

누룩으로부터 분리된 전분대사 효모 *Saccharomycopsis fibuligera* 균주의 생육특성

최다혜, 박은희, 김명동*
강원대학교 식품생명공학과

Received: September 25, 2014 / Revised: September 26, 2014 / Accepted: September 27, 2014

Characterization of Starch-Utilizing Yeast *Saccharomycopsis fibuligera* Isolated from Nuruk

Da-Hye Choi, Eun-Hee Park, and Myoung-Dong Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

A number of *Saccharomycopsis fibuligera* strains that can hydrolyse and utilize starch as a carbon source were isolated from *nuruk*, a traditional Korean starter for rice wine fermentation, and their specific growth rates on starch-containing medium were compared to choose the prominent strain. *S. fibuligera* strain MBY1320 showed a higher growth rate at 42°C than that of strain *S. fibuligera* KCTC7806, indicating that *S. fibuligera* MBY1320 has more thermo-tolerant machinery for starch hydrolysis and utilization than KCTC7806. Although the activity of α -amylase at 30°C was significantly lower for *S. fibuligera* MBY1320 than KCTC7806 (3,812.5 U vs. 14,878.5 U), *S. fibuligera* MBY1320 showed a much higher glucoamylase activity at 42°C than *S. fibuligera* KCTC7806 (5,048.9 U vs. 13,152.3 U). Thus, a new *S. fibuligera* strain, with a higher starch-hydrolysing activity at elevated temperatures than that of other types of strain, this study reports.

Keywords: *Saccharomycopsis fibuligera*, Nuruk, α -amylase, glucoamylase, starch hydrolysis

막걸리를 비롯한 우리나라 전통주는 쌀을 주원료로 하며 자연상태의 곰팡이, 효모 및 세균을 이용하여 제조한 누룩을 발효에 필요한 효소 및 미생물 원으로 사용하여 병행발효 방식으로 제조되고 있다[20]. 우리나라 전통주인 막걸리는 탄수화물과 단백질을 풍부하게 함유하고 있으며 원료곡물의 종류에 따라 차이가 있지만, 발효과정에서 생성된 각종 유기산, 아미노산, 비타민 등을 함유하고 있어 영양학적 가치가 높다. 막걸리는 발효에 사용한 균주, 원료곡물의 종류 및 발효환경에 따라 독특한 풍미를 나타내는 것으로 알려져 있다[13]. 막걸리의 발효과정에는 다양한 미생물이 관여하며 *Mucor* 속, *Rhizopus* 속, *Aspergillus* 속 등의 곰팡이[11], *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Troulopsis* 속 등의 효모[29] 그리고 *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, 속 등의 세균들이[23] 보고된 바 있다. 누룩은 밀이나 보리, 쌀 등 곡류에 물을 첨가한 후 반죽하고 성형하

여 자연적으로 발효시켜서 제조하는 것이 일반적이다[17]. 따라서 당화제의 역할을 주로 수행하는 일본의 코지와는 달리 누룩 제조 과정 동안 주변 환경으로부터 유래된 다양한 미생물이 자연적으로 생육하므로 생산된 지역의 기후나 풍토, 제조 환경 등에 따라 특색 있는 누룩이 만들어 지게 된다[2]. 이러한 누룩에 존재하는 다양한 미생물은 효소활성, 알코올 발효력, 유기산과 유리 아미노산 생성능 등에서 차이를 나타내게 되고 결국 막걸리의 맛, 향기, 색 등의 품질 특성에 영향을 미치게 된다[12, 28]. 누룩의 다양한 미생물 중에서도 효모는 대부분 GRAS (Generally Recognized As Safe) 균주로서 오래 전부터 주류, 장류 등의 전통발효 식품 제조에 사용되고 있으며[31], 최근 건강기능성 식품 소비의 증가에 따라 효모에 의해서 생성되는 acetylcholinesterase 저해물질[16], 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해물질[10], 항통풍성 xanthine oxidase 저해물질[8] 및 항치매성 β -secretase 저해물질[15]과 같은 다양한 기능성 소재들이 보고된 바 있다. 최근 막걸리에서 항고혈압활성이 우수한 *Pichia burtonii* 등이 분리 동정되었고[22], urease [18], amylase [1] 등의 유용 효소생산 균주가 분리되어 산업적 이

