

RESEARCH ARTICLE

반날개과 곤충 장으로부터 야생 효모의 분리 및 국내 미기록 효모들의 균학적 특성

이상은, 한주현, 김명겸*
서울여자대학교 생명환경공학

Separation of Wild Yeast from Intestine of *Othius punctulatus* and Microbiological Characteristics of Unrecorded Wild Yeast Strains in Korea

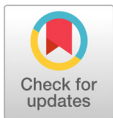
Sang Eun Lee, Joo Hyun Han, Myung Kyum Kim*
Department of Bio & Environmental Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea

*Corresponding author: biotech@swu.ac.kr

ABSTRACT

The goal of this study was to isolate and identify the wild yeast strains in intestine of *Othius punctulatus* collected in Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, Korea and characterize their unrecorded yeast strains. We isolated 16 wild yeast strains from 5 intestine samples from *Othius punctulatus*. The 16 wild yeast strains were included three strains in the genus *Aureobasidium*, four strains in the genus *Cystofilobasidium*, one strain in the genus *Mrakia*, three strains in the genus *Naganishia*, two strains in the genus *Saitozyma*, two strains in the genus *Sampaiozyma* and one strain in the genus *Scheffersomyces*. Among them *Cystofilobasidium capitatum* YP53, *Cystofilobasidium capitatum* YP71, *Cystofilobasidium macerans* YS620, *Cystofilobasidium macerans* YS622, *Mrakia aquatica* YP158 and *Scheffersomyces stipitis* Y15 were recorded for the first time in Korea. The microbiological characteristics and carbon assimilation of these previously unrecorded yeasts were investigated. Almost all of them were oval-shaped. And, glycerol, L-arabinose, xylitol, and inositol are not utilized.

Keywords: Intestine, Microbiological characteristics, *Othius punctulatus*, Unrecorded wild yeasts



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 September, 48(3): 229-235
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200024>

Received: April 29, 2020

Revised: July 03, 2020

Accepted: August 27, 2020

© 2020 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.

서론

효모는 진균류 중 영양 세포가 단세포이고 주로 출아에 의해 증식하는 고등 미생물로서 미생물 분류학상 유포자 효모에 속하는 자낭균류, 담자균류, 사출포자 효모와 불완전 균류에 속하는 무포자 효모로 분류된다.

과거부터 현재까지 효모는 누룩과 같은 발효제나 된장, 메주 등 전통발효식품 제조에 이용되어 왔으며, 주로 전통발효 식품으로부터 효모를 분리하고 있다[1]. 최근에는 의약품 공업, 사료의 단백질원 등으로 다양한 산업에 활용되고 있다. 이와 같이 산업적 가치가 큰 효모를 다양하게 발굴하여 확보하고자, 여러 연구진들이 곤충의 장, 갈대밭, 인삼 재배 토양, 야생화 및 막걸리, 메주, 된장과 같은 전통발효 식품으로부터 다양한 종의 야생 효모들을 분리, 동정하여 보고하였다[1-12].

본 연구는 반날개과 곤충 장에 공생하는 야생 효모의 종 다양성을 확립하고 이들 중 아직까지 국내에 보고되지 않은 효모들을 선별하여 이들의 균학적 특성을 밝히기 위한 목적으로 실시되었다. 이를 위해 충북대학교 주변 토양에서 서식하는 반날개과 곤충을 채집하고 곤충의 장으로부터 효모들을 분리하여 동정하였다. 동정한 결과를 토대로 하여 국내에 보고되지 않은 효모들을 선별하였고 이들의 균학적 특성과 탄소원의 자화성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

야생 효모의 분리 및 동정

충청북도 청주시에 위치한 충북대학교(36°37'29.7"N, 127°27'12.7"E) 주변 토양에서 서식하는 반날개과 곤충 5개체를 2019년 7월에 채집하여 장을 분리하였다. 분리한 장을 멸균 튜브에 넣고, 1 mL의 멸균수를 첨가한 후 진탕 하였다. 이들 현탁액 일부를 프로피온산나트륨($0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)과 클로람페니콜($0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)을 첨가한 YM (yeast extract-malt extract) 한천배지에 도말하고 25°C에서 48시간 배양한 후 형성된 효모 집락들을 분리하였다[3].

분리한 효모들의 동정을 위하여 먼저 이들의 26S rRNA의 D1/D2 영역의 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열들을 미국 국립생물정보센터(NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST를 사용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 효모들과의 상동성을 비교하여 분자생물학적 유연관계를 분석하고 동정하였다[10,11].

