfactants on extracellular accumulation of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Biochem.* **38**, 1133–1138.