

RESEARCH ARTICLE

국내 포도밭 토양에서 분리된 야생 효모 미기록종들의 균학적 특성과 탄소원 활성

임봉순, 김명겸*

서울여자대학교 생명환경공학과

Mycological Characteristics and Carbon Source Activities of Unrecorded Wild Yeast Species from Vineyard Soil in Korea

Bong Soon Yim, and Myung Kyum Kim*

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

*Corresponding author: biotech@swu.ac.kr

ABSTRACT

This study aimed to isolate and characterize wild yeast strains from the vineyard soil in Korea. Twenty yeast strains were isolated from vineyard soil in Gimpo-si, Gyeonggi-do, Korea, where *Vitis labrusca* cv. Campbell Early is grown. Eighteen strains were previously recorded in Korea. The remaining two, *Cyberlindnera mrakii* VG-21-10C and *Starmerella bacillaris* GR9 were not previously recorded in Korea. The mycological characteristics of VG-21-10C and GR9 were investigated. Both were oval-shaped, convex, and smooth. However, differences were evident in colony color and carbon assimilation activities. Strain VG-21-10C is white-colored and assimilates glucose, glycerol, D-xylose, D-cellobiose, D-saccharose, and D-raffinose as carbon sources. Strain GR9 is cream-colored and assimilates glucose, D-saccharose, and D-raffinose as carbon sources.

Keywords: *Cyberlindnera*, *Starmerella*, Unrecorded wild yeasts, Vineyard



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2023 December, 51(4): 373-381
<https://doi.org/10.4489/kjm.20230037>

Received: November 08, 2023

Revised: December 08, 2023

Accepted: December 11, 2023

© 2023 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 예로부터 식품을 발효하는데 이용되어 왔으며, 현대에는 식품뿐 아니라 향장소재, 바이오 에너지, 환경개선제 등 다양한 분야에서 활용되며 미생물 산업화에 기여하고 있다. 예를 들어, 대표적인 자낭균문 효모인 *Starmerella cerevisiae*는 버려지는 감귤질을 발효시켜 바이오에탄올 생산이 가능하게 하고, *Candida tropicalis*는 바이오필터에 적용 시 인체에 유해한 톨루엔 제거 성능을 증가시키며, *S. exiguous*는 돈분뇨에 첨가 시 악취를 제거할 뿐 아니라 대장균 증식 억제를 통해 환경개선제로서 이용할 수 있다고 밝혀진 바 있다. 따라서, 야생 효모 발굴은 단순 미생물의 발굴을 넘어 효모의 융복합적 활용을 통해 산업화에 기여할 수 있다[1-3].

포도밭과 포도나무 주변 환경은 효모가 많이 분포하는 장소 중 하나로 알려져 있으며, 전 세계적으로 포도밭 등에서 발견되는 효모는 *Rhodotorula graminis*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Satumispora divera*, *Starmerella bacillaris* 및 *Hanseniaspora uvarum* 등과 같이 발효성을 가지거나 산화성을 가지는 효모로 알려져 있다[4].

Cyberlindnera 속은 *Phaffomycetaceae* 과의 효모이다. 그 이름은 '음식'과 '세계'를 의미하는 "Cibus"에서 유래한 라틴어 "Ciber"를 사용하였고, *Saccharomyces* 및 *Pichia* 속 발굴에 기여한 독일의 미생물 분류학자 Paul Linder의 이름에서 유래한 "-lindnera"를 사용하였다. 이 속은 다양한 방식으로 다른 유기체와 상호작용하며, 전세계 각지의 여러 환경에서 발견되고 있다[5].

Starmerella 속은 1998년에 Rosa & Lachance에 의해 분류된 효모 속으로, *Candida stellata*가 재분류되었다. 이 속은 *C. bombicola*와 유성생식이 가능한 것으로 알려져 있다[6]. *Starmerella* 속에 속하는 *S. bacillaris* 종은 *Saccharomyces cerevisiae* 종과 함께 발효에 사용될 경우 와인의 향과 구성에 긍정적인 영향을 미친다고 알려져 있다[7].

