Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2018;37(4):312-316. Korean
Published online 2018 October 23. https://doi.org/10.5338/KJEA.2018.37.4.32

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

해국(*Aster spathulifolius* Maxim.)의 꽃에서 분리한 효모의 분자계통학적 분포해석 및 생물계면활성제 생산 균주의 스크리닝

김종식[1*], 김대신[2]

[1]경북해양바이오산업연구원, [2]세계유산·한라산연구원

Phylogeny of Yeasts Isolated from the Flower of *Aster spathulifolius* Maxim. and Screening of Biosurfactant Producers

Jong-Shik Kim[1] and Dae-Shin Kim[2] ([1]Gyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry, Uljin 36315, Korea, [2]World Heritage Office, Jeju Special Self-Governing Provincial Government, Jeju 63341, Korea)

Received: 13 September 2018/ Revised: 2 October 2018/ Accepted: 16 October 2018
Copyright ⓒ 2018 The Korean Society of Environmental Agriculture
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID
Jong-Shik Kim
http://orcid.org/0000-002-8181-1707

Abstract

BACKGROUND: Yeast biotechnology finds applications in various industries. Hence, we sought to explore the yeasts associated with the flower of *Aster spathulifolius* Maxim. This study aimed to isolate yeasts from the flower of the plant and screen for biosurfactant-producing yeasts.
METHODS AND RESULTS: We collected flowers of *Aster spathulifolius* Maxim. and performed pure isolation using four types of media. In total, 117 strains belonging to 4 genera, namely, *Cryptococcus* (75 strains), *Aureobasidium pullulans* (30 strains), *Candida* (11 strains), and *Rhodotorula* (1 strain), were isolated and identified by ITS sequencing. Upon in-depth analysis, *Cryptococcus*, the most dominant genus (75 strains) was categorized into the 'Unknown group'. Upon in-depth analysis of *A. pullulans*, we discovered the 'Unknown group I' (27 strains) and the 'Unknown group II' (2 strains), which have not been reported previously. Two *A. pullulans* isolates with potent surfactant activity were selected via the screening procedure.
CONCLUSION: In this study, a total of 117 strains were isolated from the flower of *Aster spathulifolius* Maxim. In addition, two biosurfactant-producing yeasts were identified from among the isolated yeasts.

Key words: *A. pullulans*, *Aster spathulifolius* Maxim., Biosurfactant,Yeast

*Corresponding author: Jong-Shik Kim
Phone: +82-54-720-3451; Fax: +82-54-780-3469;
E-mail: soilmicrobiome@gmail.com

서 론

효모는 육상 및 해양생태계뿐만 아니라 식물체, 동물체 등 생명체에도 널리 분포한다. 바이오테크놀로지 분야에서 광범위하게 활용되고 있는 효모는 농업을 비롯한 식품, 생의약, 생체촉매, 작물보호, 전통발효를 포함하여 인류에게 유용하게 활용되는 미생물이다(Deak 2009). 그 중에서도 yeast-like fungi의 일종인 흑효모 *Aureobasidium pullulans*는 mannitols (Price *et al.*, 2013), (poly) malic acid (Liu 1996; Nagata *et al.*, 1993; Zan and Zou 2013; Zou *et al.*, 2013), laccase (Rich *et al.*, 2011), lipase (Leathers *et al.*, 2013), biocontrol (Mari *et al.*, 2012; Prasongsuk *et al.*, 2013), siderophore (Ma *et al.*, 2012), lipid (Certik *et al.*, 2005; Turk *et al.*, 2004)를 생산하는 것이 알려져 왔으며, 최근 생물계면활성제도 생산한다는 것이 밝혀지고 있다 (Kim *et al.*, 2015, 2016, 2018).

해안에 자생하는 식물인 해국의 꽃을 분석하여, *A. pullulans*를 비롯한 유용효모를 분리하고자한다.

해국(*Aster spathulifolius* Maxim.)은 국화과(Compositae)의 반목본성 초본으로, 크기는 높이 30-60cm이며, 제주도를 비롯한 전국 바닷가에 자생하며 일본에도 분포한다(Lee, 2003). 잎은 어긋나고 주걱모양으로 양면에 융털이 있으며, 꽃은 가지끝에 머리모양꽃차례로 7월부터 11월까지 피며, 겨울에도 반상록으로 자란다(Lee, 1996). 해국의 어린잎은 식용하고 전초를 이뇨제, 보익제, 해수, 방광염 등의 약으로 쓰고, 뿌리줄기는 발한, 이뇨, 진통, 건위 등에 효능이 있다(Yun and Kim, 2010).

