

발효차로부터 효모의 분리 및 동정

강옥주*

경남대학교 식품영양학과

Isolation and Identification of Yeast Strain from Fermented Tea

Ok-Ju Kang*

Department of Food and Nutritional Science, Kyungnam University

Abstract

In searching for yeast to be utilized as biocontrol agents, a single yeast strain was isolated from *Camellia sinensis* based on its morphological, cultural, physiological, and biochemical properties, as well as by molecular techniques. This single strain was pink to red in color and designated as strain JY-1. The effects of temperature, pH, NaCl concentration, and ethanol concentration on the growth of the JY-1 strain were examined for the JY-1. Growth occurred at temperatures ranging from 20 to 35°C, and between pH 3.0 and 12.0, with optimal growth at 25-30°C and pH 5.0. The yeast also grew in the presence of 0-2% (w/v) NaCl and 0-4% (v/v) EtOH. The isolate was further classified based on biochemical characteristics using the VITEK system. The biochemical data obtained using this system were similar to those of *Rhodotorula glutinis/Rhodotorula mucilaginosa* (exhibiting a 93% matching level). Molecular phylogenetic analysis based on 18S rDNA sequences indicated that the yeast represented a basidiomycetous species, and its highest degree of sequence similarity was with *Rhodosporidium azoricum*, strain JCM11251 (99%).

Key words: fermented tea, identification, isolation, yeast

I. 서 론

현재 전 세계에서 생산되고 있는 차는 대략적인 집계만으로도 수 백 여종을 헤아린다. 우리나라에도 몇 년 전부터 다양한 종류의 차가 수입, 판매되고 있어 차인들의 기호를 만족시키고 있다. 우선 ‘차(茶)’라고 하면 차나무(*Camella Sinensis*)의 어린 쑥이나 잎을 음용하기 좋게 가공한 것을 말한다(김종태 1996). 중국 사천성과 운남성 등을 중심으로 발전되기 시작한 차 가공법은 현재 전 세계적으로 수백 여종에 이르는 차를 탄생시켰다. 차나무의 품종, 차를 만드는 계절과 방법, 형상과 풍미가 달라 다양한 종류의 차가 생산이 되고 있는데 통상적으로 발효 정도에 따라 구분하는 것이 일반적이다. 차는 발효 정도에 따라 발효를 전혀 시키지 않은 불발효차, 발효 정도가 12-55% 사이인 것을 약발효차와 반 발효차, 발효를 85% 이상 시킨 것을 발효차라고 한다(정동효와 김종태 2003). 차의 발효란 찻잎의 산화 효소

작용과 효모, 곰팡이 등의 미생물들을 이용하게 된다. 오랜 시간 동안 찻잎을 쌓아 두거나 또는 발효를 유도하여 미생물들의 작용이 일어나도록 한다. 이때 자연 발생적으로 생기는 효모, 곰팡이의 작용에 의해서 차는 향과 맛이 결정되는데 대체적으로 발효차는 일반녹차의 찬 성질에 비해 비교적 순하며 누구나 부담 없이 섭취 할 수 있고 다양한 맛에 대한 소비자의 요구가 증대되면서 발효차에 대한 관심도가 높아지고 있다. 그러나 이때 발효에 관여하는 미생물은 곰팡이 *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속 정도로만 알려져 있고 효모는 어떤 종인지 아직 연구가 매우 미비한 실정이다(정동효와 김종태 2003). 최근 생명공학의 발전과 더불어 연구의 기초가 되는 미생물 균주의 확보에 대한 중요성이 널리 인식되고 있으며, 미생물 탐색에 대한 관심과 필요성이 증대되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이미 널리 시판되고 있는 발효차에 있는 효모균종을 순수 배양하여 다양한 효모균주 자원을 확보하려는 일환으로 효모를 분리 동정하고, 그 균학적 특성을 조사하였다(Sujaya IN 등 2004). 분리된 균주의 형태학적 및 생리학적 (Lodder J와 Kreger-van R 1952, Yarrow D 1998), 생화학적 특성 등 각종 미생물학적 특성과 18S rDNA의 부분 염기서열을 이용하여 이미 동정된 균주들의 결과와 비교, 분석함으로써 최