국내 미기록 효모들의 선별 및 균학적 특성

충북대학교 주변 토양에서 채집한 반날개과 곤충 장 시료에서 분리, 동정한 16균주의 야생 효모들을 대상으로 미국 국립생물정보센터(NCBI)의 BLAST결과와 국내 진균 관련 학술자료들을 토대로 하여 국내 미기록 효모들을 선별하였다. 선별된 효모들의 균학적 특성은 콜로니 모양을 관찰하기 위한 계대배양, 출아 여부, 세포의 모양, 포자와 의균사 형성유무 등을 관찰하기 위한 위상차현미경 사진 등을 이용하여 조사하였다[10].

국내 미기록 야생 효모들의 탄소원 이용 여부 확인

야생 효모들의 탄소원 이용 여부를 확인하기 위해 bioMérieux사의 API 20 C AUX를 사용하였다. 선발된 국내 미기록 야생 효모들을 YM배지에 접종하여 25°C에서 24시간 배양한 후 균을 모야 suspension medium (2 mL) 또는 NaCl 0.85% medium (2 mL)에 풀어 2 McFarland의 탁도를 만든다. 이 균액은 다시 API C medium (7 mL)의 앰플에 100 µL를 넣은 후 균일하게 혼합한다. 수분을 유지하기 위해 증류수를 부어준 tray 위에 20 C AUX 스트립을 올려놓고 API C medium의 균액을 기포가 생기지 않게 하여 큐플까지 채운다. Tray의 뚜껑을 덮고 29±2°C에서 48-72시간 배양한다. 48시간에서 72시간까지 배양한 후 '0'큐플을 음성 대조군으로 해서 혼탁도가 높은 큐플을 양성 반응으로 결과지에 기록하였다[12].

결과 및 고찰

반날개과 곤충 (*Othius punctulatus*) 장으로부터 야생 효모의 분리 및 동정

충청북도 청주시 서원구에 위치한 충북대학교 주변 토양에서 서식하는 반날개과 곤충 5개체를 확보하였고, 그 개체로부터 장을 분리하였다. 반날개과 곤충 장으로부터 야생 효모들을 분리하여 26S rRNA의 D1D2 염기서열을 동정한 결과, Table 1과 같이 *Aureobasidium* 속 3균주, *Cystofilobasidium* 속 4균주, *Mrakia* 속 1균주, *Naganishia* 속 3균주, *Saitozyma* 속 2균주, *Sampaiozyma* 속 2균주와 *Scheffersomyces* 속 1균주 모두 7속, 9종, 16균주의 다양한 야생 효모들을 분리, 동정하였다. 반날개과 곤충 장에서는 *Aureobasidium pullulans* 1균주를 포함한 *Aureobasidium* 속 3균주, *Cystofilobasidium capitatum* 2균주를 포함한 *Cystofilobasidium* 속 4균주, *Naganishia globosa* 3균주를 포함한 *Naganishia* 속 3균주가 분리되어 이들이 우점균으로 보인다.

Table 1. Yeasts from intestine of *Othius punctulatus* in Korea.

No.	Putative species	Isolated No.	GenBank No.	Similarity (%)
1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	YP63	NG_055734.1	585/585 (100)
2	<i>A. subglaciale</i>	YA47	MH874818.1	572/574 (99)
	<i>A. subglaciale</i>	YP166	MH874818.1	584/586 (99)
3	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	YP53	KY107453.1	601/601 (100)
	<i>C. capitatum</i>	YP71	DQ363333.1	613/613 (100)
4	<i>C. macerans</i>	YS620	NG_059011.1	609/609 (100)
	<i>C. macerans</i>	YS622	NG_059011.1	610/610 (100)
5	<i>Mrakia aquatica</i>	YP158	KY108574.1	611/615 (99)
6	<i>Naganishia globosa</i>	YP104	AF181539.1	579/579 (100)
	<i>N. globosa</i>	YP186	KY108616.1	584/584 (100)
	<i>N. globosa</i>	YP235	AF181539.1	603/603 (100)
7	<i>Saitozyma podzolica</i>	YO31	NG_058283.1	609/612 (99)
	<i>S. podzolica</i>	YP492	NG_058283.1	607/609 (99)
8	<i>Sampaiozyma ingeniosa</i>	YP279	AF189934.1	602/603 (99)
	<i>S. ingeniosa</i>	YP361	AF189934.1	601/601 (100)
9	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	YI5	JQ025392.1	588/588 (100)

반날개과 (*Othius punctulatus*) 곤충 장에서 분리, 선별한 국내 미기록 야생 효모들의 균학적 특성

반날개과 곤충 장으로부터 분리한 야생 효모들 중 *Cystofilobasidium capitatum* YP53, *C. capitatum* YP71, *C. macerans* YS620, *C. macerans* YS622, *Mrakia aquatica* YP158 와 *Scheffersomyces stipitis* YI5 6 균주들이 국내 미기록 효모들로 최종 선별되었다. 이들의 균학적 특성과 계통수는 Table 2, Fig. 1, Fig. 2에 기술하였다.