본 연구에서는 해국의 꽃에서 효모를 순수분리하고, 분자계통해석을 시행하여 그 특성을 파악하고, 생물계면활성제의 스크리닝을 통해서 바이오테크놀로지에의 응용을 위한 기초정보로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채취

시료채취는 2016년 10월에 시행하였으며. 채취 지점은 경북 울진군 죽변면에 소재하는 죽변등대 아래쪽이었다(N37.059°, E129.428°). 멸균한 핀셋과 가위로 현장에서 해국의 꽃부분만을 채취하여 코니칼 튜브(50 ml)에 수집하였다.

효모의 순수분리

효모분리를 위한 시료의 처리는 선행 연구와 같은 방법으로 진행하였다(Kim and Kim, 2015a, b). 즉, 가급적 다양한 효모를 발굴하기 위해 DG18 (Dichloran –Glycerol, 18%, MB Cell, Seoul), DOB with CSM (MP Bio, CA, USA), GPY agar (4% glucose, 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 1.5% agar), SCG (Sabouraud Glucose Agar, MB Cell, Seoul) 배지 등 총 4종의 배지를 고루 사용했고, 항생제(각 100 mg/L Streptomycin, Chloramphenicol), 곰팡이 억제제(0.4% L-sorbose, 0.1% Triton X-100)를 배지에 첨가했다. 배양 후 대형 플레이트(245 × 245 × 25 mm, Nunc Bio-Assay Dish, Thermo Scientific, Roskilde, Denmark)에서 효모로 추정되는 단일 콜로니를 117 균주를 분리하여, 총 4회의 순수분리를 진행했다(Kim and Kim, 2015a, b).

Sequence 분석 및 계통해석

효모를 순수분리 후 ㈜마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 균주의 ITS sequencing을 (Kim and Kim, 2015a, b), 유럽생물정보학연구소(EMBL-EBI)의 웹사이트에서 다중서열정렬 프로그램인 Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)로 multiple sequence alignment 를 수행하였다. 계통도는 MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011)의 neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)와 UPGMA method를 이용하여 완성하였으며, 균주의 염기서열 정보를 DDBJ/EMBL/GenBank에 등록하여 Accession numbers (LC331135~LC331251, 117 entries)를 부여받았다.

Fig. 1. Photographs of habitat of *Aster spahulifolius* Maxim. and characteristics of the plant (A: habitat, B: flower, C: leaf, D: root).

표면장력 측정

표면장력은 Sigma Model 700 Tensiometer (KSV instruments Ltd., Helsinki, Finland)를 이용하여 Du Noüy 링 방법으로 효모배양액을 측정하였다(Kim *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016).

결 과

해국 꽃에 있어서 효모 분포

해국의 꽃으로부터 분리한 균주의 ITS 유전자 염기서열 분석을 실시하여 총 117 균주의 염기서열 결과를 얻었다. *Cryptococcus* (75 균주, 64%), *A. pullulans* (30 균주, 25%), *Candida* (11 균주, 9%), *Rhodotorula* (1 균주)로 구성됨이 확인되었다. 특히 *Cryptococcus*가 64% (75 균주)로 우점하였다(Fig. 2).

*Cryptococcus*는 *C. aureus*와 근연관계인 유사 분리균주들이 75 균주 분리되었다(Fig. 3a). 또한 *Candida* 속중에서도 *C. powellii*와 유연관계인 11 분리균주가 하나의 그룹을 이루었다(Fig. 3b). 그 중 선행연구에서 생물계면활성제 등의 유용물질을 생산하는 것으로 규명된 *A. pullulans* 를 대상으로 추가분석을 실시했다. 그 결과 대다수가 Unknown group을 형성하여 이전에는 보고되지 않았던 그룹이 검출되었다(Fig. 3c). 추가분석에서 얻어진 결과를 토대로 본 연구그룹에서 분석한 해수효모(Chin *et al.*, 2017)와 재분석한 결과 Group I (1 균주), Unknown I (27 균주), Unknown II (2 균주)로 구분할 수 있었다(Fig. 3c).