*Corresponding author: Ok-Ju Kang, 449, Wolyoung-Dong Masan, Kyungnam, 631-701, Korea
Tel: 82-55-249-2235
Fax: 82-55-244-6504
E-Mail: koj117@kyungnam.ac.kr

종 동정하였다(Choi OJ와 Choi KH 2002, White TJ 등 1990). 또한 분리 동정된 효모의 배지조성 및 배양방법 및 배양조건에 대하여 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료, 사용배지 조건

본 실험재료인 발효차는 2006년 4월에 전남 순천시 명설원에서 생산한 것을 구입하여 사용하였다. 효모 분리용 배지로 penicillin과 streptomycin을 각각 50 μ g/mL 함유한 PDA (1% potato extract, 2% dextrose, 1.5% agar, Becton, Dickinson and Company, USA) 배지를 이용하였다.

2. 효모균주의 순수분리 및 보존

발효차 1g을 멸균한 생리식염수(0.85% w/v NaCl) 용액 10mL에 첨가하여 혼탁한 다음 10분 동안 병치한다. 십진법으로 순차적으로 희석한 후 penicillin과 streptomycin을 각각 50 μ g/mL 함유한 PDA 평판배지에 각각 도말하고 30°C에서 18시간 이상 배양 후 효모로 추정되는 균들을 1차로 분리한다. 분리 균주들은 PDA 평판배지에 옮겨 5회 계대 배양한 다음 단일 효모균주를 분리, 보관하였다. 이때 분리된 효모는 4°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

1) 분리균주의 분류 및 동정

분리 균주의 분류학적인 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 생리학적, 생화학적인 제반 특성을 효모의 분류동정법 “The Yeast a Taxonomic Study” Kreger-Van R(1984)과 Barnett JA(2000)에 따라 조사한 후 Lodder J와 Kreger-Van R(1952)과 Yarrow D(1998) 법으로 동정하였다. 선발된 효모 균주의 형태학적 분류 방법에서는 penicillin과 streptomycin을 각각 50 μ g/mL 함유한 PDA(potato extract 0.5%, dextrose 2%, agar 1.5%) 고체배지에서 생육한 집락의 크기, 모양과 색깔 등을 관찰하고, 광학현미경(CX-40, OLYMPUS, Japan)으로 자낭포자의 형성 유무, 단세포의 형태 등을 관찰하였다.

2) 효모의 일반적 특성 조사

효모의 PDA 고체배지에서의 집락특성, PD(1% potato extract, 2% dextrose) 기본 액체배지에서의 배양특성, 염의 농도에 따른 생육조건, 최적 pH, 최적 온도, ethanol 농도에 따른 특성은 Lodder J(1952) 와 Yarrow D(1998) 의 방법을 참고하여 실험하였다.

3) 영양세포의 특징

PDA 배지 상에서 2일간 배양하여 활성화 시킨 효모를 2% glucose-yeast extract-peptone water(glucose 20g, yeast extract 5g, peptone 10g, D.W. 1 L)에 접종한 다음 25°C에서 3일간 배양하여 세포형태와 증식방법을 관찰하였다.

4) 당류 발효성 시험

Yeast nitrogen base(Difco사, USA) 배지가 들어 있는 Durham관에 미리 filter로 여과 제균한 당 용액을 넣고 PD (1% potato extract, 2% dextrose) 배지에서 전 배양한 효모균체를 원심분리 하여 멸균수로 세척한 후, 그 혼탁액을 접종하여 25°C에서 72시간 배양하면서 가스 발생여부에 의해 발효성을 판정하였다.

5) 자화성 시험

API Kit(ID 32C)와 자동화 쿠주동정기계 VITEK system (Vitek-II compact, Biomerieux Inc., France)을 이용(2회 실시)하여 효모를 1백금이 접종한 후 25°C에서 48시간 동안 배양한 후 자화성 유무를 판별하였다.

3. DNA의 추출 및 정제

분리된 균주로부터 chromosomal DNA 분리는 GenExTM Genomic Sx genomic DNA extraction kit(General Biosystem, Korea)를 사용하여 분리하고, 분리된 genomic DNA는 18S rDNA sequencing을 위한 template로 사용하였다.

