

낙동강과 영산강 담수와 주변 토양으로부터 야생효모의 분리 및 동정

한상민¹ · 김하근¹ · 이항범² · 이종수^{1*}

¹배재대학교 바이오·의생명공학과, ²전남대학교 응용생명공학부

Isolation and Identification of Wild Yeasts from Freshwaters and Soils of Nakdong and Yeongsan River, Korea, with Characterization of Two Unrecorded Yeasts

Sang-Min Han¹, Ha-Kun Kim¹, Hyang-Burm Lee² and Jong-Soo Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea

²Division of Food Technology, Biotechnology and Agrochemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

ABSTRACT : Diverse wild yeast were isolated from freshwaters and soils of Nakdong and Yeongsan rivers in Korea and identified by the comparison of polymerase chain reaction-amplified nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region (including the 5.8S rRNA) and D1/D2 regions of 26S rDNA, using BLAST. In total, 15 strains belonging to 9 species were isolated from 25 samples, out of which *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus bestiolae* were dominant. *Candida ghanaensis* JSF0127 and *Meira geulakonigii* JSF0130 were identified as unrecorded yeasts, for which their mycological characteristics were investigated. These unrecorded yeasts formed ascospores and grew in yeast extract peptone dextrose medium containing 5% NaCl.

KEYWORDS : Freshwater, Identification, Isolation, Unrecorded yeasts, Wild yeasts

효모는 자낭균류와 담자균류 및 불완전균류 등에 분포하는 진균류로서 일부는 오래 전부터 주류 등의 전통 발효 식품제조에 이용되어왔다[1]. 지금까지 효모는 주로 발효식품 등에서 *Saccharomyces cerevisiae* 등의 일부만이 분리되어 발효식품산업에 응용되고 있고 최근 이들로부터 항고혈압 활성[2] 등의 고부가가치의 건강 소재 생산 등에 관한 연구가 보고되고 있다[3-9].

필자 등은 2012년부터 우리나라 자연 환경의 효모 중 다양성을 확립하기 위하여 야생화들과 토양 등으로부터 약 1,900여 균주의 효모들을 분리, 동정한 결과 이들 지역간 야생화 종류에 따라 다양한 효모 중 다양성을 갖고 있음을 보고하였다[10-14]. 또한 이들의 산업적 응용을 위한 기초 연구로 이들의 향통풍성 xanthine oxidase 저해활성 등을 갖는 유용 효모들을 보고하였다[15].

위와 같이 야생효모들은 과거에는 주로 전통발효식품이나 이들의 원료로부터 분리, 동정되었고 최근에는 필자 등에 의해서 야생화들과 토양 등에서 분리되었다. 그러나 담수와 바다, 해안가 등지의 분리원에서는 일부 곰팡이들이 분리, 보고되었을 뿐 효모류의 분리, 동정 보고는 없거나 매우 미흡하다[16, 17]. 따라서 본 연구에서는 담수와 바닷물, 해변가와 이들 주변 토양의 효모 분포 특성을 조사하고자 우선 낙동강과 영산강 일부 지역의 물과 주변 토양 등을 수집하여 야생효모들을 분리, 동정하였다. 또한 이들 가운데 국내 미기록 효모들을 선별하여 몇 가지 특성을 조사하였다.