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

용가능성 대한 관심이 고조되고 있다. 효모는 토양, 수생환경, 식물체, 곤충, 극한 환경 등의 다양한 환경에서 생육하고 있으며, 식품, 의약품, 농업 및 산업에 중요한 영향을 미치고 있다[9]. 가장 많은 연구가 이루어진 *Saccharomyces cerevisiae*의 경우 포도당 이외의 당을 대사하는 속도가 느린 편이며, 전분질을 분해할 수 없는 특징이 있다[30]. *Saccharomycopsis fibuligera*는 glucoamylase 뿐만 아니라 α -amylase를 발현시켜 전분을 분해할 수 있는 능력으로 전분을 에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있는 효모이다[5]. *S. fibuligera*의 α -amylase 유전자 염기서열이 보고되었으며, 유전자 변이를 통하여 효소의 내열성 증진 및 단백질 분해 활성 저감에 대한 연구결과[7]와 *S. fibuligera*와 *S. cerevisiae*를 혼합배양하여 에탄올을 생산한 연구결과가 보고된 바 있다[27]. 가용성 전분과 *Saccharomycopsis* 속 미생물의 발효물은 표피 손상과 염증성 산화질소 생산의 억제[3] 연구결과를 활용하여 화장품 제조에 이용하려는 연구가 최근 보고되고 있다. 본 연구에서는 마걸리를 비롯한 전통주 생산에 사용할 수 있는 효모종균을 탐색하기 위하여 다양한 지역에서 수집된 누룩으로부터 전분을 분해할 수 있는 효모인 *S. fibuligera*를 분리하고 이들 균주의 성장속도, α -amylase 및 glucoamylase 효소활성을 비교하고 내열성과 전분분해 활성이 우수한 균주를 분리하고자 하였다.

진주, 용인, 상주, 예산, 제주, 광주, 부산, 상주 등 8개 지역의 재래시장에서 시판되는 누룩과 농가에서 직접 제조한 누룩 11점을 수집하였다. 분쇄한 누룩 1 g을 펩톤수 9 ml에 현탁한 후, 적정 희석배수로 희석하여 chloramphenicol (100 mg/l, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 함유된 YEPD (yeast extract 1%(w/v), peptone 2%(w/v), glucose 2%(w/v), BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 평판배지에 도말하였다. 도말한 배지는 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 현미경 관찰을 통하여 효모로 추정되는 집락을 분리하였다. 대조구 균주로서 *S. fibuligera* KCTC7806 균주를 미생물자원센터(KCTC, Daejeon, Korea)로부터 분양받아 사용하였다.

Internal transcribed spacer (ITS) 영역을 증폭할 수 있는 프라이머인 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [32]를 사용하여 18S rRNA 단편을 증폭하였고, NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 및 NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 프라이머[31]를 사용하여 26S rDNA 영역의 D1/D2 단편을 증폭 후, 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)의 BLAST를 사용하여 18S rRNA 및 26S rDNA 유전자 단편의 염기서열 상동성을 근거로 동정하였다[26].

전분분해 활성 측정을 위하여 1%의 가용성 전분을 함유한 YEPS (yeast extract 1%(w/v), peptone 2%(w/v), soluble

starch 1%(w/v), BD) 고체배지를 사용하였다. 효모균주는 YEPS 액체배지에서 대수증식기로 성장할 때 희석하여 멸균수로 희석하고 동량을 고체배지에 분주한 후 세포의 성장을 관찰하였다. YEPS 고체배지에서 효모에 의한 가용성 전분의 분해를 관찰하기 위하여 요오드-전분 반응법[14]을 사용하였다. 요오드용액(I₂ 2%(w/v), KI 0.5%(w/v), Sigma-Aldrich)을 평판배지에 분주한 후 10분 동안 실온에서 반응하여 생성된 투명환의 크기를 관찰하였다. 배양온도에 따른 효모균주의 비성장속도를 측정하기 위하여 YEPS 액체배지에 초기 세포 흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 접종한 후 각각 30, 37, 42°C의 진탕배양기를 이용하여 배양하면서 각 균주의 대수증식기에서 비성장속도를 측정하였다.

