

RESEARCH ARTICLE

지렁이(*Eisenia andrei*)의 장으로부터 분리한 국내 미기록 야생효모들의 균학적 특성과 탄소원 활성

한주현, 이상은, 김명겸*
서울여자대학교 생명환경공학과

Microbiological Characteristics and Carbon source activity of Unrecorded Wild Yeast Strains from gut of the earthworm(*Eisenia andrei*) in Korea

Joo Hyun Han, Sang Eun Lee and Myung Kyum Kim*

Department of Bio & Environmental Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 01767, Republic of Korea

*Corresponding Author : biotech@swu.ac.kr

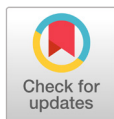
ABSTRACT

The goal of this study was to isolate and characterize the wild yeast strains from the gut of earthworm(*Eisenia andrei*). The 19 yeast strains isolated from 5 gut of earthworm samples from Nanji water regeneration center in Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea. Among them, 16 strains were recorded and 3 strains, *Yarrowia deformans* YP242 (=KACC48778), *Sporidiobolus pararoseus* YP66 (=KCTC27963) and *Naganishia liquefaciens* Y19 (=KACC48948) were recorded for the first time in Korea. The microbiological characteristics of these previously unrecorded yeasts were investigated. All three strains were oval-shaped, convex and smooth. However, they showed some differences in colony color and result of carbon assimilation assays. YP242 was white-colored and assimilated glycerol, L-arabinose and N-acetyl-D-glucosamine as carbon sources. YP66 was red-colored and assimilated D-Saccharose. Y19 was white-colored and positive for 2-keto-D-gluconate assimilation.

Keywords: earthworm, *Naganishia*, *Sporidiobolus*, Unrecorded wild yeasts, *Yarrowia*

서론

효모는 예로부터 식품을 발효하는데 이용되어 왔으며, 현대에는 식품뿐 아니라 향장소재, 바이오 에너지, 환경개선제 등 다양한 분야에서 활용하여 미생물 산업화에 기여하고 있다. 예를 들어, 효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 버려지는 감껍질을 발효시켜 바이오에탄올 생산이 가능하게 하고, *Candida tropicalis*는 바이오필터에 적용 시 인체에 유해한 톨루엔 제거 성능을 증가시키며, *Saccharomyces exiguus*는 돈분뇨에 첨가 시 악취를 제거할 뿐 아니라 대장균 증식 억제를 통해 환



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 June, 48(2): 161-167
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200017>

Received: April 29, 2020

Revised: June 30, 2020

Accepted: June 30, 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.

경개선제로서 이용할 수 있다고 밝혀진 바 있다[1, 2, 3]. 따라서, 야생 효모 발균은 단순 미생물의 발균을 넘어 효모의 융복합적 활용을 통해 산업화에 기여할 수 있다.

곤충에는 다양한 미생물이 공존하며, 유용 미생물도 분포한다고 알려져 있다. 미생물이 분비하는 효소를 이용하여 환경오염을 줄일 뿐 아니라 인체에 안전한 물질을 만들어 건강보조식품으로 제공할 수 있다고 밝혀진 바 있다[4]. 또한, 메뚜기 장으로부터 담자균 효모 *Papiliotrema aspenensis*, *Saitozyma flava*, *Moesziomyces aphidis*가 분리되었으며, 이들 효모는 셀룰로오스를 분해하는 셀룰레이즈의 기능을 가진다고 밝혀진 바 있다. 이 셀룰라아제는 바이오 에탄올 생산에 참여하여 바이오 연료와 같은 다양한 산업 공정에서 사용될 수 있다[5, 6].

본 연구는 우리나라에 서식하는 곤충들로부터 야생효모를 분리, 동정하여 종 다양성을 확립하고 국내에 보고되지 않은 야생효모들을 선별하여 이들의 균학적 특성을 밝히고자 하였다. 이를 위해 난지물재생센터로부터 분양 받은 지렁이에서 야생효모를 분리하여 동정하였다. 분리한 야생효모 중 국내 미기록종을 선별하여 위상차현미경을 통해 형태학적 특징을 관찰하고, 20C AUX를 실시하여 탄소원 활성을 측정하였다. 미기록종 효모의 정확한 분자생물학적 유연관계를 확인하기 위하여 LSU rRNA 유전자의 D1/D2 domains을 분석하였다.