경북 상주시 중동면 하상리 낙동강과 전남 나주시 다시

Kor. J. Mycol. 2016 December, 44(4): 350-354

<https://doi.org/10.4489/KJM.2016.44.4.350>

pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249

© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

Received September 19, 2016

Revised November 13, 2016

Accepted November 21, 2016

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

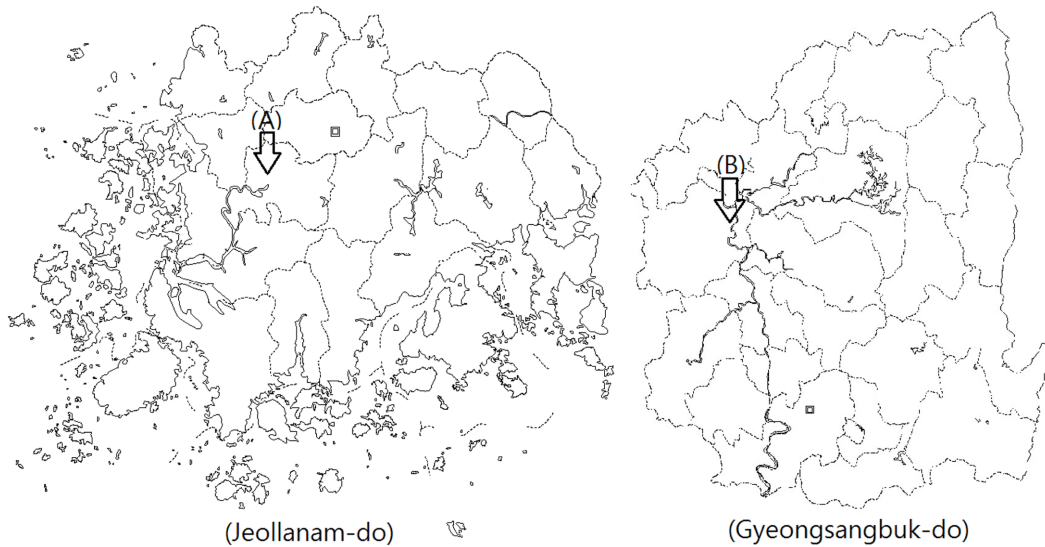


Fig. 1. Sampling sites in Yeongsan river (A) and Nakdong river (B), Korea.

면 죽산리 영산강(Fig. 1)의 담수 약 5 mL와 주변 토양 2 g 내외를 멸균 스패툴라로 채취하여 멸균 튜브에 넣고, 5 mL의 멸균수를 첨가한 후 1시간 동안 진탕하여 현탁액을 얻었다. 담수와 토양 현탁액 일부를 전보[12]의 방법에 따라 스트렙토마이신(50 µg/mL)과 앰피실린(50 µg/mL)이 들어 있는 yeast extract peptone dextrose (YPD) 배지에 도말하고 30°C에서 48시간 배양한 후 형성된 효모 집락들을 분리하였다.

효모들의 동정은 5.8S rDNA를 포함하는 internal transcribed spacer (ITS) 부위와 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열 상동성 비교법을 이용하여 전보[10]와 같이 실시하였다. 이와 같이 얻은 염기서열들을 NCBI의 BLAST를 사용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 효모들과의 분자생물학적 유연관계를 분석하여 동정하였다.

낙동강과 영산강 담수와 주변 토양들로부터 분리한 야생 효모들을 대상으로 국립생물자원관 DB와 RISS, PubMed 및 배재대학교 도서관 등의 한국 균학 관련 논문 자료들을 이용하여 국내에 아직까지 보고되지 않은 균주들을 확인하여 국내 미기록 효모로 최종 선별하였다.

또한 선정된 미기록 효모들에 대하여 전보[18]의 일반 미생물 실험방법 등을 이용하여 형태학적 특징과 배양 및 주요 생리적 특성 등을 조사하였다.

낙동강과 영산강 담수와 주변 토양으로부터 효모의 분리 및 동정

먼저 경북 상주시 중동면 하상리 낙동강의 담수와 주변 토양 등 10점을 수집하여 이들로부터 효모들을 분리하여 동정한 결과는 Table 1과 같다. 10점의 시료에서 모두 5주 3종의 효모들을 분리, 동정하였고 이들 중 *Aureobasidium pullulans* 균이 3주로 가장 많았고 *Candida* sp.와 *Rhodo-*

torula minuta 각각 1종씩 분리되었다.

또한, 전남 나주시 다시면 죽산리 영산강의 담수와 주변 토양 15점 시료로부터 효모를 분리 동정한 결과 *Cryptococcus bestiolae*가 3균주, *Lachancea thermotolerans*가 2주 등 4종 10균주의 야생효모들이 분리되었다(Table 1).

이와 같이 필자 등이 야생화에서 분리한 효모 균주들 [10-13] 보다 담수와 주변 토양에서 효모가 아주 적게 분리된 것은 일반적으로 미생물들이 생육할 수 있는 최저 수분 활성도(Aw)가 세균은 0.94~0.99인데 비해서 효모는 0.88~0.94로 낮은 점 [19], 물과 토양에는 대체로 탄소원이 적은 점 등의 환경요인에 의한 것으로 추정된다.

국내 미기록 효모들의 선별 및 특성

위와 같이 낙동강과 영산강 담수와 주변 토양에서 분리, 동정한 15주의 야생 효모들 중 아직까지 국내에 보고되지 않은 효모들을 선별한 결과 *Candida ghanaensis* JSF0127와 *Meira geulakonigii* JSF0130를 국내 미기록균들로 최종 선별하였다.

이들 국내 미기록 효모 균주들의 phylogenetic tree는 Fig. 2와 같고 이들의 형태적 특징을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 두 균 모두 출아법으로 영양증식을 하였고 포자를 형성하였으며 *Meira geulakonigii* JSF0130는 의균사를 형성하였다.

또한 미기록 효모균주 모두 potatoes dextrose 배지와 YPD 배지, yeast extract malt extract (YM) 배지 등에서 잘 생육하였고, 10% glucose를 함유한 YPD 배지에서 잘 생육하였으며 특히 두 효모 모두 5% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 내염성 효모들이었다.