본 연구에서는 국내 포도밭의 포도나무 밑 흙에서 분리된 야생 효모 중 국내 미기록종을 선별하여 위상차 현미경을 통해 형태학적 특징을 관찰하고, 20C AUX를 실시하여 탄소원 활성을 측정하였다. 미기록종 효모의 정확한 분자생물학적 유연관계를 확인하기 위하여 26S rDNA의 D1/D2 region을 분석하였다.

재료 및 방법

포도밭 내 야생 효모의 분리 및 동정

2023년 4월 경기도 김포시 소재 Campbell Early 품종의 포도를 재배하는 포도밭(37°41'39.5"N 126°38'55.3"E)에서 토양 샘플을 채집하였다. 멸균된 튜브에 9 mL의 멸균수를 넣고, 포도나무 주변 토양 샘플을 1 g 넣어 희석하였다. 이 현탁액을 연쇄 희석하여 YPD (Yeast extract peptone dextrose, DB Difco, USA) 한천 배지(pH 3.7-5.0)에 100 µL씩 분주하여 도말하였다. 이후 10°C에서 3~5일 배양한 후 효모 집락을 분리하였다[8]. 실험에 사용한 YPD 한천 배지는 chloramphenicol (0.4 g/mL) 0.04%, sodium propionate (0.2 g/mL) 0.02%를 첨가하여 제조하였다.

분리한 효모의 동정을 위해 26S rDNA의 D1/D2 region을 NL1, NL4 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하고, 증폭된 산물에 대하여 염기서열 분석을 수행하였다[9]. 확보한 염기서열은 미국 국립생물정보센터(National Center for biotechnology Information, NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 데이터베이스를 통해 다른 효모와의 상동성을 비교하였고, Clustal X 2.0 프로그램을 이용하여 주변 서열들과 정렬하였다[10]. 계통수는 MEGA 11.0 프로그램에서 neighbor-joining method를 사용하여 구축하였다[11].

포도밭에서 발견된 국내 미기록 효모들의 선별 및 균학적 특성 확인

효모의 위상차 현미경 관찰을 위해, YPD 한천 배지에서 3일간 배양한 후 단일 집락을 분리하여 슬라이드 글라스 위의 멸균 증류수에 희석하고 커버 글라스로 덮어주었다. 위상차 현미경을 통하여 세포의 크기와 출아 여부를 확인하였다.

포도밭에서 발견된 국내 미기록 야생 효모들의 탄소원 활성 측정

효모의 탄소원 활성을 측정하기 위해 API 20C AUX kit (bioMerieux, Hazelwood, USA)를 이용하였다. Suspension medium (2 mL)에 YPD 한천 배지에 균을 모아 2McFarland의 탁도에 맞추어 희석하였다. 탁도를 맞춘 균주 혼합물은 API C Medium의 앰플에 100 µL씩 넣어 기포가 생기지 않도록 혼합하였다. 피펫으로 API C medium 균액을 스트립의 큐플에 기포가 생기지 않도록 분주하였다. 이를 30°C에서 48-72시간 배양하였다. 음성 대조군과 비교하여 혼탁도가 높은 큐플을 양성 반응으로 결과를 기록하였다[12].

결과

포도밭에서의 야생 효모 분리 및 동정과 미기록종 선별

경기도 김포시의 토양에서 야생 효모 20균주가 분리되었다. 26S rDNA의 D1/D2 region을 분석하여 미국 국립생물정보센터(NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 데이터베이스를 통해 기존에 보고된 종과의 유사도를 확인하였다. 그 결과, 샘플로부터 *Moesziomyces* 속 4 균주, *Solicoccozyma* 속 8 균주, *Pseudozyma* 속 1 균주, *Filobasidium* 속 2 균주, *Rhodospordiobolus* 속 2 균주, *Rhodotorula* 속 2 균주, *Cyberlindnera* 속 1 균주 그리고 *Starmerella* 속 1 균주로 총 10 종, 20 균주가 분리되었다(Table 1). 분리된 20 개의 균주 중 *Moesziomyces* 속이 4 균주, *Solicoccozyma* 속이 8 균주로 다른 속 균주들에 비해 상대적으로 많이 분리되었다.

