

# Isolation and Characterization of Acidophilic Yeasts Producing Urease from Korean Traditional *Nuruk*

Min-Na Lee<sup>1</sup> and Heui-Dong Park<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Institute of Fermentation Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

## 전통 누룩으로부터 호산성 Urease 생산 효모의 분리 및 특성

이민나<sup>1</sup> · 박희동<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품공학부, <sup>2</sup>경북대학교 발효생물공학연구소

### Abstract

Two hundred and twenty three yeast strains were randomly isolated from Korean traditional *nuruk*. Among them, six urease producing yeast strains (designated JJA, JJB, JJ2, SHA, SHC and SH10) were selected on the Christensen urea agar plates. They showed the same pattern in the PCR-RFLP analysis of the ITS I-5.8S-ITS II region digested with *Hae*III and *Hin*F1 restriction endonucleases. Its DNA sequences showed 100% (strains SHA, SHC and SH10) and 99.8% (strains JJA, JJB and JJ2) identity with those of *Issatchenkia orientalis* type strain ATCC 24210. Phylogenetic analysis resulted in that all the strains were closely related to *I. orientalis*. Two representative strains, JJ2 and SH10, showing the highest urease activities were selected for further characterization. Their morphological, physiological and biochemical characteristics were also the same as *I. orientalis*. Therefore, both the two strains were identified as *I. orientalis*. They could grow at a wide range of temperature between 20-40°C as well as pH between 2.0 and 10.0. However, a higher level urease activity were obtained at acidic pH than that at alkalic pH. The maximal level of urease activity was obtained at 30°C (strain SH10) or 35°C (strain JJ2) and in a liquid medium adjusted to the initial pH 5.0.

Key words : urease, acidophilic yeast, *I. orientalis*, *nuruk*, ethyl carbamate

### 서 론

Urease (EC 3.5.1.5)는 요소를 가수분해하여 암모니아와 이산화탄소의 생성 반응을 촉매하는 효소로서 세균, 효모, 곰팡이 등의 미생물과 동물 그리고 고등식물에 널리 분포하고 있다(1-3). 1926년 처음으로 이 효소가 발견된 이후 다양한 생물체에서의 존재가 밝혀지고 있다. Urease를 생산하는 미생물로는 *Proteus*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia* spp.를 포함하는 장내세균 일부와 *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Ureaplasma urealyticum*, *Lactobacillus fermentum*, *Arthrobacter mobilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Canavalia ensiformis*, *Rhizobium meliloti* 등의 세균 및

*Cryptococcus* spp. 등의 효모가 알려져 있다(1,2,4-7). *Helicobacter pylori*의 urease를 이용하여 암모니아를 생산함으로써 위산을 중화하여 성장에 필요한 환경을 만드는 것으로 알려져 있어 이 병원균의 진단을 위하여 urease의 존재 유무를 조사하기도 한다(8).

또한 urease는 시멘트나 토양의 고결 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 일반적인 토양세균의 하나인 *Bacillus pasteurii*의 urease는 요소 분해로 생성된 이산화탄소를 이용하여 불용성의 calcite를 형성하고 침전을 유도한다(9,10). 이렇게 형성된 calcite는 콘크리트에 강하게 부착하여 콘크리트를 견고하게 하거나 균열이 일어난 콘크리트 벽 사이를 메워주는 역할을 하기 때문에 이를 세균성 시멘트(bacterial cement)라고도 한다(11,12).

알코올성 음료를 포함한 다양한 발효식품에는 발효 중에 생성되는 소량의 요소를 함유하고 있는데 이 요소는 에틸알

\*Corresponding author. E-mail : [hpark@knu.ac.kr](mailto:hpark@knu.ac.kr)  
Phone : 82-53-950-5774, Fax : 82-53-950-6772

코올과 반응하여 발암성의 에틸카바메이트(EC, ethyl carbamate, urethane)를 생성한다. 이 반응은 발효식품의 살균을 위하여 가열할 경우 더욱 활발히 진행된다(13). 식품 중의 EC는 청주, 포도주, 빵, 요구르트, 치즈, 간장, 김치 등의 다양한 발효식품에서 검출되는 것으로 밝혀지고 있다(13-17). 우리나라 식품의약품 안전청에서 2004년부터 과실주 등 발효식품에 대한 연구용역을 실시해 오고 있으며 2007년 1월 16일에 모니터링 결과를 발표하여 과실주 등 일부 주류제품에서 검출되어 관리 필요성이 대두되었다(16,17). 요소를 함유하는 발효식품에 urease를 처리함으로써 발암성 EC의 전구체인 요소를 분해할 수 있기 때문에 내산성 urease를 발효식품에 처리하여 EC의 함량을 낮추고자 시도한 연구가 보고된 바 있다(15,18).