해국 꽃에서 분리한 효모의 표면장력

분리한 효모중에서 대표적으로 *A. pullulans* 30 균주와 *Candida* 속 7 균주의 표면장력을 측정한 결과, *A. pullulans* 2 균주가 각각 29.47 N/m, 29.09 N/m 로 낮은 표면장력을 보였으며, *A. pullulans* 는 전체적으로 29.09에서 50.87 N/m 의 결과를 보였다. 또한 *Candida* 분리균은 모두 31.68 N/m 에서 37.22 N/m 정도의 비교적 낮은 표면장력을 보였다.

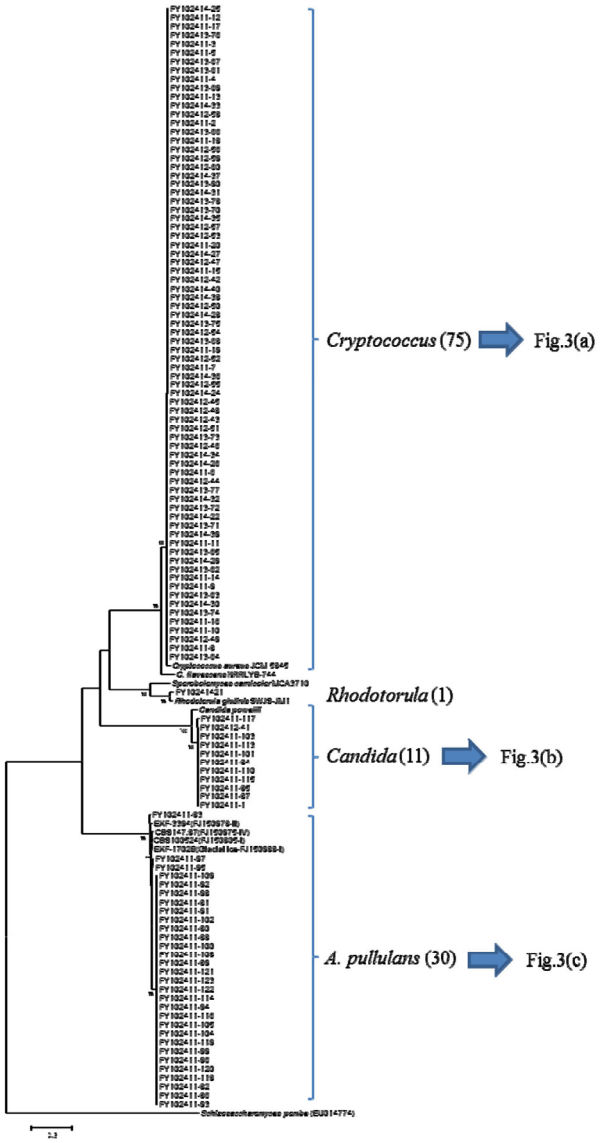

Fig. 2. Phylogenetic tree constructed by neighbor-joining method using the sequences of 117 yeast isolates from flower of *Aster spahulifolius* Maxim. The numerals represent the confidence levels from 1000 replicate bootstrap samplings (frequencies of less than 75% are not indicated).

고 찰

본 연구에서는 일반 육상과는 다른 환경인 해안가에 자생하는 해국의 꽃유래 효모 군집을 파악하고 그 특징을 분석하고자 하였다. 분자계통학적 분석을 통하여 이전에 발견하지 못했던 효모의 그룹을 발견하였다. *A. pullulans* 뿐만 아니라 *Cryptococcus* 속과 *Candida* 속에서도 지금까지 규명된 적이 없는 해국의 꽃에만 서식하는 신규의 그룹이 드러났다.

본 연구그룹의 선행연구에서 개망초 꽃에서는 총 79 효모 분리균주 중에서 39 균주가 *A. pullulans*로 규명되었으며, 그 중에서 group II가 2 균주, group I이 우점하며 특히