α -Amylase 효소활성은 Park 등[24]의 방법을 수정하여 측정하였다. YEPS 액체배지에 흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 *S. fibuligera* 균주를 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하고 균체를 제거한 상등액으로 효소활성을 측정하였다. 효소반응은 인산 완충액(50 mM, pH 6)에 조효소액 0.2 ml과 기질용액인 가용성 전분(1% w/v) 1 ml를 첨가하고 각 반응온도에서 30분 동안 반응하였다. 반응액 0.1 ml를 취하여 1 ml의 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS, Sigma-aldrich) 용액과 100°C에서 10분간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다[21]. 1 unit (U)의 효소활성은 1분동안 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

Glucoamylase 효소활성은 Liu [19] 등의 방법을 수정하여 측정하였다. YEPS 액체배지에서 흡광도가 0.1이 되도록 *S. fibuligera* 균주를 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 뒤 상등액으로 효소활성을 측정하였다. 아세트산 완충액(10 mM, pH 5)에 조효소액 0.7 ml과 기질용액인 가용성 전분(1%, w/v) 0.2 ml를 첨가하여 각 반응온도에서 30분 동안 반응시킨 후 100°C에서 10분 동안 가열하여 반응을 종결시켰다. 효소반응이 종결된 반응액은 포도당 정량키트(YD Diagnostic, Yongin, Korea)를 사용하여 생성된 포도당의 양을 측정하였다. 1 unit(U)의 glucoamylase 효소활성은 1분 동안 1 μ mole의 포도당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

Bradford Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 제조사가 제시한 조건에서 단백질 농도를 측정하였으며 적정 농도로 희석된 bovine serum albumin (Biosesang, Sungnam, Korea)을 이용하여 검량선을 작성하였다. 균체농도는 흡광광도계(GE healthcare, Uppsala, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 에탄올 농도는 Rezex ROA-Oranic Acid H+ (Phenomenex, Torrance, CA, USA) 컬럼이 장착된 HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)로 측정하였으며 0.005 N 황산용액을 이동상(0.6 ml/min)으로 사용하였다. Analytic Profile Index 20 C AUX kit (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)

를 제조사의 사용방법에 따라 사용하여 효모균주의 탄소원 대사특성을 조사하였다. 모든 측정은 3회 수행하였으며 평균값과 표준오차는 SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

전국 각지에서 수집한 누룩으로부터 60점의 효모를 분리하였으며 평판배지에서 배양하였다. 전분이 함유된 배지에서 성장한 MBY1276, 1280, 1320, 1322, 1323, 1324 및 MBY1327로 명명된 효모 7점을 18S rRNA 유전자의 ITS 염기서열 및 26S rDNA 유전자의 D1/D2 단편의 염기서열을 분석한 결과 MBY1276 및 MBY1280 균주는 기존에 보고된 *S. fibuligera*와 99%의 상동성을 나타내었으며 MBY1320, 1322, 1323, 1324 및 MBY1327 균주는 *S. fibuligera*와 100%의 상동성을 나타내었다. API AUX 20 키트를 사용하여 누룩에서 분리된 효모균주의 탄소원 대사특성을 조사한 결과 KCTC7806 균주와 누룩에서 분리된 균주들은 탄소원 대사 특징[6, 25]이 유사하였다. 따라서 누룩으로부터 분리된 전분분해 활성을 나타내는 7점의 효모균주는 *S. fibuligera*로 최종 동정하였다.

