

RESEARCH NOTE

충남 서천군 갈대밭 주변 토양에서 야생효모의
분리 및 미기록종 특성한상민¹, 이상엽¹, 이향범², 이종수^{1*}¹배재대학교 바이오·의생명공학과, ²전남대학교 농식품생명화학부Isolation of Wild Yeasts from Soils of Reed Fields
in Seocheon-gun County, Chungcheongnam-do,
South Korea, and Characterization of Unrecorded
YeastsSang-Min Han¹, Sang-Yeop Lee¹, Hyang Burm Lee², Jong-Soo Lee^{1*}¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea²Environmental Microbiology Lab, Division of Food Technology, Biotechnology & Agrochemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Yongbong-Dong 300, Buk-Gu, Gwangju 61186, Korea

*Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr

Abstract

The goal of this study was to isolate wild yeasts from reed fields in the Seocheon-gun county in Chungcheongnam-do, South Korea. Molecular analysis of the D1/D2 domain of the 26S rDNA of the yeasts isolated from soil samples was performed using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). In total, 20 yeast strains from 11 species were isolated from 20 different soil samples. *Candida* species were observed to be the most common yeasts. Of these 20 strains, *Candida subhashii* (6 strains), *Candida tropicalis* (3 strains), *Candida boleticola* MS008, and *Lachancea thermotolerans* (2 strains) were identified as alcohol-fermenting yeasts. Further, *Bullera japonica* YJ10-1, *Candida subhashii* J7-1, *Kluyveromyces yarrowii* YJ11-1, and *Ustilago shanxiensis* Y10-1 were newly recorded yeast strains in Korea, and therefore, their microbiological characteristics were investigated further. All of these unrecorded yeast strains had oval cells; only *Candida subhashii* J7-1 formed ascospores and pseudomycelia. *Kluyveromyces yarrowii* YJ11-1 grew in vitamin-free medium, and all of these strains, except *Candida subhashii* J7-1, grew in 5% NaCl-containing YPD broth.

Keywords: Alcohol-fermenting yeasts, Reed field, Soils, Unrecorded yeasts, Wild yeast

효모는 진핵세포를 가지는 고등 미생물중의 하나로 최근까지는 주로 전통 발효식품들로부터 분리되었으며, 일부는 이들의 제조에 이용되어 왔다[1].

그러나 2000년대에 들어와 필자 등이 전국 각지의 야생화와 산, 논, 밭들의 토양 및 하천이

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 September, 45(3): 234-240
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170028>

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Received: 11 August, 2017

Revised: 23 August, 2017

Accepted: 24 August, 2017

© The Korean Society of Mycology



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.

나 연못, 강이나 바다 등의 토양 등으로부터 야생효모들을 분리, 동정하여 보고하였다[2-13]. 또한, 이들 중 국내에 보고되지 않은 미기록 효모들을 선별하여 이들의 균학적 특성을 조사하여 보고하였으나[8, 10, 12, 13]. 아직까지 하천과 바다가 만나서 특수한 생태환경을 가진 강 하구지역 토양에 존재하는 효모의 다양성 연구는 수행되지 않았다.

또한, 지금까지 국내에서 분리한 야생효모들의 산업적 활용을 위한 응용연구는 매우 미흡하여 필자 등이 야생효모로부터 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해물질 등 몇 가지 주요 생리 활성 물질 생산에 관해 보고하였을 뿐이다[3, 6, 7, 14, 15].

따라서 본 연구에서는 충남 서천군 한산면 신성리 갈대밭 토양의 야생효모 분포 특성을 알아보고 이들을 산업적으로 이용하기 위한 자료를 얻고자 이들 갈대밭 토양들로부터 야생효모들을 분리, 동정하였고, 이들 중 국내 미기록 효모들과 알코올 발효능을 가진 효모들을 선별하여 특성을 조사하였다.

