

누룩으로부터 맥아당 이용능과 에탄올 생산성이 우수한 효모의 분리와 특성

최다혜¹, 최영환², 여수환³, 김명동^{1*}

¹강원대학교 식품생명공학과

²국순당

³농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

Received: October 23, 2015 / Revised: December 12, 2015 / Accepted: December 25, 2015

Isolation and Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* from nuruk for Production of Ethanol from Maltose

Da-Hye Choi¹, Yeong-Hwan Choi², Soo-Hwan Yeo³, and Myoung-Dong Kim^{1*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

²Kooksoondang Bldg 110-3, Samsung-Dong, Seoul 06083, Republic of Korea

³Fermented Food Science Division, Department of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

Wild-type yeast strains were isolated from nuruk, a type of microbial starter culture used for fermenting grains to produce alcoholic products, that was collected from different areas in Korea. Strains were identified based on the analysis of 18S rRNA sequences. Fifty strains shared the highest sequence similarity with *Saccharomyces cerevisiae* and were designated MBYK1–MBYK50. Among these *S. cerevisiae* isolates, MBYK45 produced 44.0 ± 0.3 g of ethanol from 200 g maltose after incubation at 30°C for 48 h. Maximum ethanol production of 110.80 ± 0.81 g/l with productivity of 3.79 ± 0.14 g⁻¹ l⁻¹ h⁻¹ was obtained at optimum culture conditions of pH (6.0), maltose (200 g/l), and temperature (35°C). This study indicates that the MBYK45 strain of *S. cerevisiae*, isolated from nuruk, might be suitable for traditional liquor production from malts.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, nuruk, ethanol, maltose

서 론

우리나라의 전통주는 주로 찹쌀이나 멥쌀을 주원료로 사용하고 발효제로 누룩을 사용하는 병행발효 방식으로 생산되고 있다[6, 27]. 발효제로 사용되는 누룩은 밀, 쌀 등의 곡류원료를 사용하여 자연의 미생물을 번식시킨 것으로서 곰팡이, 효모, 젖산균 등의 다양한 미생물이 존재한다[26]. 전통주 제조의 원료에 함유된 전분은 *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Monascus purpureus* 등의 곰팡이에 의하여 당화되고[2, 12], *Saccharomyces* sp., *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Absidia idahoensis* 등의 효

모에 의하여 에탄올로 전환된다[1, 7, 16]. *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus* sp., *Weissella* sp. 등의 젖산균은 젖산, 구연산, 초산 등의 유기산을 생산하여 전통주의 맛과 향을 형성하는데 기여한다[17, 24]. 국내 대부분의 지역에서는 보리, 밀, 쌀 등이 원료로 사용된 누룩을 사용하여 전통주를 생산하였으나, 강원도는 지리적 특성상 쌀이나 밀을 포함한 곡류보다는 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 호밀 등의 잡곡을 사용하여 누룩을 제작하였다[9, 19]. 또한 강원도 지역에서는 다른 지역과 달리 누룩 이외에 엿기름(맥아)을 전통주 제조에 많이 사용하였는데[19], 이는 타 지역에서 제조된 누룩과 비교하여 전분의 당화력이 상대적으로 낮은 것에서 기인한 것으로 추정된다. 강원도 지역에서 엿기름을 사용하여 생산된 전통주로서는 옥수수술, 옥수수엿술, 옥로주 등이 있다[19]. 옥수수엿술의 경우 누룩의 양을 상대적으로 적게 사용하고 발아된 옥수수를 이용하

*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

여 제조하는데[10], 이 또한 당화력이 낮은 누룩의 당화력을 높이기 위한 방법으로 추정된다. 강원도의 지역적 및 기후적 특성상 누룩의 발효온도가 국내 다른 지역보다 상대적으로 낮아 누룩에 분포하는 미생물의 종류 및 밀도가 다른 지역의 누룩과 상이하여 전통주를 제조하는 방법상 차이를 가져온 것으로 판단된다[3].