누룩에서 분리한 7점의 *S. fibuligera* 균주의 전분분해 활성을 요오드 염색법으로 조사하였다(Fig. 1). MBY1276, 1280, 1320, 1322 및 MBY1323 균주는 37°C에서 대조구인 KCTC7806 균주와 비슷한 크기의 전분 분해환을 나타냈으며, 예산지역에서 수집된 누룩에서 분리된 MBY1327 균주의 전분 분해환의 크기가 가장 작게 나타났다. 그러나 KCTC7806 균주와 MBY1324 균주는 42°C에서 전분 분해환이 거의 나타나지 않았으며 MBY1280, 1320, 1322, 1323 및 MBY1327 균주는 전분 분해환을 나타내었다.

배양온도에 대한 *S. fibuligera*의 성장속도를 조사하기 위

하여 전분을 함유한 배지에서 비성장속도를 측정하였다(Fig. 2). 대조구인 KCTC7806 균주의 비성장속도는 37°C에서 0.25 h⁻¹로 측정되었으며, 42°C에서는 93.7% 감소한 수준인 0.016 h⁻¹로 나타났다. 누룩에서 분리한 *S. fibuligera* 균주 중에서 MBY1320 균주는 37°C에서 비성장속도가 0.31 h⁻¹로 대조구보다 높은 비성장속도를 나타냈으며 42°C에서 비성장속도가 0.28 h⁻¹로 대조구인 KCTC7806 균주의 비성장속도보다 약 94% 높은 수준을 나타내어 대조구보다 내열성이 우수한 것으로 판단되었다.

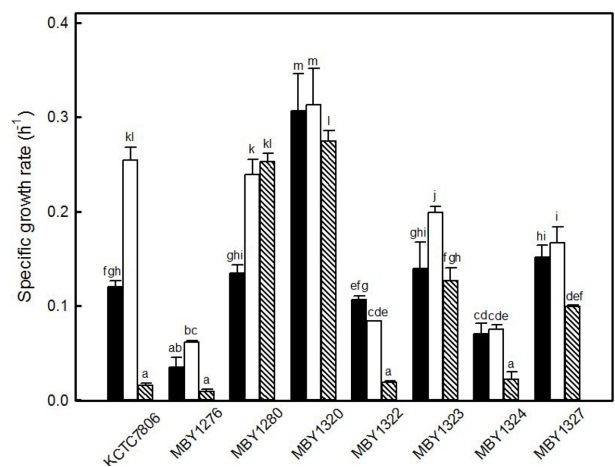


Fig. 2. Specific growth rates of *S. fibuligera* strains utilizing soluble starch (1%) as carbon source. Cells were grown in YEPS medium at an indicated temperature and specific growth rate determined at an exponential growth phase (■: 30°C, □: 37°C, ▨: 42°C). Different letters in indicate a significant difference between means.