충남 서천군 한산면 신성리 금강하구의 갈대밭 토양 20점을 무균적으로 수집하여 5 mL의 멸균수가 들어있는 튜브에 넣고 2시간 동안 진탕하였다. 이들 현탁액 0.1 mL를 스트렙토마이신(100 µg/mL)과 앰피실린(100 µg/mL)이 들어 있는 yeast extract peptone dextrose (YPD) 한천배지에 도말하고 30에서 48시간 배양한 후 효모 집락들을 분리하였다[5].

이들 분리 효모들의 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열들을 결정한 후 이들 염기서열들을 NCBI의 BLAST를 사용하여 데이터베이스상의 기등록 효모들과의 상동성 비교를 통해 동정하였다[6,7].

갈대밭 토양들로부터 분리한 야생효모들의 알코올 발효능을 YPD 배지에 Einhorn 관과 Durham 관을 이용하여 조사하였다. 이들 분리균들에 대하여 국립생물자원관 데이터베이스와 RISS, Pubmed 등의 한국 진균 관련 학술자료들을 이용하여 지금까지 국내에 미보고된 야생효모들을 선별하였고, 이들의 형태학적, 배양학적 특성 등을 조사하였다[8,10].

갈대밭 토양들로부터 야생효모의 분리 및 알코올 발효 야생효모의 선별

충남 서천군 신성리 갈대밭 주변토양에서 총 11종 20균주의 야생효모를 분리 및 동정하였다(Table 1). *Candida subhashii*가 6균주로 가장 많았고 *C. tropicalis*도 3균주가 분리되는 등 *Candida*속 균이 주로 분리되었다. 이 결과들은 다른 지역들의 토양들보다 시료를 채취한 갈대숲 토양들이 강과 인접해 있어 매우 다습하고 공기 유통이 적은 환경임에도 비교적 많은 다양한 야생효모들이 분리된 것으로 환경조건과 야생효모 분포간의 서식 특성을 규명하기 위한 추가의 연구가 요구된다.

분리된 효모들의 알코올 발효능을 조사한 결과 *C. tropicalis* (Y 5-1, Y6-1)와 *Lachancea thermotolerans* (MJS 007, MJS 019) 균주들이 강한 알코올 발효능을 보였고, *C. subhashii* (J7-1, 3과 J8-1, Y9-1,2,3)과 *C. boleticola* (MS008) 등도 알코올 발효력이 비교적 우수하였으며, *C. tropicalis* Y5-2도 약하게 알코올 발효능을 보였다(Table 2). 지금까지 알코올 발효 유용효모로는 각종 발효 식품이나 이들의 원료 등에서 분리된 *Saccharomyces cerevisiae*가 주로 알려져 있고 실제 주류 산업에서 이미 오래 전부터 사용되고 있으나[16, 17], 본 연구에서 새롭게 선별된 알코올 발효성 야생효모인 *C. subhashii*와 *C. tropicalis* 균주들은 일반적으로 xylose와 탄화수소 등을 자화시킬 수 있는 효모로 알려져 있으므로 앞으로 이들을 이용한

Table 1. Yeasts isolated from soils of reed field in Sinseong-ri, Seochon-gun, Chungcheongnam-do, Korea

No.	Putative species	Isolate no.	Related GenBank sequence	Identity	Remarks
1	<i>Bullera japonica</i>	YJ10-1	AB863498.1	609/613 (99%)	unrecorded
2	<i>Candida boleticola</i>	MJS008	KY106351.1	605/612 (99%)	
		MJS020	KY106351.1	602/612 (98%)	
3	<i>Candida</i> sp.	MJS006	EF550308.1	579/582 (99%)	
4	<i>Candida subhashii</i>	J7-1	EU836708.1	605/615 (98%)	unrecorded
		J7-3	EU836708.1	609/615 (99%)	
		J8-1	EU836708.1	607/615 (99%)	
		Y9-2	EU836708.1	608/616 (99%)	
		Y9-3	EU836708.1	606/617 (98%)	
		Y9-1	EU836708.1	611/614 (99%)	
5	<i>Candida tropicalis</i>	Y5-1	KY711241.1	610/613 (99%)	
		Y5-2	KY711241.1	610/614 (99%)	
		Y6-1	KY711241.1	610/616 (99%)	
6	<i>Cryptococcus albidus</i>	MJS009	KY106963.1	618/624 (99%)	
7	<i>Cystobasidium slooffiae</i>	Y10-2	AB566328.1	635/642 (99%)	
8	<i>Kluyveromyces yarrowii</i>	YJ11-1	AY048170.1	610/615 (99%)	unrecorded
9	<i>Lachancea thermotolerans</i>	MJS019	XR_002432231.1	609/615 (99%)	
		MJS007	XR_002432231.1	608/614 (99%)	
10	<i>Rhodotorula toruloides</i>	J9-2	KY109172.1	610/617 (99%)	
11	<i>Ustilago shanxiensis</i>	Y10-1	KY109996.1	634/650 (98%)	unrecorded

