

누룩으로부터 스트레스 내성이 우수한 *Pichia farinosa* 균주의 분리

권훈주, 김명동*
강원대학교 식품생명공학과

Received: July 14, 2016 / Revised: August 10, 2016 / Accepted: August 11, 2016

Isolation of Stress-tolerant *Pichia farinosa* from Nuruk

Hun-Joo Kwon and Myoung-Dong Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

A variety of nuruks collected in different areas in Korea were explored to isolate sixty yeast strains that was able to grow at 44°C. MBY/L1569 strain, which showed the highest growth rate, was selected and identified as *Pichia farinosa* (*Millerozoma farinosa*). The isolated strain exhibited superior resistance to heat, acid, and alkali compared with those of *P. farinosa* KCTC27412 as a control strain. The specific growth rate of *P. farinosa* MBY/L1569 at 46°C was $0.37 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$, and the highest specific growth rate of $0.50 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ was obtained when it was grown at pH 7.0 and 37°C with 50 g/l (w/v) glucose as the carbon source. Under optimum growth conditions, strain MBY/L1569 produced ethanol $19.66 \pm 0.68 \text{ g/l}$ from glucose 50 g/l, with an approximate yield of 40%. *P. farinosa* MBY/L1569 was deposited at the Korean Collection for Type Cultures as *pichia farinosa* KCTC27753.

Keywords: Nuruk, stress tolerance, ethanol, specific growth rate, *Pichia farinosa*

서 론

최근 화석연료의 고갈과 원유의 가격상승 등으로 인하여 이를 대체할 재생 가능한 바이오에너지 생산의 필요성이 전 세계적으로 대두되고 있으며, 이미 국내에서도 친환경 바이오에너지 생산기술을 다양하게 연구하고 있는 추세이다[4, 15, 18]. 대표적인 바이오에너지로서 사탕수수나 옥수수 등의 당질계와 전분질계의 바이오매스로부터 생산하는 바이오에탄올을 들 수 있다. 바이오에탄올은 생산성과 생산수율이 높아 경제적인 생산이 가능하며, 인화성이 우수하다고 알려져 있어 석유의 대체 연료로도 인정받고 있다[1, 6, 16]. 그러나 바이오에탄올 생산으로 인한 식량자원의 가격 상승과 개발도상국들의 식량문제로 인하여 생산이 제한되고 있는 실정이다[4, 14, 15]. 이러한 문제들로 인하여 현재 벵짚이나 목재등의 목질계 원료등의 다양한 셀룰로오스계 바이오매스로부터 바이오에탄올을 생산하려는 시도가 증가하고 있다

[14, 15]. 셀룰로오스계 바이오매스는 탄수화물이 기반인 자원으로서 비교적 단시간에 재생산이 가능하며, 육탄당인 포도당, 갈락토즈, 오탄당인 자일로즈등으로 구성되어 있다[10].

일반적으로 셀룰로오스계 바이오매스의 경우 효모를 비롯한 발효미생물을 이용한 바이오에탄올 발효공정을 위하여 미생물이 대사할 수 있도록 전처리 공정이 필요하다[1, 5, 14, 22]. 전처리공정으로는 주로 산이나 알카리 처리법, 효소 가수분해법이 사용되며[1, 5, 8, 10, 20], 동시당화발효와 같은 공정도 사용된다. 전처리 공정의 경우, 160°C 이상의 고온에서 산이나 알카리를 첨가하여 바이오매스를 구성하는 다당류를 가수분해 하는 과정을 거친다[14]. 이때, 고온으로 처리한 반응물을 미생물을 이용한 발효를 진행하기 위해서는 냉각과정을 거쳐야 하는데, 냉각수 사용 등 대량생산 공정에는 경제적으로 불리할 수 있다[14]. 동시당화발효 공정의 경우 효소를 첨가하여 당화를 진행시키는 것으로서 주로 45–50°C에서 진행된다[3, 9]. 그러나, 이 온도에서는 미생물을 사용한 발효가 어렵고, 미생물 생육 온도인 30–35°C에서는 효소를 사용한 당화효율이 낮아 고가의 당화 효소의 사용량이 증가하게 된다[9, 10].

