

컴퓨터 시스템에 의한 효모균주의 동정

차성관^{1*}·이해숙²·김영배²·고영희³

¹한국식품개발연구원 ²고려대학교 농과대학 ³한국과학기술원 유전공학센터

Identification of Yeast Strains with Computer System

Cha, Seong-Kwan^{1*}, Hae-Suk Lee², Young-Bae Kim² and Yung-Hee Kho²

¹ Korea Food Research Institute, P.O. Box 131 Cheong-Ryang, Seoul 130-650, Korea

² Agriculture College, Korea University

³ Genetic Engineering Center, KAIST

Three yeast strains isolated from various sources were tested in its morphological, physiological, and biochemical characteristics. The results were compared with those of 35 standard yeast strains in order to study important taxonomical characteristics for yeast identification and to find out the problem of computer identifying system. Although few characteristics did not coincide with literature data, three unidentified strains were temporarily identified as *Saccharomyces exiguus*, *Candida edax*, and *Candida membranaefaciens*. The use of computer identifying system must be accompanied with conventional identification method because of the restriction of data sources for computer system.

효모의 분류에 대해서는 지금까지 많은 문헌에 의해 충실되고 (1, 2, 3, 4) 혹은 내용이 증감되는 변천을 하여 왔는데 Lodder(4)에 의해 36개 genus로 분류되던 효모는 Kreger-van Rij(3)에 의해서는 62개의 효모 genus로 분류되었다. 이들 효모의 분류에는 곰팡이와는 달리 형태학적인 성질보다 생리·생화학적 성질들이 중요하게 사용되고 있지만 효모의 genus까지 동정하는 데는 아직까지도 형태학적인 성질들이 중요한 분류 열쇠로서 사용되고 있다. 컴퓨터에 의한 균의 동정 시스템이란 지금까지 보고된 많은 동정자료들을 컴퓨터에 입력시켜 놓고 새로 조사된 동정자료와 얼마나 일치된 것인가 검색하는 시스템으로 어떻게 검색할 것인가 또 검색 결과를 어떻게 판정할 것인가는 많은 문제점으로 지적되고 있다. 컴퓨터에 의한 효모의 동정 시스템은 Barnett *et al.* (2)의 data를 기초로한 컴퓨터 동정 시스템이 만들어져 있고 NCYC(National Collection of Yeast Cultures) 균주 은행에 효모 동정 프로그램이 만들어져 있는데 본 실험의 목적은 이러한 컴퓨터 동정 시스템의 하나인 NCYC의 "Compass"를 이용하여 효

모 동정을 실시함으로써 컴퓨터에 의한 효모 동정 시스템의 문제점 파악 및 효모의 동정에 중요한 역할을 하는 분류학적 성질들을 조사하는데 있었다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용된 균주는 Table 1에 나와 있는 것과 같이 kefir grain에서 분리된 균주와 돈분 발효액에서 분리된 균주 그리고 KCTC 7007의 새가지 미지 균주와 35개의 표준 효모 균주들을 사용하였다. 모든 균주들은 YM-broth(Difco, 0711-01-9)에 접종하여 25°C에서 48시간 진탕배양 하여 냉장고에 저장하였고 6개월에 한번씩 계대배양 하였다. 생리·생화학적 특성조사를 위한 균주의 inoculum 준비는 증류수에 수회 세척하여 사용하였다.

형태학적 및 생리·생화학적 성질들의 조사

효모의 동정을 하기 위한 형태학적 및 생리·생화학적 성질들의 조사는 NCYC의 Computer

Key words: computer identification, *Saccharomyces exiguus*, *Candida edax*, *Candida membranaefaciens*