Table 2. Alcohol fermenting yeasts from soils of reed field in Sinseong-ri, Seochon-gun, Chungcheongnam-do, Korea

No.	Putative species	Isolated no.	Alcohol fermentation
1	<i>Candida subhashii</i>	J7-1	++
		J7-3	++
		J8-1	++
		Y9-2	++
		Y9-3	++
		Y9-1	++
2	<i>Candida tropicalis</i>	Y5-1	+++
		Y5-2	+
		Y6-1	+++
3	<i>Lachancea thermotolerans</i>	MJS019	+++
		MJS007	+++
4	<i>Candida boleticola</i>	MJS008	++

바이오 에탄올 생산 등에 매우 유용할 것이다. 또한 *L. thermotolerance* (MJS007, MJS019)는 고온성 효모로 알코올 발효시 품온상승에 의한 효모의 노화로 야기되는 발효 후반부의 발

효능 저하를 해결할 수 있고 개방식 발효 중 잡균 오염을 예방할 수 있는 이점이 알려져 있어 [18], 산업적으로 유용한 효모로 생각한다.

국내 미기록 야생효모들의 선별 및 특성

신성리 갈대밭 토양에서 분리한 야생효모들 중 *Bullera japonica* YJ 10-1, *Candida subhashii* Y7-1, *Kluyveromyces yarrowii* YJ11-1, *Ustilago shanxiensis* Y10-1 등 4균주가 국내 미기록 효모 균주들로 최종 동정되었다. 이들 국내 미기록 효모 균주의 계통학적 관계 (Fig. 1) 및 대표적인 균학적 특성이 조사되었다 (Table 3). 이들 세포의 형태는 구형으로 출아에 의해 영양증식을 하였고 *C. subhashii* Y7-1 균주만이 자낭포자와 의균사를 형성하였다. *K. yarrowii* YJ11-1 균주만이 비타민을 첨가하지 않은 YPD 배지에서도 생육하였고 *C. subhashii* Y7-1은 YM, YPD 배지, 그리고 5% NaCl를 함유한 YPD 배지에서 생육하지 못하였다.