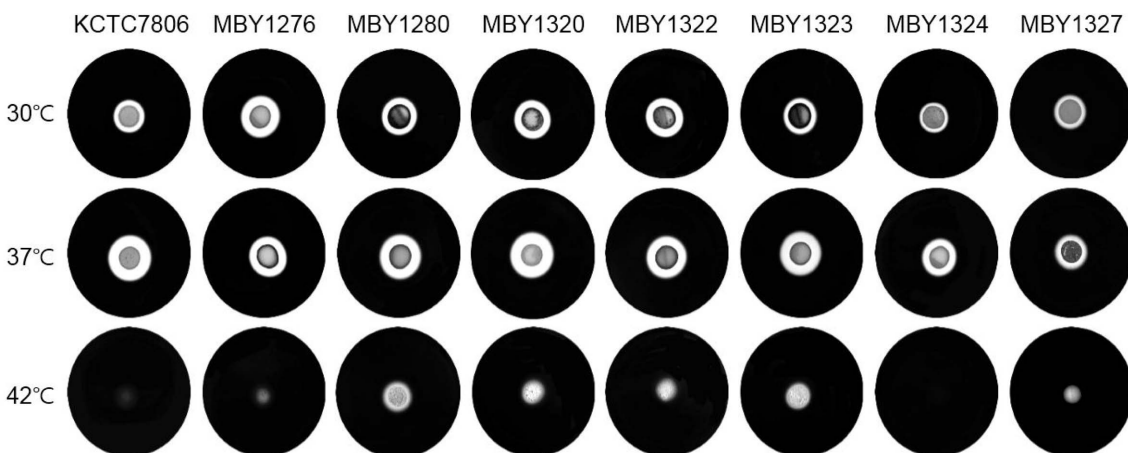


Fig. 1. Hydrolysis of starch by *S. fibuligera* strains incubated at different temperatures. *S. fibuligera* strains were grown overnight in YEPS and washed twice with sterile water to achieve an OD₆₀₀ of 0.2. The cell suspension taken by five-fold serial dilutions were spotted onto a YEPS plate. The plates were incubated at the indicated temperature for 2 days and iodine reagent (KI) was added to flood the growth.

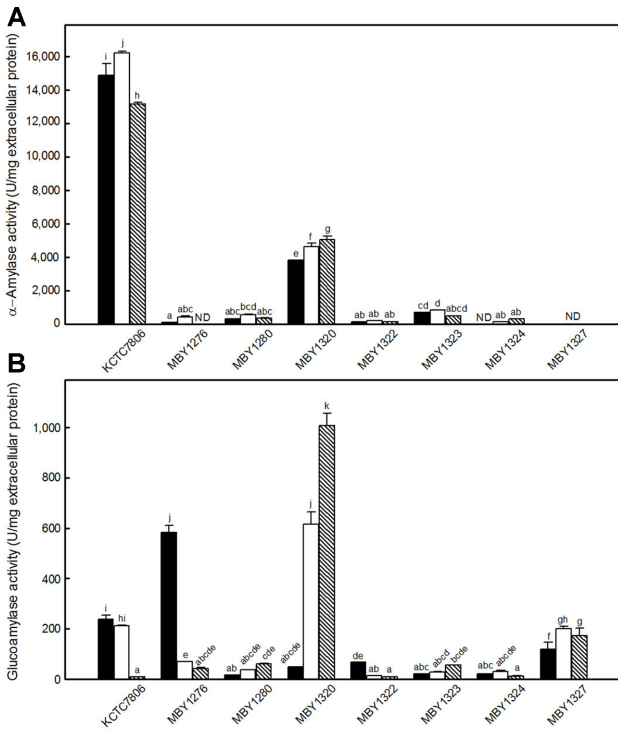


Fig. 3. Enzyme activity of α-amylase (A) and glucoamylase (B) for starch-degrading yeast *S. fibuligera* strains. Extracellular protein was harvested by incubating *S. fibuligera* strain in YEPS for 24 h at 30°C and culture broth obtained by centrifugation was used for an enzyme assay (■: 30°C, □: 37°C, ▨: 42°C). Different letters in indicate a significant difference between means.

가용성 전분이 함유된 배지에서 균주를 배양한 후 상등액을 회수하여 30, 37, 42°C에서 전분 분해 효소활성을 측정하였다. 대조구인 KCTC7806 균주는 37°C에서 가장 우수한 α-amylase 효소활성을 나타냈지만 반응온도의 증가에 따라 효소활성이 급격히 감소하였다. MBY1320 균주는 대조구인 KCTC7806 균주보다 낮은 수준의 α-amylase 효소활성을 나타내었지만 반응온도가 증가함에 따라 α-amylase 효소활성이 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었지만 42°C에서 KCTC7806 균주가 나타낸 α-amylase 효소활성의 약 38.8% 수준이었다(Fig. 3A).