효모는 발효 및 양조에 있어서 오래 전부터 사용해온 미생물로 알려져 있으며, 바이오에탄올을 생산하는 공정에도

*Corresponding author

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

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

사용되고 있다[5, 15]. 에탄올 발효에 사용되는 효모로는 주로 *Saccharomyces* 속이 사용되며, 일반적인 효모 균주는 배양온도 30°C에서 가장 활발하게 성장한다. 효모를 사용하는 에탄올 발효는 대부분 30–33°C에서 진행되며 35°C 이상에서는 발효력이 급속도로 감소되므로 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 냉각과정이 필요하다[11, 13, 21]. 따라서, 높은 온도와 낮은 pH에서도 성장이 우수하며 발효능이 우수한 균주는 전처리 및 발효과정에 사용되는 냉각 비용의 절감과 다른 균주로부터의 오염 방지 등의 이점을 가지게 되며, pH가 낮은 전처리물에서도 지속적인 에탄올 생산을 할 수 있는 효과를 기대할 수 있다[13, 23].

본 연구에서는 우리나라 전통 누룩으로부터 고온에서 성장속도가 빠르고 산, 알칼리에 대하여 내성이 우수한 효모를 선별하여 바이오에탄올을 생산하는데 적합한 균주를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

균주분리

경상북도 상주시를 비롯하여 전국의 재래시장에서 판매되고 있는 누룩 12점을 구매하였다. 분쇄한 누룩 1 g을 멸균수 9 ml에 현탁한 후 10^1 – 10^5 희석배수까지 단계적으로 희석하고[2], chloramphenicol (100 mg/l, Sigma-Aldrich, USA)이 함유된 YEPD (yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l, pH 6.8, BD Diagnostic, USA) 평판배지에 도말한 후 44°C에서 48시간 동안 배양하여 단일집락을 분리하였다.

균주동정

분리한 효모 균주는 YEPD 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 동안 진탕배양한 후 GenEx™ genomic Sx (GeneAll, Korea)를 사용하여 염색체 DNA를 추출하였다. 염색체의 Internal transcribed spacer 영역을 증폭하기 위하여 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3')와 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머[7]를 사용하였다. PCR 산물은 (주)마크로젠(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 해석하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI, RP, MD, USA)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 프로그램을 사용하여 기존에 보고된 균주의 염기서열과 상동성을 비교하여 균주를 동정하였다.

균주의 생육특성

단일집락을 5 ml YEPD 배지에 접종하여 30°C에서 12시간 배양한 후, 세포흡광도(OD_{600}) = 1에 해당하는 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 멸균수로 5회 세척하고 10^0 부터 10^4

까지 단계적으로 멸균수를 사용하여 희석한 후 5 N H₂SO₄ (Korea) 용액과 5 N NaOH (Samchun, Korea) 용액을 사용하여 pH를 조정하여 YEPD 평판배지에 15 µl씩 점적한 후 25, 30, 44°C에서 48시간 동안 배양하였다. 대조구로서 *Pichia farinosa* (*Millerozyma farinosa*) KCTC27412 균주를 한국 미생물자원센터(KCTC, Korea)로부터 분양 받아 사용하였다.