본 연구에서는 전통주 제조에 사용하는 누룩으로부터 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 분리하여 엿기름을 구성하는 주요 성분인 맥아당(maltose) 이용능과 에탄올 생산성이 우수한 균주를 선발하고 균체성장과 에탄올 생산특성을 분석하여 옥수수를 주원료로 사용하는 전통주 생산에 적합한 균주를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

누룩수집 및 효모균주 분리

강원도를 비롯한 전국 8개 지역의 재래시장에서 판매되는 누룩과 농가에서 직접 제조한 누룩 11점을 수집하였다. 분쇄한 누룩 1 g을 펩톤수 9 ml에 현탁한 후, 10^{-1} - 10^{-5} 희석배수까지 단계적으로 희석하고 chloramphenicol(100 mg/l, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 함유된 YEPD (yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l, pH 6.8) 평판배지에 도말하였다[7]. 도말한 배지는 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 단일집락을 분리하였고, 분리된 균주 중 탄소원으로서는 자일로스(xylose)를 이용하지 못하는 균주를 *Saccharomyces* 속 균주로 추정하였다[4].

균주동정

분리한 균주는 YEPD 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 GenEx™ genomic Sx(GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 염색체 DNA를 추출하였다. ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머[8]를 사용하여 18S rRNA 유전자의 Internal transcribed spacer 영역을 증폭하였다. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 94°C에서 30초(denaturation), 58°C에서 30초(annealing), 72°C에서 1분(extension)간 총 35회(cycles) 반복 수행하였으며, 전기영동을 통하여 약 650 bp의 PCR 반응산물을 확인하였다. 정제된 PCR 산물을 (주)마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 확보하였으며 National Center for Biotechnology Information(NCBI, MD, USA)의 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 프로그램을[7]를 사용하여 확보한 상동성을 근거로 균주를 동정하였다.

배양조건

분리한 효모균주의 맥아당 이용능 및 에탄올 생산성을 측정하기 위하여 단일집락을 10 ml의 YEPD 배지에 접종하고 30°C에서 200 rpm의 교반속도로 12시간 동안 전배양하였다. 전배양액은 멸균수로 세척한 후 10 ml의 YEPM(yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, maltose 200 g/l, pH 6.8) 배지가 포함된 시험관에 세포흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 접종하고 30°C에서 200 rpm의 교반속도로 48시간 동안 배양한 후 맥아당을 이용한 세포성장과 에탄올 생산을 조사하였다. 에탄올 생산량은 g/l의 단위로 표시하였으며, 에탄올 생산성은 에탄올 생산량을 배양시간으로 나누어 계산하였다.

맥아당 이용능이 우수한 균주로 선발된 균주의 균체성장 및 에탄올 생산성을 조사하기 위하여 200 ml의 YEP(yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l) 배지에 맥아당을 20%(w/v) 첨가하고 30°C에서 48시간 동안 200 rpm의 교반속도로 진탕 배양하면서 배양액을 취하여 균체성장 및 에탄올 생산량을 측정하였다. 연구용 효모균주로 널리 사용되고 있는 *S. cerevisiae* BY4742[20]를 대조군으로 사용하였다.

배양온도에 따른 효모균주의 성장 및 에탄올 생산성을 조사하기 위하여 2%(w/v)의 맥아당을 탄소원으로 첨가한 200 ml의 YEP 배지에 균주를 접종한 후 다양한 배양온도(25, 30, 35, 37°C)에서 48시간 동안 200 rpm의 교반속도로 배양하였다. 맥아당 농도에 따른 균체성장 및 에탄올 생산을 조사하기 위하여 200 ml의 YEP배지에 맥아당을 5, 10, 20, 30%(w/v)의 농도로 각각 첨가한 후 35°C에서 48시간 동안 200 rpm의 교반속도로 배양하였다. 배지의 pH에 따른 균체성장 및 에탄올 생산을 조사하기 위하여 인산염 완충액(100 mM)으로 pH가 3, 4, 5, 6, 7, 8로 조정된 YEP 배지에 맥아당을 20%(w/v)의 농도로 첨가한 후 균주를 각각 접종하고 35°C에서 48시간 동안 200 rpm의 교반속도로 배양하였다.