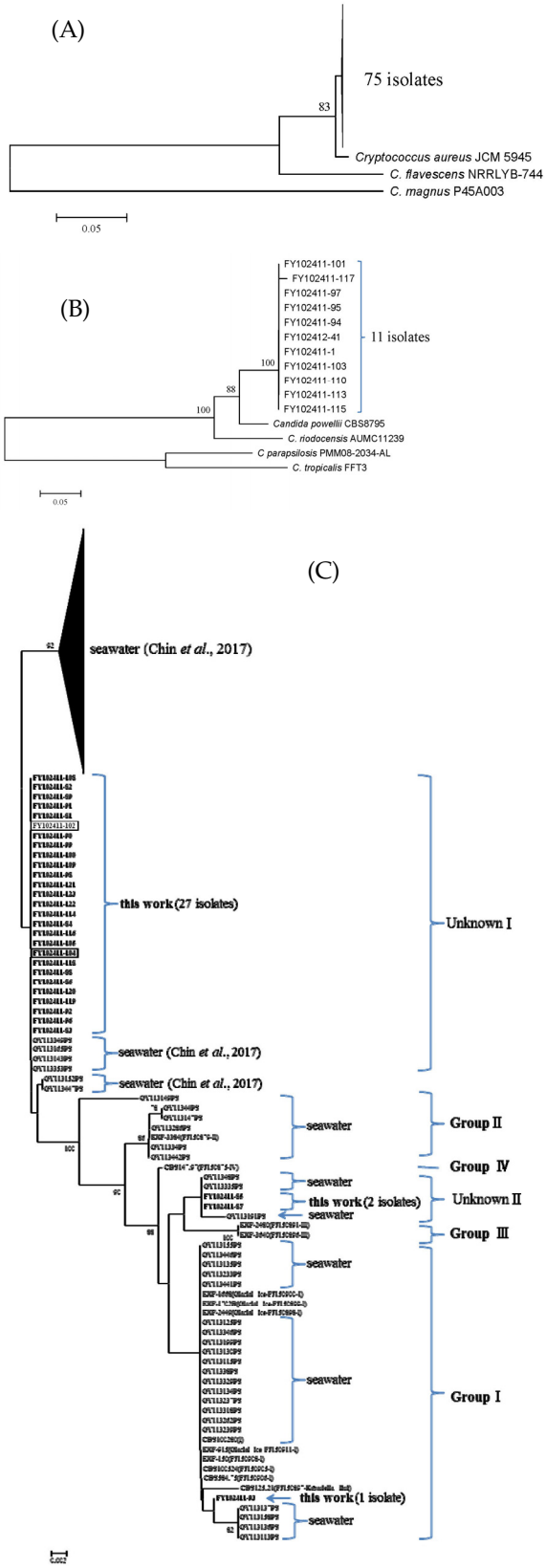

Fig. 3. Phylogeny of yeast isolates. (a) 75 isolates of *Cryptococcus* genus, (b) 11 isolates of *Candidas* genus, (c) 30 isolates of *A. pullulans* from this work and 236 from seawater, boxed isolates which were high surface activity.

group I 내의 Unknown 그룹이 발견되었으며, 25 균주가 새로이 규명되었다(Kim and Kim 2015a). 참나리 꽃에서는 총 96 효모분리균주 중에서 *A. pullulans*가 94 균주로 압도적으로 우점하였으며, 그 중에서 group I (83 isolates), group II (10 isolates)이 특히 우점하였다(Kim and Kim 2015b). 개망초와 참나리 꽃에서 분리한 *A. pullulans*와 본 연구에서 해국에서 분리한 27 효모균주를 계통해석을 수행한 결과, 개망초 및 참나리에서 분리된 *A. pullulan*와도 분류학적으로 근연관계를 보이지 않았다(data not shown). 바닷가에 맞닿아 해풍과 파도를 쉽게 접하고 있는 해안가에서 서식하는 해국에 정착하고 있는 *A. pullulans* 의 경우는 지금까지와는 전혀 다른 신규의 *A. pullulans* 이 정착하고 있었다. 생물계면활성제의 스크리닝을 위한 배양액의 표면장력 측정에서 일반적으로 물의 표면장력이 72 N/m인데 반해 30 N/m 이하의 생물계면활성제를 생산하는 *A. pullulans*을 두 균주 발견하였다. 이들 결과에서 확인된 고활성 *A. pullulans*의 생물계면활성제 생산 및 구조규명이 이루어지면 지금까지 규명된 적이 없는 신규의 구조를 가진 생물계면활성제의 발견이 기대된다. 선행연구에서와 같이 신규의 당지질계 생물계면활성제 glycerol-liamocin (Kim *et al.*, 2015)과 pullusurfactans (Kim *et al.*, 2018), 그리고 신규의 지방산계 생물계면활성제 aureosurfactin과 3-deoxyaureosurfactin (Kim *et al.*, 2016)과 같은 생물계면활성제의 발견 등으로 이어질 가능성이 있으며, 이를 활용한 향장소재 및 생의약 소재와 같은 신소재로의 가능성도 기대된다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was supported by a grant from the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by Korean government MSIP (Ministry of Science, ICT and Future Planning) (No. NRF-2014R1A2A1A11052888).

