

누룩으로부터 자일리톨 생산능이 있는 내열성 효모 *Millerozyma farinosa* 균주의 분리

정은혜, 배영우, 권세영, 박은희, 김명동*
강원대학교 식품생명공학과

Received: February 8, 2019 / Revised: April 13, 2019 / Accepted: April 22, 2019

Isolation of Xylitol-Producing Thermotolerant Yeast *Millerozyma farinosa* from Nuruk

Eun-Hye Jung, Young-Woo Bae, Se-Young Kwun, Eun-Hee Park, and Myoung-Dong Kim*

Division of Food Biotechnology and Biosystems Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

Diverse types of nuruks (traditional Korean fermentation initiators) were examined in order to isolate thermotolerant yeast strains capable of utilizing xylose as a carbon source. Among twenty yeast strains that grew at 46°C, MBY/L1597 showed a notably higher specific growth rate than other strains. This strain was identified as *Millerozyma farinosa*. While the control strain *M. farinosa* KCTC27412 (= CBS7064) did not show xylose reductase (XR) activity and apparent growth at 46°C, *M. farinosa* MBY/L1597 exhibited XR activity of 4.98 ± 0.49 U/mg protein when NADPH was used as a cofactor. *M. farinosa* MBY/L1597 cultured at 46°C produced (9.87 ± 1.00 g/l) xylitol from 20 g/l xylose, corresponding to approximately 50% yield. *M. farinosa* MBY/L1597 was deposited at the Korean Collection for Type Cultures as KCTC27797.

Keywords: Tolerance, Nuruk, xylose reductase, xylitol, yeast, *Millerozyma farinosa*

누룩은 전통적인 방법으로 술을 제조할 때 사용하는 발효제로서 쌀, 밀 등의 곡류에 다양한 미생물을 자연적으로 번식시킨 것이다[1]. *Aspergillus oryzae* [2], *Rhizopus oryzae* [3] 등의 곰팡이와 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici* 등의 젖산균 [4, 5], *Saccharomyces cerevisiae* [6, 7], *Saccharomycopsis fibuligera* [8] 효모 균주 등 다양한 미생물이 누룩으로부터 분리되었다. 쌀, 밀 등의 원료에 포함된 전분은 곰팡이에 의하여 포도당을 비롯한 발효 가능한 당분으로 분해되고[9], 효모에 의해서 에탄올로 전환되어 술이 만들어진다[10]. 젖산균은 젖산을 포함한 유기산을 생산하여 전통주 특유의 맛과 향을 생성하는 것으로 알려져 있다[11].

누룩에 존재하는 미생물에 대한 연구는 현재도 활발하게 진행 중이며[3, 10], 전분 당화능이 우수한 *Saccharomycopsis fibuligera* 균주[8], 알코올 생산성이 우수한 *S. cerevisiae* 균

주[6], 술의 풍미에 영향을 미치는 젖산균에 대한 연구결과 [4]가 보고되었다.

자일리톨은 오탄당 당알콜로서 감미도가 설탕과 유사하여 대체감미료로 사용되고 있으며, 과일과 채소 등의 자연계에 널리 존재한다[12]. 자일리톨은 *Candida tropicalis* [13] 등의 효모, *Aspergillus* [14] 등의 곰팡이 균주를 이용하여 생산하는 방법이 보고되었다. 목질계 바이오매스는 밀짚이나 볏짚을 비롯하여 옥수수대나 과채류의 껍질과 같은 농업 부산물 등이 해당되며[15], 이들은 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그닌으로 구성된 견고한 구조로 이루어져 있다. 셀룰로스, 헤미셀룰로스는 당화를 통해 미생물이 이용할 수 있는 육탄당인 포도당과 오탄당인 자일로스로 전환되는데[16] 효소와 미생물을 사용하는 동시당화 발효공정의 경우, 주로 45–50°C에서 진행되므로[17, 18] 내열성이 우수한 균주의 확보가 필수적이다.