분석방법

균체성장은 흡광광도계(Ultrospec 6300 pro, GE healthcare, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 맥아당 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, Torrance, CA, USA)를 사용하였으며, 이동상으로 0.005 N 황산용액을 0.6 ml/min의 유속으로 사용하였다.

통계처리

모든 측정은 3회 반복하였으며 평균값과 표준오차는 IBM

SPSS Statistics 21(IBM, NY, USA)를 사용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

효모균주의 분리 및 동정

전국에서 수집한 11점의 누룩으로부터 효모균주 100점을 분리하였다. 분리된 균주 중 오탄당인 자일로스를 대사하지 못하는 균주를 우선적으로 선별한 후, 동정하여 표준 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 18S rRNA 유전자와 99% 이상의 상동성을 보인 균주 50점을 확보하였다.

에탄올 생산성이 우수한 *S. cerevisiae* 균주 선정

*S. cerevisiae*로 동정된 50점의 균주는 맥아당을 탄소원으로 사용한 배지에서 균체성장 및 에탄올 생산성을 비교하였다. 고농도 맥아당(200 g/l) 조건에서 균체생장이 다른 균주들에 비해 상대적으로 우수한 균주로서 MBYK12로 명명된 균주 외 6점을 선발하였으며 그 중 MBYK12 균주가 48시간 배양 후 균체생장이 가장 우수하였다(Fig. 1A). 그러나 MBYK12 균주의 에탄올 생산량은 8.53 ± 0.10 g/l로서 다른 균주와 비교하였을 때 상대적으로 낮은 수준이었다(Fig. 1B). 한편 MBYK45로 명명된 균주는 200 g/l의 맥아당으로부터 44.00 ± 0.28 g/l의 에탄올을 생산하여 에탄올 생산성이 가장 우수하였고, MBYK44 균주는 약 40.80 ± 1.13 g/l의 에탄올을 생산하였다. 맥아당으로부터 에탄올 생산성이 가장 우수한 MBYK45 균주는 48시간 배양 후 균체농도가 $OD_{600} =$

30.80 ± 0.50 로서 맥아당 이용농도 우수한 것으로 판단되었다. 맥아당을 탄소원으로 사용하여 에탄올 생산성이 우수한 균주로 선정된 MBYK45 균주와 대조구인 *S. cerevisiae* BY4742 균주를 배양온도 30°C에서 균체성장 및 에탄올 생산성을 비

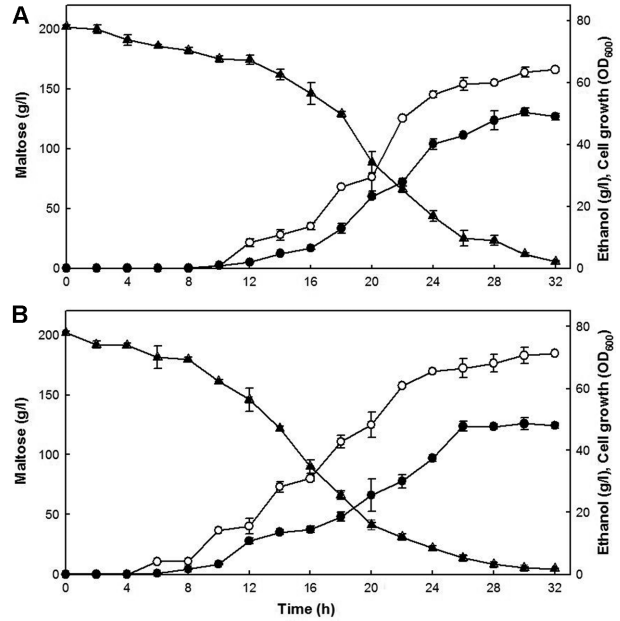


Fig. 2. Profiles of cell growth (●), maltose utilization (▲), and ethanol production (○) in shake flasks cultivation of *S. cerevisiae* BY4742 (A) and MBYK45 (B) at 30°C and pH 6.8. Averages and standard errors obtained from three independent experiments are shown.