대조구인 KCTC7806 균주의 glucoamylase 효소활성은 30°C에서 상대적으로 높은 효소활성을 보이지만, 반응온도가 증가할수록 효소활성이 유의적으로 감소하여 42°C에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 3B). MBY1280, 1322, 1323 및 MBY1324 균주는 glucoamylase 효소활성이 KCTC7806 균주에 비해 상대적으로 낮았으며 MBY1276 균주는 30°C에서 583.0 U으로 높은 효소활성을 나타냈으나 37°C 이상으로 반응온도가 상승하면서 활성이 급격히 감소하였다. 그러나 MBY1320 균주는 반응온도가 증가할수록

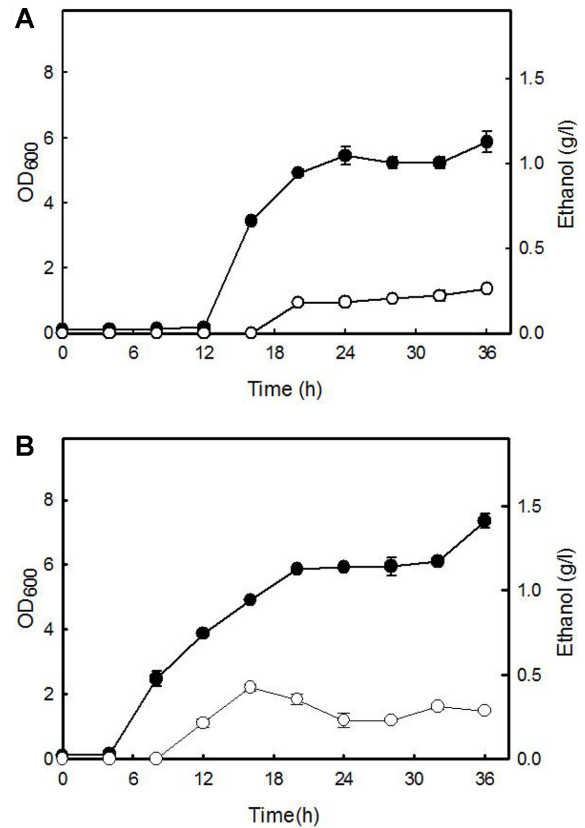


Fig. 4. Shake flask cultivation of *S. fibuligera* strain KCTC 7806 (A), and MBY 1320 (B) at 42°C. Soluble starch (1%) was used as carbon source and initial medium acidity was adjusted to pH 6. Agitation speed was maintained at 200 rpm throughout the cultivation (●: OD₆₀₀, ○: ethanol).

glucoamylase 효소활성이 증가하였으며 42°C에서 1,006.9 U로 가장 우수한 효소활성을 나타내었다. 이러한 결과는 MBY1320 균주가 대조구인 KCTC7806 균주를 비롯한 다른 *S. fibuligera* 균주에 비해 높은 배양온도에서도 상대적으로 빠른 비성장속도로 성장하는 것을 부분적으로 뒷받침하는 결과로 판단되었다.

가용성 전분을 탄소원으로 사용하여 42°C에서 *S. fibuligera* KCTC7806 및 MBY1320 균주의 균체 성장속도와 에탄올 생산속도를 비교하였다(Fig. 4). 대조구인 KCTC7806 균주는 42°C에서 에탄올 생산량이 배양 36시간 경과 후 약 0.25 g/l이었으나(Fig. 4A), MBY1320 균주는 0.32 g/l로 상대적으로 우수한 에탄올 생산성을 나타내었다(Fig. 4B). 또한 가용성 전분을 탄소원으로 이용하여 성장할 때 MBY1320 균주의 비성장속도가 KCTC7806 균주보다 유의적으로 높은 수준을 나타내었다. 이러한 결과는 42°C에서 MBY1320 균주의 glucoamylase의 효소활성이 상대적으로 높은 것과 관련이 있는 것으로 판단되었다.