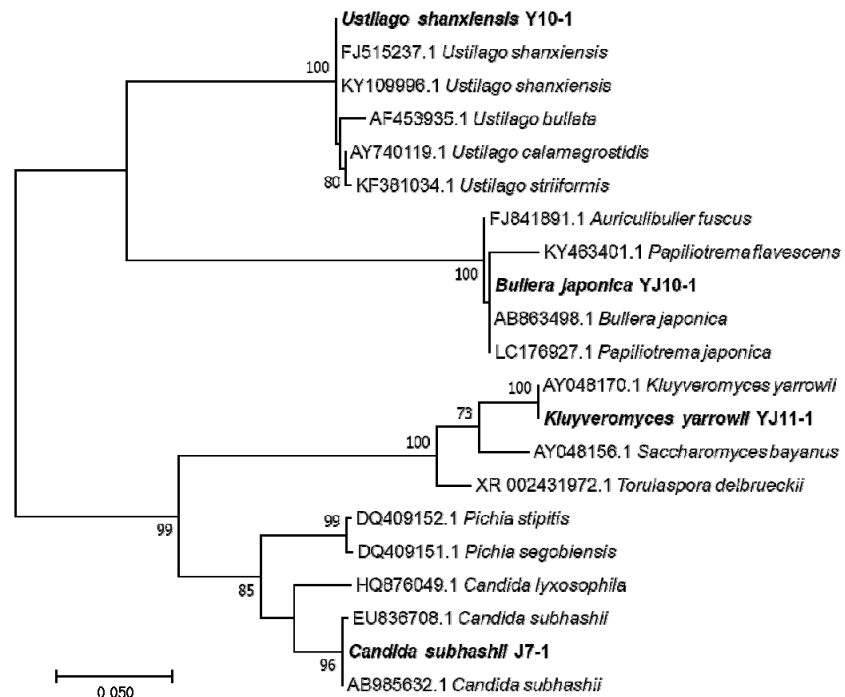


Fig. 1. Phylogenetic tree of the unrecorded yeasts isolated from soils of reed field in Sinseong-ri based on the D1/D2 sequences of the large subunit (26S) ribosomal DNA. The tree was generated by the maximum likelihood method, using MEGA 7.

이들 국내 미기록 효모들에 대한 외국 학술지 보고로 Sampaio 등[19]은 분자계통학적 방법으로 전에 *Bullera alba*로 동정되었던 균을 *Bullera japonica*로 재동정하여 보고하였다. Hilber-Bodmer 등[20]은 *B. japonica*가 식물 병원성 균을 방제할 수 있는 경쟁성 길항 토양 효모임을 제시하였다. Belloch 등[21]은 미토콘드리아 cytochrome-c oxidase II 유전자 염기 서열을 이용하여 *Kluyveromyces phaffii* 그룹의 균으로 *K. yarrowii*를 재동정하였다. 또한 U.

shanxiensis (*Pseudozyma shanxiensis*와 이명)는 콩기름으로부터 계면 활성제인 새로운 형태의 mannosylerythritol 지질 생산균으로 보고되었다[22].

Table 3. Characteristics of the unrecorded yeasts from soils of reed field in Sinseong-ri, Seocheon-gun, Chungcheongnam-do, Korea

Genus	<i>Bullera japonica</i>	<i>Kluyveromyces yarrowii</i>	<i>Ustilago shanxiensis</i>	<i>Candida subhashii</i>
Isolate no.	YJ10-1	YJ11-1	Y10-1	J7-1
Morphological characteristics				
Shape	O	O	O	E
Vegetative reproduction	B	B	B	B
Size (μm)	0.8 × 1.8	0.5 × 1.7	0.8 × 1.0	0.2 × 1.5
Ascospores	-	-	-	+
Pseudomycelia	-	-	-	+
Cultural characteristics				
Growth on YM/YPD media	++/+++	++/-	++/++	-/-
Growth/color on YPD medium	+++ / C	+++ / C	+++ / C	+++ / C
Growth on vitamin-free medium	-	++	-	-
Growth on 50% glucose-YPD medium	-	-	-	-
Growth on 5%/10%/20% NaCl-YPD medium	+/-/-	+/-/-	+/-/-	-/-/-
Growth on temp/pH range	25~30°C/pH 6~7	25~30°C/pH 6~7	20~30°C/pH 6~7	25~37°C/pH 6~7

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.

지금까지 강이나 호수, 바다와 인접해있는 숲이나 늪지대에서 효모 분포 특성에 대한 연구는 실시되지 않았다. 따라서 본 연구 결과들은 앞으로 국내의 이와 유사한 지역 토양에 서식하는 균류의 종 다양성 연구와 이들의 산업적 응용 연구 등에 기초 자료로 활용 될 수 있을 것으로 생각한다.