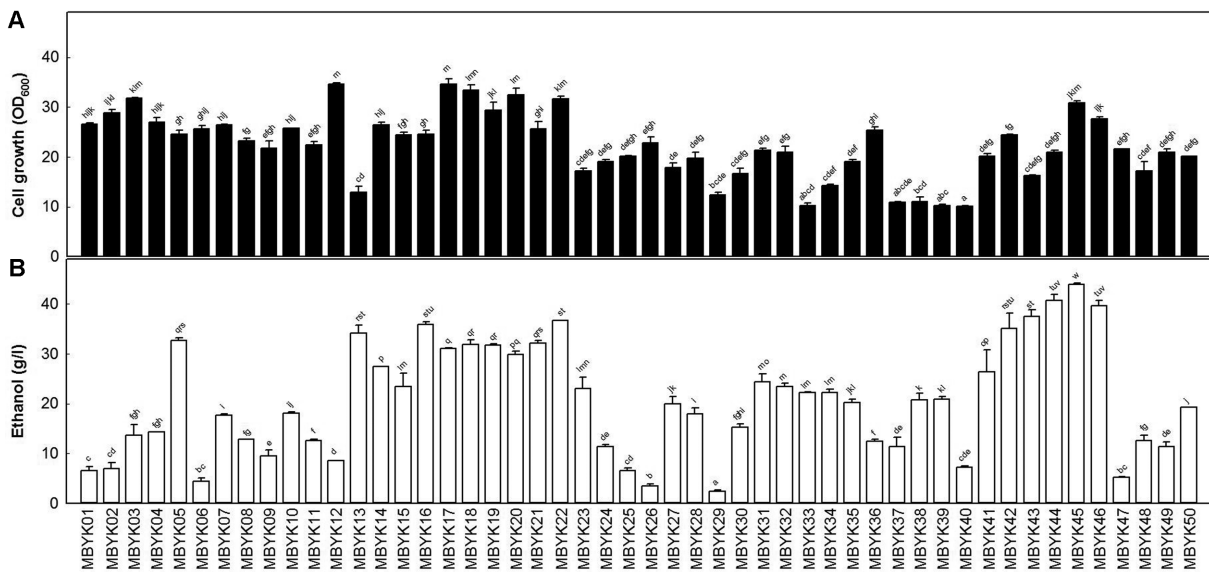


Fig. 1. Comparison of cell growth (A) and ethanol production (B) by *S. cerevisiae* strains isolated from nuruk. Maltose (20%) was used as carbon source at 30°C and pH 6.8. Averages and standard errors obtained from three independent experiments are shown. Different letters indicate significant difference between means ($p < 0.05$).

교하였다(Fig. 2). 맥아당이 20% 첨가된 배지에서 초기 생육 기간에는 유의적인 차이가 없었으나, 대수기에는 누룩으로부터 분리된 MBYK45 균주가 대조구 효모균주에 비해 균체 성장 및 맥아당 소모속도가 우수하였다. 발효 종료 후 MBYK45 균주에 의하여 생산된 에탄올은 71.33 ± 0.34 g/l로서 대조구 효모균주의 에탄올 생산량인 64.18 ± 0.51 g/l에 비해 유의적으로 우수하였다. 이러한 결과는 10 ml 규모의 배양부피를 기준으로 에탄올 생산성을 평가하였던 Fig. 1의 결과와는 차이가 있었으나, 시험관과 플라스크의 교반 및 통기 조건의 차이에서 발생한 것으로 판단된다. 위의 실험결과를 바탕으로 맥아당을 이용한 균체 성장과 에탄올 생산성이 우수한 균주로서 MBYK45 균주를 최종 선정하였다.

배양조건이 MBYK45 균주의 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향

배양온도에 따른 MBYK45 균주의 성장과 에탄올 생산성 변화를 조사하였다(Table 1). 균체 성장은 25°C에서 상대적으로 가장 우수하였고, 배양온도가 높아질수록 균체 성장이 유의적으로 감소하였으며 39°C에서는 균체가 성장하지 않았다. 그러나 에탄올 생산은 35°C에서 상대적으로 가장 우수하였으며 맥아당 농도를 20 g/l로 주입하였을 때 에탄올 생산성은 1.30 ± 0.12 g⁻¹ l⁻¹ h⁻¹, 수율은 0.58 ± 0.01 g/g으로서 다른 배양온도에 비해 우수한 결과를 나타내었다.