* Corresponding author

Table 1. Yeast strains used for the taxonomical study

Unidentified yeasts	
SK2	from kefir grain
H	from fermented swine manure
7007	KCTC (Korean Collection for Type Cultures) 7007 <i>Candida</i> sp. soybean yeast
Ascosporogenous yeasts	
<i>Clavispora lusitaniae</i>	KCTC 7135, IFO 1019
<i>Debaryomyces hansenii</i>	KCTC 7128, NRRL 7426
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	KCTC 7125, NRRL 1626
<i>Hansenula capsulata</i>	KCTC 1565, ATCC 24204
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KCTC 7001, CBS 1555
<i>Lipomyces starkeyi</i>	KCTC 7127, NRRL 1388
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	KCTC 1194, NCYC 166
<i>Nematospora coryli</i>	KCTC 7124, NRRL 12970
<i>Pachysolen tannophilis</i>	KCTC 1703, ATCC 32691
<i>Pichia membranaefaciens</i>	KCTC 7006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCTC 1199, IFO 2346
<i>Sacch. cerevisiae</i>	KCTC 1213, ATCC 9763
<i>Sacch. cerevisiae</i>	KCTC 1709, ATCC 28338
<i>Sacch. diastaticus</i>	KCTC 1426, ATCC 13007
<i>Sacch. diastaticus</i>	KCTC 1804
<i>Sacch. uvarum</i>	KCTC 1198
<i>Sacch. uvarum</i>	KCTC 1218, ATCC 26602
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	KCTC 7126, NRRL 12793
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	KCTC 1704, ATCC 24945
<i>S. fibuligera</i>	KCTC 1705, ATCC 32693
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	KCTC 7005
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	KCTC 7111, ATCC 10664
Basidiosporogenous yeasts	
<i>Filobasidiella neoformans</i>	KCTC 7129, NRRL 179
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	KCTC 7102, ATCC 44444
<i>Rhodosporeidium toruloides</i>	KCTC 7130, NRRL 6987
<i>Tremella mesenterica</i>	KCTC 7131, NRRL 6151
Imperfect yeasts	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	KCTC 7132, NRRL 1411
<i>Candida intermedia</i>	KCTC 1701, ATCC 14439
<i>C. methanolica</i>	KCTC 1713, ATCC 26175
<i>Cryptococcus neoformans</i>	KCTC 7003
<i>Rhodotorula glutinis</i>	KCTC 7134, IFO 0667
<i>Rh. pallida</i>	KCTC 1208
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	KCTC 7114, ATCC 26697
<i>Torulopsis bombicola</i>	KCTC 7136, ATCC 22214
<i>T. candida</i>	KCTC 7000, ATCC 10539

Services Handbook(10)을 따랐으며 조사항목은 Table 2에 나와 있는 것과 같이 44개 항목으로 사용 배지 및 실험결과와 점검시간은 표에 나와 있는 것과 같다. 방법중에 carbon assimilation 실험은 액체 배지를 사용하지 않고 한천배지를 만들어 15 mm 페트리 접시에 한 플레이트 당 7균주씩 루프로 선을 그어 접종을 하였다. Table 2에 나와 있는 실험 이외에 Kreger-van Rij(3)에 따라 몇가지 추가 항목을 조사하였는데, 당 발효실험에서 melibiose, raffinose, starch, melezitose, trehalose, cellobiose, xylose와 같은 당들의 발효실험을 추가로 조사하였고, 유생생식을 알아보기 위하여 Gorodkova agar(3), Fowell's acetate agar(9), Malt extract agar(3), Aqueous agar(3), Oatmeal agar(3) 등을 추가로 사용하였다. 또 37°C에서의 성장률 조사하기 위하여 YM-broth를 사용하였고 yeast nitrogen base에 glucose를 첨가하고 100 ppm, 1000 ppm cycloheximide를 각각 첨가하여 만든 배지로 cycloheximide의 저항성에 대한 실험을 추가로 실시하였다.

전자현미경에 의한 포자관찰

포자가 형성된 효모 세포들은 세척 후 1.5% KMnO₄에 30분 고정시켰다. 고정된 효모 세포들은 ethanol series에 의해 50, 70, 90, 95% 및 100%의 순서로 탈수시켰고 propylenoxide로 embedding 하고 60-90 nm로 sectioning 하여 전자현미경(JEM 100 CS-II, 80 KV)으로 관찰하였다.