발효식품 중의 요소를 분해하기 위한 urease의 생산 미생물로는 병원균이 아닌 GRAS의 미생물을 사용하는 것이 중요하다. 이러한 미생물로 대표적인 것은 유산균과 효모를 들 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 산업적으로 유용한 urease를 생산하는 효모의 분리를 목적으로 우리나라 전통주 제조에 사용되는 전통누룩으로부터 다양한 효모를 분리하고 이들 중 urease 활성이 강한 효모를 선별하여 미생물학적 특성과 urease 생산능을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 배지

실험에 사용한 누룩은 (주) 경주범주 제조에 사용하는 누룩과 각 지역에서 상업적으로 제조되는 대표적 전통 누룩인 상주곡자, 송학곡자, 진주곡자를 구입하여 사용하였다. 본 실험에서 사용한 배지는 누룩에서 효모 분리와 증식을 위한 배양 배지로 곰팡이 생육을 억제하기 위하여 0.4% sodium propionate를 첨가한 YPD 배지(1.0% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Dextrose)를 사용하였고 urease 생산 효모 분리 배지는 Christensen's urea agar 배지(Sigma-Aldrich, St. Lois, Mo USA)를 사용하였다. 그리고 urease 활성 측정을 위한 배양배지로는 YNB 배지(0.17% YNB base w/o AS and AA, 1% glucose, 0.1% urea, 5% NaCl)를 사용하였다.

### Urease 생산 효모 분리

각각의 누룩을 막자사발에 곱게 갈아 멸균식염수를 적당량 가하여 현탁한 후 0.9% 멸균 식염수로 적당히 희석하였다. 이 희석액 일정량을 0.4%의 sodium propionate를 첨가한 YPD 배지에 도말하여 30°C에서 48시간 배양한 다음 효모 균주를 분리하였다. 분리한 균주는 현미경에서 검경하여 효모의 형을 취하고 있는 것만을 골라서 YPD 배지에서 4회 계대 배양하여 순수분리하였다. 누룩에서 분리한 효모에서 urease 생산 효모를 선별하기 위하여 분리한 균을

Sigma-Aldrich 사의 Christensen's urea agar 평판배지에 접종하여 30°C에서 5일간 배양 후 핑크색을 띄는 것을 요소 분해능 양성으로 판단하였다.

### Urease 활성 측정

Urease 활성 측정을 위해 YNB 배지를 사용하여 30°C에서 150 rpm의 속도로 약 24시간 균을 배양한 다음 4°C, 10,000×g로 10분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. Urease 활성측정을 위한 암모니아 함량의 분석은 Weatherburn의 indophenol법(19)을 사용하여 행하였다. A-phenol 시약은 25 g의 phenol과 0.125 g의 sodium nitroprusside를 500 mL로 정용하고, B-alkaline hypochlorite은 12.5 g의 sodium hydroxide와 21 mL sodium hypochlorite를 첨가하여 500 mL로 정용하여 사용하였다. Urease 효소 활성 측정은 McIlvaine buffer (pH 5.0) 0.25 mL에 McIlvaine buffer (pH 5.0)에 urea를 녹여 최종 농도가 0.5 M이 되도록 첨가하고 urease 활성 측정 최적배지에서 배양하여 원심분리하여 얻은 상등액 0.5 mL를 잘 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Weatherburn의 indo phenol 시약을 사용하여 생성된 암모니아를 정량하였다. Urease 효소 활성의 단위는 본 실험의 반응조건에서 1시간 동안 요소를 분해하여 암모니아 1 nmol을 생산하는 효소의 양으로 환산하였다.