분리한 20 개 균주 중 VG-21-10C 균주는 *Cyberlindnera mrakii* NRRL Y-1364^T와 D1/D2 영역 염기서열이 99.60% 일치하였으며, GR9 균주는 *Starmerella bacillaris* CBS 843^T와 D1/D2 영역 염기서열이 100% 일치하였다.

Table 1. Wild yeasts isolated from vineyard soil in Gimpo-si, Gyeonggi-do, Korea.

Class	Order	Family	Strain ID	Most closely related species	26S rDNA similarity (%)	Record in Korea
Saccharomycetes	Saccharomycetales	Phaffomycetaceae	VG-21-10C	<i>Cyberlindnera mrakii</i>	99	Unrecorded
		Saccharomycetales incertae sedis	GR9	<i>Starmerella bacillaris</i>	100	Unrecorded
Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Ustilaginaceae	VG-15-10C	<i>Moesziomyces aphidis</i>	100	Recorded
			VG-18-10C		100	Recorded
			VG-27-10C		100	Recorded
			VG-37-10C		100	Recorded
			VG-24-10C	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	100	Recorded
Tremellomycetes	Filobasidiales	Piskurozymaceae	VG-10-10C	<i>Solicoccozyma aeria</i>	99	Recorded
			VG-3-10C	<i>Solicoccozyma phenolica</i>	99	Recorded
			VG-8-10C		100	Recorded
			VG-12-10C		99	Recorded
			VG-13-10C		99	Recorded
			VG-14-10C	<i>Solicoccozyma terricola</i>	100	Recorded
			VG-17-10C		100	Recorded
			VG-26-10C	<i>Filobasidium magnum</i>	100	Recorded
Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae	VG-29-10C		100	Recorded
			VG-6-10C	<i>Rhodospordiobolus azoricus</i>	99	Recorded
			VG-20-10C		99	Recorded
			VG-4-10C	<i>Rhodotorula graminis</i>	100	Recorded
			VG-25-10C		100	Recorded

포도밭에서 분리, 선별한 국내 미기록 야생 효모의 분자계통학적 위치

국내 미기록종으로 선별된 *Cyberlindnera mrakii* VG-21-10C 균주와 *Starmerella bacillaris* GR9 균주의 D1/D2 영역을 기준으로 시퀀스 유사도의 결과는 다음과 같았다. VG-21-10C 균주는 *C. mrakii* NRRL Y-1364^T 균주와 염기서열 유사도가 99.6%이었고, 균주 GR9은 *S. bacillaris* CBS 843^T 균주와 염기서열이 100% 일치하였다. 이를 통해 균주 VG-21-10C는 *C. mrakii*와 균주 GR9는 *S. bacillaris*와 매우 유사한 것으로 확인되었다. Neighbor-joining 기법을 이용하여 구성한 계통수는 각각 Fig. 1 그리고 Fig. 2와 같다. *C. mrakii* VG-21-10C 균주와 *S. bacillaris* GR9에서 획득한 D1/D2 영역 염기서열을 Genbank에 등록하였으며, 각각의 accession 번호는 OR826467과 OR827441이다.