이러한 결과는 35°C에서 최대 에탄올 생산을 보인 이 등[21]의 보고와 유사하였다. 균체 성장의 경우 MBYK45 균주는 25°C에서 가장 우수하였던 이 등[20]이 보고한 *S.*

cerevisiae NK28 균주와는 상이한 특성을 나타내었다. 김 등[14]이 보고한 *S. cerevisiae* 균주는 40°C에서 20%의 포도당으로부터 약 9.8%(w/v)의 에탄올을 생산하였으며, 백 등[23]은 NaCl 적응과정에 의한 *S. cerevisiae* 균주의 고온내성과 고온에서의 발효성능과의 관련성을 보고한 바 있다. 또한 박 등[25]은 효모의 성장속도와 에탄올 생산속도를 위한 최적 온도가 다르다는 결과를 보고하였다.

YEP 배지에 맥아당을 5, 10, 20, 30%(w/v)의 농도로 첨가하여 맥아당 농도에 따른 MBYK45 균주의 성장과 에탄올 생산성을 비교하였다(Table 2). 균체의 성장은 10%의 맥아당을 첨가한 배지에서 가장 우수하였으나, 에탄올 생산량, 생산성 및 수율은 20%의 맥아당을 첨가한 실험구가 가장 우수하였다. 에탄올 생산량은 20%의 맥아당을 첨가한 실험구가 110.55 ± 1.65 g/l로서 5%의 맥아당을 첨가한 실험구에 비해 약 4.8배 이상 우수한 결과를 나타내었다. 에탄올 생산성 또한 20%의 맥아당이 첨가된 실험구가 3.71 ± 0.10 g⁻¹ l⁻¹ h⁻¹로서 5%의 맥아당을 첨가한 실험구에 비해 약 2 배 이상 우수하였다. 따라서 균체 성장 및 에탄올 생산을 위한 최적 맥아당 농도는 20%로 판단되었다.

김 등[13] 및 이 등[21]은 *S. cerevisiae* 균주를 이용한 에탄올 생산은 10%의 포도당에서 가장 우수하였다고 보고하였으며, 이 등[20]은 키위로부터 분리된 *S. cerevisiae* 균주를 이용한 에탄올 생산연구에서 최적 포도당 농도를 20%(w/v)로 보고하였으며, 차 등[5]은 단수수 착즙액을 이용한 에탄올 생산 연구에서 최대 에탄올 생산성 확보를 위한 최적 당

Table 1. Effects of temperature on cell growth and ethanol production by *S. cerevisiae* MBYK45.

Temperature (°C)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Ethanol concentration (g/l)	Ethanol productivity (g ⁻¹ l ⁻¹ h ⁻¹)	Ethanol yield (g/g)
25	20.37 ± 0.21	10.95 ± 0.57	0.68 ± 0.03	0.46 ± 0.03
30	12.83 ± 0.51	10.23 ± 0.56	0.77 ± 0.03	0.47 ± 0.02
35	11.63 ± 0.32	11.15 ± 0.24	1.30 ± 0.12	0.58 ± 0.01
37	11.07 ± 0.95	10.52 ± 0.04	0.19 ± 0.00	0.54 ± 0.00

*Each value is the average ± standard error from three independent batch cultivations performed for 48 h with an initial maltose concentration of 2%(w/v) at pH 6.8. Ethanol productivity was determined at an exponential growth phase.

Table 2. Effects of initial maltose concentration on cell growth and ethanol production by *S. cerevisiae* MBYK45.