### PCR-RFLP 분석

PCR 주형으로 사용을 위한 효모 염색체 DNA의 분리는 Kaiser (20)와 Philippsen (21)의 방법에 따라 행하였다. 효모의 ITS I-5.8S-ITS II 영역의 증폭을 위한 primer는 ITS 1 (5'-CATTTAGAGGAACTAAAAGTCG-3')과 ITS 4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer를 사용하였다. Polymerase chain reaction (PCR)은 Gene cycle™ (Bio-Rad Co code 9084, Hercules, USA)를 사용하여 일반적인 방법(20)에 따라 총 반응액 양이 50 µL가 되게 하여 행하였다. PCR로 증폭된 DNA 단편의 분석을 위하여 제한 효소로는 *Hae*III, *Hinf*I 을 사용하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. DNA 전기영동은 일반적인 방법(20)에 준하여 1.2% agarose gel, 0.5×TBE buffer를 사용하여 100 V의 전압으로 전기영동 후 0.5 mg/mL ethidium bromide (EtBr) 용액으로 염색한 후 UV transilluminator (Vilber Lourmat, Paris, France)로 관찰하였다. DNA 단편의 size 측정용 marker로는 100 bp DNA ladder (Solgent, Lot No 100BP056ZP, Daejeon, Korea)를 사용하였다.

### 분리효모의 계통분석 및 동정

Urease 생산 효모의 동정을 위하여 분리 균의 배양학적, 형태학적 및 생화학적 특성을 조사하여 Kurtzman과 Fell의 *The Yeast, A Taxonomic Study* (22)에 따라 분류 동정하였다. 효모의 계통분석을 위한 DNA 염기서열은 SolGent 사

(Daejeon, Korea)의 Sequencing Service를 의뢰하여 분석하였다. 염기서열 결과에 대한 서열간의 유사성을 알아보는 상동성 검색은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 운영하는 BLAST를 이용하였고 계통분석을 위한 다중서열정렬(Multiple Sequence Alignment)은 European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)에서 제공하는 Clustal W2를 이용하였다. 그리고 계통 유연관계 분석에서 염기서열의 편집은 BioEdit (version 7.0.9.0) 프로그램을 이용하였으며(23) 근린결합분석(neighbor-joining analysis)에 의한 phylogenetic tree 작성 및 분석에는 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA4 version 4.0.2) 프로그램을 이용하였다(24).

## 결과 및 고찰

### Urease 생산 효모의 분리

전통 누룩 시료로부터 urease 생산 효모를 분리하기 위하여 효모의 형태를 가지고 있는 다양한 균주를 1차 분리하였다. 경주법주 누룩에서 80개의 균주와 상주, 송학, 진주 곡자에서 143개의 균주를 분리하여 총 223 균주를 분리하였다. 1차 분리한 균주를 urease 생산 균주의 선택배지인 Christensen's urea agar slant를 이용하여 30°C에서 약 7일간 배양하여 urease를 생산하는 6 균주를 2차 선별하였다.

선별된 6 균주를 urease 활성 측정용 배지에서 30°C, 24시간 배양하여 4°C, 10,000×g로 원심분리하여 얻은 상등액의 urease 활성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 균주의 생육

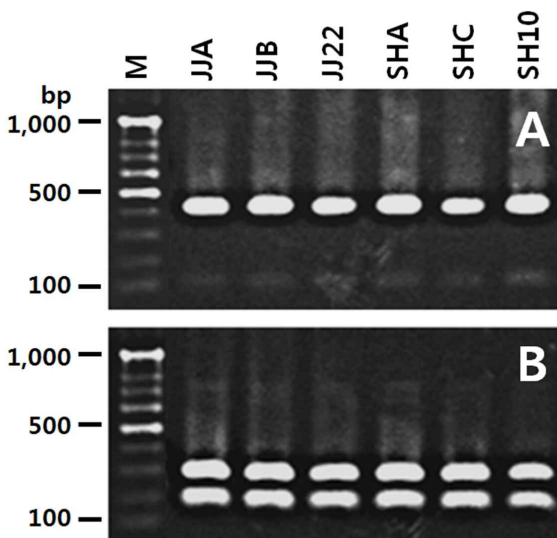


Fig. 1. Urease activities of several yeasts isolated from Korean nuruk by using Christensen's urea agar plate for the selection of urease producing microorganisms.

Units of the enzyme activity was defined as the enzyme amount producing 1 nmol of  $\text{NH}_3$  from urea for 1 hour under the conditions of this study. ■, Urease activity; ●, Cell density at 660nm

정도는 거의 유사하였으며 urease 활성은 약 20-60 U/mL로 모든 균주가 urease 활성을 나타내었다. 그러나 그 활성의 정도는 균주 간에 차이가 있었으며 특히 SH10 균주가 55.2 U/mL로서 활성이 가장 높았으며 그 다음으로 JJ22 균주가 52.9 U/mL로서 활성이 높게 나타났다.