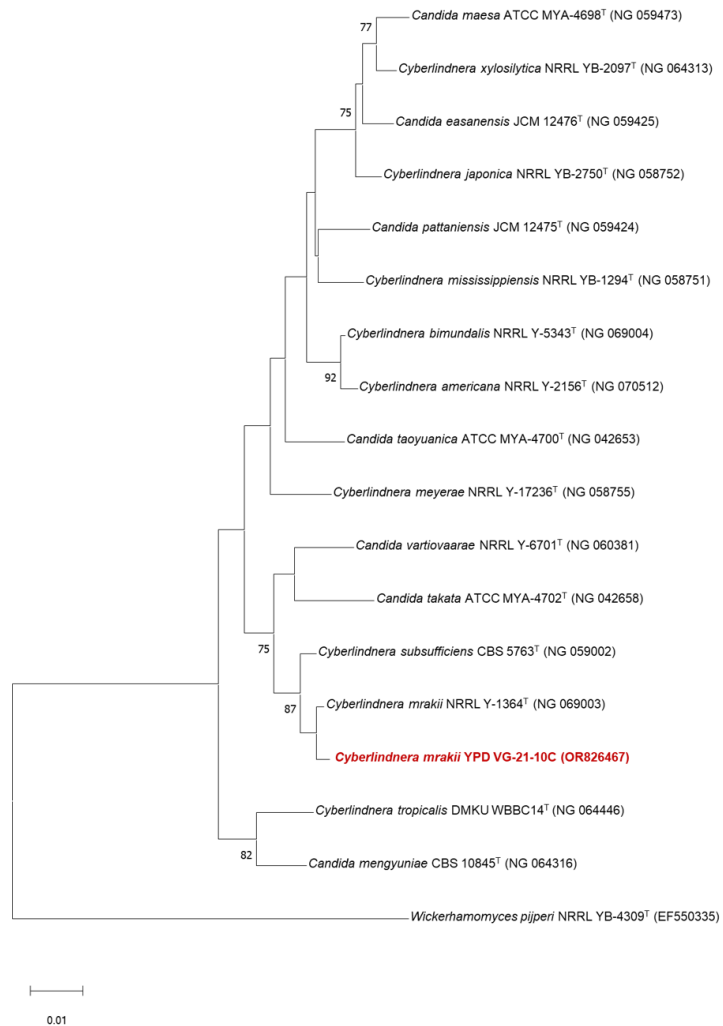


Fig. 1. A neighbor-joining phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of D1/D2 region of 26S rDNA showing the position of *Cyberlindnera mrakii* VG-21-10C and other species of the genera *Cyberlindnera* and *Candida*. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA11. Bootstrap values (>70%) based on the neighbor-joining method were shown at the branch nodes. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. *Wickerhamomyces pijperi* NRRL_YB-4309^T was used as the outgroup. , type strain.