본 연구에서는 전통주 제조를 위한 발효제로 사용되는 누룩으로부터 내열성이 우수한 자일로즈 대사 균주를 분리하고 균체성장과 자일리톨 생산특성을 조사하였다.

전국의 재래시장에서 전통방식으로 제작한 누룩 12점을

*Corresponding author

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

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

구매하였다. 오탄당인 자일로스를 탄소원으로 이용할 수 있는 효모 균주를 분리하기 위하여 분쇄한 누룩 1 g을 9 ml의 펩톤수에 현탁하고 단계적으로 희석한 후, chloramphenicol (100 mg/l, Sigma-Aldrich, USA)을 함유한 YEPX (yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, xylose 20 g/l, pH 6.8, BD Diagnostic, USA) 평판배지에 도말하였다[19]. 도말한 배지는 46°C로 유지되는 정체배양기에서 60시간 동안 배양하여 형성된 단일집락을 분리하였다.

분리한 균주의 단일집락을 50 ml의 YEPD (yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l, pH 6.8, BD Diagnostic) 배지에 접종하고 진탕 배양기(JSR, Korea)를 사용하여 30°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 균주는 원심분리(4,000 ×g, 10 min)하여 회수한 후 멸균수로 2회 세척하고 600 nm에서의 세포흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 100 ml의 YEPX 배지에 접종하고 46°C의 진탕배양기에서 배양하였다.

선별 효모 균주는 단일집락을 YEPD 배지에 접종하고 30°C에서 24시간 동안 진탕 배양한 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[20]를 사용하여 PCR 반응산물을 확보한 후 (주)마크로젠(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [21]를 사용하여 염기서열이 보고된 균주들과의 상동성을 바탕으로 동정하였다. 대조구로 사용한 *Millerozyma farinosa* KCTC27412 균주는 한국미생물자원센터(KCTC,

Korea)로부터 분양받았다.

선별 균주의 내열성을 확인하기 위해 단일집락을 5 ml의 YEPD 배지에 접종하여 30°C에서 12시간 배양한 후 균체를 회수하였다. 균체는 멸균수로 5회 세척하고 적정 농도로 희석한 후 YEPD 및 YEPX 평판배지에 각각 10 µl씩 점적한 후 60시간 동안 호기조건에서 배양하였다.

자일로스 환원효소(XR)의 활성은 Bengtsson 등[22]의 방법을 사용하여 측정하였다. YEPX 배지 5 ml에 세포흡광도가 0.1이 되도록 균주를 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 뒤 원심분리하여 균체를 회수하였다. 인산염 완충액(50 mM, pH 6.0)에 현탁한 균체를 glass beads (Sigma-Aldrich)를 사용하여 세포를 파쇄한 후 원심분리(13,000 ×g, 10 min)하여 조효소액을 확보하였다.

조효소액 100 µl에 2 mM의 NADPH 또는 NADH를 첨가하고 500 mM의 자일로스를 기질로 주입하여 각 반응온도에서 15분간 반응하였다. XR 효소활성은 자일로스가 기질로 존재할 때 1분 동안 1 µmol의 NADH 또는 NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의하였고, 조효소액 중의 단백질 농도는 Bradford dye reagent (Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였다.

균체성장은 흡광광도계(GE Healthcare, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 세포흡광도를 측정하여 결정하였다. 자일로스 및 자일리톨의 농도는 굴절률 검출기가 장착된 고성능 액체 크로마토 그래프(Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정하였다. 컬럼은 65°C로 유지된 Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (Phenomenex, USA)를 사용하였으며, 이동상으로 0.005 N H₂SO₄ 용액을 0.6 ml/min의 유속으로 사용하였다.