재료 및 방법

야생효모의 분리 및 동정

경기도 고양시에 위치한 난지물재생센터로부터 지렁이(*Eisenia andrei*) 5마리를 분양받았다. 이를 실험용 가위로 지렁이를 가로로 절개하여 장을 적출하였다. 장을 약 2 cm로 절단한 후, 멸균된 1.5 mL 튜브에 넣고, 일회용 원심관 샘플 페슬(Scienceware, USA)을 이용하여 지렁이 샘플을 분쇄하였다. 지렁이 샘플이 들어있는 멸균튜브에 1 mL의 멸균수를 첨가한 후에 9 mL의 멸균수가 들어있는 1.5 mL 튜브에 100 μ l씩 연속희석하였다. 10^3 , 10^4 , 10^5 으로 희석한 현탁액을 YM 한천 배지(pH 3.7~5.0)에 100 μ l씩 분주하여 도말하였다. 이후 10 °C에서 3~5일간 배양한 후 효모 집락을 분리하였다[6]. YM 한천 배지(Difco™, USA)는 Chloramphenicol (0.4 g/mL; TCI, Japan) 0.04%, Sodium propionate (0.2 g/mL; SIGMA, USA) 0.02%를 첨가하여 제조하였다.

분리한 효모의 동정을 위해 NL1, NL4 primer를 이용하여 LSU rRNA 유전자의 D1/D2 domains을 확보하였다[7]. 확보한 염기서열은 미국 국립생물정보센터 (NCBI, National Center for biotechnology Information)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 데이터베이스를 통해 다른 효모와의 상동성을 비교하였고, Clustal X 2.0 프로그램을 이용하여 수집한 염기서열 분석결과를 정렬하였다[8]. 계통수는 MEGA 7.0 프로그램에서 neighbor-joining method를 사용하여 작성하였다[9].

국내 미기록 효모들의 선별 및 균학적 특성

위와 같이 경기도 고양시의 난지물재생센터로부터 분양받은 지렁이의 장에서 분리, 동정한 19종의 효모를 구글스콜라, 국가과학기술정보센터(NDSL, National Digital Science Library) 등의 논문 데이터베이스를 이용하여 국내에서 보고된 적 없는 미기록종 효모 균주를 선별하였다[10].

효모의 형태를 관찰하기 위해 YM 한천 배지에서 3일간 배양하였다. 단일 집락을 분리하여 슬라이드 글라스 위의 멸균 증류수에 희석하고 커버 글라스로 덮어주었다. 커버글라스 위에 immersion oil (Cargille, USA)을 떨어트리고 위상차현미경(LEICA DM500, Germany)을 통하여 세포의 크기, 출아여부를 관찰하였다.

국내 미기록 야생효모들의 탄소원 활성 측정

효모의 탄소원 활성을 측정하기 위해 API 20C AUX kit (bioMérieux, Hazelwood, Mo.)를 이용하였다. Suspension medium (2 mL, bioMérieux, France)에 YM 한천 배지에 균을 모아 2 McFarland의 탁도에 맞추어 희석하였다. 탁도를 맞춘 균주 혼합물은 API C Medium의 앰플(bioMérieux, France)에 100 uL씩 넣어 기포가 생기지 않도록 혼합하였다. 멸균한 피펫으로 API C medium의 균액을 스트립의 큐플에 기포가 생기지 않도록 적정 균액을 분주하였다. 이를 30°C에서 48~72시간 배양하였다. 음성 대조군과 비교하여 혼탁도가 높은 큐플을 양성 반응으로 결과를 기록하였다[11].

