



Research Article

# Physicochemical and functional characteristics of non-*Saccharomyces cerevisiae* isolated from traditional *nuruk*

## 전통누룩에서 분리한 non-*Saccharomyces cerevisiae*의 이화학적 및 기능적 특성

A Ra Kim<sup>1,2</sup>, Sun Hee Kim<sup>1</sup>, Woo Soo Jeong<sup>1</sup>, So Young Kim<sup>1</sup>, Myung-Kon Kim<sup>2</sup>, Soo-Hwan Yeo<sup>1\*</sup>  
 김아라<sup>1,2</sup> · 김순희<sup>1</sup> · 정우수<sup>1</sup> · 김소영<sup>1</sup> · 김명곤<sup>2</sup> · 여수환<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Fermented and Processed Food Science Division, Department of Agrofood Resource, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

<sup>1</sup>국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과, <sup>2</sup>전북대학교 식품공학과

**Abstract** This study was conducted to evaluate the alcohol-producing abilities and functional characteristics of five strains of non-*Saccharomyces cerevisiae* (NSC), namely, *Kluyveromyces marxianus* KJ-L, *Wickerhamomyces anomalus* KJ-1, *W. anomalus* CP-2, *Pichia anomalus* HAN-1, and *Meyerozyma guilliermondii* SU-L, which were isolated from Korean traditional *nuruk*. The selected yeast strains produced large amounts of alcohol using a carbon source of 20% glucose and were identified as NSC based on their 18S rDNA sequences. The optimal growth temperature and pH of the NSC except for *M. guilliermondii* SU-L were 25°C and 4.0, respectively. Two NSC strains, KJ-L and CP-2, produced 5–10% more alcohol compared to that produced by *S. cerevisiae* LP (SC LP) control. Although the  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -glucosidase activities were slightly lower in the NSC strains than in the SC LP, glucoamylase activity was 1.4-fold higher in the NSC strains than in the SC LP. The  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity evaluated using 1% acarbose was 29-fold higher for *K. marxianus* KJ-L and *P. anomalus* HAN-1 than that of SC LP. The five strains of NSC exhibited higher angiotensin-converting enzyme inhibitory activity with inhibition rates of 51.7–61.7% compared to that of SC LP (37.3%). The tyrosinase inhibition activities of NSC (86.4–91.5%) and SC LP (94.9%) were significantly higher than that of the positive control, kojic acid. These NSC yeast show high potential for industrial application as domestic starters for manufacturing fermented foods and cosmetics based on their physiological activities and functional characteristics.

**Keywords** alcohol producing ability, non-*Saccharomyces cerevisiae*,  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity, ACE inhibition activity, tyrosinase inhibition activity

OPEN ACCESS

**Citation:** Kim AR, Kim SH, Jeong WS, Kim SY, Kim MK, Yeo SH. Physicochemical and functional characteristics of non-*Saccharomyces cerevisiae* isolated from traditional *nuruk*. Korean J Food Preserv, 29(3), 482-493 (2022)

**Received:** April 27, 2022

**Revised:** May 25, 2022

**Accepted:** May 27, 2022

**\*Corresponding author**

Soo-Hwan Yeo  
 Tel: +82-63-238-3609  
 E-mail: yeobio@korea.kr

Copyright © 2022 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서론

우리나라 고유의 술인 탁약주를 빚는 데 사용하는 전통누룩은 자연계에서 유래한 곰팡이, 효모, 젖산균 등 다양한 종류의 발효 미생물이 분포하고 있다(Jung과 Chung, 2017). 이러한

미생물은 전분분해 활성, 알코올 생산, 유기산과 유리아미노산 및 향기성분 등의 차이를 나타낸다(Kim 등, 2009; Lee 등, 2015; Nam 등, 2015). 지역별로 다양한 특성이 있는 전통누룩은 탁·약주 등을 빚는 발효제로써 사용되고 있으며, 쌀, 보리와 같은 잡곡류 등을 파쇄하여 무증자 상태로 성형한 후, 자연 발효를 통해 만들어진다. 누룩 속의 미생물 분포와 성분 변화는 제조한 지역, 원료, 제조 방법 등 지리적·환경적 조건에 의하여 결정되며(Kim 등, 2014b), 원료 또한 다양하여 옥수수, 보리, 대두, 귀리, 조 및 쌀 등의 잡곡류로 만들어 탁·약주 제조에 사용되었다(Baek 등, 2010). 누룩에 분포하는 미생물 중에서 알코올과 향미 생성에 관여하는 효모는 대부분 GRAS(generally recognized as safe) 균주로서, *Saccharomyces cerevisiae*를 비롯하여 non-*Saccharomyces* 계열인 병원균 *Candida albicans*의 길항작용으로 의약산업에 응용할 수 있는 *Pichia jadinii* (Buerth 등, 2016; Song 등, 2013), 고알코올 농도에 내성이 있는 *P. anomala*(Tao 등, 2011), 고온에서 glucoamylase 효소활성 및 비성장속도가 우수한 *Saccharomycopsis fibuligera*(Choi 등, 2014) 등이 분리된 바 있지만, *Saccharomyces cerevisiae* 이외 산업적으로 상용화되지는 못하였다. 특히, 국내 대부분 양조장에서 탁·약주 제조용 효모는 와인 및 제빵용 효모(La Parisinne, LP 등)를 수입하여 사용하는 실정이다.

주류에 있어서 알코올 생산과 풍미에 관여하는 효모는 진핵생물로서 오래전부터 주류 및 제빵 등의 식품산업뿐만 아니라, 사료용 첨가물, 균체 생산 및 유지와 색소생산 등 biotechnology(BT) 산업의 핵심 소재로써 이용된다(Kim 등, 1999; Lee 등, 1997; Lee 등, 1999). 학문적인 분야에서 특정 대사산물의 생성, 분비와 발현 기작 해석 등의 분자생물학적 도구로서 폭넓게 이용되고 있다(Kim 등, 2004). 최근에는 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해물질(Kim 등, 2004), 항치매성  $\beta$ -secretase 저해물질(Lee 등, 2007)과 acetylcholinesterase 저해물질(Lee 등, 2008), 혈관신생 억제물질(Jeong 등, 2006), 미백성 tyrosinase 저해물질(Jang 등, 2012b), 혈전용해 활성물질(Jang 등, 2011) 및 정미성 핵산 물질(Lee 등, 2004) 등 건강 기능성 관련 연구가 활발히 이루어지고 있다.