1) 18S rDNA의 PCR 증폭

효모 균종의 분류가 가능한 부위 2 곳을 forward primer; NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')와 reverse primer; ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')을 사용하여 18S rDNA site를 증폭하였다(White TJ 등 1990). PCR 반응은 5U의 Taq polymerase, 10mM dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂를 포함하는 PCR 혼합물을 이용하였다. PCR은 first denature 95°C(5분), 30 cycle로 denaturation 95°C(60초), annealing 55°C(45초), extension 72°C(5분)으로 수행하였다(Model 9600 thermocycler, PE Applied Biosystems, Washington USA).

2) 18S rDNA의 염기서열분석

증폭된 PCR 산물은 1.0% agarose gel에 전기영동한 후 DNA 단편을 회수하였다, 염기서열분석은 DNA sequencing 대행업체인 Solgent(Korea)의 자동염기서열 분석 장치 ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analysis(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분석의뢰 하였다. 결정된 18S rDNA의 염기서열은 Genebank의 Blast program을 이용하여 이미 Genebank에 등록되어 있는 18S rDNA의 염기서열과 상동성을 비교하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 gene bank database와 비교 분석하여 동정하였다.

III. 결과 및 고찰

본 실험에서 분리, 동정한 효모균주의 균학적 성질과 특성 및 효모의 배양 조건을 조사하였다. 지금부터 순수 분리

한 효모균종의 명명은 JY-1이라 하였다.

1. 균주의 분류학적 성질

1) 형태학적 성질

Penicillin과 streptomycin을 각각 50 µg/mL 함유한 PDA (potato extract 0.5%, dextrose 2%, agar 1.5%) 고체배지에서 생육한 JY-1의 세포 형태는 Fig. 1 및 Table 1과 같다. 형태는 ovoid 형이었으며, 출아법에 의한 생식과 colony color 는 pink에서 red 사이였다.

2) 생리학적 성질

Lodder(1952)의 방법에 준하여 본 효모에 대한 생화학적 검사 결과는 Table 1과 같다. D-glucose, D-rafinose, D-sorbitol, sucrose은 양성반응을 나타내었고 나머지 당 성분은 음성을 나타내었다. VITEK system의 실험 결과와 비교하여 볼 때 JY-1 균주는 *Rhodotorula glutinis* 및 *Rhodotorula mucilaginosa* 와 약 93%의 유사성을 보였다.

2. 순수 분리된 효모의 배양조건 및 배양상의 특징

1) 염의 농도에 따른 생육조건

JY-1 균주의 내염성 생육조건에서는 NaCl 농도가 2%(w/v) 일 때 생육이 저하되었음을 알 수 있었다(Fig. 2).

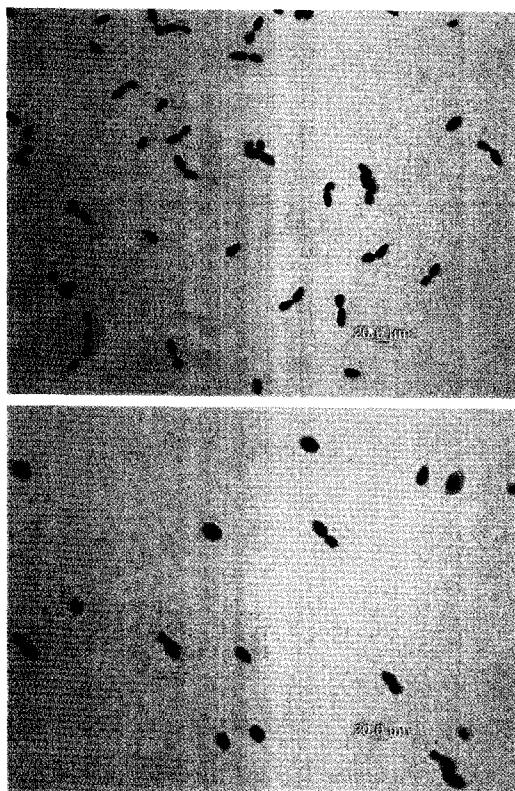


Fig. 1. Phase-contrast micrographs of the strain JY-1 (Magnification: ×1,000). The cells were cultured in PDA medium plate for 24 hr at 30°C.

Table 1. Characteristics of the isolated strain JY-1.