### ITS 영역의 PCR-RFLP 분석과 계통분석

효모의 ITS I-5.8S-ITS II 영역의 염기서열은 균주에 따라 차이가 심하여 분자생물학적 계통분석에 널리 이용되고 있다(25-28). 본 연구에서는 분리 균주의 특성을 알아보고자 PCR-RFLP 분석 및 이 영역의 염기서열을 기반으로 한 계통분석을 행하였다. 분리 효모 6 균주의 DNA를 주형으로 하여 ITS I-5.8S-ITS II 영역을 PCR로 증폭한 다음 제한효소 *Hae*III과 *Hinf*I 을 사용하여 처리한 결과 6 균주 모두 동일하게 *Hae*III 처리에서는 400 bp, *Hinf*I 처리에서는 200, 300 bp 크기의 동일한 밴드가 나타났다 (Fig. 2).

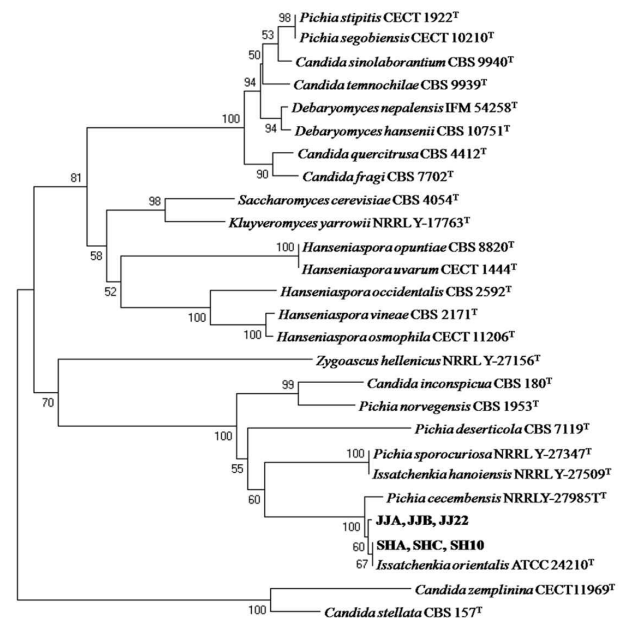


Fig. 2. PCR-RFLP analysis of the ITS I-5.8S-ITS II region amplified from the yeast isolates.

The PCR amplicons were digested with *Hae*III (A) and *Hinf*I (B) restriction endonucleases and resolved 1.2% agarose gel. Lane M represents 100 bp DNA ladder used as a size marker.

또한 6 균주의 ITS I-5.8S-ITS II 영역의 염기서열을 분석하고 이 영역의 상동성을 검색한 결과 분리 균주 모두 *Issatchenkia orientalis* ATCC 24210과 유사하게 나타났다. 균주 SHA, SHC, SH10는 *I. orientalis* ATCC 24210과 100%의 상동성을 나타내었으며 JJA, JJB, JJ22는 422 bp의 염기서열 중 한 개 염기서열의 차이가 있어 99.8%의 상동성을 나타내었다(자료 미제시). 이 염기서열을 토대로 하여 분리된 6개의 균주와 유전적으로 근연관계에 있는 다른 균주와

의 상관관계를 분석한 결과는 Fig. 3과 같이 이 균주들이 *I. orientalis* ATCC 24210과 유전적으로 매우 가까운 위치에 있음을 확인할 수 있었다.

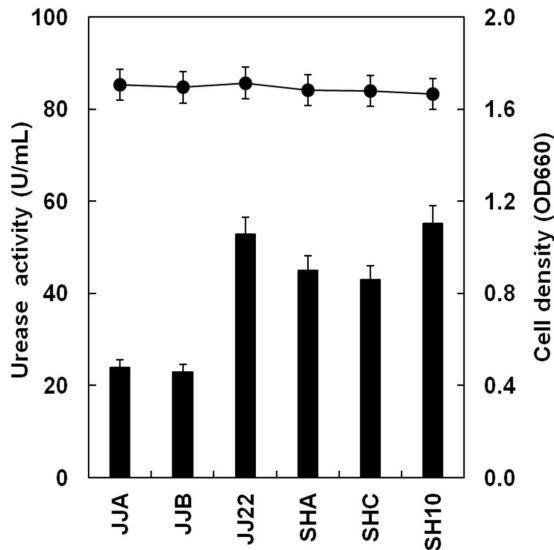


Fig. 3. Phylogenetic tree of the yeast isolates based on the ITS I-5.8S-ITS II sequences.