따라서, 향미 증진 등 발효 특성이 우수한 효모 종균을 발굴하여 우리 술의 품질 향상과 종균 산업 발전에 이바지하고자 본 연구에서는 알코올 생산성이 뛰어난 효모를 선별하여 이들의 기능적 특성 등을 규명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 누룩에서 효모 분리 및 보존

발효 특성이 우수한 토착 효모를 분리·선별하기 위하여 국내 4개 지역(부산, 서울, 전북, 경기)에서 제조한 전통누룩을 수집하였다. 누룩에 자생하는 효모를 순수분리하기 위하여 YPD(BD DIFCO, Mississauga, Ontario, Canada) 배지에 sodium propionate를 0.45% 첨가하여 곰팡이의 생육을 억제시켰다. 생리식염수에 현탁한 누룩 1 g을 YPD 고체배지에 100  $\mu$ L 도말하고 25°C에서 24-48시간 배양하여 단일 colony를 분리하였다. 분리된 효모는 YPD 액체 배지에 배양하여 이후 실험을 위하여 배양액에 40% 글리세롤을 첨가해 -80°C 냉동고에 보관하였다. 비교 균주로는 국내 종균 수입업체 삼광산업(주)(Seoul, Korea)에서 구입한 *Saccharomyces cerevisiae*(La Parisinne, Saint-Denis, France)를 사용하였다.

### 2.2. 분리 균주의 동정

수집 전통누룩으로부터 분리한 효모 동정은 18S rDNA 유전자 염기서열로 분석하였다. 프라이머는 NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')과 NS8(5'-TCCGCAGGTTCACCTACG GA-3')를 사용하였고, PCR은 initial denaturation 5분, 그리고 94°C에서 45초간 denaturation, 55°C에서 60초간 annealing 및 72°C에서 60초간 extension cycle을 35회 수행하였다. PCR 산물의 염기서열은 (주)제노텍(GenoTech Corp., Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였고(Kim 등, 2008), phylogenetic tree는 The National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 제공하는 Advanced Blast Search 프로그램을 통하여 GenBank에 보고된 표준 균주와의 염기서열을 비교하여 계통분류학적 유연관계를 분석한 후, MEGA V6.0을 이용하여 Tamura-Nei distance model과 neighborjoining method에 따

라 계통도를 작성하였다(Tamura 등, 2013).

### 2.3. 생육 특성 조사

분리 효모의 온도 및 pH별 생육 특성을 규명하기 위해 YPD 고체배지에서 생균수를 측정하였다. 생균수 측정은 십진 희석법을 이용하여 YPD 고체배지에 100  $\mu$ L를 도말하고 30°C에서 48시간 배양한 후, 생성된 집락 수를 계수해 형성 단위(colony forming units, CFU/mL)로 나타내었다.

### 2.4. 알코올 생성능 분석

효모의 알코올 생성량을 조사하기 위해 분리된 효모를 20% glucose(Chung 등, 1990a; Rhee 등, 1997)가 포함된 YPD 액체배지에 각각 접종하여 25°C에서 5일간 배양한 후, 원심분리(10,000  $\times g$ , 5 min)한 상등액 100 mL를 시험관에 넣고 소포제(규소수지) 2-3방울을 떨어뜨려 증류기(VAP200, Gerhardt, Konigs-winter, Germany)로 증류하였다. 회수한 증류액 80 mL에 증류수를 가하여 100 mL로 정용한 후, 밀도측정기(AT/DMA5000M, Anton Paar, TR, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 2.5. $\alpha$ -Amylase 분석

$\alpha$ -Amylase 활성은 효모 배양액을 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 상등액을 사용하였다. 각각의 배양 상등액 20  $\mu$ L에 멸균수 180  $\mu$ L를 가한 후, 30 mM PBS (pH 6)에 녹인 starch (1 g/L) 200  $\mu$ L를 섞어 30°C에서 20분 배양하였다. 각각의 배양 검체에 DNS reagent 400  $\mu$ L를 넣어 5분간 끓인 후, 실온에서 냉각하여 흡광도(BioTek®, Gen5™, Winooski, VT, USA) 550 nm에서  $\alpha$ -amylase 활성을 측정하였다. 1 unit(U)의 효소활성은 1분 동안 1  $\mu$ M의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 한편, 정성적인 방법은 Park 등(2018)의 방법을 따랐다. LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride)에 1% soluble starch를 넣고 24시간 배양 후, 요오드 용액(0.5 g I<sub>2</sub>와 1 g KI)을 떨어뜨려 노란 환의 생성 여부로 활성을 확인하였다.

### 2.6. $\alpha$ -Glucoamylase 분석

Glucoamylase 활성은 시험관에 2% 가용성 전분 용액

1 mL와 0.2 mL acetic acid를 분주하여 40°C에서 5분간 예열한 후, 효모 배양액 100  $\mu$ L를 넣고 40°C에서 20분간 반응하였다. 1 N NaOH 용액 100  $\mu$ L를 첨가해 반응을 정지시켰다. 30분간 실온에 방치한 후, 1 N HCl 용액 0.1 mL를 첨가하여 중화시켰다. 중화된 반응액 1 mL를 glucose assay kit(Sigma-Aldrich Co. Ltd., St. Louis, Mo, USA)를 이용하여 glucose를 정량하였다. 이 반응액을 흡광도(BioTek®, Gen5™, Winooski, VT, USA) 570 nm에서 측정하여 glucoamylase 활성을 산출하였다.

### 2.7. Acidic protease 분석

Acidic protease 활성은 시험관에 0.5% casein 용액 150  $\mu$ L에 Mcllvaine 완충액 100  $\mu$ L를 넣어 40°C 항온 수조에서 5분간 예열시켰다. 배양액 50  $\mu$ L를 첨가하여 40°C에서 60분간 반응시킨 후, trichloroacetic acid (TCA) 용액 300  $\mu$ L를 가해 반응을 정지시켰다. 반응액을 여과하여 침전물을 제거한 뒤, 여과액 100  $\mu$ L에 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 500  $\mu$ L와 페놀시약 100  $\mu$ L를 넣고 40°C에서 30분간 발색시켰다. 반응 종료액을 흡광도(BioTek®, Gen5™, Winooski, VT, USA) 660 nm에서 측정한 후, acidic protease 활성을 다음 계산식으로 산출하였다.

$$\text{Unit/mL} = \text{Tyrosine } (\mu\text{g}) \times 6 (0.6 \text{ mL} \div 0.1 \text{ mL}) \div 0.05 \text{ mL}$$

0.6 mL: Casein 용액 + Mallvaine 용액 + 배양액 + TCA 용액

0.1 mL: 여과액

0.05 mL: 배양액

### 2.8. $\beta$ -Glucosidase 분석

$\beta$ -Glucosidase 활성은 Seo 등(2015)의 방법을 변형하여 사용하였다. 10 mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (Sigma-Aldrich Co. Ltd.)를 100  $\mu$ L 넣고, 100 mM citrate phosphate buffer(pH 4.0)를 890  $\mu$ L 넣은 후, 배양 상등액을 10  $\mu$ L 넣고 45°C에서 반응시킨 후, 0.5 M sodium carbonate(Sigma-Aldrich)로 반응을 정지시키고, 원심분리한 상등액을 흡광도(BioTek®, Gen5™, Winooski, VT, USA) 405 nm에서 측정하였다. 분당 생성되는 1  $\mu$ M

은 *p*-nitrophenol을 1 unit으로 정의하였다. 한편, 정성적인 방법으로 esculin(Sigma-Aldrich Co. Ltd.)을 YPD agar 배지에 0.5%가 되도록 조정하여 멸균한 다음, 1% ferric ammonium citrate(Sigma-Aldrich Co. Ltd.)가 2% 되도록 첨가하여 배지를 제조하였다. 이 배지에 효모를 접종하고 25°C에서 24시간 배양한 후, 주변에 검은 환의 생성 여부로 활성을 평가하였다.