모든 측정은 3회 반복하였으며 평균값과 표준오차는 IBM

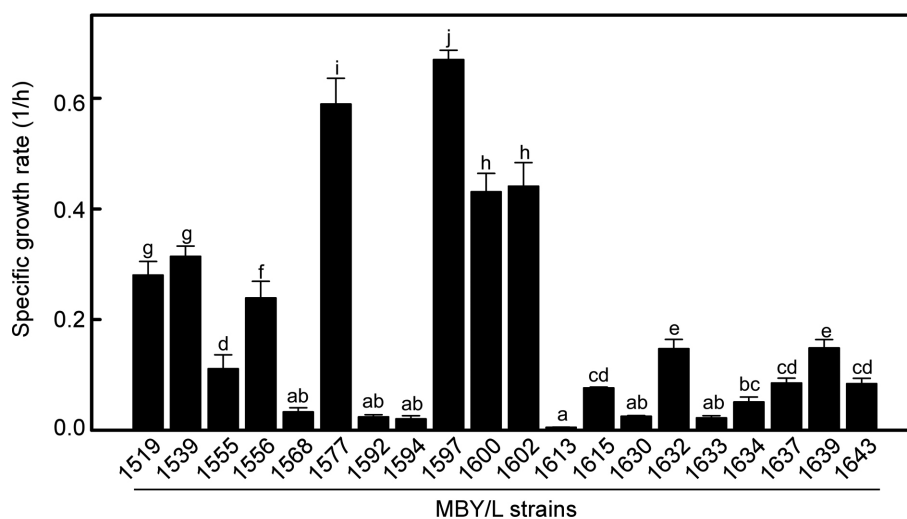


Fig. 1. Specific growth rates of the yeast isolates grown at 46°C in YEPX medium containing 20 g/l xylose as carbon source. Averages and standard errors determined from three independent measurements are shown. Different letters indicate significant difference between means ($p < 0.05$).

SPSS Statistics 24 (IBM, USA)를 사용하여 결정하였고, 유의성 검증은 일원배치 분산 분석법[23]을 사용하였다.

충청남도 예산군을 비롯한 전국 5개 지역에서 구매한 누룩으로부터 자일로스를 탄소원으로 이용할 수 있는 944점의 효모 균주를 분리하였다. 내열성이 우수한 균주의 선별을 위하여 분리된 균주를 46°C 호기조건에서 60시간 동안 배양하였고 20점의 효모 균주가 자일로스를 이용하여 성장하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 선발된 균주 중 충남 예산군에서 확보한 누룩으로부터 분리된 MBY/L1577, 1597, 1600 및 1602 균주의 비성장속도가 우수하였으며, 이들 균주 중 MBY/L1597 균주의 비성장속도가 0.67 ± 0.10 1/h로서 가장 높은 값을 나타내어 추가 연구를 위한 균주로 선정하였다. MBY/L1597 균주의 18S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 다른 균주들과의 상동성을 비교한 결과 *Millerozyma farinosa*와 100%의 상동성을 나타내었으며, 한국미생물자원센터에 KCTC27797 균주로 기탁하였다.

M. farinosa MBY/L1597 균주의 내열성을 조사하여 대조구인 KCTC27412 균주와 비교한 결과 탄소원으로써 포도당과 자일로스를 각각 함유된 배지에서 유의적으로 다른 내열성을 나타냈다(Fig. 2).

내열성이 우수한 균주는 기질의 당화조건에서도 상대적으로 안정적인 성장을 나타내어 동시 당화발효가 가능하며, 세균에 의한 오염 가능성을 낮출 수 있는 장점도 있다[24]. 따라서 다양한 발효공정에서 균주의 내열성, 내산성, 에탄올 내성 등은 생산공정의 비용 절감 및 생산성과 밀접한 관련이 있다[25].