Letter T after each strain number represents a type strain.

#### 우수 urease 생산 효모의 동정

분리 효모 6 균주 중 유전적 근연관계 두 그룹 각각의 urease 활성이 가장 강한 균주 JJ22와 SH10의 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. YM 한천배지에서 배양한 후 현미경으로 관찰한 결과 대부분의 세포가 원통형이고 출아에 의한 증식을 하였으며 진균사를 형성하지 않았다. Glucoside 분해능, 전분 유사물질 생성능이 없었고 glucose로부터 산을 생성하지도 않았으나 요소 분해능과 ester 생성능이 있는 것으로 나타났다. 또한 50% glucose와 10% NaCl 농도에서 성장하였고 37°C와 pH 2~10에서도 성장하였다. 탄소원의 발효성으로는 2 균주 모두 glucose, fructose 및 mannose는 발효하였으나 그 외의 탄소원은 발효하지 못하였다. 탄소원의 자화성을 조사한 결과 2 균주 모두 유사하게 나타났으며 특히 sorbitol의 경우에는 JJ22는 자화하지 못하였으나 SH10 균주는 약하게 자화하는 것으로 나타났다. 질소원 자화성으로는 2 균주 모두 nitrate와 nitrite를 자화하지 못하였으나 cadavarine은 자화하였다. 특이적 사실은 균주 JJ22가 L-lysine을 자화한 반면 SH10은 L-lysine을 자화하지 못하여 큰 차이를 나타내었다. 이상의 분자생물학적 계통분석 및 형태학적, 생리학적 특성을 바탕으로 2 균주 모두 *I. orientalis*로 동정하였다.

*I. orientalis*는 내산성 및 내알코올성이 강하고 알코올을 자화할 수 있는 효모로 분리된 바 있으며(29) 그 후 포도주의 발효 중 토착 효모로 존재하는 것이 밝혀졌다 (30). 최근

우리나라에서도 Campbell Early 포도주 주박에서 malic acid 분해 효모로 분리되어 그 특성이 연구된 바 있다(31). 이 균주 KMBL 5774는 Campbell Early 포도주에서 혼합발효 또는 고정화 효모의 고산도 포도주에 첨가되었을 때 malic acid를 효율적으로 분해하는 것으로 알려져 있다(32,33). 동일한 종에 속하는 이 균주가 본 연구에서 우리나라 전통 누룩으로부터 urease 생산 균주로 분리된 것은 흥미 있는 일이라 할 수 있을 것이다. Urease 생산 균주로는 주로 세균이 잘 알려져 있다(4-7).

#### *I. orientalis* JJ22 및 SH10의 urease 생성 조건

균주 JJ22와 SH10의 urease 활성과 균 생육도에 미치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양 온도를 20, 25, 30, 35 및 40°C로 조정하여 다음 각 조건에서의 urease 활성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 균의 생육은 2 균주 모두 온도에 따라 거의 차이가 없어 생육온도의 영역이 넓은 것으로 생각된다. 효소의 활성은 JJ22는 배양온도가 35°C에서 SH10은 30°C일 때 urease 활성이 가장 높게 나타나 두 효모의 효소 생산 최적온도가 일치하지 않음을 알 수 있었다.

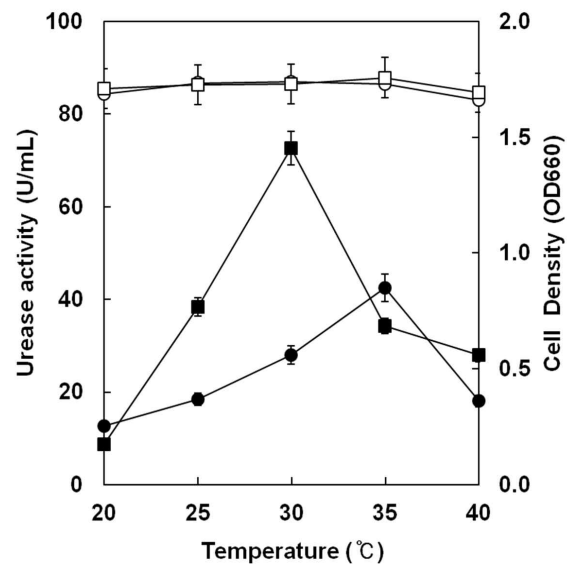


Fig. 4. Effects of the temperature on the cell growth and urease activity in *I. orientalis* JJ22 and SH10 strains.