### 2.9. 항당뇨 활성 분석

$\alpha$ -Glucosidase 저해능은 탄수화물 식이 후, 혈당 상승을 억제할 수 있어 항당뇨 활성( $\alpha$ -glucosidase inhibition) 측정법으로 분석하였다. 항당뇨 활성은  $\alpha$ -glucosidase activity assay kit (Cat No. MAK123, Sigma-Aldrich Co. Ltd.)에서 negative 활성을 100으로 시료의 활성을 환산하여 저해율을 구하였다. 이러한 활성은 enzyme (0.5 unit/mL  $\alpha$ -glucosidase) 50  $\mu$ L와 효모 배양액 50  $\mu$ L를 넣고 초기 값(A<sub>405</sub>) initial을 측정하였다. 37°C에서 5분 반응시킨 뒤, 2 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside 50  $\mu$ L를 넣고, 37°C에서 30분간 반응시킨 후 최종 흡광도(A<sub>405</sub> nm) final을 측정하였다. 이때 positive control은 배양 상층액 대신 1% acarbose 50  $\mu$ L를 넣어 측정하였다. 항당뇨 저해율(%)은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

Inhibitory activity (%)

$$= [(1 - (A_{405}^{\text{final}} - A_{405}^{\text{initial}}) / A_{405}^{\text{calibrator}} - A_{405}^{\text{water}})) \times 100]$$

A<sub>405</sub> calibrator: 20분 반응 후 calibrator 흡광도 값

A<sub>405</sub> water: 20분 반응 후 water 흡광도 값

### 2.10. ACE 저해 활성 분석

Angiotensin converting enzyme (ACE) 저해 활성은 ACE inhibition screening kit(Cat No. KT-534, Kamiya Biomedical Co., Seattle, WA, USA)를 사용하여 제조회사의 분석 방법대로 분석하였다. 96 well plate의 blank 1, 2에는 증류수 20  $\mu$ L와 40  $\mu$ L씩 분주한 후, 모든 well에 20  $\mu$ L의 substrate buffer를 처리하였고, blank 2를 제외한 well에는 효소액을 20  $\mu$ L씩 분주하였다. 37°C 배양기에서 60분간 반응시킨 후, 모든 well에 지

시액 200  $\mu$ L를 처리하여 상온에서 10분간 반응시켜 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. 양성 대조군은 ACE 저해제로 널리 사용되는 captopril을 사용하였다. ACE 저해 활성은 아래의 식으로 계산하여 백분율(%)로 나타내었다.

ACE 저해 활성(%)

$$= [(A_{\text{blank 1}} - A_{\text{sample}}) / (A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 2}})] \times 100$$

Blank 1: positive control (without ACE inhibition)

Blank 2: reagent blank

### 2.11. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성은 tyrosinase inhibitor screening assay kit(Cat No. ab204715, Abcam, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 96 well plate에 시료와 대조군을 각각 20  $\mu$ L씩 분주하고 각 well에 tyrosinase enzyme 용액 50  $\mu$ L를 첨가하여 25°C에서 10분 반응시킨 후, tyrosinase 기질을 30  $\mu$ L를 넣고 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 30-60분간 측정할 타임 포인트 2개를 선택하여 흡광도의 차( $\Delta A = A_2 - A_1$ )에 의하여 다음과 같이 측정했다.

Relative inhibition(%)

$$= [(Slope \text{ of EC} - Slope \text{ S}) / (Slope \text{ of EC})] \times 100$$

Slope S: 샘플의 흡광도 차

Slope of EC: 효소 대조군(tyrosinase assay buffer)의 흡광도 차

### 2.12. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 실험군당(n=3) 평균(mean)과 표준편차(SD)로 나타내었고, Statistic Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 평균± 표준편차로 표시하였다. 통계처리는 분산분석(ANOVA)으로 실시하였으며, 유의성 비교는 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