"Compass"에 의한 효모동정

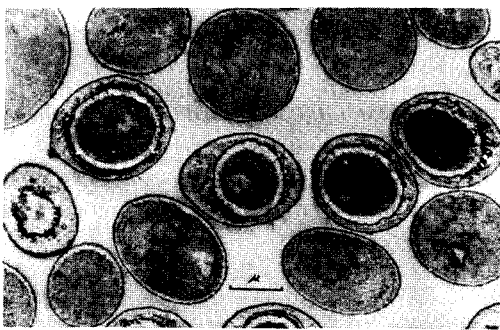
조사된 효모의 생태학적 생리·생화학적 성질중 46개의 실험결과 자료는 과학기술원 유전공학센터 유전자 은행(KCTC; Korean Collection, for Type Cultures)에서 DACOM-NET를 이용하여 영국에 있는 NCYC 데이터 बैं크의 "Compass(Computer Assisted Identification System)"에 자료 입력을 시켜 효모 동정을 실시하였다.

결과 및 고찰

효모의 특성중 가장 시간을 많이 요하고 판단이 어려운 것은 sporulation 실험이었다. 포자의 형성은 쉽게 관찰이 되지 않았고 또 포자의 모양과 상태를 결정하는 것이 광학현미경으로는 쉽게 구분이 되지 않았기 때문이다. 이러한 문제는 전자현미경을 이용한 포자의 관찰로서 해결할 수가 있었다. 이러한 포자의 형성과 모양은 효모의 그룹을 결정하는데 또 genus를 동정하는데 중요한 관건이 되고 있으면서도

Table 2. Morphological, biochemical and physiological tests according to NCYC (National Collection for Yeast Cultures) computer identifying system

Tests	Media	Recording results (days)
Cell morphology	YM-broth	2
Cultural characters	YM-broth, YM-agar	7, 14, 21
Vegetative reproduction	Corn meal agar	21
Sexual reproduction	Potassium acetate agar	21
Fermentation	Yeast extract 0.5% + 2% Carbohydrate (Glucose, Galactose Sucrose, Maltose, Lactose)	7, 14, 21
Carbon assimilation	Yeast nitrogen base + 0.5% Carbon source (Galactose, Sorbose, Sucrose, Maltose, Cellobiose, Trehalose, Lactose, Melibiose, Raffinose, Melezitose, Inulin, soluble Starch, Xylose, L-Arabinose, D-Arabinose, Ribose, Rhamnose, Ethanol, Glycerol, Erythritol, Ribitol, Galactitol, Mannitol, Sorbitol, α -M-D-Glucoside, Salicin, Lactic acid, Succinic acid, Citric acid, Inositol)	7, 14, 21
Nitrogen assimilation	Yeast carbon base + 0.064% Ethylamine (0.078% KNO_3)	7, 14, 21
Urease activity	0.1% peptone, 0.1% Glucose 0.5% NaCl, 0.2% KH_2PO_4 + 2% urea	7, 14, 21
Vitamin free growth	Vitamin free media	7, 14, 21

**Fig. 1. Ultrastructure of the ascospore of SK₂ after sporulation on potassium acetate agar.**

쉽게 관찰할 수 없는 경우가 많으므로 여러 저자들은 이러한 sexual reproduction 관찰이 없이 효모를 동정할 수 있는 열쇠를 제안하고 있다(1, 2, 3). *Saccharomyces*와 *Kluyveromyces* 두 genus의 구분은 ascospore의 모양과 ascospore가 free 상태로 되는가가 중요한 관건이 되고 있는데 또한 전자현미경