균주의 비성장속도

분리된 균주의 생육특성을 조사하기 위하여 다양한 배양 온도, pH 및 포도당 농도 조건에서 비성장속도를 측정하였다. 단일집락을 YEPD 배지 50 ml에 접종하여 30°C에서 18시간 동안 호기적인 조건으로 전배양하였다. 배양액을 원심 분리(13,000 × g, 1분)하여 균체를 회수하고 멸균수로 세척한 후 20 g/l의 포도당이 첨가된 YEPD 배지에 세포흡광도가 0.1이 되도록 접종한 후 200 rpm으로 진탕배양하여 대수증식기로 성장하고 있을 때 비성장속도를 측정하였다. 비성장속도는 다양한 배양온도에서 결정하였으며, 비성장속도가 가장 빨랐던 온도를 최적 배양온도로 선정하였다. 최적 배양 온도를 결정한 후 최적 pH 조건을 설정하기 위하여 5 N H₂SO₄와 5 N NaOH를 사용하여 YEPD 배지의 초기pH를 조정된 뒤 배지에서 균주의 비성장속도를 측정하였다. 최적 배양온도 및 pH 조건을 결정한 후 탄소원으로 주입하는 포도당 농도를 조정하여 균주의 비성장속도를 측정하였다.

배양조건

배양시간에 따른 균주의 성장 및 포도당 소모 특성을 조사하기 위하여 단일집락을 50 ml의 YEPD 배지에 접종하고 30°C에서 200 rpm의 교반속도로 18시간 동안 전배양하였다. 전배양된 균주를 멸균수로 세척한 후 세포흡광도가 0.1이 되도록 200 ml의 YEPD 배지에 접종하고 진탕배양기를 사용하여 37°C에서 200 rpm의 교반속도로 36시간 동안 배양하였다. 또한, 같은 조성의 YEPD 배지에 20 ml/l의 oxyrase (Bioworld, USA)를 첨가하고 플라스크를 밀봉하여 혐기적 배양조건 하에서 균주의 성장 및 포도당 소모 특성을 호기적 배양조건과 비교하였다.

분석방법

균체성장은 흡광광도계(Ultrospec 6300 pro, GE Healthcare, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 세포흡광도를 측정하여 결정하였다. 포도당 및 에탄올 농도는 굴절률 검출기(RID-10A, Shimadzu, Japan)가 장착된 고성능 액체 크로마토 그래프(HPLC 20A-Series, Shimadzu)를 사용하여 측정하였다. 컬럼은 Rezex ROA-Organic Acid H+ (Phenomenex, USA)를 사용하였으며, 이동상으로서 0.005 N H₂SO₄ 용액을 0.6 ml/min의 유속으로 사용하였다.

통계처리

모든 측정은 3회 반복하였으며 평균값과 표준오차는 SPSS (v 20.0, SPSS, USA)를 사용하여 결정하였고 유의성 검증은 Duncan의 다중범위 검정법을 사용하였다[24].

결과 및 고찰

균주분리 및 동정

누룩으로부터 44°C에서 성장할 수 있는 효모 균주 60점을 분리하였다. 분리된 균주 중 YEPD 액체 배지에서 가장 성장속도가 우수한(data not shown) 균주를 선발하여 MBY/L1569 균주로 명명하였다. MBY/L1569 균주는 동정한 결과 *P. farinosa* CBS8045 균주[17]의 18S rRNA 유전자 (GenBank Accession No. FR668061.1)의 염기서열과 매우 높은 상동성(99%)을 나타내어 *P. farinosa*로 최종 동정하였다.

분리 균주의 생육특성

P. farinosa MBY/L1569 균주의 내열성과 내산성을 대조구 균주와 비교하기 위하여 YEPD 평판배지를 사용하여 성장을 비교하였다(Fig. 1). 배양온도 44°C에서 *P. farinosa* MBY/L1569 균주는 모든 pH 조건에서 성장하였지만 대조

구 균주는 성장하지 못하여 *P. farinosa* MBY/L1569 균주가 대조구 균주보다 내열성과 내산성이 우수한 것으로 판단되었다. 배양온도 25°C와 30°C에서는 pH 5와 7로 조정된 배지에서 대조구와 실험구 균주가 유사하게 성장하여 유의적인 차이를 판단할 수 없었다. 평판배지를 이용한 실험결과로부터 *P. farinosa* MBY/L1569 균주가 대조구로 사용한 KCTC27412 균주에 비하여 내열성, 내산성이 우수한 것을 확인하였다.