전분의 당화에 필요한 공정을 생략 또는 축소할 경우 에탄올 생산경비를 절감할 수 있으므로 전분 분해활성이 우수한 효모를 이용하여 전분을 직접 에탄올로 전환시키는 방법이 개발되고 있다[4]. 또한, 에탄올 생산에 적합한 효모 종군으로서 내열성, 에탄올 내성, 전분 발효능 및 응집성 등이 요구되고 있으므로[1] 기존의 *S. fibuligera* 균주보다 높은 온도에서 전분분해 활성 및 성장속도가 우수한 *S. fibuligera* MBY1320 균주는 육종 및 개량을 통하여 전통주 및 에탄올 생산에 사용할 수 있는 후보균주로서 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

누룩으로부터 MBY1276, 1280, 1282, 1320, 1322, 1324 및 MBY 1327로 각각 명명된 전분을 분해하는 효모균주를 분리하였다. 이들 균주는 18S rRNA 영역의 ITS 단편 및 26S rDNA 영역의 D1/D2 단편의 염기서열 해석 및 탄소원 대사특성 분석을 통하여 *S. fibuligera*로 동정하였다. 상주지역에서 수집된 누룩으로부터 분리된 MBY1320 균주는 대조구 균주인 *S. fibuligera* KCTC7806 및 누룩으로부터 분리된 다른 *S. fibuligera* 균주에 비해 고온에서 상대적으로 높은 비성장속도를 나타내었다. 전분을 분해하는데 필요한 효소인 α -amylase 및 glucoamylase 효소활성을 측정된 결과 MBY1320 균주의 α -amylase 효소활성은 대조구 균주보다 낮지만 glucoamylase 효소활성은 고온에서 상대적으로 우수한 것으로 나타났다. 효소활성 분석결과는 MBY1320 균주가 표준균주 및 다른 *S. fibuligera* 균주와 비교하여 고온에서 상대적으로 높은 비성장속도를 나타내는 것을 뒷받침하는 결과로 판단되었다. 가용성 전분을 이용한 회분식 배양 결과 MBY1320 균주는 표준균주 보다 42°C에서 우수한 성장속도 및 에탄올 생산속도를 나타내었다. 본 연구를 통하여 기존에 보고된 *S. fibuligera* 균주보다 고온에서 glucoamylase 효소활성 및 비성장속도가 우수한 *S. fibuligera* 균주를 보고하는 바이다.

Acknowledgments

This work was supported by "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009993)", Rural Development Administration Republic of Korea.

References

1. Abouzied MM, Reddy CA. 1987. Fermentation of starch to ethanol by a complementary mixture of an amylolytic yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **9**: 59-62.
2. Baek SY, Yun HJ, Choi HS, Hong SB, Koo BS, Yeo SH. 2010. Screening and characteristics of useful fungi for brewing from commercial Nuruk in chungcheong provinces. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 373-378.
3. Chi Z, Liu J, Zhand W. 2001. Trehalose accumulation from soluble starch *Saccharomycopsis fibuligera* sdu. *Enzyme Microb. Tech.* **28**: 240-245.
4. De Mot R, Van K, Donkers A, Verachert H. 1985. Potentialities and limitation of direct alcoholic fermentation of starch material with amylolytic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 222-226.
5. González CF, Fariña JI, Figueroa LICd. 2008. Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554 an approach to efficient cassava starch utilization. *Enzyme Microb. Tech.* **42**: 272-277.
6. Ha DM, K DC, Hong SM, Lee CW. 1989. Identification and properties of starch utilizing yeasts isolated from Nuruk. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**: 408-415.
7. Hostinova E, Janecek S, Gasperik J. 2010. Gene sequence, bioinformatics and enzymatic characterization of alpha-amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* KZ. *Protein J.* **29**: 355-364.
8. Hyun SH, Mun HY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. 2013. Isolation of yeasts from wild flowers in Gyonggi-do province and Jeju island in korea and the production of anti-gout xanthine oxidase inhibitor. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 383-390.
9. Joseph R, Bachhawat AK. 2014. Yeasts: Production and commercial uses. *Enc. Food Microbiol.* **2**: 823-830.
10. Kang MG, Kim YH, Bolormaa Z, Kim MK, Seo GS, Lee JS. 2013. Characterization of an antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biomed Res. Int.* **2013**: 6.
11. Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu TS. 1997. Characteristics of useful fungi isolated from traditional korean Nuruk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 767-774.
12. Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu TS. 1998. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional korean nuruk. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 456-464.
13. Kim IH, Park WS, Koo YJ. 1996. Comparison of fermentation characteristics of korean traditional alcoholic beverages prepared by different brewing methods and their quality changes after aging. *Korean J. Dietary Culture* **11**: 497-506.
14. Koo SC, Jeon MG, Lee YH, Kim HY, Kang BK, Go JM, et al. 2014. Screening of soybean germplasm with high starch content. *Korean J. Breed Sci.* **46**: 52-57.
15. Lee DH, Lee DH, Lee JS. 2007. Characterization of a new antimentia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Tech.* **42**: 83-88.
16. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. 2008. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* **36**: 102-105.
17. Lee MK, Lee SM, Bae SM. 1991. The bibliographical study on