○, Cell density of JJ22; □, Cell density of SH10; ●, Urease activity of JJ22; ■, Urease activity of SH10

균의 생육과 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의 초기 pH를 2.0에서 10.0까지 1.0 간격으로 조정하여 다음 각 조건에서 균의 생육 및 효소 활성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 두 균주의 생육은 모두 pH 2-6까지 거의 유사하게 생육이 양호하였으나 pH 7.0 이상에서는 생육도가 감소하는 경향을 나타내었다. Urease 활성은 2 균주 모두 pH 5.0에서 최대치를 나타내었으며 pH가 더 낮아지거나 높아질 경우 효소의 활성이 감소하는 경향을 나타내

**Table 1. Characteristics of the isolates JJ22 and SH10**

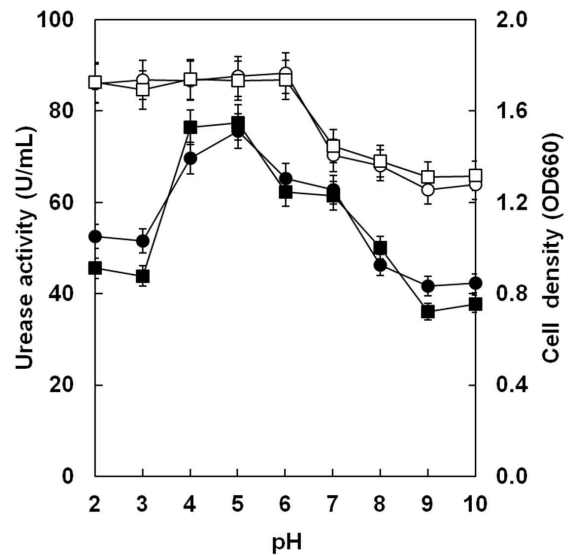
Characteristics	JJ22	SH10
<u>Morphological</u>		
Form	Cylindrical	Cylindrical
Vegetative production	Budding	Budding
Pseudomycelium, true mycelium	Absent	Absent
Culture in YM media : Pellicle, ring	Absent	Absent
Growth in YM media	Moderate growth, circular, convex	Moderate growth, circular, convex
<u>Physiological</u>		
Splitting of glucoside, Starch hydrolysis, Acid production of glucose	-	-
Urease test, Ester production	+	+
Growth in 50% glucose, 10% NaCl or at 37°C	+	+
pH	2.0-10.0	2.0-10.0
<u>Fermentation</u>		
Arabinose, Galactose, Ribose, Sorbose, Lactose, Maltose, Raffinose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose, Inositol, Glycerol, Mannitol, Xylitol, Dextran, Inulin, Starch	-	-
Fructose, Glucose, Mannose	+	+
<u>Assimilation (C source)</u>		
D-arabinose, L-arabinose, Galactose, Sorbose, Lactose, Rhamnose, Adonitol, Dulcitol, Erythritol, Inositol, Mannitol, Methanol, Citric acid, Salicin, Starch	-	-
Mannose, Ribose, Fructose, Glucose, Raffinose, Sucrose, Dextrin, Inulin, Ethanol, Glycerol, Lactic acid, Malic acid,	+	+
Maltose, Trehalose, Xylose	w	w
Sorbitol	-	w
<u>Assimilation (N-source)</u>		
Potassium nitrate, Sodium nitrate	-	-
Cadevarine	+	+
L-lysine	+	-

+, positive; -, negative; w, weak

었다.

Seo 등(31)의 연구결과에 의하면 malic acid 분해 균주로 분리된 *I. orientalis* KMBL 5774의 경우 고농도의 당, 온도, pH, NaCl 등 환경에 대한 내성이 강하며 특히 pH 2.0에서도 생육이 양호한 결과를 얻은 바 있어 *I. orientalis*는 내산성이 강하여 호산성 효모의 독특한 특성을 잘 나타낸 바 있다. 정상적인 경우 위의 pH가 2.2-2.6 정도로 알려져 있어 이 균주들의 강한 내산성은 매우 흥미 있는 현상이라 하겠다. 현재 이 균주들의 pH 2.0 미만에서 생육 및 세포내 내산성 물질의 축적 등에 관하여 연구 중에 있다.