배양조건에 따른 MBY/L1569 균주의 비성장속도

누룩으로부터 분리된 *P. farinosa* MBY/L1569 균주의 생육 특성을 조사하기 위하여 배양온도, 배지의 초기 pH 및 탄소원으로 주입한 포도당 농도에 따른 비성장속도를 측정하였다. 모든 배양온도에서 대조구로 사용한 *P. farinosa* KCTC27412 균주에 비하여 *P. farinosa* MBY/L1569 균주의 비성장속도가 유의적으로 우수하였다(Fig. 2A). 고체배지에서는 대조구 균주가 44°C에서 성장하지 못하였으나, 액체배지에서는 44°C에서 $0.18 \pm 0.08 \text{ h}^{-1}$ 의 비성장속도를 나타냈으며, 46°C에서는 $0.12 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ 의 비성장속도를 나타내었다. 고체배지보다 액체배지에서 비성장속도가 빠른 것은 균체 성장에 필요한 산소, 영양원 등의 물질전달이 고체배지보다 용이한 것에서 기인한 것으로 추정된다. 실험구 균주는

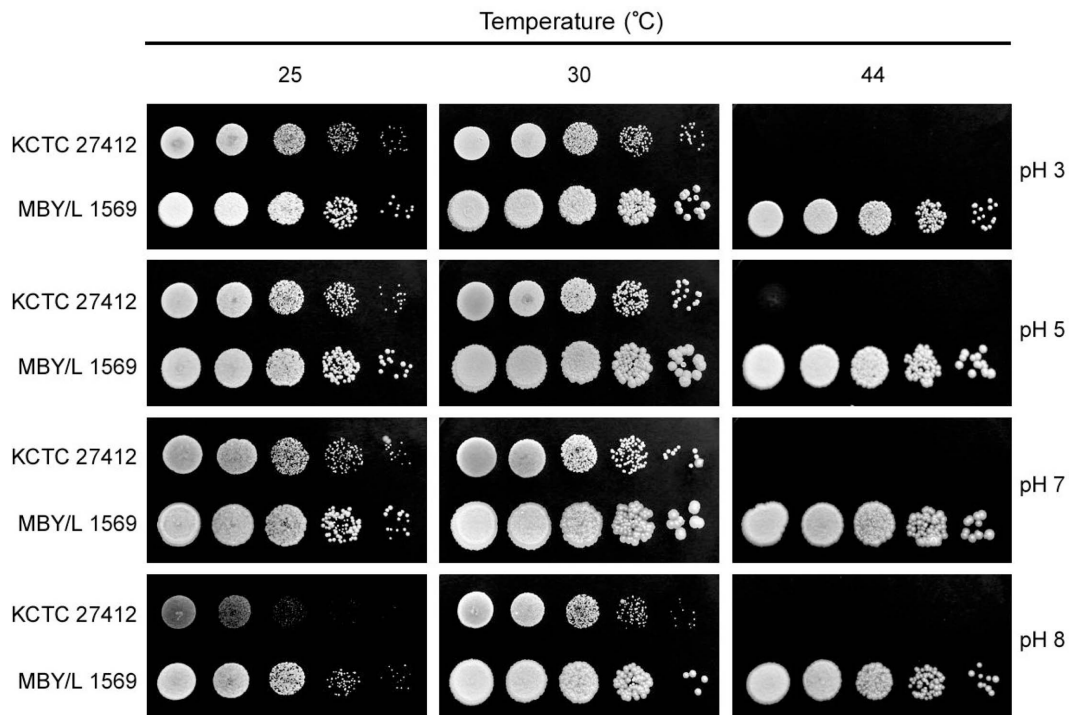


Fig. 1. Influences of temperature and medium pH on growth of *P. farinosa* strains. Exponential stage of cells at 30°C were diluted to an OD_{600} of 1.0 with sterilized YEPD with ten-fold serial dilutions, and 15 μl of each dilution was spotted. The plates were incubated at indicated temperature, and pH.