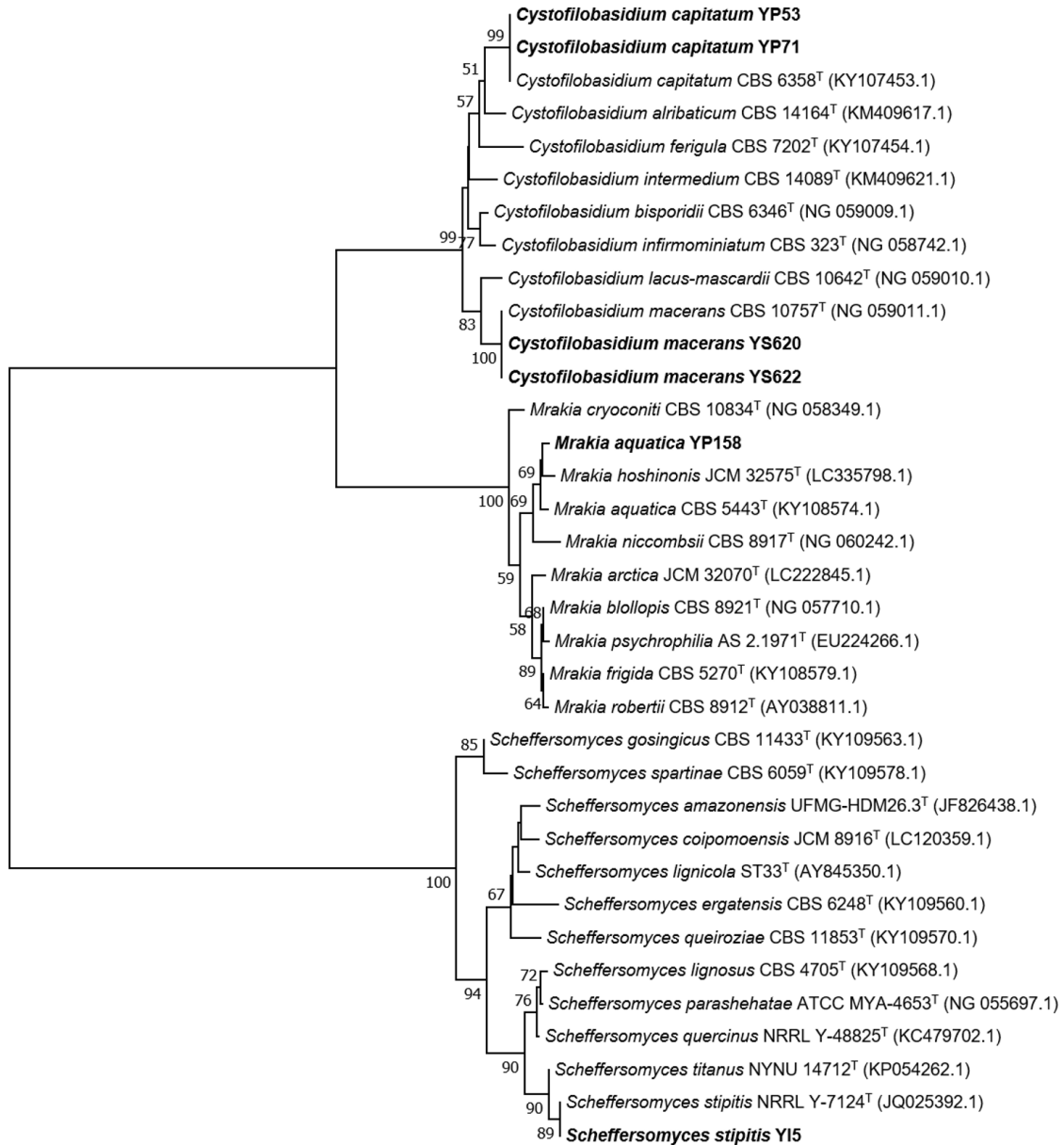


Fig. 1. Phylogenetic tree of the unrecorded yeasts isolated from intestine of *Othius punctulatus* in Korea, based on the nucleotide sequences of D1/D2 region of 26S ribosomal RNA. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA7 program.