결과 및 고찰

지렁이의 장으로부터 야생효모의 분리 및 동정과 미기록종 선별

경기도 고양시에 위치한 난지물재생센터로부터 분양받은 지렁이(*Eisenia andrei*) 5마리의 장에서 야생효모들을 분리하였다. LSU rRNA 유전자의 D1/D2 domains을 분석하여 미국 국립생물정보센터(NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 데이터베이스를 통해 동정하였다. 그 결과, 지렁이 장으로부터 *Aureobasidium* 속 3균주, *Yarrowia* 속 1균주, *Hanseniaspora* 속 2균주, *Rhodospodium* 속 1균주, *Sporidiobolus* 속 1균주, *Sampaiozyma* 속 2균주, *Filobasidium* 속 1균주, *Naganishia* 속 2균주, *Bullera* 속 1균주 그리고 *Saitozyma* 속 5균주로 총 14종, 19균주가 분리되었다(Table 1). 분리된 19개의 균주 중 *Aureobasidium* 속이 3균주, *Saitozyma* 속이 5균주로 다른 속 균주들에 비해 상대적으로 많이 분리되었다. 따라서 지렁이에 *Aureobasidium* 속과 *Saitozyma* 속 효모가 존재하는 비율이 높은 것으로 판단되어진다.

Table 1. Wild yeasts from gut of the earthworm in Gyeonggi-do, Korea

Phylum	Class	Order	Family	Strain ID	Most closely related species	D1/D2 sequence similarity	Record in Korea	
Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideales	Sacrotheciaceae	YP376	<i>Aureobasidium lini</i>	599/604(99)	recorded	
				YP51	<i>Aureobasidium namibiae</i>	582/584(99)	recorded	
				YP63	<i>Aureobasidium pullulans</i>	587/587(100)	recorded	
	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Dipodascaceae	YP242	<i>Yarrowia deformans</i>	514/514(100)	unrecorded	
				YF18	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	584/584(100)	recorded	
			Saccharomycodaceae	YF20	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	587/587(100)	recorded	
Basidiomycota	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae	YP480	<i>Rhodospodium toruloides</i>	536/541(99)	recorded	
				YP66	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	587/589(99)	unrecorded	
		-	Chrysozymaceae	YP365	<i>Sampaiozyma ingeniosa</i>	600/600(100)	recorded	
		YP288	<i>Sampaiozyma vanillica</i>	607/608(99)	recorded			
	Tremellomycetes	Filobasidiales	Filobasidiaceae	YP547	<i>Filobasidium magnum</i>	614/614(100)	recorded	
				YP258	<i>Naganishia globosa</i>	615/615(100)	recorded	
				YI9	<i>Naganishia liquefaciens</i>	605/606(99)	unrecorded	
				YP495	<i>Bullera alba</i>	615/615(100)	recorded	
				Trimorphomycetaceae	YO29	<i>Saitozyma podzolica</i>	616/618(99)	recorded
				YP283		615/617(99)	recorded	
	YP299		614/616(99)	recorded				
	YP464		608/610(99)	recorded				
YP491		589/589(100)	recorded					

분리한 19개 균주 중 *Yarrowia deformans* YP242(CBS 2071^T; 100%, D1/D2 영역 유사도), *Sporidiobolus pararoseus* YP66(CBS 491^T; 99.66%, D1/D2 영역 유사도) 그리고 *Naganishia liquefaciens* YI9(CBS 968^T; 99.83%, D1/D2 영역 유사도)를 국내에 보고되지 않은 미기록종으로 선별하였다 (Table1).

지렁이에서 분리, 선별한 국내 미기록 야생효모들의 균학적 특성

국내 미기록종으로 최종선별된 *Yarrowia deformans* YP242 (KACC48778, Genbank MT658745), *Sporidiobolus pararoseus* YP66 (KCTC27963, Genbank MT658744), *Naganishia liquefaciens* YI9 (KACC48948, Genbank MT658746)의 균학적 특성은 Table 2, 계통수는 Fig. 1에 나타냈다. 이 미기록 효모들의 형태적, 배양적 특징으로는 3균주 모두 세포의 형태가 난형이고, 출아하여 영양증식하였다(Fig. 2). YP66은 담자포자를 형성함을 확인하였다. 또한, 세포의 크기는 각각 YP242는 4.2~4.5 μm와 5.5~5.8 μm, YP66은 4.3~4.6 μm와 6.5~7 μm, YI9는 3.2~3.5 μm와 5.5~5.9 μm 이다(Fig. 2).