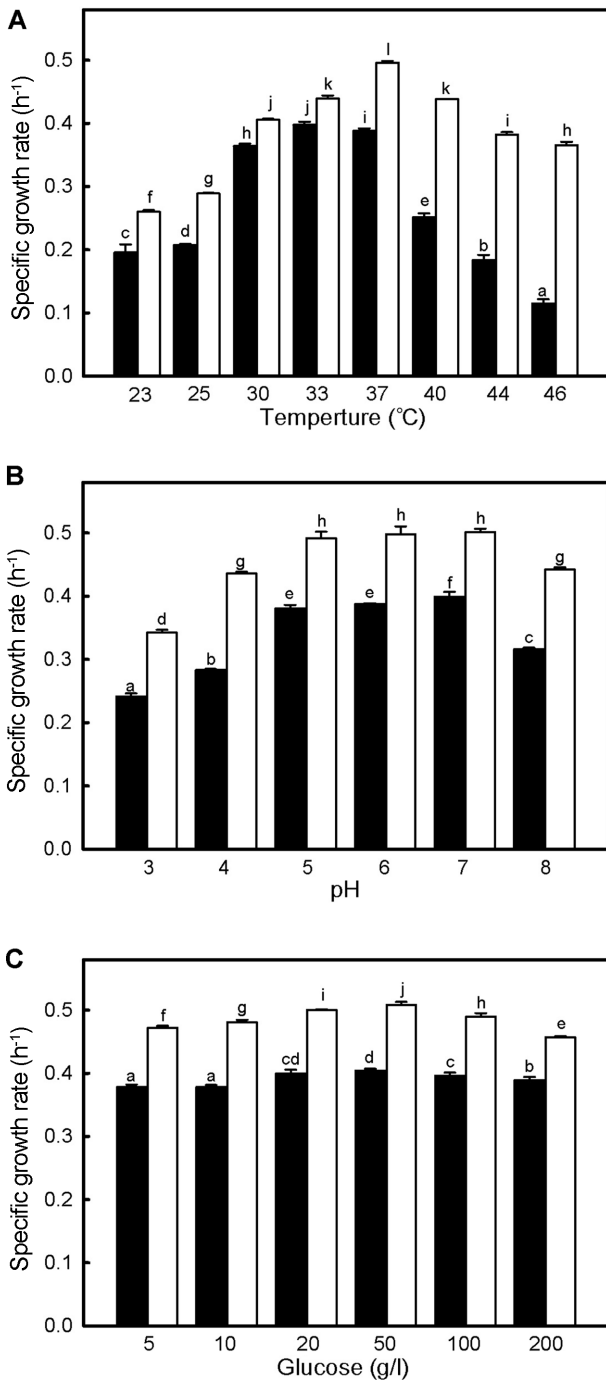


Fig. 2. Effects of temperature (A), pH (B), and glucose concentration (C) on specific growth rates of *P. farinosa* KCTC27412 (■) and MBY/L1569 (□) in aerobic condition. For panel A (pH 6.8) and B (37 °C), YEPD medium containing 20 g glucose/l as carbon source was used. For panel C, YEPD medium (pH 7.0, 37 °C) containing different concentration of glucose was used as carbon source. Different letters in each panel indicate significant difference between means ($p < 0.05$).

44°C, 46°C에서 각각 $0.38 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$, $0.37 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ 의 비성장속도를 나타내어 대조구 균주보다 고온에서 상대적으로 빠른 성장속도를 나타내었다. *P. farinosa* MBY/L1569 균주는 37°C에서 가장 빠른 비성장속도($0.50 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$)를 나타냈다.