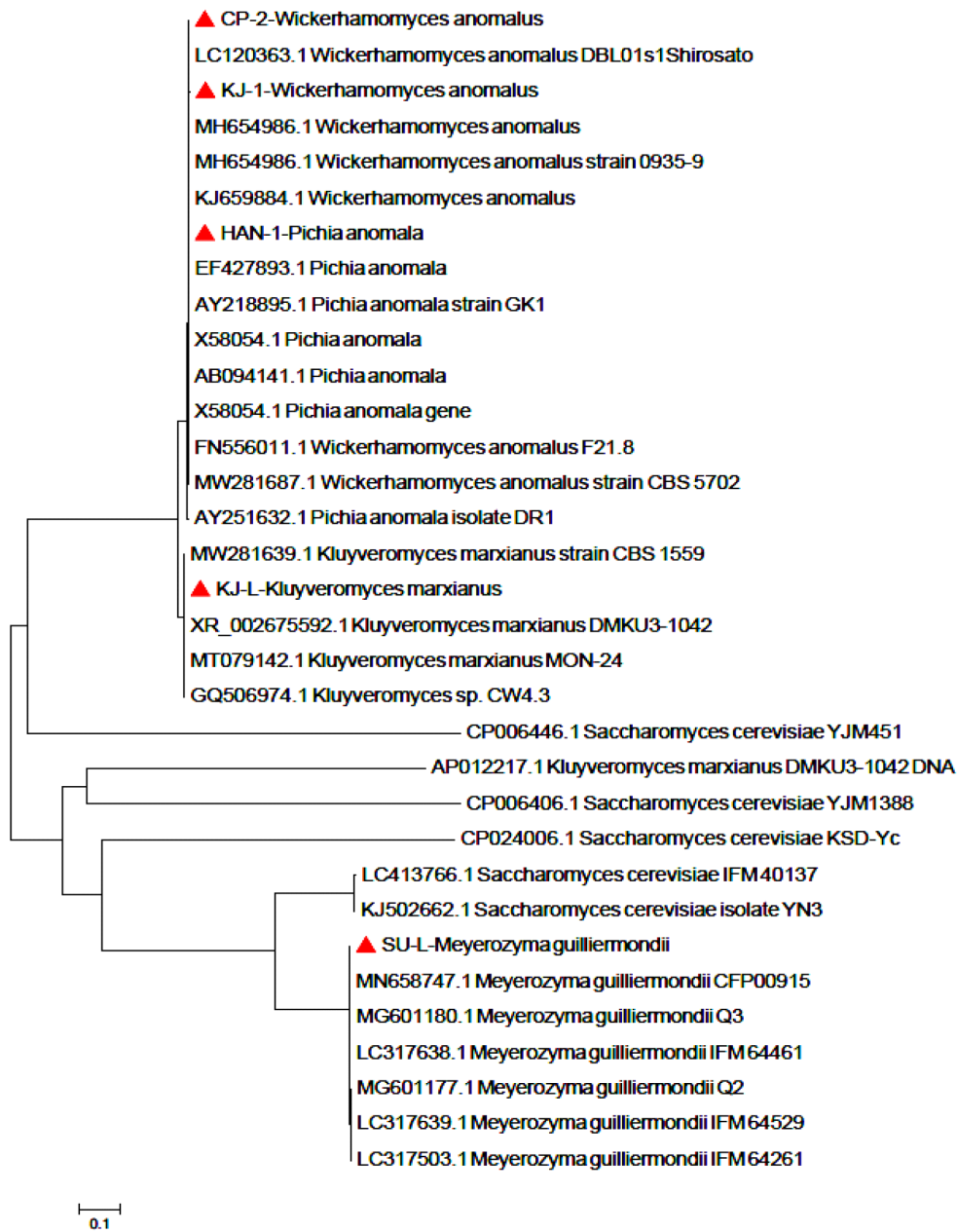
### 3.1. 전통누룩에서 분리한 효모의 동정

국내 4개 지역(부산, 서울, 전북, 경기)에서 수집한 전통



누룩으로부터 순수분리한 5주(KJ-L, KJ-1, CP-2, HAN-1, SU-L)의 효모를 18S rDNA 염기서열 분석을 통해 분자생물학적으로 동정하였다. *Saccharomyces cerevisiae*(SC)와 non-*Saccharomyces cerevisiae*(NSC) 효모의 18S

rDNA 염기서열을 바탕으로 계통도를 Fig. 1에 나타냈다. 선발된 NSC를 NCBI blast로 염기서열을 분석한 결과, SC 바깥쪽에 *Kluyveromyces marxianus*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia anomala*, *Meyerozyma guilliermondii*



**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequences showing the positions of five isolated strains and the representatives of other related taxa. The tree was constructed from an alignment of 18S rDNA from various species using the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates. The bar denotes the relative branch length. The 18S rDNA sequences are identified by their GenBank accession numbers in parentheses. Symbol: ▲, 5 selected non-*Saccharomyces cerevisiae*.

로 각각 동정되었다. NSC로 동정된 5주의 효모는 NCBI에 등록된 type strain과 99% 이상 높은 상동성을 나타내었다.

### 3.2. Non-Saccharomyces 효모의 생육 특성

지역별로 수집한 4종류의 전통누룩에서 분리한 5주 효모의 온도 및 환경적응성(pH 2-pH 9)을 조사한 결과, NSC 4주(*K. marxianus* KJ-L, *W. anomalous* KJ-1, *W. anomalous* CP-2, *P. anomalous* HAN-1)의 최적 생육 온도는 25°C였다(Table 1). 생육 25°C 대비 35°C에서 18-40%의 생육을 보였고, 저온(5°C와 10°C)에서는 1% 미만에서 7% 이하의 생육을 보였다. 특히, 고온(45°C, 55°C) 조건에서는 이들 효모는 생육하지 않았다. 대조구로 사용한 SC 최적 생육은 25°C 대비 35°C에서 35% 생육과 그 외 온도에서 1% 미만의 생육 특성을 나타낸 것과 비슷하였다(data not shown). 또한, *M. guilliermondii* SU-L 효모는 35°C가 최적 생육이었으며, 25°C에서는 78%의 생육을 보였다(Table 1). 한편, 분리 효모의 pH에 따른 환경적응성을 조사한 결과, pH 4에서 생육이 가장 양호하였고, 중성인 pH 7보다는 10-60%까지 생육능이 우수하였고, 산성과 알칼리

성 조건에서(pH 2, pH 9) 25% 미만으로 NSC 생육능은 저조하였다(Table 2).

### 3.3. Non-Saccharomyces 효모의 알코올 생성능

선발한 5주의 NSC를 22 °Brix로 보당한 YPD 액체배지에 각각 접종한 후, 25°C에서 5일간 배양하여 알코올 생성량을 조사한 결과, *W. anomalous* CP-2가 11.73%로 가장 높게 나타났고, *K. marxianus* KJ-L(11.14%), *S. cerevisiae* LP(10.54%), *P. anomalous* HAN-1(10.14%), *W. anomalous* KJ-1(9.91%), *M. guilliermondii* SU-L(9.55%) 순으로 알코올을 생산하였다(Table 3). 또한, 이들 효모의 발효에 따른 가용성 당도 변화를 살펴본 결과, 발효가 진행됨에 따라 NSC와 SC는 잔존 당이 영양원이나 발효 기질로 이용되면서 당도는 감소하고 알코올 함량은 증가하였다(Table 3). SC 효모의 고형분 함량은 7.2 °Brix로, NSC 속 효모(7.3-8.3 °Brix)보다 낮게 나타났다. SC의 고형분 함량은 NSC 속 효모보다 낮은 함량을 나타내었는데, 이는 SC가 NSC 속(genus)보다 당을 이용하여 알코올 발효가 더 진행(Baek 등, 2015)된 것과는 상이하게 나타났다. Baek 등

**Table 1.** Temperature-dependent growth characteristics of five yeast strains isolated from traditional *nuruk* (unit: CFU/mL)

Strains		Temp. (°C)						
		5	10	15	25	35	45	55
<i>K. marxianus</i>	KJ-L	2.8×10 <sup>6</sup>	3.6×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>9</sup>	5.0×10 <sup>8</sup>	ND <sup>1)</sup>	ND
<i>W. anomalous</i>	KJ-1	2.6×10 <sup>6</sup>	5.3×10 <sup>6</sup>	3.0×10 <sup>7</sup>	6.1×10 <sup>9</sup>	1.2×10 <sup>9</sup>	ND	ND
<i>W. anomalous</i>	CP-2	9.1×10 <sup>6</sup>	4.5×10 <sup>6</sup>	3.2×10 <sup>7</sup>	1.2×10 <sup>9</sup>	2.2×10 <sup>8</sup>	ND	ND
<i>P. anomalous</i>	HAN-1	3.0×10 <sup>6</sup>	6.1×10 <sup>6</sup>	3.1×10 <sup>7</sup>	7.6×10 <sup>8</sup>	2.9×10 <sup>8</sup>	ND	ND
<i>M. guilliermondii</i>	SU-L	3.3×10 <sup>6</sup>	8.0×10 <sup>6</sup>	3.7×10 <sup>7</sup>	5.4×10 <sup>8</sup>	6.9×10 <sup>8</sup>	ND	ND

<sup>1)</sup>ND, not detected.