M. farinosa 균주의 XR 활성은 보조효소로서 NADH보다 NADPH와 관련성이 높은 것으로 나타났으며, *M. farinosa* MBY/L1597 균주 및 대조구 균주의 XR 효소활성은 반응온도 30°C 및 37°C에서 유의적으로 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3). 그러나 대조구 균주는 46°C에서 XR 효소활성을

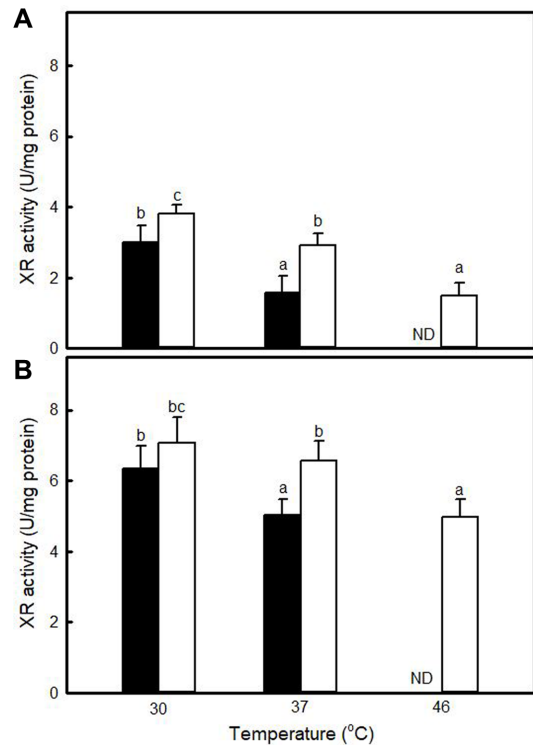


Fig. 3. Xylose reductase activities of *M. farinosa* KCTC27412 (■) and MBE/L1597 (□). For panel A, NADH was used as a cofactor and NADPH was used for panel B. Averages and standard errors determined from three independent measurements are shown. Different letters in each panel indicate significant difference between means ($p < 0.05$). ND: not detected.

나타내지 않았으나 *M. farinosa* MBY/L1597 균주는 NADH를 보조인자로 사용하였을 때 1.50 ± 0.34 U/mg protein, NADPH를 사용하였을 때 4.98 ± 0.49 U/mg protein의 XR 효소활성을 각각 나타냈다. 이러한 두 균주의 XR 효소활성

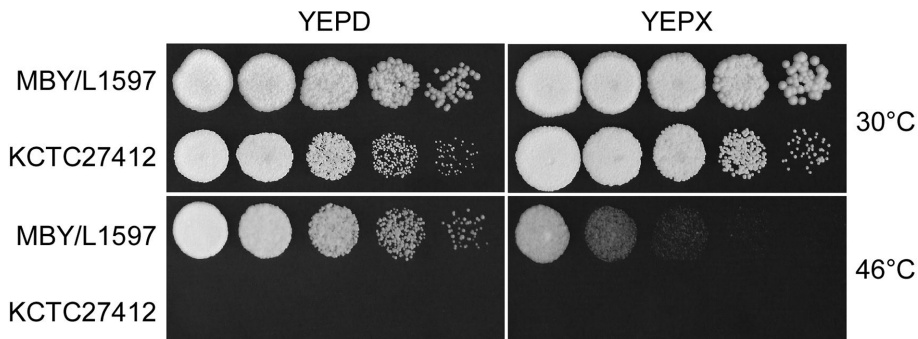


Fig. 2. Influences of temperature and carbon sources on growths of *M. farinosa* KCTC27412 and MBE/L1597. Strains growing exponentially in YEPD were harvested, washed five times with sterile water, and diluted to an OD₆₀₀ of 1.0 with sterile water. Then, ten-fold serial dilutions were spotted on agar plate. The plates were incubated at an indicated temperature, and cell growth was assessed after 36 h.

의 차이는 46°C에서 *M. farinosa* MBY/L1597 균주와 대조구 균주의 성장특성을 일부 뒷받침하는 것으로 사료된다.