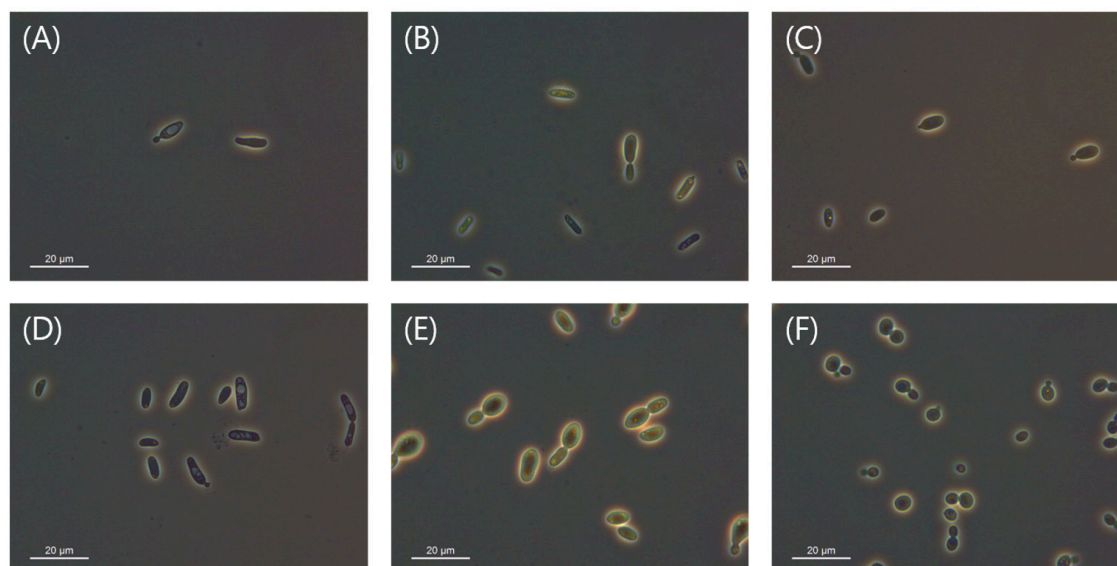


Fig. 2. Microscopic features of the unrecorded yeasts isolated from intestine of *Othius punctulatus* in Korea. (A) *Cystofilobasidium capitatum* YP53, (B) *C. capitatum* YP71, (C) *C. macerans* YS620, (D) *C. macerans* YS622, (E) *Mrakia aquatica* YP158, (F) *Scheffersomyces stipitis* YI5.

Table 2. Microbiological characteristics of unrecorded yeasts from intestine of *Othius punctulatus* in Korea.

Strains Isolated No.	<i>C. capitatum</i> YP53	<i>C. capitatum</i> YP71	<i>C. macerans</i> YS620	<i>C. macerans</i> YS622	<i>M. aquatica</i> YP158	<i>S. stipitis</i> YI5
Morphological characteristics						
Shape	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval
Vegetative reproduction	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding
Size (µm)	4.6×12.3	4.6×15.4	5.4×10.8	3.8×12.3	7.7×15.4	6.2×10.8
Cultural characteristics						
Growth on temp (°C)/pH range	10-20/pH 6-7	10-20/pH 6-7	10-20/pH 6-7	10-20/pH 6-7	10-21/pH 6-7	10-25/pH 6-7
Color on YM media	Orange	Yellow	Pink	Pink	White	White
Carbon assimilation						
Glucose	-	-	-	-	-	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-
2-Keto-D-Gluconate	-	-	-	-	-	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	+
Xylitol	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	-	-	-	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	+
d-Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	-	-	-	-	+
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	+
D-Lactose (bovine origin)	-	-	-	-	-	w
D-Maltose	-	-	-	-	-	+
D-Saccharose (sucrose)	-	-	-	-	-	+
D-Trehalose	-	-	-	-	-	+
D-Melezitose	-	-	-	-	-	+
D-Raffinose	-	-	-	-	-	w

이들 미기록 효모들의 형태적, 배양적 특징으로는 *Cystofilobasidium capitatum* YP53, *Cystofilobasidium capitatum* YP71, *C. macerans* YS620, *C. macerans* YS622, *Mrakia aquatica* YP158, *Scheffersomyces stipitis* YI5는 모두 타원형의 세포 형태를 가졌고, 출아에 의해 영양증식을 하였다. 그리고 이들의 포자와 의균사를 2주간 관찰하였으나 관찰하지 못했다.