Characteristics	
Morphological characteristics:	
Shape	Ovoid
Vegetative reproduction	Budding
Colony color	Pink to red
Optimum temperature (°C)	25-30
Optimum pH	5.0
Biochemical characteristics ³⁾ :	
Assimilation test:	
2-Keto-D-gluconate	-
D-Cellobiose	-
D-Galactose	-
D-Glucose	+ ¹⁾
D-Melezitose	- ²⁾
D-Rafinose	+
D-Sorbitol	+
D-Trehalose	-
D-Xylose	-
Glycerol	-
Lactose	-
L-Arabinose	-
N-Acetyl-glucosamine	-
Sucrose	+
Selected organism (VITEK system)	<i>Rhodotorula glutinis/Rhodotorula mucilaginosa</i> (93%)
18S rDNA sequence analysis (similarity, %)	<i>Rhodosporidium azoricum</i> (99%)

+¹⁾, positive; -²⁾, negative; ³⁾, VITEK system was used.

2) 최적 pH

JY-1 균주의 생육에 미치는 pH를 조사하기 위하여 기본 배지를 pH 3-7은 citrate-phosphate buffer, pH 7-8은 phosphate buffer, pH 8-9는 Tris(hydroxymethyl) aminomethane buffer, pH 9-11은 glycine-NaOH buffer로 조정하였다. 생육에 적합한 배지의 초기 pH를 3.0에서 11.0까지 각각 조성하여 30°C에서 2일간 배양하여 조사하였다. 그 결과 최적 pH는 5.0이었다(Fig. 3).

3) 최적 온도

최적의 생육온도는 PD 배지의 초기 pH를 5.0으로 조정하여 20°C, 30°C, 40°C에서 2일간 220rpm에서 진탕 배양하면서 600nm에서 흡광도를 측정하여 최종 검토한 결과 Fig. 4에서와 같이 최적 온도범위는 25°C에서 30°C를 나타내었다.

4) Ethanol 농도에 따른 생육조건

각 에탄올 농도를 0에서 10%(v/v)까지 조정하여 실험한 결과 3%의 농도에서 생육조건이 저하되어 4% 일 때 생육이 거의 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 5).

5) JY-1 균주의 기질분해력 시험

기질분해력의 정도를 알아보기 위하여(Porter N와 Fox FM, 1993) JY-1 균주를 Skim milk-PDA medium plate에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 결과 Fig. 6에서 보듯이 Rhodo를 중심으로 한 기질분해 영역을 나타내었다.

6) JY-1 균주의 당 발효성 시험

당 발효성 실험의 결과는 Table 2와 같다. Fructose, D-glucose, maltose, raffinose, sucrose 만 양성 반응을 나타내었다.

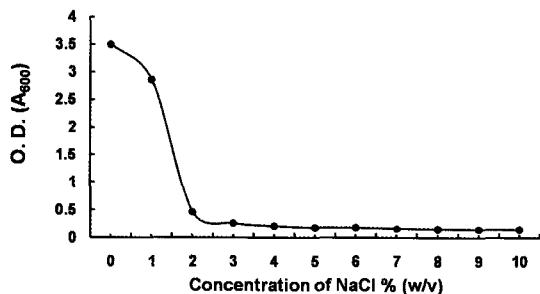


Fig. 2. The effect of NaCl concentration on growth of the strain JY-1. Cells were cultured at 30°C for 16 hr in PD broth containing various concentration of NaCl.

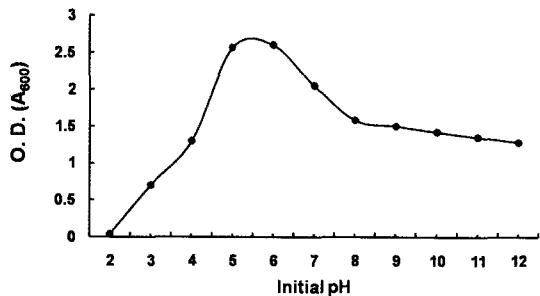


Fig. 3. The effect of initial pH on growth of the strain JY-1 in PD broth at 30°C and at the various pH buffer. Cell growth was monitored by measuring the O.D. 600.