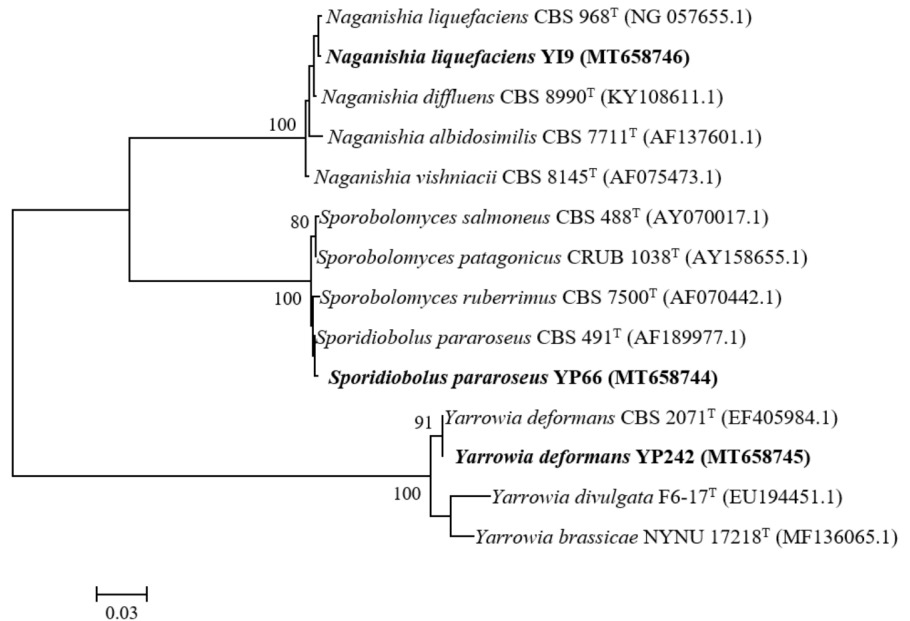


Fig. 1. Phylogenetic tree of the unrecorded yeasts isolated from gut of the earthworm in Korea, based on the nucleotide sequences of D1/D2 sequence. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA7. Bar: 0.03

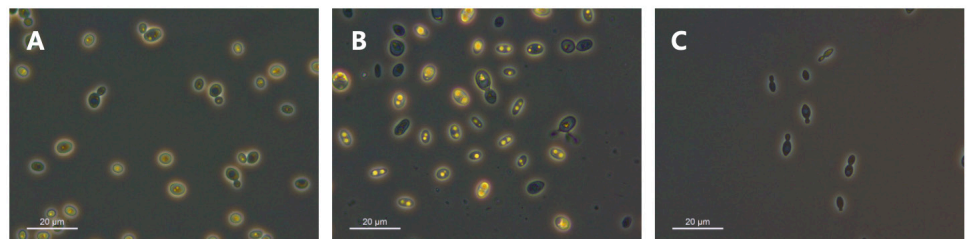


Fig. 2. Microscopic features of the unrecorded yeasts isolated from gut of the earthworm in Korea A; *Yarrowia deformans* YP242, B; *Sporidiobolus pararoseus* YP66, C; *Naganishia liquefaciens* YI9. (scale bar, 20μm)

Table 2. Microbiological characteristics of unrecorded wild yeasts from gut of the earthworm in Gyeonggi-do, Korea. All data were obtained in this study. +, positive; w, weakly positive; -, negative

Strain ID	YP242	YP66	YI9
Morphological characteristics			
Shape	Oval	Oval	Oval
Vegetative reproduction	Budding	Budding	Budding
API 20C AUX			
Glucose	+	w	+
Glycerol	+	-	-
2-Keto-D-Gluconate	w	-	+
L-Arabinose	+	-	-
D-Xylose	-	-	-
Adonitol	w	-	-
Xylitol	w	-	-
D-Galactose	w	-	-
Inositol	w	-	-
D-Sorbitol	w	-	-
α -Methyl-D-Glucoside	w	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	-	-
D-Cellobiose	w	w	+
D-Lactose(bovine origin)	w	-	-
D-Maltose	w	w	-
D-Saccharose(Sucrose)	w	+	-
D-Trehalose	w	w	-
D-Melezitose	w	w	-
D-Raffinose	w	w	-

국내 미기록 야생효모들의 탄소원 활성 측정

Yarrowia deformans YP242의 탄소원 활성 측정 결과는 다음과 같다(Table 2). glucose, glycerol, L-arabinose 그리고 N-acetyl-D-glucosamine는 양성, adonitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, α -methyl-D-glucoside, D-cellobiose, D-lactose(bovine origin), D-maltose, D-saccharose(sucrose), D-trehalose, D-melezitose 그리고 D-raffinose는 약한 양성, D-xylose는 음성으로 확인되었다.