자일로스를 탄소원으로 이용할 수 있는 효모 균주 중 *Pichia stipitis* (*Shefferosomyces stipitis*)는 NADH보다 NADPH를 보조인자로 사용하였을 때 XR 효소활성이 상대적으로 높게 나타났으며[26], *C. tropicalis* [27], *C. parapsilosis* [28]도 유사한 경향을 나타냈다.

M. farinosa MBY/L1597 균주와 대조구 균주를 YEPX 배지에서 30°C 및 46°C에서 배양하여 자일로즈 소모 및 자일리톨 생산 특성을 조사하였다(Fig. 4). 대조구 균주인 KCTC27412 균주는 30°C에서 50시간 동안 초기에 주입한 자일로즈를 거의 이용하지 못했으나 *M. farinosa* MBY/L1597 균주는 약 15 g/l의 자일로즈를 소모하였다. 대조구 균주인 KCTC27412 균주의 최대 균체성장은 *M. farinosa* MBY/L1597의 약 17% 수준이었다. 배양온도 30°C에서 성장한 대조구 균주는 자일리톨을 생산하지 못한 반면, *M. farinosa* MBY/L1597 균주는 9.12 ± 0.12 g/l의 자일리톨을 생산하여 대조구 균주보다 유의적으로 높은 자일리톨 생산량을 나타냈다. 그러나 두 균주 모두 자일로즈를 이용하여 에탄올은 생산하지 않았다(Date not shown). 또한 대조구인 KCTC27412 균주는 46°C에서 성장하지 못하였으나, *M. farinosa* MBY/L1597 균주는 46°C에서 108시간 동안 배양 초기에 주입한 자일로즈를 모두 소모하여 9.87 ± 1.00 g/l의

자일리톨을 생산하여 소모한 자일로즈 대비 약 50%의 수율을 나타냈다.

하 등[29]은 40°C에서 성장이 우수한 *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 균주와 XR 효소활성이 증대된 돌연변이 균주의 효소활성을 비교하였다. 모균주는 NADH를 보조인자로 사용하였을 때 0.71 ± 0.01 U/mg의 XR 효소활성을 나타내어 NADPH를 보조인자로 사용한 효소활성(0.37 ± 0.01 U/mg)에 비해 약 1.9배 우수한 효소활성을 나타냈다. 돌연변이 균주의 경우 모균주에 비해 보조인자에 의한 효소활성의 차이가 감소하였으며 자일리톨 생산량이 증가하였다[12].

본 연구에서 사용한 *M. farinosa* MBY/L1597 균주의 XR 효소활성을 46°C에서 측정하였을 때, NADH보다 NADPH를 보조인자로 사용하였을 때 약 3.32배 높게 나타났으며 이는 NADPH를 보조효소로 사용하는 경우 상대적으로 활성 저해가 크지 않아 균체성장 및 자일리톨 생산에 영향을 미친 것으로 판단된다.

본 연구를 통하여 누룩에서 분리한 *M. farinosa* MBY/L1597 균주는 대조구 균주보다 고온에서 우수한 균체성장과 자일리톨 생산성을 나타내어 바이오매스를 기질로 사용하는 생물공정에 적용이 유망한 균주로 사료되며 실험실적 진화[30]를 포함한 균주 개량을 통하여 동시당화 발효공정에 적용하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