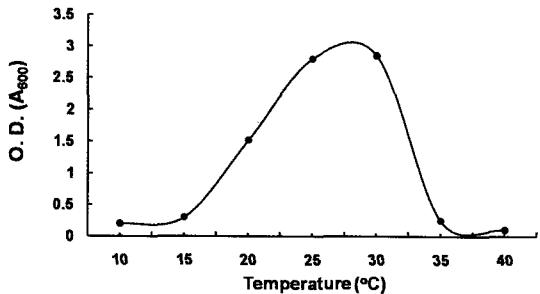


Fig. 4. The effect of temperature on growth of the strain JY-1 in PD broth at pH 5.0 and at the various temperature. Cell growth was monitored by measuring the O.D. 600.

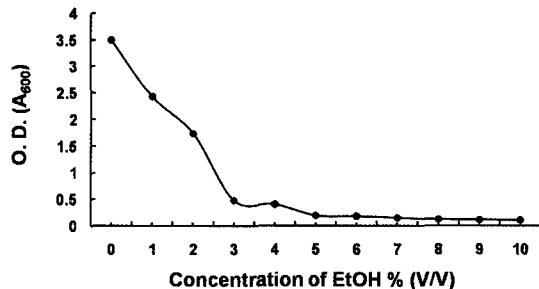


Fig. 5. The effect of ethanol concentration on growth of the strain JY-1. Cells were cultured at 30°C for 16 hr in PD broth containing various concentration of ethanol.

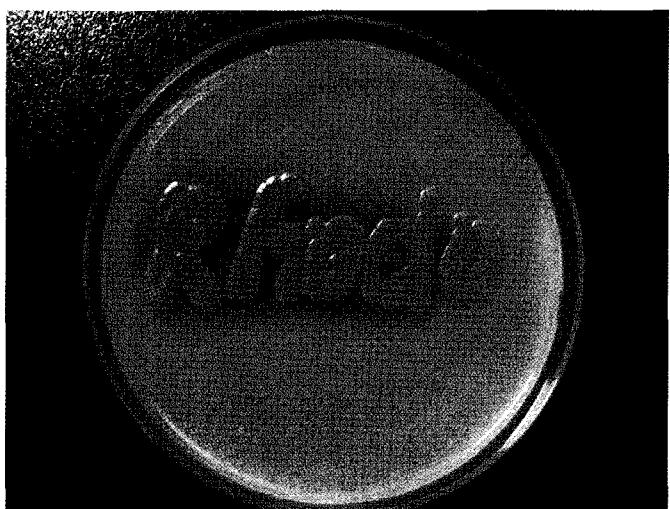
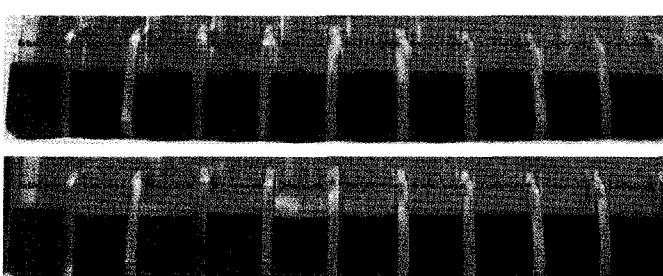


Fig. 6. The halozone of hydrolysis of the strain JY-1 on skim milk agar. The cells were grown on Skim milk-PDA medium plate at 30°C for 24 hr.

Table 2. Fermentation of the isolated strain JY-1

Compounds	JY-1	Compounds	HY-1
Fructose	+ ¹⁾	Raffinose	+
D-galactose	- ²⁾	Solublestarch	-
D-glucose	+	Sucrose	+
Lactose	-	Trehalose	-
Maltose	+	Inulin	-
Melezitose	-	Nelumbo	-
Cellobiose	-	Xylose	-

+¹⁾, positive; -²⁾, negative



3. 18S rDNA의 분석에 의한 동정법

JY-1 균주의 DNA를 추출하여 PCR로 18S rDNA를 부분적으로 증폭하여 염기서열을 분석하였다. Saitou N(1987)와 Thompson J.D 등(1997)의 분석 방법에 의해서 18S rDNA 염기서열과 CLUSTAL-X로 비교한 후 evolutionary distance 및 molecular phylogenetic tree를 작성한 결과는 Fig. 7과 같다. JY-1 균주는 *Rhodosporidium azoricum* JCM11251과 99%의 유의성을 나타내었다(Barnett JA 등 2000).