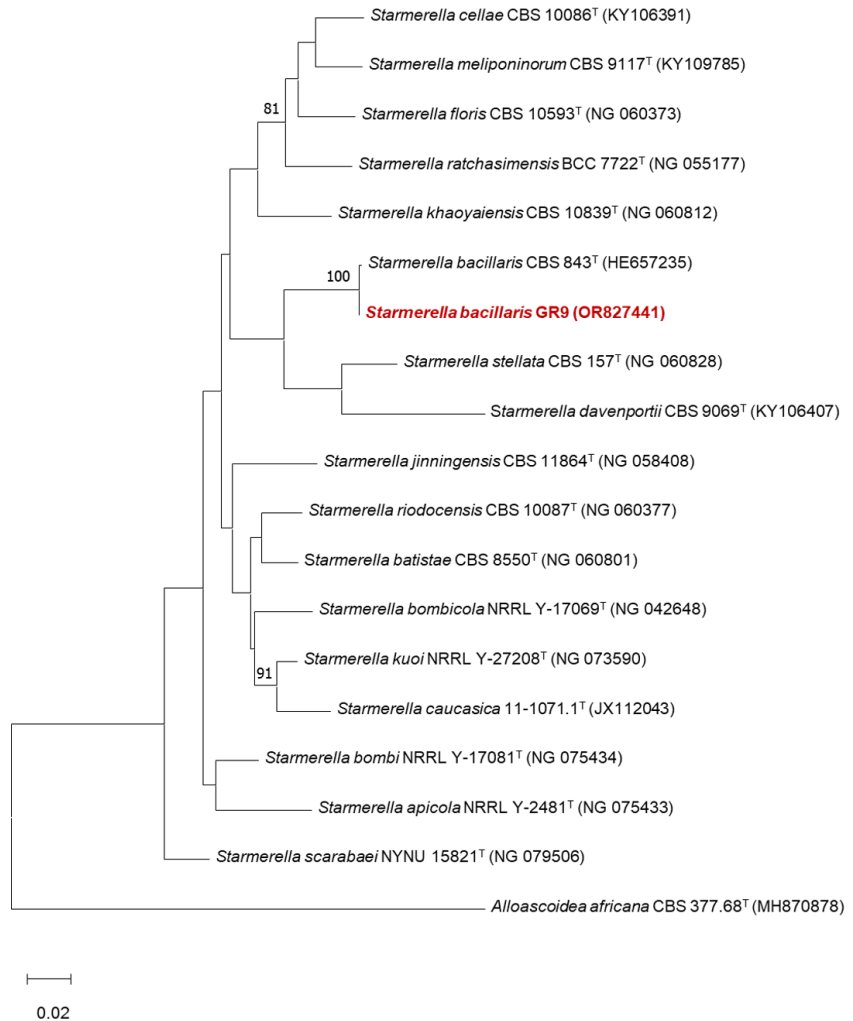


Fig. 2. A neighbor-joining phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of D1/D2 region of 26S rDNA showing the position of *Starmerella bacillaris* GR9 and other species of the genus *Starmerella*. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA11. Bootstrap values (>70%) based on the neighbor-joining method were shown at the branch nodes. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. *Alloscoidea africana* CBS 377.68^T was used as the outgroup. T type strain.

포도밭에서 분리, 선별한 국내 미기록 야생 효모들의 균학적 특성

국내 미기록종으로 최종 선별된 *Cyberlindnera mrakii* VG-21-10C, *Starmerella bacillaris* GR9 균주의 균학적 특성은 Table 2와 Table 3에 나타냈다. 이들 미기록 효모들의 형태적, 배양적 특징으로는 두 균주 모두 세포의 형태가 난형이고, 출아로 영양증식하였다. 또한, 세포의 크기는 각각 균주 VG-21-10C는 5.3-5.6 μm 와 3.1-3.4 μm , 균주 GR9은 2.2-2.5 μm 와 0.8-1.0 μm 이었다(Fig. 3). VG-21-10C 균주는 최근연종인 *C. mrakii* NRRL Y-1364^T 균주의 형태 및 배양적 특징을 비교한 결과, 형태학적으로 동일한 특징을 보여주었다[13]. GR9 균주는 *S. bacillaris* CBS 843^T 균주의 형태 및 배양적 특징을 비교한 결과, 형태학적으로 동일한 특징을 보여주었다[14]. 동정된 VG-21-10C와 GR9 균주는 국립농업과학원 농업미생물은행에 각각 KACC 410281과 KACC 410282로 기탁하였다.

Table 2. Characteristics of unrecorded wild yeast *Cyberlindnera mrakii* VG-21-10C and closely related species.

Characteristics	<i>C. mrakii</i> VG-21-10C	<i>C. mrakii</i> CBS 1707 ^T	<i>C. suaveolens</i> CBS 255 ^T
Morphological characteristics			
Shape	Oval	Oval	Oval
Vegetative reproduction	Budding	Budding	Budding
API 20C AUX			
Glucose	+	+	+
Glycerol	+	+	+
L-Arabinose	-	ND	-
D-Xylose	-	+	ND
D-Galactose	-	-	-
Inositol	-	ND	-
D-Sorbitol	-	-	ND
Methyl- α -D-glucopyranoside	-	-	ND
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-
D-Cellobiose	+	+	+
D-Lactose (bovine origin)	-	ND	+
D-Maltose	-	+	-
D-Saccharose (sucrose)	+	ND	+
D-Raffinose	+	+	+

+: positive; -: negative; ND: no data.

Table 3. Characteristics of unrecorded wild yeast *Starmerella bacillaris* GR9 and closely related species.

Characteristics	<i>S. bacillaris</i> GR9	<i>S. bacillaris</i> CBS 844 ^T	<i>S. meliponinorum</i> UWO(PS)00 -227.1 ^T
Morphological characteristics			
Shape	Oval	Oval	Oval
Vegetative reproduction	Budding	Budding	Budding
API 20C AUX			
Glucose	+	+	+
Glycerol	-	+	+
2-Keto-D-gluconate	-	ND	-
L-Arabinose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
Adonitol	-	ND	-
Xylitol	-	ND	+
D-Galactose	-	-	-
Inositol	-	-	-
D-Sorbitol	-	+	-
α -Methyl-D-glucoside	-	ND	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-
D-Lactose (bovine origin)	-	-	-
D-Maltose	-	-	+
D-Saccharose (sucrose)	+	+	-
D-Trehalose	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-
D-Raffinose	+	+	+

+: positive; -: negative; ND: no data; ^T: type strain.