**Table 2.** pH-dependent growth characteristics of five yeast strains isolated from traditional *nuruk* (unit: CFU/mL)

Strains		pH			
		2	4	7	9
<i>K. marxianus</i>	KJ-L	9.0×10 <sup>7</sup>	3.6×10 <sup>8</sup>	4.0×10 <sup>7</sup>	1.5×10 <sup>7</sup>
<i>W. anomalous</i>	KJ-1	2.4×10 <sup>6</sup>	1.3×10 <sup>8</sup>	3.0×10 <sup>7</sup>	1.3×10 <sup>7</sup>
<i>W. anomalous</i>	CP-2	2.1×10 <sup>6</sup>	6.7×10 <sup>8</sup>	2.0×10 <sup>8</sup>	9.0×10 <sup>7</sup>
<i>P. anomalous</i>	HAN-1	1.9×10 <sup>7</sup>	2.3×10 <sup>8</sup>	6.5×10 <sup>7</sup>	4.0×10 <sup>7</sup>
<i>M. guilliermondii</i>	SU-L	2.0×10 <sup>7</sup>	1.8×10 <sup>8</sup>	1.0×10 <sup>8</sup>	1.1×10 <sup>7</sup>

**Table 3.** The soluble solid and alcohol production in five yeast strains

Strain	Soluble solid (°Brix)	Alcohol (%)
Non- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>K. marxianus</i> KJ-L	8.3±0.01 <sup>a1)</sup>	11.14±0.60 <sup>b2)</sup>
<i>W. anomalus</i> KJ-1	7.3±0.05 <sup>cd</sup>	9.91±0.70 <sup>e</sup>
<i>W. anomalus</i> CP-2	7.5±0.05 <sup>b</sup>	11.73±0.02 <sup>a</sup>
<i>P. anomalus</i> HAN-1	7.4±0.11 <sup>bc</sup>	10.14±0.02 <sup>d</sup>
<i>M. guilliermondii</i> SU-L	7.4±0.05 <sup>bc</sup>	9.55±0.02 <sup>f</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>S. cerevisiae</i> LP	7.2±0.11 <sup>d</sup>	10.54±0.3 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Mean values±SD (n=3).

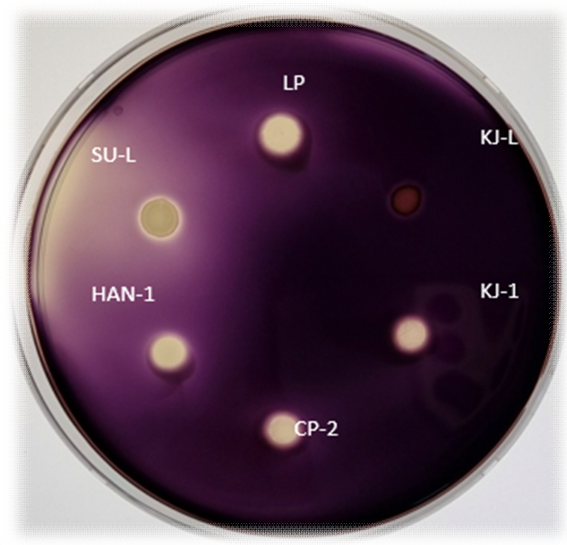
<sup>2)</sup>Values with different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

(2015)의 보고에서 25°C, 48시간 배양 시, SC의 알코올 생성능은 7.3-9.5%를 보였고, NSC는 2.2-4.7%로 나타낸 것과는 다소 차이를 나타내었다. 그러나 Choi 등(2019)에서는 *W. anomalus* SC-1이 기존 시판 효모와 비교하여 효과적인 알코올 발효능을 나타낸 것과는 유사하였다. 배양온도와 시간의 차이는 있지만, 대체적으로 SC의 알코올 생성능이 NSC에 비교하여 높다고 알려졌지만, 본 연구에서는 NSC 중에서도 *K. marxianus* KJ-L과 *W. anomalus* CP-2가 기존 시판 효모보다 알코올을 5.8-11.3% 더 많이 생산했다. 기존 수입산 양조용 효모 대비 알코올 생성능이 뛰어난 NSC 계열의 효모를 탁·약주 제조에 적극 활용을 권장한다.

**3.4. 선발한 효모의 효소활성**

일반적으로 NSC는 다양한 효소를 세포 밖으로 분비함으로써 주류의 향기 성분 증가에 큰 영향을 준다고 알려져 있다(Baek 등, 2015). NSC의 알코올 생산에 대한 산업적 활용성을 살펴보고자 세포 밖으로 분비한 다양한 종류의 효소 활성을 조사하였다.

전분은 식물의 광합성 작용으로 생성 및 저장되었다가 amylase에 의해 분해되어 동물의 에너지원으로 사용된다. 분리한 5주 NSC의 요오드 염색법에 따른 전분 분해능을 살펴봤을 때, *K. marxianus* KJ-L을 제외한 효모는 30°C에서 비슷한 크기의 전분 분해능을 나타냈었다(Fig. 2). 정



**Fig. 2.** α-Amylase activity of isolated yeast strains. α-Amylase cells were incubated on plate at 25°C and photographed after 3 days. Symbol: KJ-L, *Kluyveromyces marxianus*; KJ-1, *Wickerhamomyces anomalus*; CP-2, *Wickerhamomyces anomalus*; HAN-1, *Pichia anomalus*; SU-L, *Meyerozyma guilliermondii*; LP, *Saccharomyces cerevisiae*.

량적 NSC의 α-amylase 활성 분석에서도 *K. marxianus* KJ-L 효모의 α-amylase 활성이 가장 낮게 나타났다 (Table 4). 본 실험에 대조구로 사용한 SC가 α-amylase 활성이 가장 높았고 *W. anomalus* CP-2, *M. guilliermondii* SU-L, *P. anomalus* HAN-1은 같은 정량값으로 두 번째, *W. anomalus* KJ-1은 세 번째 순으로 효소활성을 나타냈다. 전통적으로 알코올 발효에 사용되는 효모의 전분 분해력이 낮아 전분 분해에 필요한 α-amylase와 glucoamylase 등의 효소 비용과 그 공정비는 전체 에탄올 생산비에 상당 부분을 차지하고 있다. 특히, α-amylase보다 당화능이 우수한 glucoamylase가 전분분해에 더 필수적이다(Park 등, 1999).

Glucoamylase는 단당류인 glucose 생산에 관여하며, 당화력을 평가하는 주요한 효소(Chung 등, 1990b)로서 배양 상층액을 회수하여 glucose assay kit로 glucose를 정량한 결과, 대조구로 사용한 SC LP(28.24±0.58 units/mL)보다 NSC인 *M. guilliermondii* SU-L(40.21±1.28 units/mL)이 1.4배 높게 나타났다. 그 외 4종류의 효모는 14.62±0.14-22.52±2.64 units/mL로 대조구보다 낮은 당화력을 나타내었다(Table 4).

Table 4. Various enzyme activities of five yeast strains

Strain	Extra cellular enzymatic activity (U/mL)			
	$\alpha$ -Amylase	Glucoamylase	Acidic protease	$\beta$ -Glucosidase
<i>K. marxianus</i> KJ-L	41.68±0.04 <sup>d1)</sup>	22.52±2.64 <sup>c2)</sup>	27.54±8.85 <sup>d</sup>	565.48±20.62 <sup>f</sup>
<i>W. anomalous</i> KJ-1	41.69±0.00 <sup>c</sup>	21.14±0.39 <sup>c</sup>	89.01±51.15 <sup>bc</sup>	2,386.90±20.62 <sup>c</sup>
<i>W. anomalous</i> CP-2	41.70±0.00 <sup>b</sup>	14.62±0.12 <sup>e</sup>	83.69±14.23 <sup>c</sup>	2,172.62±232.37 <sup>d</sup>
<i>P. anomalous</i> HAN-1	41.70±0.00 <sup>b</sup>	18.14±0.57 <sup>d</sup>	148.31±23.46 <sup>a</sup>	2,910.71±35.71 <sup>b</sup>
<i>M. guilliermondii</i> SU-L	41.70±0.00 <sup>b</sup>	40.21±1.28 <sup>a</sup>	136.77±16.54 <sup>ab</sup>	934.52±41.24 <sup>e</sup>
<i>S. cerevisiae</i> LP	41.72±0.00 <sup>a</sup>	28.24±0.58 <sup>b</sup>	181.77±30.77 <sup>a</sup>	3,767.86±128.76 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Mean values±SD (n=3).