References

Čertík, M., Breierová, E., & Juršíková, P. (2005). Effect of cadmium on lipid composition of *Aureobasidium pullulans* grown with added extracellular polysaccharides. International Biodeterioration & Biodegradation, 55(3), 195-202.

Chin, I. S., Kim, Y. H., Yun, W. K., Park, N. H., & Kim, J. S. (2017). Phylogeny of marine yeast isolated form coastal seawater in the East sea of Korea. Korean Journal of Environmental Agriculture, 36(2), 129-134.

Deak, T. (2009). Ecology and biodiversity of yeasts with potential value in biotechnology. Yeast biotechnology: diversity and applications (eds. Satyanarayana, T., and Kunze, G.), pp. 151-168, Springer Science + Business Media B. V., Dordrecht.

Kim, J. S., & Kim, D. S. (2015a). Phylogeny of the yeast species isolated from wild tiger lily (*Lilium lancifolium* Thunb.). Korean Journal of Environmental Agriculture, 34(2), 149-154.

Kim, J. S., & Kim, D. S. (2015b). Yeasts in the flowers of wild fleabane [*Erigeron annus* (L.) Pers]. Korean Journal of Environmental Agriculture, 34(3), 254-259.

Kim, J. S., Lee, I. K., & Yun, B. S. (2015). A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb. PLoS One, 10(4), e0122917.

Kim, J. S., Lee, I. K.., Kim, D. W., & Yun, B. S. (2016). Aureosurfactin and 3-deoxyaureosurfactin, novel biosurfactants produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY. Journal of Antibiotics. 69(10), 759-761.

Kim, J. S., Lee, I. K., & Yun, B. S. (2018). Pullusurfactans A-E, new biosurfactants produced by *Aureobasidium pullulans* A11211-4-57 from a fleabane, Erigeron annus (L.) pers. Journal of Antibiotics, 71(11), 920-926.

Leathers, T. D., Rich, J. O., Anderson, A. M., & Manitchotpisit, P. (2013). Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol Letters, 35(10), 1701-1706.

Lee, T. B. (2003). Coloured flora of Korea. Hyangmunsa, Seoul, Korea.

Lee, W. T. (1996). Coloured standard illustrations of Korean plants. Academy Publishing Co., Seoul, Korea.

Liu, S., & Steinbüchel, A. (1996). Investigation of poly (β-L-malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans*. Applied Microbiology and Biotechnology, 46(3), 273-278.

Ma, Z. C., Chi, Z., Geng Q., Zhang, F., & Chi, Z. (2012). Disruption of the pullulan synthetase gene in siderophore-producing *Aureobasidium pullulans* enhances siderophore production and simplifies siderophore extraction. Process Biochemistry 47(12), 1807-1812.

Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., & Bertolini, P. (2012). Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biology and Technology 73, 56-62.

Nagata, N., Nakahara, T., & Tabuchi, T. (1993). Fermentative production of poly (β-L-malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium* sp. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 57(4), 638-642.

Prasongsuk, S., Ployngam, S., Wacharashindhu, S.,

Lotrakul, P., & Punnapayak, H. (2013). Effects of sugar and amino acid supplementation on *Aureobasidium pullulans* NRRL58536 antifungal activity against four Aspergillus species. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(17), 7821-7830.

Price, N. P., Manitchotpisit, P., Vermillion, K. E., Bowman, M. J., & Leathers, T. D. (2013). Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. Carbohydrate Research, 370, 24-32.

Rich, J. O., Manitchotpisit, P., Peterson, S. W., & Leathers, T. D. (2011). Laccase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. Rangsit Journal of Arts and Sciences, 1(1), 41-47.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4(4), 406–425.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10), 2731-2739.

Turk, M., Mejanelle, L, Sentjure, M., Grimalt, J. O., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitas, A. (2004). Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. Extremophiles. 8(1), 53-61.

Yun, K. W., & Kim, M. Y. (2010). Korean medicinal plants. Korea. pp. 502-503, Shinkwang Publishing Co., Seoul.

Zan, Z., & Zou, X. (2013). Efficient production of polymalic acid from raw sweet potato hydrolysate with immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 in aerobic fibrous bed bioreactor. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 88(10), 1822-1827.

Zou, X., Zhou, Y., & Yang, S. T. (2013). Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, 110(8), 2105-2113.