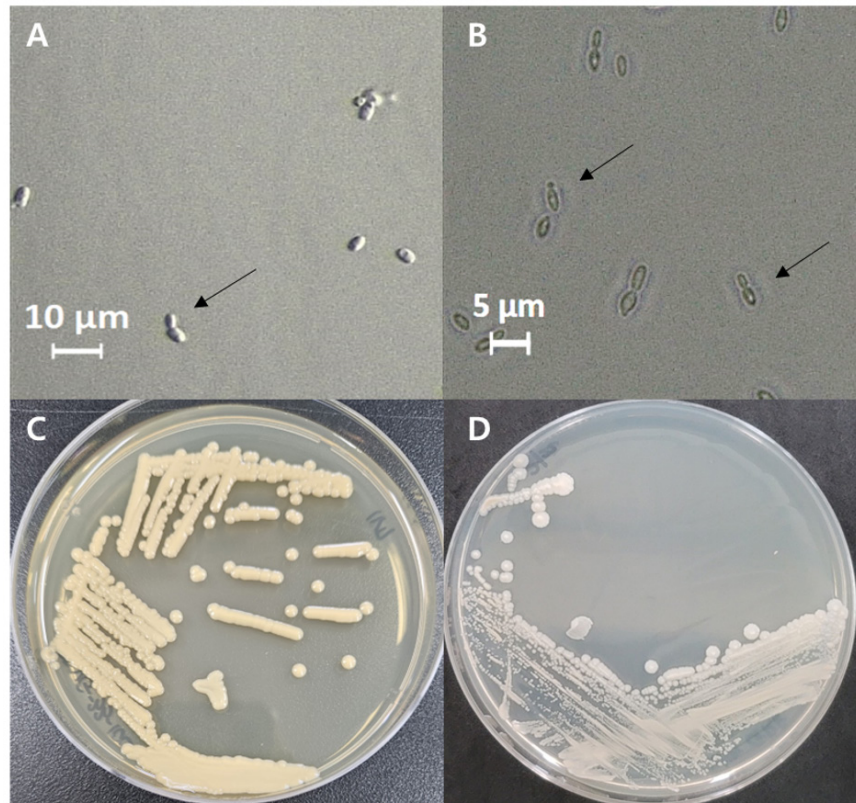


Fig. 2. Microscopic features of the unrecorded yeasts isolated from vineyard soil in Gimpo-si, Gyeonggi-do, Korea. The budding cells of *Starmarella bacillaris* GR9 (A) and *Cyberlindnera mrakii* VG-21-10C (B). bars, 10 μm and 5 μm , respectively. The colonies of *Starmarella bacillaris* GR9 (C) *Cyberlindnera mrakii* VG-21-10C (D).

국내 미기록 야생 효모들의 탄소원 활성 측정

Cyberlindnera mrakii VG-21-10C 균주의 탄소원 활성 측정 결과는 다음과 같았다. Glucose, glycerol, D-xylose, D-cellobiose, D-saccharose 그리고 D-raffinose는 양성, calcium 2-keto-gluconate, L-arabinose, anoitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, methyl- α -D-glucopyranoside, N-acetyl-glucosamine, D-lactose, D-maltose, D-trehalose 그리고 D-melezitose는 음성이었다. VG-21-10C 균주는 최근연종인 *C. mrakii* CBS 1707^T와 D-lactose (bovine origin) assimilation 실험 결과에서 차이를 보였다[13]. *Starmarella bacillaris* GR9 균주의 탄소원 활성 측정 결과는 다음과 같았다. Glucose, D-saccharose 그리고 D-raffinose는 양성, glycerol, calcium 2-keto-gluconate, L-arabinose, D-xylose, adonitol, xylitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, methyl- α -D-glucopyranoside, N-acetyl-glucosamine, D-cellobiose, D-maltose, D-trehalose 그리고 D-melezitose는 음성이었다. GR9 균주는 최근연종인 *S. bacillaris* CBS 844^T 균주와 D-Lactose (bovine origin) assimilation 실험 결과에서 차이를 보였다[14].