<sup>2)</sup>Values with different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Ducan's multiple range test.

Acidic protease의 경우에는 *P. anomala* HAN-1이 148.31±23.46 units/mL로 높은 활성을 보였고, *M. guilliermondii* SU-L은 136.77±16.54로 나타냈지만 대조구인 SC LP(181.77±30.77 units/mL)보다 활성이 낮게 나타내었다(Table 4). 일반적으로 발효식품의 맛과 향기는 주로 미생물이 생성하는 protease에 의해 영향을 받는다고 알려져 있듯이(Lee 등, 1997), 본 실험에서 효모의 protease 활성을 나타내는 정도에 의해 차이가 있으므로 다양한 효모 종균의 자원화로 다양성을 확보할 수 있으리라 기대된다.

$\beta$ -Glucosidase 활성은 와인 제조 시, 비휘발성 향기성분을 생산하는 데 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있고(Hernández, 2003), NSC인 *Candida stellata*, *Candida hellenica*, *Kloeckera apiculata*에서  $\beta$ -glucosidase 활성이 보고되었다(Strauss, 2001). 특히, *Hansenispora vinea*와 *Candida* 종이 생산한 glucosidase가 와인의 다양한 향에 영향을 미친다고 알려져 있다(Strauss, 2001).  $\beta$ -Glucosidase 집락 주변의 검은색 환의 생성 여부로 이들 효소의 활성을 구분할 수 있다. 국내 전통누룩에서 분리·선발한 5주의 NSC에서 이들 효소의 활성을 확인하였다(Fig. 3, Table 4). Table 4에 나타낸 것처럼  $\beta$ -glucosidase 활성은 시판 효모인 SC LP가 3,767.86±128.76 units/mL로 가장 높았으며, *P. anomalous* HAN-1과 *W. anomalous* KJ-1, *W. anomalous* CP-2가 2,910±353.71과 2,386.90±20.62, 2,172.62±232.37 units/mL 순으로 활성을 나타내었다(Table 4).

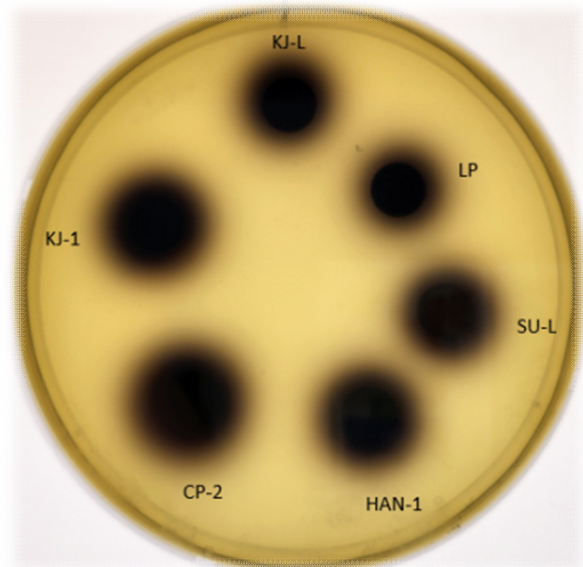


Fig. 3.  $\beta$ -Glucosidase activity of isolated yeast strains.  $\beta$ -Glucosidase cells were incubated on plate at 30°C and photographed after 1 day. Symbol: KJ-L, *Kluyveromyces marxianus*; KJ-1, *Wickerhamomyces anomalous*; CP-2, *Wickerhamomyces anomalous*; HAN-1, *Pichia anomalous*; SU-L, *Meyerozyma guilliermondii*; LP, *Saccharomyces cerevisiae*.

이러한 효소활성은 탁·약주 제조에 있어서 *Saccharomyces*와 non-*Saccharomyces cerevisiae*를 혼합으로 사용할 경우, 주질의 향미를 증진할 가능성을 시사해 준다.

### 3.5. $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성

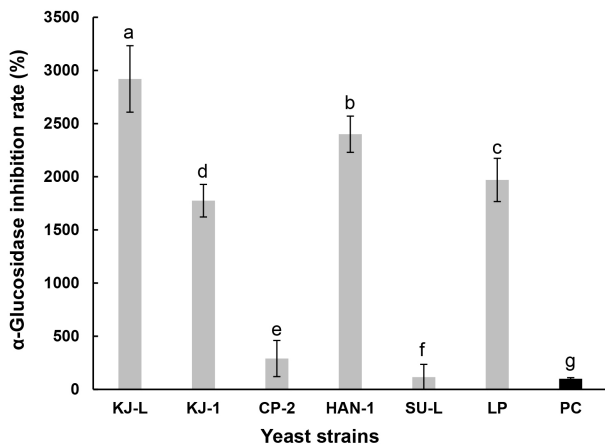
$\alpha$ -Glucosidase는  $\alpha$ -amylase에 의해 분해된 이당류를 최종적으로 단당류로 분해하여 소장의 용모로 흡수되어 혈



관으로 이동되고, 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수과정을 지연시킴으로 식후 혈당이 급격히 상승하는 것을 억제할 수 있다(Shinde 등, 2008). Baron(1998)은,  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 당뇨와 같은 당질 관련 질병을 위한 치료제 개발에 유용하다고 보고하였다. 전통누룩에서 분리한 NSC의  $\alpha$ -glucosidase 저해능을 조사하였고, 그 결과를 Fig. 4에 나타낸 것처럼 *K. marxianus* KJ-L과 *P. anomalus* HAN-1 효모가 유의적으로 저해 활성능이 높았다. 경구투여용  $\alpha$ -glucosidase 억제제로 잘 알려진 1% acarbose와의 비교에서도 *K. marxianus* KJ-L 효모는 약 27배의 높은 활성을 나타냈었다. 이는 Kim(2014)이 보고한 *P. burtonii* Y257-7의 90.9%보다도 29배 높은 활성을 가지고 있었다.

### 3.6. ACE 저해 활성

선발한 5주 효모의 배양액으로부터 얻은 상등액을 취하여 ACE 저해 활성 결과를 Table 5에 나타내었다. ACE는 불활성인 angiotensin I을 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환하는 촉매 효소로, 혈압을 상승시키는 동시에 혈압 강하 작용을 하는 bradykinin을 분해하는 작용으로 생체 내에서 고혈압을 일으키는 중요한 효소로 알려져 있다(Hong 등, 2004). ACE 저해능을 조사하기 위해 양성 대조



**Fig. 4.**  $\alpha$ -Glucosidase inhibition rate of isolated yeast strains. Data values were expressed as mean $\pm$ SD (n=3). The different letters represent significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05). Symbol: KJ-L, *Kluyveromyces marxianus*; KJ-1, *Wickerhamomyces anomalous*; CP-2, *Wickerhamomyces anomalous*; HAN-1, *Pichia anomalous*; SU-L, *Meyerozyma guilliermondii*; LP, *Saccharomyces cerevisiae*; PC, 1% acarbose.