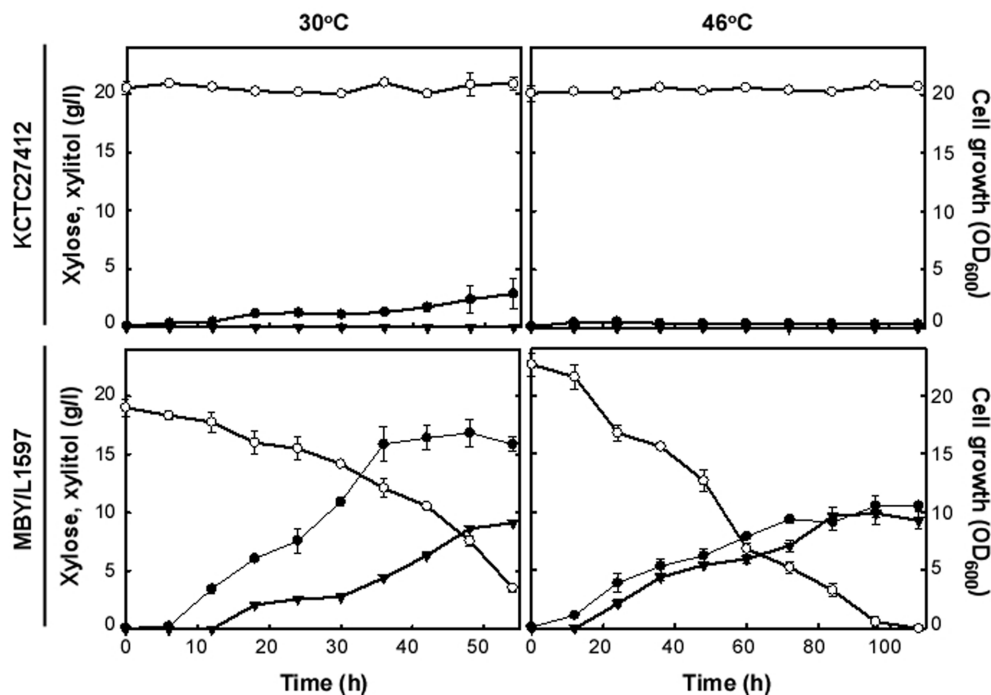


Fig. 4. Profiles of cell growth (●), xylose consumption (○), and xylitol production (▼) in shake flasks cultivation of *M. farinosa* KCTC27412 and MBE/L1597. Averages and standard errors determined from three independent measurements are shown.

요약

누룩으로부터 자일로스를 탄소원으로 이용할 수 있는 내열성이 우수한 효모 균주를 분리하고 46°C에서 비성장속도가 우수한 MBY/L1597 균주를 선발하였으며, 해당 균주는 *Millerozyma farinosa*로 동정되었다. 대조구인 *M. farinosa* KCTC27412(=CBS7064) 균주는 46°C에서 자일로스 환원효소의 활성이 나타나지 않았고 균체도 성장하지 않았다. 그러나 *M. farinosa* MBY/L1597 균주는 46°C에서 NADPH를 보조인자로 사용한 경우 4.98 ± 0.49 U/mg protein의 효소활성을 나타냈다. *M. farinosa* MBY/L1597 균주는 46°C에서 20 g/l의 자일로스를 이용하여 9.87 ± 1.00 g/l의 자일리톨을 생산하여 약 50%의 수율을 나타내었고 한국미생물자원센터에 KCTC27797 균주로 기탁하였다.