위와 같이 선별한 국내 미기록 효모들에 대한 외국 학술지 발표 내용은 매우 미흡하여 Kurtzman [20]이 인도의

Table 1. Yeasts species isolated from freshwater and soils of Nakdong and Yeongsan rivers, Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genebank Sequence	Remarks
1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JSF0101	AY213693.1	Nakdong river ^a
		JSF0102	AY213693.1	
		JSF0103	AY213693.1	
2	<i>Candida</i> sp.	JSF0104	JN936885.1	
3	<i>Rhodotorula minuta</i>	JSF0105	FR870029.1	
4	<i>Cryptococcus bestiolae</i>	JSF0121	NG_042482.1	
		JSF0122	NG_042482.1	
		JSF0123	NG_042482.1	
5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JSF0124	AY213693.1	Yeongsan river ^b
6	<i>Lachancea thermotolerans</i>	JSF0125	JX129903.1	
		JSF0126	JX129903.1	
7	<i>Candida ghanaensis</i>	JSF0127	GU373764.1	
8	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	JSF0128	KT895982.1	
		JSF0129	GU373764.1	
9	<i>Meira geulakonigii</i>	JSF0130	GQ917048.1	

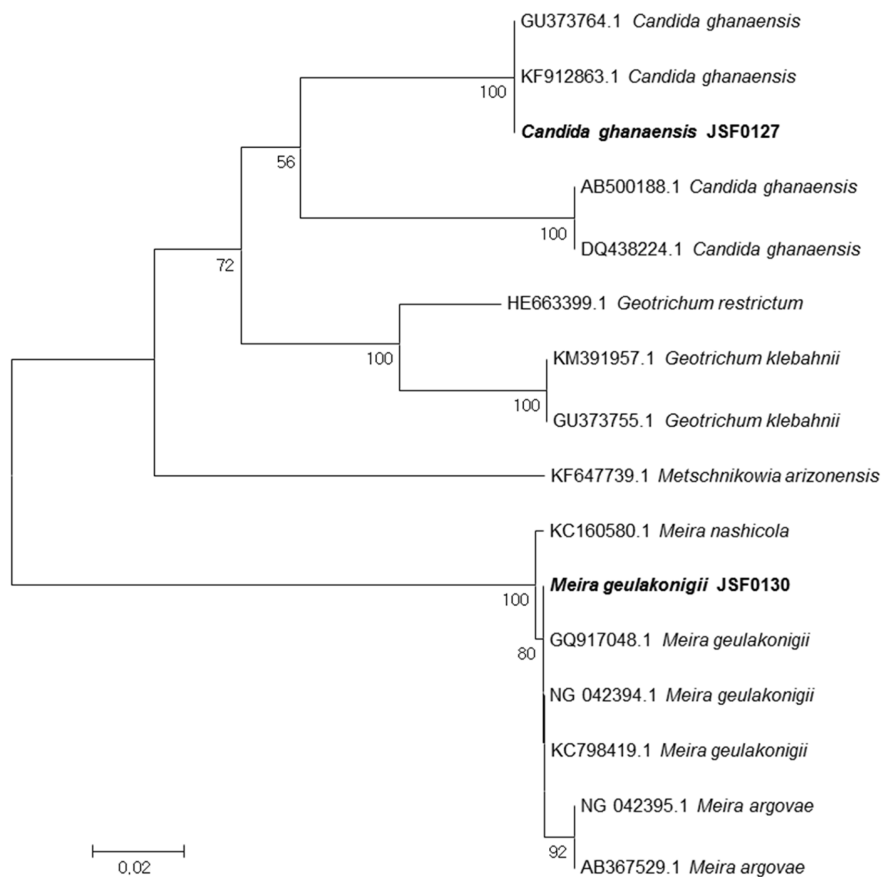
^aHasang-ri, Jungdong-myeon, Sangju-city, Gyeongsangbuk-do.^bJuksan-ri, Dasi-myeon, Naju-city, Jeollanam-do.**Fig. 2.** Phylogenetic tree of two unrecorded yeasts, *Candida ghanaensis* JSF0127 and *Meira geulakonigii* JSF0130, isolated from freshwater and soils of Nakdong and Yeongsan rivers based on the nucleotide sequences of large subunit 26S rDNA. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA7.

Table 2. Morphological characteristics of unrecorded yeast strains from Nakdong and Yeongsan rivers, Korea

	<i>Candida ghanaensis</i> JSF0127	<i>Meira geulakonigii</i> JSF0130
Morphological characteristics		
Shape	O	E
Vegetative reproduction	B	B
Size (μm)	1.4 × 1.7	0.4 × 1.0
Ascospore	+	+
Pseudomycelium	–	+
Cultural and physiological characteristics		
Growth on		
YM	+++	++
YPD	+++	++
PD	++	+++
vitamin-free medium	+	–
Color on YPD	C	C
Osmotolerance		
Glucose (%)	5	++
	10	+
	20	+
	50	–
NaCl (%)	1	+
	5	+
	10	–

O, oval; E, ellipsoidal; B, budding; +++, very good growth; ++ or +, good growth; –, no growth; C, cream color; YM, yeast extract malt extract medium; YPD, yeast extract peptone dextrose medium; PD, potato dextrose medium.