고찰

국내 포도밭의 포도나무 주변 흙에서 야생 효모를 분리, 동정하였다. 토양 샘플에서 총 20개의 야생 효모가 분리되었다. 26S rRNA 유전자의 D1/D2 영역 서열을 분석한 결과 국내에서 보고되지 않은 효모 2 균주를 선별하였다. 국내 미기록종 효모인 *Cyberlindnera mrakii* VG-21-10C와 *Stammerella bacillaris* GR9 균주는 위상차 현미경과 API 20C AUX kit를 통해 표현형적 특성을 조사하였다. VG-21-10C 균주와 GR9 균주의 세포 모양은 타원형이며, 집락은 볼록하고, 부드러운 질감을 가지는 것으로 관찰되었다. 탄소원 활성 측정 결과, VG-21-10C 균주는 glucose, glycerol, D-xylose, D-cellobiose, D-saccharose, D-raffinose를 탄소원으로 사용할 수 있었고, GR9 균주는 glucose, D-saccharose, D-raffinose를 탄소원으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

균주 VG-21-10C는 *C. mrakii* CBS 1707^T 균주와 유전적으로 매우 유사한 특성이 확인되었다. 두 균주는 D-lactose (bovine origin) assimilation 실험 결과에서 차이를 보였지만 집락이 볼록하고, 부드러운 형태를 가졌으며 위상차 현미경 하에서 관찰한 형태적 특징도 일치하였다[13]. 계통수 상에서도 균주 VG-21-10C는 *C. mrakii* CBS 1707^T 균주와 동일한 종임을 알 수 있었다. *C. mrakii* 종은 지금까지 국내에서 보고된 바 없으므로, 균주 VG-21-10C는 미기록종으로 판단된다(Table 1).

균주 GR9는 유전적으로 매우 유사한 *S. bacillaris* CBS 844^T 균주와 유사한 특성이 확인되었다. 하지만 *S. bacillaris* CBS 844^T 균주와 D-lactose (bovine origin) assimilation 실험 결과에서 차이를 보였지만 집락이 볼록하고 부드러운 형태를 가지며 위상차 현미경 하에서 관찰한 형태적 특징이 일치하였다[14]. 계통수 상에서도 *S. bacillaris* CBS 844^T 균주와 동일한 종임을 알 수 있다. *S. bacillaris* 종은 아직까지 국내에서 보고된 바 없는 미기록종이므로 균주 GR9는 국내 미기록종으로 판단된다.

CONFLICT OF INTERESTS

No conflict of interest was reported by the authors.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a research grant from Seoul Women's University (2023).

REFERENCE

1. Ahmed Z, Song J. Removal of gaseous toluene using immobilized *Candida tropicalis* in a fluidized bed bioreactor. *Biotech* 2011;1:111-6.
2. Yoon DH, Kang DW, Nam KW. The effect of yeast (*Saccharomyces exiguus* SJPAF1) on odor emission and contaminants reduction in piggery slurry. *Kor J Environ Agric* 2009;28:47-52.
3. Lee JS, Park EH, Kwun SY, Yeo SH, Kim MD. Optimization of pretreatment of persimmon peel for ethanol production by yeast fermentation. *Kor J Mycol* 2014;42:202-6.
4. Costantini A, Vaudano E, Pulcini L, Boatti L, Gamalero E, Garcia-Moruno E. Yeast biodiversity in vineyard during grape ripening: comparison between culture dependent and

- NGS analysis. *Processes* 2022;10:901.
5. Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res* 2008;8:939-54.
 6. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. *The yeast: a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier; 2010. DOI:10.1016/B978-0-444-52149-1.00071-9.
 7. Ciani M, Canonico L, Comitini F. Improving white wine aroma and structure by non-Saccharomyces yeasts. In *White Wine Technology*. Cambridge: Academic Press; 2022. p. 117-30.
 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. *Kor J Microbiol* 2019;55:234-41.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol* 2021;38:3022-7.
 12. Gales AC, 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.
 13. Bellut K, Michel M, Zarnkow M, Hutzler M, Jacob F, Atzler JJ, Hoehnel A, Lynch KM, Arendt EK. Screening and application of *Cyberlindnera* yeasts to produce a fruity, non-alcoholic beer. *Fermentation* 2019;5:103.
 14. Nadai C, Duarte VS, Sica J, Vincenzi S, Carlot M, Giacomini A, Corich V. *Starmerella bacillaris* released in vineyards at different concentrations influences wine glycerol content depending on the vinification protocols. *Foods* 2022;12:3.