탄소원으로 포도당이 20 g/l 농도로 첨가된 YEPD 배지의 초기 pH를 배양온도 37°C를 기준으로 조정된 뒤 비성장속도를 측정하였다(Fig. 2B). 모든 초기 pH 조건에서 실험구 균주가 대조구 균주에 비해 유의적으로 빠른 비성장속도를 나타냈다. 실험구 균주는 초기 pH 7에서 가장 빠른 비성장속도($0.51 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$)로 성장하여, 대조구 균주($0.40 \pm 0.08 \text{ h}^{-1}$)에 비하여 약 1.25배 빠른 비성장속도를 나타냈다.

비성장속도가 가장 우수하였던 조건인 배지의 초기 pH를 7.0으로 조정된 뒤 포도당을 다른 농도로 첨가하고 37°C에서 비성장속도를 측정하였다. 대조구 및 실험구 균주 모두 50 g/l의 초기 포도당 농도에서 가장 빠른 비성장속도를 나타냈으며, 포도당 농도가 증가할수록 비성장속도가 감소하였다(Fig. 2C). 대조구 균주는 200 g/l의 초기 포도당 농도에서 $0.39 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ 의 비성장속도를 나타내었으나 MBY/L1569 균주는 $0.46 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ 의 비성장속도를 나타내어 대조구 균주보다 고농도의 포도당에 대한 내성도 우수한 것으로 판단되었다. 결론적으로 *P. farinosa* MBY/L1569 균주는 초기 pH 7.0, 포도당 농도 50 g/l, 배양온도 37°C에서 가장 빠른 비성장속도를 나타내었다.

MBY/L1569 균주의 성장 및 에탄올 생산 특성

대수증식기에서 결정된 비성장속도를 기준으로 설정된 최적 배양조건에서 회분식 플라스크 배양을 통하여 *P. farinosa* MBY/L1569 균주의 포도당 소모, 균체성장 및 에탄올 생산 특성을 조사하였다(Fig. 3). 호기적 배양조건에서 균체가 최대 성장하였을 때는 발효 개시 후 32시간이었으며 세포흡광도는 22.87 ± 0.50 이었다(Fig. 3A). 균체는 대수증식기에서 $0.50 \pm 0.08 \text{ h}^{-1}$ 의 비성장속도로 성장하였으며 배양 개시 후 28시간 이후에 성장이 정체되었다. 발효 개시 후 36시간이 경과하였을 때 초기에 주입한 포도당이 모두 소모되었고 $19.66 \pm 0.68 \text{ g/l}$ 에탄올을 생산되어 소모된 포도당 대비 약 40%의 수율을 나타내었다. 혐기적인 배양의 경우, 발효 개시 후 36시간에서 균체가 최대 성장하였으며 14.10 ± 0.46 의 세포흡광도를 나타내었다(Fig. 3B). 균체가 최대 성장하였을 때, $45.30 \pm 0.64 \text{ g/l}$ 의 포도당을 소모하였으며, $20.60 \pm 1.11 \text{ g/l}$ 의 에탄올을 생산하여 소모된 포도당 대비 약 45.5%의 에탄올 수율을 나타내었다. *P. farinosa* MBY/L1569 균주는 한국미생물자원센터에 KCTC27753 균주로 기탁하였다.