Maltose (% w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Ethanol concentration (g/l)	Ethanol productivity (g ⁻¹ l ⁻¹ h ⁻¹)	Ethanol yield (g/g)
5	21.67 ± 0.29	23.13 ± 0.46	1.84 ± 0.14	0.48 ± 0.01
10	32.49 ± 0.21	50.60 ± 1.09	3.09 ± 0.05	0.48 ± 0.03
20	30.20 ± 0.20	110.55 ± 1.65	3.71 ± 0.10	0.55 ± 0.02
30	21.33 ± 0.86	95.88 ± 1.06	2.75 ± 0.24	0.30 ± 0.03

*Each value is the average ± standard error from three independent batch cultivations performed for 48 h at 35°C and pH 6.8. Ethanol productivity was determined at an exponential growth phase.

Table 3. Effects of initial pH on cell growth and ethanol production by *S. cerevisiae* MBYK45.

pH	Cell growth (OD ₆₀₀)	Ethanol concentration (g/l)	Ethanol productivity (g ⁻¹ l ⁻¹ h ⁻¹)	Ethanol yield (g/g)
3.0	11.00 ± 0.33	61.07 ± 4.67	1.30 ± 0.06	0.27 ± 0.01
4.0	37.17 ± 1.48	107.77 ± 1.46	3.23 ± 0.07	0.54 ± 0.01
5.0	37.47 ± 5.60	109.70 ± 0.95	3.78 ± 0.03	0.56 ± 0.00
6.0	31.67 ± 2.75	110.80 ± 0.81	3.79 ± 0.14	0.55 ± 0.00
6.8	30.20 ± 0.20	110.55 ± 1.65	3.71 ± 0.10	0.55 ± 0.02
7.0	29.00 ± 0.44	109.80 ± 0.42	3.38 ± 0.04	0.55 ± 0.02
8.0	28.50 ± 0.50	108.35 ± 0.07	3.04 ± 0.03	0.55 ± 0.01

*Each value is the average ± standard error from three independent batch cultivations performed for 48 h with an initial maltose concentration of 20%(w/v) at 35°C. Ethanol productivity was determined at an exponential growth phase.

농도를 보고하였다.

맥아당 농도 20% 및 배양온도 35°C 조건에서 배지의 초기 pH 변화에 따른 MBYK45 균주의 성장 및 에탄올 생산을 조사하였다(Table 3). MBYK45 균주는 pH 3을 제외한 조건에서 100 g/l 이상의 높은 에탄올 생산량을 나타내었다. 균주의 성장은 pH 5.0에서 가장 우수하였으며, 109.70 ± 0.95 g/l의 에탄올이 생산되었다. 그러나 에탄올 생산량은 배지의 초기 pH가 6.0일 때 110.80 ± 0.81 g/l로 가장 우수하였으며, 에탄올 생산성은 3.79 ± 0.14 g⁻¹ l⁻¹ h⁻¹이었다. 에탄올 생산량 및 에탄올 생산성을 기준으로 하였을 때 배지의 pH가 6.0일 때 에탄올 생산에 보다 유리한 것으로 판단되었다.

에탄올 발효공정에서 요구되는 균주의 바람직한 특성은 발효속도가 빨라야 하며, 고온과 높은 기질농도에서도 우수한 성장속도를 나타내는 것 등이다[22]. 원 등[18]은 에탄올 생산성이 균체의 초기농도 및 초기 탄소원 농도에 영향을 받는다고 보고하였으며, 김 등[15]은 첨가제와 가교제를 첨가하였을 때, 에탄올 생산성이 증가되었다고 보고하였다. 에탄올 생산량 뿐만 아니라 에탄올 생산성의 향상은 에탄올 생산공정에 있어 생산비용을 절감시킬 수 있는 중요한 요소로 작용한다[11]. 높은 맥아당 농도에서 균체성장과 에탄올 생산속도가 우수한 MBYK45 균주는 맥아를 이용한 전통주 생산에 적용 가능성이 높은 균주로 사료된다.