Acknowledgments

This research was supported by Traditional Culture Convergence Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Plannig (No.2017M3C1B5019250).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Kim MJ. 2002. The study about traditional Nuruk. *J. Natur. Sci.* **9**: 291-310.
- Park HS, Jeong DY, Cho SH. 2014. Study on manufacturing method of Sunchang's Nuruk and Yakju and screening of Nuruk microorganism. *J. Agric. Life Sci.* **45**: 6-11.
- Choi YH, Choi DH, Park EH, Kim MD. 2016. Isolation of potent amylolytic fungus *Rhizopus oryzae* from Nuruk. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 376-382.
- Park CD, Jung HK, Park HH, Hong JH. 2007. Identification and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from Hahyangju Nuruk. *Korean J. Food Preserv.* **14**: 188-193.
- Jo KY, Ha DM. 1995. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from Nuruk. *Agricul. Chem. Biotechnol.* **38**: 95-99.
- 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.
- Jung HK, Park CD, Park HH, Lee GD, Lee IS, Hong JH. 2006. Manufacturing and characteristics of Korean traditional liquor, Hahyangju prepared by *Saccharomyces cerevisiae* HA3 isolated from traditional Nuruk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 659-667.
- Choi DH, Park EH, Kim MD. 2014. Characterization of starch-utilizing yeast *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from Nuruk. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 407-412.
- Baek SY, Yun HJ, Choi HS, Hong SB, Yeo SH. 2010. Screening and characteristics of useful fungi for brewing from commercial Nuruk in Chungcheong provinces. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 373-378.
- Baek SY, Lee YJ, Kim JH, Yeo SH. 2015. Isolation and characterization of wild yeasts for improving liquor flavor and quality. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 56-64.
- Park JH, Chung CH. 2014. Characteristics of Takju prepared with Nuruk, and identification of lactic acid bacteria in Nuruk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**: 153-164.
- Kim JS, Park JB, Jang SW, Kwon DH, Hong EK, Shin WC, Ha SJ. 2017. Xylitol production by *Kluyveromyces marxianus* 36907-FMEL1 at high temperature was considerably increased through the optimization of agitation conditions. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**: 57-62.
- Seo JH. 1999. Production of xylitol from *Candida tropicalis*. *Ann. Rep. Res. Agric. Life Sci.* **3**: 272-274.
- Mahmud A, Hattori K, Hongwen C, Kitamoto N, Suzuki T, Nakamura K, et al. 2013. Xylitol production by NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase (*xdhA*) and L-arabitol-4-dehydrogenase (*ladA*)-disrupted mutants of *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 353-359.
- Ko JJ, Yun SL, Kang SW, Kim SK. 2008. A review on thermochemical pretreatment in lignocellulosic bioethanol production. *Korea Organic. Res. Recyc. Assoc.* **16**: 79-88.
- 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.
- Kang HW, Kim Y, Park JY, Min J, Choi GW. 2010. Development of thermostable fusant, CHY1612 for lignocellulosic simultaneous saccharification and fermentation. *KSBB* **25**: 565-571.
- Choi JM, Choi SS, Yeom SH. 2012. Bioethanol production from wasted corn stalk from Gangwon province: from enzymatic hydrolysis to fermentation. *Appl. Chem. Eng.* **23**: 326-332.
- Kwon HJ, Kim MD. 2016. Isolation of stress-tolerant *Pichia farinosa* from Nuruk. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 349-354.
- Guillamon JM, Sabate 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.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Bengtsson O, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund M. 2009. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels.* **5**: 1-10.
- Wu G, Nie L, Freeland SJ. 2007. The effects of differential gene expression on coding sequence features: analysis by one-way ANOVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**: 1108-1113.

24. Ryu BH, Nam KD, Kim HS, Kim DS, Ji YA, Jung SJ. 1988. Screening of thermotolerant yeast strain for ethanol fermentation. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 265-269.
25. Choudhary J, Singh S, Nain L. 2016. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electron. J. Biotechnol.* **21**: 82-92.
26. Verduyn C, Van KR, Van DJ, Scheffers W. 1985. Properties of the NAD(P)H- dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem. J.* **226**: 669-677.
27. Yokoyama S, Suzuki T, Kawai K, Horitsu H, Takamizawa K. 1995. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 217-223.
28. Lee JK, Koo BS, Kim SY. 2003. Cloning and characterization of the *xyl1* gene, encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6179-6188.
29. Kim JS, Park JB, Jang SW, Ha SJ. 2015. Enhanced xylitol production by mutant *Kluyveromyces marxianus* 36907-FMEL1 due to improved xylose reductase activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **176**: 1975-1984.
30. Yoo BH, Park EH, Kim MD. 2016. Enhanced resistance to lactic acid by laboratory adaptive evolution of *Saccharomycopsis fibuligera*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 488-492.