**Table 5.** Antihypertensive activity of five yeast strains isolated from traditional *nuruk*

Species	Strain	ACE inhibitory activity (%)
<i>K. marxianus</i>	KJ-L	56.20 $\pm$ 2.57 <sup>c1)</sup>
<i>W. anomalous</i>	KJ-1	61.65 $\pm$ 1.63 <sup>b2)</sup>
<i>W. anomalous</i>	CP-2	54.30 $\pm$ 1.61 <sup>cd</sup>
<i>P. anomalous</i>	HAN-1	56.49 $\pm$ 0.90 <sup>c</sup>
<i>M. guilliermondii</i>	SU-L	51.72 $\pm$ 2.04 <sup>d</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LP	37.31 $\pm$ 1.83 <sup>e</sup>
Positive control	Captopril (1%)	75.81 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Mean values $\pm$ SD (n=3).

<sup>2)</sup>Values with different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

군으로 1% captopril(표준물질)로 사용한 결과, 75.81 $\pm$ 0.11%로 나타났으며, NSC의 ACE 저해 활성은 *K. marxianus* KJ-1, *P. anomalous* HAN-1, *K. marxianus* KJ-L, *W. anomalous* CP-2, *M. guilliermondii* SU-L 순으로 나타났다. 이는 *S. cerevisiae* LP보다 1.4-1.7배 높은 활성을 나타낸 것으로 Jang(2012a)이 보고한 *P. anomala*의 ACE 활성과 같은 결과라 할 수 있다. 우리나라의 서구화된 식습관, 운동 부족, 과도한 스트레스 등 다양한 생활 요인으로 인해 심혈관계 질환 발병률이 높아지고 있는 실정(Kim 등, 2022)에서, 항고혈압 활성을 나타내는 다양한 non-*Saccharomyces* 계열의 효모를 발효식품에 적용함으로써 합성 고혈압 치료제의 부작용에 대비하여 식품 유래의 ACE 저해 활성물질에 관한 기초 연구로서 향후 산업적 활용성이 기대된다.

### 3.7. Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase는 인체 내 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서, 활성이 저해 되면 멜라닌 생성을 저해하는 결과를 일으킨다(Kim 등, 2014). 선발한 5주의 NSC 배양 상등액의 tyrosinase 저해 활성 결과를 Table 6에 나타내었다. Kojic acid를 양성 대조군으로 사용하였고, 일반적으로 주류 제조에 가장 많이 사용하는 SC LP와 선발한 NSC의 미백 활성을 조사한 결과, *W. anomalous* CP-2가 활성(93.18%)이 가장 높았고,

**Table 6.** Tyrosinase inhibitory activity of five yeast strains isolated from traditional *nuruk*

Species	Strain	Tyrosinase inhibitory activity (%)
<i>K. marxianus</i>	KJ-L	90.91±1.14 <sup>ab1)</sup>
<i>W. anomalus</i>	KJ-1	86.36±1.14 <sup>c2)</sup>
<i>W. anomalus</i>	CP-2	93.18±3.41 <sup>a</sup>
<i>P. anomalus</i>	HAN-1	88.64±1.14 <sup>bc</sup>
<i>M. guilliermondii</i>	SU-L	91.48±0.57 <sup>ab</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LP	94.89±3.98 <sup>a</sup>
Positive control	Kojic acid	63.07±1.70 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>Mean values±SD (n=3).

<sup>2)</sup>Values with different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

*W. anomalus* KJ-1(86.36%)이 가장 낮았지만, 양성 대조구로 사용한 Kojic acid(63.07%)보다 선발한 효모의 상층액에서 미백 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다(Table 6). Jang(2012b)이 보고한 *P. anomala*의 tyrosinase 저해 활성(3.4%-14.4%)과 비교하여도 선발한 NSC의 tyrosinase 저해 활성이 6-28배 높게 나타났다. 현재, 메디푸드 및 향장산업에서 미백 소재의 이용성이 높아지는 시점에서 본 연구에서 선발한 미백 활성 등이 뛰어난 non-*Saccharomyces cerevisiae*는 향후, 기능성 발효식품 및 화장품 원료로서 활용성이 기대된다.

## 4. 요약

전통누룩에서 분리한 5주의 non-*Saccharomyces cerevisiae*, *K. marxianus* KJ-L, *W. anomalus* KJ-1, *W. anomalus* CP-2, *P. anomalus* HAN-1 및 *M. guilliermondii* SU-L 효모의 알코올 생산 및 기능적 특성을 조사하였다. 선발한 효모는 20% 포도당에서 높은 알코올 생산능을 보였고, 18S rDNA 염기서열 분석을 통하여 모두 NSC 계열의 효모(NSC)로 동정되었다. NSC의 최적 생육 온도와 pH는 각각 25℃와 4.0이었으나, *M. guilliermondii* SU-L은 35℃에서 최적조건을 나타내었다. 2종류의 NSC 균주(KJ-L 및 CP-2)는 *S. cerevisiae* LP(SC LP)보다 5-10% 더 높은 알코올을 생산하였다.  $\alpha$ -Amylase와  $\beta$ -glucosidase 활성은 NSC 균주가 SC LP보

다 약간 낮았지만, glucoamylase는 SC LP보다 NSC가 1.4배 더 높은 활성을 보였다. 1% 아카보스를 사용하였을 때,  $\alpha$ -glucosidase 억제 활성은 *S. cerevisiae*보다 *K. marxianus* KJ-L 및 *P. anomalus* HAN-1에서 29배 더 높았다. 5종류의 NSC는 *S. cerevisiae*(37.3%)에 비해 억제율이 51.7%-61.7%로 높은 ACE 저해 활성을 나타내었다. NSC(86.4-91.5%)와 SC(94.9%)의 미백 활성은 양성 대조군인 kojic acid보다 현저히 뛰어났다. 선발한 NSC 효모는 우수한 생리활성과 다양한 기능적 특성을 살려, 향후 발효식품 및 화장품 등을 제조하는 국산 종균으로 산업적 활용 가치가 높다고 생각한다.

## 감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 농업과학기술개발사업(과제번호: PJ0141612022)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

## Author contributions

Conceptualization: Yeo SH. Data curation: Kim AR, Yeo SH. Formal analysis: Kim SH, Jeong WS, Kim MK. Methodology: Kim SY. Validation: Yeo SH. Writing - original draft: Kim AR. Writing - review & editing: Kim AR, Kim SH, Jeong WS, Kim SY, Kim MK, Yeo SH.

## Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

## ORCID

A Ra Kim (First author)

<https://orcid.org/0000-0003-1263-3211>

Sun Hee Kim

<https://orcid.org/0000-0003-0939-4096>

Woo Soo Jeong

<https://orcid.org/0000-0002-1620-9373>

So Young Kim  
<https://orcid.org/0000-0002-9729-6869>  
 Myung-Kon Kim  
<https://orcid.org/0000-0003-3765-9987>  
 Soo-Hwan Yeo (Corresponding author)  
<https://orcid.org/0000-0001-7722-7447>

## References

- Baek SY, Lee YJ, Kim MD, Yi JH, Mun JY, Yeo SH. Characterization of ethanol fermentation with wild type yeast strains. *Microbiol Biotechnol Lett*, 43, 227-235 (2015)
- Baek SY, Yun HJ, Choi HS, Hong SB, Koo BS, Yeo SH. Screening and characteristics of useful fungi for brewing from commercial *Nuruk* in Chungcheong provinces. *Kor J Microbiol Biotechnol*, 38, 373-378 (2010)
- Baron AD. Postprandial hyperglycemia and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract*, 40, 51-55 (1998)
- Buerth C, Tielker D, Ernst JF. *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: Yeast relatives with expanding applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 6981-6990 (2016)
- Choi DH, Park EH, Kim MD. Characterization of starch-utilizing yeast *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from Nuruk. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 42, 407-412 (2014)
- Choi JH, Kim GW, Lee HY, Park CS, Shim JY. Brewing characteristics of *Wickerhamomyces anomalus* SC-1 isolated from Korean traditional Nuruk. *Food Eng Prog*, 23, 223-228 (2019)
- Chung KT, Bang KW, Kim JK, Song HI, Jung YJ. Characterization of protoplast fusant between killer yeast and alcohol-fermenting yeast. *Korea J Microbiol*, 55-64 (1990a)
- Chung MJ, Hou WN, Jeon JH. Studies on the development and of three powerful raw starch digesting glucoamylase. *J Agr Sci Chungbuk Univ*, 8, 151-163 (1990b)
- Hernandez LF, Espinosa JC, Fernandez-Gonzalez M, Briones A.  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int J Food Microbiol*, 80, 171-176 (2003)
- Jang IT, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Kim HR, Ahn BH, Lee JS. Physiological functionality *Nuruk*, *Makgeolli* and *Cheonggukjang* made with fungi and bacteria isolated from Korean traditional fermented foods. *Kor J Mycol*, 40, 164-173 (2012a)
- Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor J Mycol*, 40, 60-64 (2012)
- Jang IT, Kim YH, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. *Kor J Mycol*, 39, 227-228 (2011)
- Jeong SC, Lee DH, Lee JS. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J Microbiol Biotechnol*, 16, 1904-1911 (2006)
- Jung S, Chung CH. Production and properties of ale beer with *Nuruk*, a Korean fermentation starter. *Korean J Food Sci Technol*, 49, 132- 140 (2017)
- Jung SJ. Beer production and properties using *Nuruk*, a Korean fermentation starter. MS Thesis, Sejong University, Korea, 10-14 (2015)
- Kim HR, Kwon YH, Jo SJ, Kin JH, Ahn BH. Characterization and volatile flavor components in glutinous rice wines prepared with different yeasts of *Nuruks*. *Korean J Food Sci Technol*, 41, 296-301 (2009)
- Kim JH, Kim NM, Lee JS. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from traditional *Meju*. *Korean J Food & Nut*, 12, 490-495 (1999)
- Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Hung KS, Lee JS. Characterization of antihypertensive angiotensin I-convertong enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol*, 14, 1318-1323 (2004)
- Kim K, Cha H, Song HK, Lee YN, Ahn KJ, An IS,

- An S. Inhibitory effects of freeze dried unripe Danguyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extracts on melanogenesis. Korean J Aesthetic Cosmetol, 12, 403-408 (2014a)
- Kim MS, Kim S, Ha BS, Park HY, Baek SY, Yeo SH. Diversity saccharification capacity, and toxigenicity analyses of fungal isolates in *Nuruk*. Kor J Mycol, 42, 191-200 (2014b)
- Kim SH, Kim JY, Jeong WS, Gwon HM, Kim SY, Yeo SH. Culture and function-related characteristics of six acetic acid bacterial strains isolated from farm-made fermented vinegars. Korean J Food Preserv, 29, 142-156 (2022)
- Kim SW, Park JH, Jun HK. Analysis of optimum condition for production of an onionic *Vinegar* by two-step fermentations. J Life Sci, 18, 1410-1414 (2008)
- Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antidementia  $\beta$ -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb Technol, 42, 83-88 (2007)
- Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. Mycobiology, 36, 102-105 (2008)
- Lee JS, Hyun KW, Jeong SC, Kim JH, Choi YJ, Miguez CB. Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and some physiological activities. Can J Microbiol, 50, 489-492 (2004)
- Lee JS, Yi SH, Kim JH, Yoo JY. Isolation of wild killer yeast from traditional *Meju* and production of killer toxin. Korean J Biotechnol Bioeng, 14, 434-439 (1999)
- Lee JS, Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional *Meju*. Korean J Appl Microbiol Biotechnol, 25, 448-453 (1997)
- Lee SH, Baek SY, Kang JE, Jeon CO, Kin DH, Kim MD, Yeo SH. Effects of temperature on the changes of enzymatic activities and metabolite during wheat *Nuruk* fermentation. Microbiol Biotechnol Lett, 43, 378-384 (2015)
- Nam K, Lee NK, Yum EJ, Kim YS, Kim DH, Yeo SH, Jeong YS. Change in the composition and enzyme activity of culturable lactic acid bacteria in *Nuruk* during fermentation at different temperatures. Korean J Food Preserv, 22, 920-925 (2015)
- Park JS, Na HS. Development of fermented pumpkin porridge as a meal replacement. Korean J Food Preserv, 25, 501-506 (2018)
- Park SY, Choi SY, Min KH. Isolation of glucoamylase producing yeasts and its enzymatic characteristics. Kor J Mycol, 27, 386-393 (1999)
- Rhee CH, Park HD. Isolation and characterization of alcohol fermentation yeasts from persimmon. Korean J Appl Microbiol Biotechnol, 25, 266-270 (1997)
- Seo DJ, Yeo SH, Mun JY, Jung WJ, Cho YS, Baek SY. Characteristics of yeast with low temperature adaptation for *Yakju* brewed. Korean J Food Preserv, 22, 908-914 (2015)
- Shinde J, Taldone T, Barletta M, Kunaparaju N, Hu B, Kumar S, Placido J, William ZS.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of *Syngium cumini* (Linn.) skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. Carbohydr Res, 343, 1278-1281 (2008)
- Song SH, Lee C, Lee S, Park JM, Lee HJ, Bai DH, Yoon SS, Choi JB, Park YS. Analysis of microflora profile in Korean traditional *Nuruk*. J Microbiol Biotechnol, 23, 40-46 (2013)
- Strauss MLA, Jolly NP, Lambrechts MG, van Rensburg P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. J Appl Microbiol, 91, 182-190 (2001)
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol, 30, 2725-2729 (2013)
- Tao N, Gao Y, Liu Y. Isolation and characterization of a *Pichia anomala* strain: A promising candidate for bioethanol production. Braz J Microbiol, 42, 668-675 (2011)