- the processing methods of traditional *nuruk*. *J. East Asian Soc. Diet Life* **1**: 277-298.
18. Lee MN and Park HD. 2012. Isolation and characterization of acidophilic yeasts producing urease from Korean traditional *Nuruk*. *Korean J. Food Preserv.* **19**: 308-314.
 19. Liu GL, Wang DS, Wang LF, Zhao SF, Chi ZM. 2011. Mig1 is involved in mycelial formation and expression of the genes encoding extracellular enzymes in *Saccharomycopsis fibuligera* A11. *Fungal. Genet. Biol.* **48**: 904-913.
 20. Lv XC, Huang XL, Zhang W, Rao PF, Ni L. 2013. Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Control.* **34**: 183-190.
 21. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 22. Min JH, Kim YH, Kim JH, Choi SY, Lee JS, Kim HK. 2012. Comparison of microbial diversity of Korean commercial makgeolli showing high beta-glucan content and high antihypertensive activity, respectively. *Mycobiology* **40**: 138-141.
 23. Park JH, Chung CH. 2014. Characteristics of *Takju* (a cloudy Korean rice wine) prepared with *Nuruk* (a traditional Korean rice wine fermentation starter), and identification of lactic acid bacteria in *Nuruks*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**: 153-164.
 24. Park JW, Kim BJ, Lee JW, Kim YB. 2002. Purification and characterization of a maltopentaose-producing amylase from *Bacillus megaterium* KSM B-404. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 352-358.
 25. Park SY, Choi SY, Min KH. 1999. Isolation of glucoamylase producing yeasts and its enzymatic characteristics. *Korean J. Micol.* **6**: 386-393.
 26. Pincus DH, Orenga S, Chatellier S. 2007. Yeast identification past, present, and future methods. *Med. Mycol.* **45**: 97-121.
 27. Pirsellova K, Smogrovicova D, Balaz S. 1993. Fermentation of starch to ethanol by a co-culture of *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 338-341.
 28. So MH. 1999. Characteristics of a modified *nuruk* made by inoculation of traditional *nuruk* microorganisms. *Korean J. Food Nutr.* **12**: 219-225.
 29. Song SH, Lee C, Lee S, Park JM, Lee HJ, Bai DH, et al. 2013. Analysis of microflora profile in Korean traditional *Nuruk*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 40-46.
 30. Tubb RS. 1986. Amyolytic yeasts for commercial applications. *TIBITECH* **4**: 98-104.
 31. Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, and Yoo JY. 1997. Isolation, identification and cultural conditions of yeasts from traditional Meju. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 435-441.
 32. Yun HJ, Lee YJ, Yeo SH, Choi HS, Park HY, Park HD, Baek SY. 2012. The isolation and culture characterization of a lipolytic enzyme producing strain from meju. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 98-103.