Urease는 발효식품에서 발암성 EC를 생성하는 요소를 분해함으로써 EC의 생산을 감소시킬 수 있는 효소이다. 발효식품에서 EC의 생성을 억제하기 위한 다양한 방법들이 보고된 바 있다. Pretorius (34)는 와인의 경우 원료 포도의 생산에 요소의 과량 시비 및 수확 직전 요소의 엽면살포를 금지하는 것이 중요하다고 하였으며 또한 와인의 발효시 발효의 지연과 발효 정지를 방지하기 위하여 요소를 함유하는 영양성분을 첨가하지 않는 것이 중요하다고 강조한 바 있다. 요소 저생산 효모 균주의 개량으로는 효모 *arginase* (*CAR1*) 유전자의 결손변이를 들 수 있다. 청주효모의 경우 *CAR1* 유전자의 인위적 결손으로 *arginase* 활성과



**Fig. 5. Effects of the initial pH of the liquid media on the cell growth and urease activity in *I. orientalis* JJ22 and SH10 strains.**  
 ○, Cell density of JJ22; □, Cell density of SH10; ●, Urease activity of JJ22; ■, Urease activity of SH10

요소의 생성이 없는 변이주를 제작한 바 있으나 아직까지 산업화는 이루지지 못하고 있다 (35). 또 다른 방법은 발효

식품 중의 요소를 분해하기 위한 산성 urease의 효모 내 발현을 들 수 있으나 현재까지 발현에 성공한 예는 거의 없는 실정이다 (34). 따라서 본 연구에서 분리한 urease 생산성 효모 균주는 발효식품에서 요소의 함량을 줄이는데 응용이 가능할 것으로 생각된다.

## 요 약

발암성 ethyl carbamate의 전구물질인 요소의 분해를 촉매하는 urease 생산 효모를 분리하고 그 특성을 조사하였다. 우리나라 전통 누룩으로부터 약 223주의 효모를 분리하고 이들 중 urease 활성이 있는 6 균주를 선별하였다. 분리된 6 균주는 ITS I-5.8S-ITS II 영역의 PCR-RFLP 분석 및 계통 분석을 통하여 이 균주 모두가 *I. orientalis* ATCC 24210과 99.8% 이상의 염기서열 상동성을 나타내어 유전적으로 매우 가까운 근연관계에 있음을 확인하였다. 분리 효모 중 urease 활성이 가장 강한 2 균주 JJ22와 SH10을 선정하여 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과 *I. orientalis*와 특성이 거의 유사하여 *I. orientalis*로 동정하였다. 이 균주들은 온도 20-40℃의 넓은 범위에서 생육이 양호하였으며 JJ22의 경우에는 35℃, SH10의 경우에는 30℃에서 urease 활성이 가장 높았다. pH의 영향을 조사한 결과 pH 2.0-6.0까지 넓은 범위의 산성 조건에서 생육이 매우 양호하여 호산성 효모로 생각된다. Urease 효소의 활성은 PH 5.0에서 최대치를 나타내었고 pH가 감소하거나 높아짐에 따라 활성이 감소하였다.