Sporidiobolus pararoseus YP66의 탄소원 활성 측정 결과는 다음과 같다(Table 2). D-Saccharose(Sucrose)는 양성, glucose, D-cellobiose, D-maltose, D-trehalose, D-melezitose 그리고 D-raffinose는 약한 양성, glycerol, 2-keto-D-gluconate, L-arabinose, D-xylose, adonitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, α -methyl-D-glucoside, N-acetyl-D-glucosamine 그리고 D-lactose(bovine origin)는 음성을 나타내었다.

Naganishia liquefaciens YI9의 탄소원 활성 측정 결과도 Table 2에 나타내었다. glucose, 2-keto-D-gluconate 그리고 D-cellobiose는 양성, glycerol, L-arabinose, D-xylose, adonitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, α -methyl-D-glucoside, N-acetyl-D-glucosamine, D-lactose(bovine origin), D-maltose, D-saccharose(sucrose), D-trehalose, D-melezitose 그리고 D-raffinose는 음성을 나타내었다.

요약

국내에 자생하는 지렁이로(붉은줄지렁이)의 장에서 야생효모를 분리, 동정하고자 하였다. 지렁이는 고양시 난지 물 재생 센터에서 분양 받았으며, 지렁이 5마리에서 19개의 야생효모를 분리하였다. 효모의 D1/D2 영역으로 동정하여 국내에 보고되지 않은 효모 3균주를 선별하였다. 국내 미기록종 효모인 *Yarrowia deformans* YP242 (=KACC48778), *Sporidiobolus pararoseus* YP66 (=KCTC27963), *Naganishia liquefaciens* YI9 (=KACC48948) 균주는 위상차현미경, API 20C AUX kit 를 통해 균학적 특성을 조사하였다. YP242, YI9, YP66 균주의 세포 모양은 타원형이며, 집락은 불록하고, 부드러운 재질을 가지는 것으로 관찰되었다. 탄소원 활성 측정 결과, YP242는 glycerol, L-arabinose, N-acetyl-D-glucosamine을, YP66는 N-acetyl-D-glucosamine을, *liquefaciens* YI9는 2-keto-D-gluconate을 탄소원으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

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

- Hwang IJ. Evaluation of the removal of toluene in a bioreactor containing *Candida tropicalis* 2006.
- Yoon DH, Kang DW, Nam KW. The Effect of Yeast(*Saccharomyces exiguus* SJPAF1) on Odor Emission and Contaminants Reduction in Piggery Slurry. *Korean J Environ Agric* 2009;28:47-52.
- Lee JS, Park EH, Kwun SY, Yeo SH, Kim MD. Optimization of Pretreatment of Persimmon Peel for Ethanol Production by Yeast Fermentation. *Korean J. Microbiol* 2014;42:202-6.
- Seo DJ, Moon C, Song YS, Choi SH, Han YS, Jo YH, Noh MY, Jung WJ. Production of N-acetyl-glucosamine by Chitinase from *Serratia marcescens* PRNK-1 Using Chitin Obtained from Edible *Tenebrio molitor* Larva. *J. Chitin Chitosan* 2017;22:149-55.
- 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. *Korean J. Microbiol* 2018;54:362-8.
- 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. *Korean J. Microbiol* 2019;55:234-41.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998;73:331-71.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-82.

9. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783-91.
10. 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
11. Gales AC1, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, Soll DR. Identification of *Candida dubliniensis* Based on Temperature and Utilization of Xylose and a-Methyl-D-Glucoside as Determined with the API 20C AUX and Vitek YBC Systems. *J Clin Microbiol* 1999;37:3804-8.