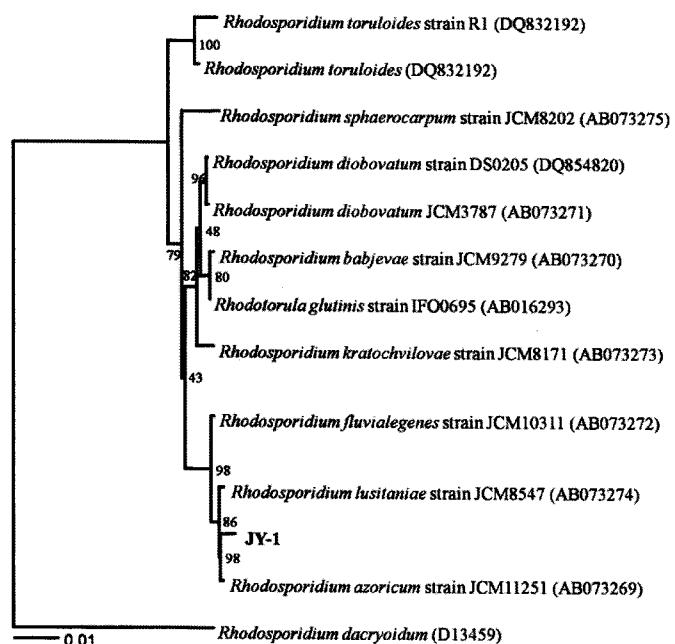


Fig. 7. Phylogenetic tree based on partial 18S rDNA sequences, showing the relationship between the isolated strains and other species belong to the genus *Rhodosporidium*. The accession numbers are in parentheses. The tree was constructed using the CLUSTAL-X and neighbour-joining method. Scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) determined from 100 resampled data.

IV. 요약

발효차로부터 분리 동정한 JY-1 효모는 18S rDNA 유전자 분석에서는 *Rhodosporidium azoricum*과의 유의성 99%, 생화학적 분석 VITEK system에서는 *Rhodotorula glutinis*/*Rhodotorula mucilaginosa*와 93%의 유의성을 나타내었다. 배양조건에서 최적의 온도는 25-30°C, pH는 5.0이었으며 염의 농도는 2%, 최적의 에탄올 농도는 4%이었다. 일반적인 실험결과에서도 *Rhodosporidium* 속의 특이성과 비교하여 보았을 때 형태적, 생리적, 생화학적 유사성을 나타내었다. 이상의 결과에서 앞으로의 연구과제는 많이 음용되고

있는 발효차와 관련한 또 다른 미생물군을 분리 동정하여 우수한 균주를 확보하는데 있으며 이를 이용한 발효차 음료산업 개발에 목적을 두고 있다.

감사의 글

본 연구는 2006학년도 경남대학교 학술연구장려금의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김종태. 1996. 차의 과학과 문화. 도서출판 보림사. pp 8-153
 정동효, 김종태 2003. 차의 과학. 대광서림. 서울. pp 51-53
 Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. 2000. Yeasts : Characteristics and identification, 3rd ed. Cambridge Universitiy Press. Cambridge, UK.
 Choi OJ, Choi KH. 2002. The phyicochemical properties of korean wild tea (Green tea, Semi-fermented tea, and Black tea) according to degree of fermentation. J Korean Soc Food Sci Nutr 32(3):356-362
 Kreger-van RN. 1984. The yeast, a taxonomic study, 3rd ed. Elsevier science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands. pp 399-413
 Lodder J, Kreger-van RN. 1952. The yeasts. 2nd ed. North Holland Publishing Co. Amsterdam, Netherlands. p 713
 Porter N, Fox FM. 1993. Diversity of microbial products-discovery and application. Pestic Sci 39:161-168
 Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol Biol Evol 4: 406-425
 Sujaya IN, Antara NS, Sone T, Tamura Y, Aryanta WR, Yokota A, Asano K, Tomita F. 2004. Identification and Characterization of Yeasts in Brem, a Traditional Balinese Rice Wine. World Journal of Microbiol Biotechnol 20:143-150
 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 24:4876-4882
 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis N., Gelband D., Sninsky J. and White T. eds, PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York, New York, U.S.A. pp 315-322
 Yarrow D. 1998. Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts. In: Kurtzman C.P. and Fell JW. eds, The Yeasts: A Taxonomic Study 4th ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands. pp 77-100

(2007년 11월 16일 접수; 2007년 12월 28일 채택)