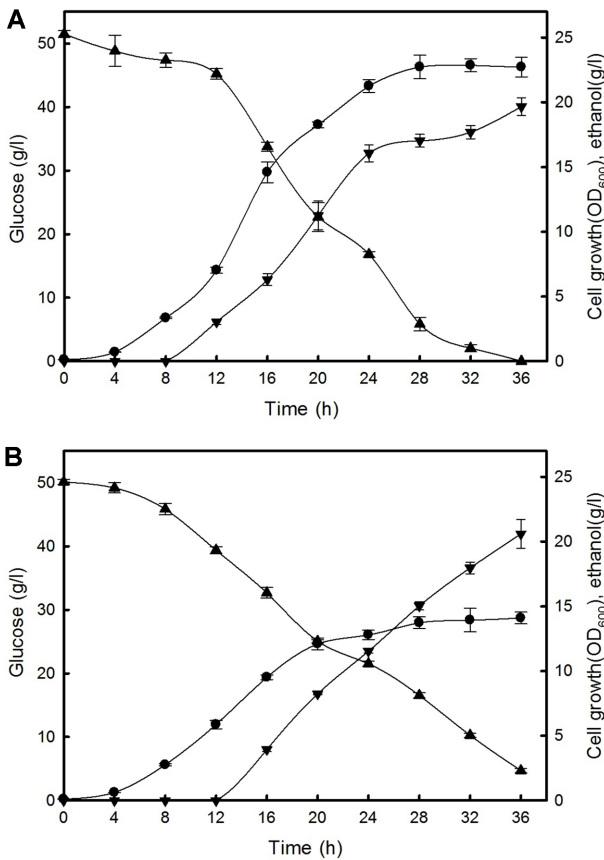


Fig. 3. Profiles of cell growth (●), glucose consumption (▲), and ethanol production (▼) in aerobic (A) and anaerobic (B) cultivation of *P. farinosa* MBY/L1569 at 37 °C.

에탄올 생산공정에서 요구되는 효모의 바람직한 특성은 고온과 높은 탄소원 농도에서도 우수한 성장을 나타내는 것 등이다[2, 19]. 고온에서도 성장이 우수하며 에탄올 생산성이 우수한 균주는 발효 공정의 생산비용을 절감시킬 수 있는 요인이 된다. *Pichia farinosa* 균주는 간장의 발효과정 중 발견된다는 보고가 있으며[25], 김[12]은 다양한 온도 및 pH 조건에서 성장하였다고 보고하였으나, 현재까지 연구결과가 많지 않은 실정이다. 따라서 기존에 보고된 균주보다 고온에서도 우수한 성장을 보이며 산과 알칼리에 대한 내성이 우수한 *P. farinosa* MBY/L1569는 바이오에탄올 생산공정 등에 적용할 수 있는 가능성이 높고, 유전체 수준에서의 개량 등을 포함한 기반 연구에 사용할 수 있는 유망한 균주로 사료된다.

요약

누룩으로부터 44°C에서 성장할 수 있는 효모 균주를 분리하고 상대적으로 성장속도가 가장 우수한 MBY/L1569 균주를 선별하였다. MBY/L1569 균주는 *Pichia farinosa*로 동정

되었으며, 대조구인 *P. farinosa* KCTC27412 균주에 비하여 내열성, 내산성 및 내알칼리성이 월등히 우수하였다. *P. farinosa* MBY/L1569 균주는 46°C에서 $0.37 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ 의 비성장속도를 나타내었으며, 배양온도 37°C, 초기 pH 7.0, 포도당 농도 50 g/l 조건에서 $0.50 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ 의 가장 빠른 비성장속도를 나타내었다. 최적 호기적 배양조건에서 *P. farinosa* MBY/L1569 균주는 50 g/l 포도당으로부터 $19.66 \pm 0.68 \text{ g/l}$ 에탄올을 생산하여 약 40%의 수율을 나타냈다. *P. farinosa* MBY/L1569 균주는 한국미생물자원센터에 KCTC27753 균주로 기탁하였다.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009993)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