반날개과 (*Othius punctulatus*) 곤충 장에서 분리, 선별한 국내 미기록 야생 효모들의 탄소원의 자화성

Cystofilobasidium capitatum YP53, YP71, *C. macerans* YS620, YS622 및 *Mrakia aquatica* YP158의 탄소원 자화성 실험결과는 glucose, glycerol, 2-keto-D-gluconate, L-arabinose, D-xylose, adonitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, d-methyl-D-glucoside, N-acetyl-D-glucosamine, D-cellobiose, D-lactose (bovine origin), D-maltose, D-saccharose (sucrose), D-trehalose, D-melezitose와 D-raffinose는 탄소원으로 이용할 수 없었다. *Scheffersomyces stipitis* YI5의 탄소원 자화성 실험결과는 glucose, 2-keto-D-gluconate, D-xylose, adonitol, D-galactose, D-sorbitol, d-methyl-D-glucoside, N-acetyl-D-glucosamine, D-cellobiose, D-lactose (bovine origin), D-maltose, D-saccharose (sucrose), D-trehalose, D-melezitose와 D-raffinose는 탄소원으로 이용할 수 있으나, glycerol, L-arabinose, xylitol과 inositol은 탄소원으로 이용할 수 없었다.

적요

곤충 장으로부터 분리되는 야생 효모들의 종 분포특성을 알아보고자 충북대학교 주변 토양에서 서식하는 반날개과 곤충 장 5점의 시료들로부터 16균주의 야생 효모들을 분리, 동정하였다. 야생 효모 16균주는 *Aureobasidium* 속 3균주, *Cystofilobasidium* 속 4균주, *Mrakia* 속 1균주, *Naganishia* 속 3균주, *Saitozyma* 속 2균주, *Sampaiozyma* 속 2균주와 *Scheffersomyces* 속 1균주를 포함한다. 이들 중 *Cystofilobasidium capitatum* YP53, *C. capitatum* YP71, *C. macerans* YS620, *C. macerans* YS622, *Mrakia aquatica* YP158 및 *Scheffersomyces stipitis* YI56균주들을 국내 미기록 효모들로 최종 선별하였다. 선별한 국내 미기록 효모들의 균학적 특성과 탄소원의 자화성 등을 조사하였다. 이들은 모두 타원형의 세포 형태를 가지고 있으며, glycerol, L-arabinose, xylitol, inositol을 탄소원으로 이용할 수 없었다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a research grant from Seoul Women's University (2020) and by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the ministry of Environment (MOE)

of the Republic of Korea (NIBR201928201).

REFERENCES

1. Min JH, Hyun SH, Kang MG, Lee HB, Kim CM, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers of Daejeon city and Chungcheongnam-do in Korea. *Kor J Mycol* 2012;40:141-4.
2. Kim JY, Jang JH, Park JH, Jung HY, Park JS, Cho SJ, Lee HB, Limtong S, Subramani G, Sung GH, Kim MK. Cellulose degrading basidiomycetes yeast isolated from the gut of grasshopper in Korea. *Kor J Microbiol* 2018;54:362-8.
3. Kim JY, Jung HY, Park JS, Cho SJ, Lee HB, Sung GH, Subramani G, Kim MK. Isolation and characterization of cellulolytic yeast belonging to *Moesziomyces* sp. from the gut of Grasshopper. *Kor J Microbiol* 2019;55:234-41.
4. Han SM, Lee SY, Lee HB, Lee JS. Isolation of wild yeasts from soils of reed fields in Seocheon-gun county, Chungcheongnam-do, South Korea, and characterization of unrecorded yeasts. *Kor J Mycol* 2017;45:234-40.
5. Kim JY, Han SM, Lee JS. Isolation and tyrosinase inhibitory activity of wild yeasts obtained from soil in the fields of medicinal plants, ginseng and Korean Angelica. *Kor J Mycol* 2018;46:315-23.
6. Hyun SH, Han SM, Kim HK, Lee JS. Yeasts diversity of wild flowers in mountains of Korea and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:137-41.
7. Mo HW, Jeong JS, Choi SW, Choi KH. Preparation of wine using wild yeast from dried Omija and optimal nutritional requirements for alcoholic fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2012;41:254-60.
8. Park IC, Kim JS, Jung JA, Yoo JH. Characterization of phosphate solubilizing yeasts from Korean traditional fermented foods. *Kor J Mycol* 2013;41:218-24.
9. Kim HK, Kim JY, Han SM, Kim C, Lee JS. Microbiological characteristics and physiological functionalities of unrecorded wild yeast strains in the soils of Hajodae and Gyungpodae beaches in Korea. *Kor J Mycol* 2019;47:249-58.
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. Hyun SH, Lee JG, 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.
12. Arias CR, Burns JK, Friedrich LM, Goodrich RM, Parish ME. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1955-61.