적 요

충남 서천군 한산면 신성리 금강하구 갈대밭 토양의 야생효모 분포특성을 알아보기 위하여 갈대밭 토양 20점을 채취하여 야생효모들을 분리하여 총 11종 20균주의 야생효모를 동정하였다. *Candida*속의 효모가 10균주로 가장 많이 분리되었고, 그 중 *Candida subhashii* 균이 6균주로 가장 많았다. 분리된 균주 중에서 *Candida tropicalis* (Y5-1, Y5-2, Y6-1), *Candida subhashii* (J7-1, J7-3, J8-1, Y9-1, Y9-2, Y9-3), *Lachancea thermotolerans* (MJS 007, MJS 019) 균주 등 12균주들이 알코올 발효능을 보였다. *Bullera japonica* YJ10-1, *C. subhashii*

J7-1, *Kluyveromyces yarrowii* YJ11-1, *Ustilago shanxiensis* Y10-1 등 4균주들이 국내 미기록 효모 균주들로 최종 선별되었다. 이들 국내 미기록 균주들은 구형으로 *Candida subhashii* J7-1만이 자낭포자와 의균사를 형성하였다. *Kluyveromyces yarrowii* YJ11-1은 비타민을 함유하지 않은 배지에서도 생육하였고 *Candida subhashii* J7-1는 YM과 YPD 배지 및 5% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생장하지 않았다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), 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. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25: 448-53.
2. 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.
3. 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. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
4. 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.
5. Hyun SH, Lee JK, Park WJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of yeasts from fruits and flowers of orchard in Sinam-myeon of Yesan-gun, Chungcheongnam-do, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:21-7.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Han SM, Han JW, Bae SM, Park WJ, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from soils of paddy fields in Daejeon metropolitan city and Chungcheongnam-do, Korea. *Kor J Mycol* 2016;44:1-7.
10. Han SM, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from soils of an herb park in Seoul metropolitan city and characteristics of unrecorded yeasts. *Kor J Mycol* 2016; 44:108-12.
11. Han SM, Lee SY, Kim HK, Lee JS. Characterization of wild yeasts isolated from leaves obtained from Mt. Daedun and Mt. Chilgap, Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:31-42.

12. Han SM, Lee JS. Characterization of unrecorded yeasts Isolated from leaves of trees of Oknyeobong peak and Yeonjasan mountain in Daejeon, Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:23-30.
13. Han SM, Kim HK, Lee HB, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from freshwaters and soils of Nakdong and Yeongsan river, Korea, with characterization of two unrecorded yeasts. *Kor J Mycol* 2016;44:350-4.
14. Hyun SH, Han SM, Kim HK, Lee JS. Yeast diversity of wild flowers in mountains of Korea and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:137-41.
15. Han SM, Jeon SJ, Lee HB, Lee JS. Screening of -aminobutyric acid (GABA)-producing wild yeasts and their microbiological characteristics. *Kor J Mycol* 2016;44:87-93.
16. Song JH, Baek SY, Lee DH, Jung JH, Kim HK, Lee JS. Screening of fungal Nuruk and yeast for brewing of Gugija-Liriope tuber traditional rice wine and optimal fermentation condition. *Kor J Mycol* 2011;39:78-84.
17. Lee DH, Kang HY, Lee YS, Cho CH, Kim SJ, Lee JS. Effects of yeast and Nuruk on the Quality of Korean Yakju. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2011;39:274-80.
18. Kim JH, Kim NM, Lee JS. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from taditional Meju. *Korean J Food Nutr* 1999;12:490-5.
19. Sampaio JP, Inácio J, Fonseca A, Gadanho M, Spencer-Martins I, Scorzetti G, Fell JW. *Auriculibuller fuscus* gen. nov., sp. nov. and *Bullera japonica* sp. nov., novel taxa in the Tremellales. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:987-93.
20. Hilber-Bodmer M, Schmid M, Ahrens CH, Freimoser FM. Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify *Candida subhashii* as a novel antagonist of filamentous fungi. *BMC Microbiol* 2017;17:4.
21. Belloch C, Querol A, García MD, Barrio E. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:405-16.
22. Fukuoka T, Morita T, Konishi M, Imura T, Kitamoto D. Characterization of new types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced from soybean oil by a basidiomycetous yeast, *Pseudozyma shanxiensis*. *J Oleo Sci* 2007;56:435-42.