요 약

전국에서 수집한 누룩으로부터 50점의 *S. cerevisiae* 균주를 분리하고 18S rRNA 유전자 영역 중 ITS 단편의 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. 누룩에서 분리한 *S. cerevisiae* 균주 중 MBYK45로 명명된 균주는 대조구 균주 및 누룩에서 분리한 다른 균주들에 비해 맥아당을 이용한 균체성장 및 에탄올 생산성이 우수하였다. MBYK45 균주는 맥아당 농도 20%, 배지 pH 6.0, 배양온도 35°C 조건에서 에탄올 생산성

이 3.79 ± 0.14 g⁻¹ l⁻¹ h⁻¹로 가장 우수하였고 110.80 ± 0.81 g/l 에탄올을 생산하였다. 본 연구를 통하여 맥아를 원료로 하는 전통주 제조에 적합한 것으로 사료되는 *S. cerevisiae* MBYK45 균주를 누룩으로부터 분리하였으며 균체성장 및 에탄올 생산을 위한 최적 배양조건을 설정하였다.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Ministry of Trade, Industry and Energy (MOTIE) and Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT) through the Promoting Regional specialized Industry (Project No. R0002423).

References

- 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.
- 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.
- Bal J, Yun SH, Song HY, Yeo SH, Kim JH, Kim JM. 2014. Microflora dynamics analysis of Korean traditional wheat-based *nuruk*. *J. Microbiol.* **52**: 1025–1029.
- Barnett JA. 1976. The utilization of sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 126–228.
- Cha YL, Park YR, Kim JK, Choi YH, Moon YH, Bark ST. 2015. Optimization of fermentation conditions for the ethanol production from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *New & Renewable Energy* **7**: 3–9.
- Chang KJ, Yu TJ. 1981. Studies on the components of *sokokju* and commercial *yakju*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **13**: 307–313.
- Choi DH, Park EH, Kim MD. 2014. Characterization of starch-utilizing yeast *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from *Nuruk*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 407–412.

8. 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.
9. Jung DH. 2012. Science of Nuruk. *Yu Han Publishers. Seoul, Korea.* pp. 75.
10. Jung ES. 2010. Makgeolli travel. *Korean broadcasting publishers. Seoul, Korea.* pp. 250.
11. Kim HD, Min KH, Hur BK. 1995. Improvement of alcohol productivity by means of repeated batch fermentation. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **10**: 55–62.
12. 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.
13. Kim JH, Kim NM, Lee JS. 1999. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from traditional Meju. *Korean J. Food Nutr.* **12**: 490–495.
14. Kim JW, Jin IY, Seu JW. 1995. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1, a thermotolerant yeast for fuel alcohol production at higher temperature. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 617–623.
15. Kim SW, Kim EY, Hong YG. 1996. Development of alginate-celite immobilization technique for the improvement of ethanol productivity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11**: 77–85.
16. Kwon SJ, Ahn TY, Sohn JH. 2012. Analysis of microbial diversity in Makgeolli fermentation using PCR-DGGE. *J. Life Sci.* **22**: 232–238.
17. Kwon SJ, Sohn JH. 2012. Analysis of microbial diversity in Nuruk using PCR-DGGE. *J. Life Sci.* **22**: 110–116.
18. Kyung HM, Kim HD, Hur BK. 1995. Effect of initial condition on the characteristics of ethanol fermentation. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **23**: 479–484.
19. Lee HJ. 2009. Korean traditional liquor. *Hanyang university press. Seoul, Korea.* pp. 90–91.
20. Lee JS, Park EH, Kim JW, Yeo SH, Kim MD. 2013. Growth and fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* NK28 isolated from kiwi fruit. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1253–1259.
21. Lee YB, Shim SK, Han MS, Chung DH. 1995. Screening and ethanol fermentation of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 723–729.
22. Novak M. 1981. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 201–211.
23. Paik SK, Yun HS, Sa KH, Kim IS, Rhee IK, Park HD. 2003. Effect of NaCl adaptation on the thermotolerance and alcohol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 63–68.
24. 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.
25. Park JK, Peck SY, Yoo YJ. 1989. Temperature effects and optimization for ethanol fermentation. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 619–623.
26. Rhee SJ, Lee JT, Kim KK, Lee CH. 2003. Comparison of the traditional (*samhaeju*) and industrial (*cheongju*) rice wine brewing in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* **12**: 242–247.
27. Seo MY, Lee JK, Ahn BH, Cha SK. 2005. The changes of microflora during the fermentation of *Takju* and *Yakju*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**: 61–66.