Ghana에 있는 토양에서 *Candida ghanaensis*를 처음으로 분리, 동정하여 보고하였다. 또한 *Meira geulakonigii*는 Yasuda 등 [21]이 일본 배 미숙과에 병을 일으키는 새로운 효모 유사 진균으로 분리하여 이들의 형태적, 생리적 특성 등을 조사하여 보고한 바 있다.

적 요

우리나라 주요 강 담수와 주변 토양 중의 야생효모 분포 특성을 조사하고자 먼저 낙동강과 영산강 일부지역의 담수와 주변 토양 25점을 수집하여 15균주 9종의 야생효모들을 PCR을 이용한 ITS 부위와 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열 상동성 비교법을 이용하여 동정하였다. 이들 가운데 *Aureobasidium pullulans*와 *Cryptococcus besioiae*가 각각 3균주로 가장 많이 분리되었고, *Lachancea thermotolerans*와 *Wickerhamomyces anomalus*도 각각 2주씩 분리되었다. 특히 *Candida ghanaensis*와 *Meira geulakonigii*는 국내 처음 보고되는 미기록 균주들로서 포자를 형성하였고, YPD 배지와 potatoes dextrose 배지 등에서 잘 생육하는 특성을 갖고 있었다. 또한 두 미기록 효모들은 5% NaCl을 함유한

YPD 배지에서 생육하는 내염성 효모들이었다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Nakdong-gang National Institute of Biological Resources (NNIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea.

REFERENCES

1. Lee JS, Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25:448-53.
2. Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 2004;14:1318-23.
3. Jeong SC, Lee DH, Lee JS. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:1904-11.
4. Min JH, Kim YH, Kim JH, Choi SY, Lee JS, Kim HK. Com-

- parison of microbial diversity of Korean commercial Makgeolli showing high β -glucan content and high antihypertensive activity, respectively. *Mycobiology* 2012;40:138-41.
5. Jang IT, Kim YH, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. *Kor J Mycol* 2011;39:227-8.
 6. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antidiem-entia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2007;42:83-8.
 7. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholin-esterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* 2008;36:102-5.
 8. Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor J Mycol* 2012;40:60-4.
 9. Lee JS, Hyun KW, Jeong SC, Kim JH, Choi YJ, Miguez CB. Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and physiological activities. *Can J Microbiol* 2004;50:489-92.
 10. Min JH, Ryu JJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Gyejoksan, Oseosan and Baekamsan of Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:47-51.
 11. Hyun SH, Mun HY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation of yeasts from wild flowers in Gyeonggi-do province and Jeju island in Korea and the production of anti-gout xanthine oxidase inhibitor. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
 12. Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of yeasts from wild flowers in Ulleungdo and Yokjido, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:28-33.
 13. Hyun SH, Han SM, Lee JS. Isolation and physiological functionality of yeasts from wild flowers in Seonyudo of Gogunsanyeoldo, Jeollabuk-do, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:201-6.
 14. Han SM, Hyun SH, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Deogyu mountain and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:47-52.
 15. Han SM, Hyun SH, Kim NM, Lee JS. Antioxidant activity and inhibitory activities of xanthine oxidase and tyrosinase of yeasts from wild flowers in Korea. *Kor J Mycol* 2015;43:99-103.
 16. Kim MC, Kang CK, Park HY, Lee DS, Kim YS, Lee WJ. Isotopic evidence of marine yeast to artificial cultural of *Moina macrocopa*. *Kor J Microbiol* 2006;42:111-5.
 17. Kim ML, Jeong JS, Lee GD. Change in growth of alcohol fermentation yeast with addition of deep seawater. *Kor J Food Preserv* 2003;10:417-20.
 18. Han SM, Hyun SH, Lee HB, Lee HW, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers collected around Jangseong lake in Jeollanam-do, republic of Korea, and characterization of the unrecorded yeast *Bullera coprosmaensis*. *Mycobiology* 2015;43:266-71.
 19. Kaplow M. Commercial development of intermediate moisture foods. *Food Technol* 1970;24:889-93.
 20. Kurtzman CP. Four new *Candida* species from geographically diverse locations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001;79:353-61.
 21. Yasuda F, Yamagishi D, Izawa H, Kodama M, Otani H. Fruit strain of Japanese pear caused by basidiomycetous, yeastlike fungi *Meira geulakonigii* and *Pseudozyma aphidis*. *Jpn J Phytopathol* 2007;73:166-71.