## 감사의 글

본 연구는 국토해양부 국토해양기술연구개발 건설기술 혁신사업의 연구비지원(과제번호 11기술혁신F01)에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Krajewska B (2009) Ureasases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J Mol Cat B: Enzymatic*, 59, 9-21
- Krajewska B (2009) Ureasases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review. *J Mol Cat B: Enzymatic*, 59, 22-40
- Balasubramanian A, Ponnuraj K (2010) Crystal structure of the first plant urease from Jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *J Mol Biol*, 400, 274-283
- Miyagawa K, Sumida M, Nakao M, Harada M, Yamamoto H, Kusumi T, Yoshizawa K, Amachi T, Nakayama T (1999) Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. *J Biotechnol*, 68, 227-236
- Karmali K, Karmali A, Teixeira A, Curto MJM (2004) The use of Fourier transform infrared spectroscopy to assay for urease from *Pseudomonas aeruginosa* and *Canavalia ensiformis*. *Anal Biochem*, 331, 115-121
- Blanchard A, Barile MF (1989) Cloning of *Ureaplasma urealyticum* DNA sequences showing genetic homology with urease genes from gram-negative bacteria. *Res Microbiol*, 140, 281-290
- Miksch G (1994) The urease structural gene *ureA* in *Rhizobium meliloti* is preceded by an open reading frame necessary for urease activity. *FEMS Microbiol Lett*, 124, 185-190
- Fakhrjou A, Somi MH, Fattahi E, Koohbanani SS, Shadravan S. (2011) Rapid urease test, touch cytology and histopathologic assessment in determining infection by *Helicobacter pylori* in outpatient setting. *Pak J Biol Sci*, 14, 698-702
- Stocks-Fischer S, Galinat JK, Bang SS (1999) Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil Biolo Biochem*, 31, 1563-1571
- Ramachandran SK, Ramakrishnan V, Bang SS (2001) Remediation of concrete using microorganisms. *ACI Mater J*, 98, 3-9
- De Muynck W, De Belie N, Verstraete W (2010) Microbial carbonate precipitation in construction material: A review. *Ecol Eng*, 36, 118-136
- Park SJ, Lee NY, Kim WJ, Ghim SY (2010) Application of bacteria isolated from Dok-do for improving compressive strength and crack remediation of cement-sand mortar. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 38, 216-221
- Uthurry CA, Suarez Lepe JA, Lombardero J, Garcia Del Hierro JR (2006) Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chem*, 94, 262-270
- Ha MS, Kwon KS, Kim MH, Park HR, Hu SJ, Lee HM, Kim KM, Ko EJ, Ha SD, Bae DH (2006) Exposure assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *J Microbiol Biotechnol*, 16, 480-483
- Kim EJ, Kim DK, Lee DS (1995) Application of acid urease to prevent ethyl carbamate formation in *Takju*

- processing. Food Technol Biotechnol, 4, 34-38
16. Chung HJ, Kwon HJ (1997) Dependence of ethyl carbamate formation on the fermentation variables in Korean traditional soysauce. Korean J Soc Food Sci, 13, 92-98
  17. Hong KP, Roh IW, Kang YS, Jung DC, Park SR, Yoon JH, Bae DH (2007) Monitoring and risk assessment of ethyl carbamate in Korean major foods. J Korean Soc Appl Biol Chem, 50, 29-35
  18. Andrich L, Esti M, Moresi M (2010) Urea degradation kinetics in model wine solutions by acid urease immobilised onto chitosan-derivative beads of different sizes. Enz Microb Technol, 46, 397-405
  19. Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Laboratory of hygiene, National Health and Welfare, Ottawa, Canada, p 971-972
  20. Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A (1994) Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory course manual. Cold Spring Havor Laboratory Press, New york, NY, p 137-147
  21. Philippsen P, Stotz A, Scherf C (1991) DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. Method Enzymol, 194, 169-182
  22. Kurtzman CP, Fell JW (1998) The yeasts: A taxonomic study. 4th Elsevier, New York, NY, USA
  23. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acid Symp Ser, 41, 95-98
  24. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 24, 1596-1599
  25. Choi SH, Hong YA, Choi YJ, Park HD (2011) Identification and characterization of wild yeasts isolated from Korean domestic grape varieties. Korean J Food Preserv, 18, 604-611
  26. Torija MJ, Rozès N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie Van Leeuwenhoek, 79, 345-352
  27. Nisiotou AA, Spiropoulos AE, Nychas GJE (2007) Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. Appl Environ Microbiol, 73, 6705-6713
  28. Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2008) Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. Int J Food Microbiol, 125, 197-203
  29. Okuma Y, Endo A, Iwasaki H, Ito Y, Goto S (1986) Isolation and properties of ethanol-using yeasts with acid and ethanol tolerance. J Ferment Technol, 64, 379-382
  30. Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martinez-Rodriguez S, Heras-Viazquez FJL, Rodriguez-Vico F (2004) Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiol, 21, 149-155
  31. Seo SH, Rhee CH, Park HD (2007) Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an acidophilic yeast strain isolated from Korean grape wine pomace. J Microbiol, 45, 521-527
  32. Kim DH, Hong YA, Park HD (2008) Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. Biotechnol Lett, 30, 1633-1638
  33. Hong SK, Lee HJ, Park HJ, Hong YA, Rhee IK, Lee WH, Choi SW, Lee OS, Park HD (2010) Degradation of malic acid in wine by immobilized *Issatchenkia orientalis* cells with oriental oak charcoal and alginate. Lett Appl Microbiol, 50, 522-529
  34. Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 16, 675-729
  35. Kitamoto K, Oda K, Gomi K, Takahashi K (1991) Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene. Appl Environ Microbiol 57:301-306.
  36. Ough CS, Trioli G (1988) Urea removal from wine by an acid urease. Am J Enol Vitic 39: 303-307.