1. Cho WS, Chung YH, Kim BK, Suh SJ, Koh WS, Choe SH. 2007. Cellulosic ethanol as renewable alternative fuel. *J. Plant Biotechnol.* **34**: 111-118.
2. Choi DH, Choi YH, Yeo SH, Kim MD. 2016. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* from nuruk for production of ethanol from maltose. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 34-39.
3. Choi GW, Han MH, Kim Y. 2008. Development of glucoamylase and simultaneous saccharification and fermentation process for high-yield bioethanol. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 499-503.
4. Choi SJ, Lee SM, Lee JH. 2013. Production of bio-ethanol from red algae by acid hydrolysis and enzyme treatment. *Appl. Chem. Eng.* **23**: 279-283.
5. Eyiini M, Rajapandy V, Parani K, Lee MW. 2004. Effect of different pretreatment methods on the bioconversion of rice bran into ethanol. *Korean Soc. Mycol.* **32**: 170-172.
6. Goshima T, Tsuji M, Inoue H, Yano S, Hoshino T, Matsushika A. 2013. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Biosci, Biotechnol. Biochem.* **77**: 1505-1510.
7. Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer(ITS) region. *Arch. Microbiol.* **169**: 387-392.
8. Jeong TS, Oh KK. 2009. Behaviors of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis lignocellulosic biomass. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **24**: 267-272.
9. Kang HW, Kim Y, Park JY, Min JH, Choi GW. 2010. Development of thermostable fusant, CHY1612 for lignocellulosic simultaneous saccharification and fermentation. *Korean Soc. Biotechnol.*

- Bioeng. J.* **25**: 565-571.
10. Kim HG, Song HJ, Park DJ, Yang WH, Kim YD, Yang JK, et al. 2015. Bioethanol production by optimal enzymatic hydrolysis of pretreated *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. *J. Agric. Sci.* **49**: 135-145.
 11. Kim HJ, Ryu YW. 1989. The condition affecting ethanol tolerance of yeast strains in alcohol fermentation-study on the fermentation temperature and substrate type. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 167-171.
 12. Kim JY. 2010. Isolation of protease-producing yeast, *Pichia farinosa* CO-2 and characterization of its extracellular enzyme. *J. Korean Soc. Appl. Bi.* **53**: 133-141.
 13. Kim MS, Kim K. 2000. Protoplast fusion of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* to develop thermotolerant ethanol-producing yeast strains. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 80-86.
 14. Ko JJ, Yun SL, Kang SW, Kim SK. 2008. A review of thermochemical pretreatment in lignocellulosic bioethanol production. *Korea Organic Res. Recy. Assoc.* **16**: 79-88.
 15. Lee JS, Park EH, Kwun SY, Yeo SH, Kim MD. 2014. Optimization of pretreatment of persimmon peel for ethanol production by yeast fermentation. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 202-206.
 16. Lee KE, Lee JY, Kim K. 2008. Effect of content of crop component on the bioethanol production. *Korean J. Crop Sci.* **53**: 339-346.
 17. Mallet S, Weiss S, Jacques N, Leh-Louis V, Sacerdot C, Casaregola S. 2012. Insights into the life cycle of yeasts from the CTG clade revealed by the analysis of the *Millerozyma(Pichia) farinosa* species complex. *Plos One* **7**: e35842.
 18. McLaren JS. 2005. Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. *Trends Biotechnol.* **23**: 339-342.
 19. Novak M. 1981. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 201-211.
 20. Oh KK, Hong SI, Lee YY. 1998. Optimization of ammonia recycled percolation process for lignocellulosic biomass pretreatment. *Korean J. Chem. Eng.* **36**: 784-791.
 21. Park AH, Kim YH. 2013. Breeding of ethanol-producing and ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* using genome shuffling. *J. Lif. Sci.* **23**: 1192-1198.
 22. Sassner P, Galbe M, Zacchi G. 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenerg.* **32**: 422-430.
 23. Shi DJ, Wang CL, Wang KM. 2009. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 139-147.
 24. Sim HS, Kim MD. 2015. Characteristics of lactic acid production by *Lactobacillus buchneri* isolated from *Kimchi*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 286-290.
 25. Wei Q, Wang H, Chen Z, Lv Z, Xie Y, Lu F. 2013. Profiling of dynamic changes in the microbial community during the soy sauce fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 9111-9119.