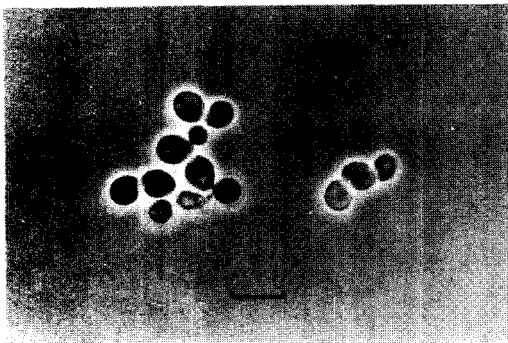
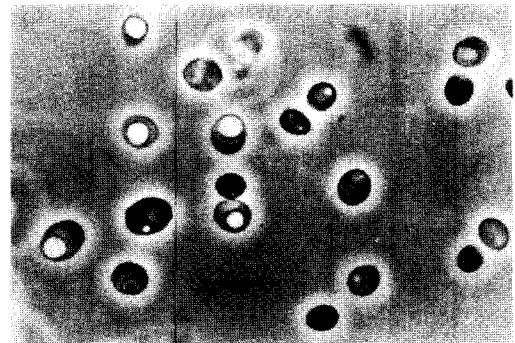
관찰에 의한 ascospore의 구조로서 두 genus를 구별할 수도 있다(5).

Fig. 1은 SK₂ 균주 ascospore의 전자현미경에 의한 관찰을 보여주고 있다. SK₂ 균주의 ascospore는 원형 또는 타원형의 모양을 가지고 있고 겉표면은 warty한 모양을 가지고 있었다. 그러나 Kreger-van Rij(5)가 *Kluyveromyces*와 일부 *Saccharomyces*에서 관찰할 수 있었던 double light inner layer는 관찰할 수가 없었다. Ascospore의 수는 항상 1개만을 관찰할 수 있었다. Table 3은 세 미지 효모 균주들의 형태학적 및 생리·생화학적 성질들을 조사한 결과를 보여주고 있는데 kefir grain에서 분리된 SK₂ 균주의 실험결과들을 NCYC의 "Compass"에 입력시킨 결과 *Saccharomyces exiguus*로 동정되었다. SK₂ 균주의 fermentation test에서 melibiose, raffinose, trehalose의 실험결과는 문헌에 의한 *Saccharomyces exiguus*의 성질들과 상이 하였고 탄소원의 이용 실험에서도 cellobiose, trehalose와 같은 탄소원 이용성이 문헌에 의한 *Saccharomyces exiguus*의 성질들과

Table 3. Comparison of test results of yeast strains

Tests	SK2	H	7007
Pseudomycelium	-	+	+
Cell morphology	Ovoidal	Cylindrical	Ovoidal
Fermentation			
Glucose	+	-	+
Galactose	+	-	+
Maltose	-	-	-
Sucrose	+	-	+
Lactose	-	-	-
Melibiose	+	-	+
Raffinose	-	-	+
Starch	-	-	-
Melezitose	-	-	-
Trelalose	-	-	+
Cellobiose	-	-	+
Xylose	-	-	-
Carbon assimilation			
Galactose	+	+	+
Sorbose	-	-	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	-	+	+
Cellobiose	+	+	+
Trehalose	-	+	+
Lactose	-	+	-
Melibiose	-	+	+
Raffinose	-	+	+
Melezitose	-	+	+
Inulin	-	-	+
Sol. Starch	-	-	-
D-Xylose	-	+	+

Tests	SK2	H	7007
L-Arabinose	-	+	+
D-Arabinose	+	+	+
D-Ribose	-	+	+
L-Rhamnose	-	+	+
Ethanol	+	+	+
Glycerol	+	+	+
Galactitol	-	+	+
D-Mannitol	-	+	+
D-Sorbitol	-	+	+
Salicin	-	+	+
Lactic acid	-	+	+
Succinic acid	-	+	+
Citric acid	-	+	+
Inositol	-	+	-
Methanol	-	+	-
α -M-D-Glucoside	-	+	+
Ribitol	-	-	+
Erythritol	-	-	-
Nitrogen assimilation			
Ethylamine	+	+	+
Pot. Nitrate	-	-	-
Growth at 37°C	-	+	+
Urease activity	-	+	+
Vitamin free medium	+	+	+
100ppm Cycloheximide	+	+	+
1000ppm Cycloheximide	+	-	+
Identified as	<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Candida edax</i>	<i>Candida membranefaciens</i>

Fig. 2. Cell morphology of SK₂ after 2 day's growth in YM-broth.Bar equals 10 μ mFig. 3. Ascospore formation of SK₂ after one week's growth on potassium acetate agar.Bar equals 10 μ m

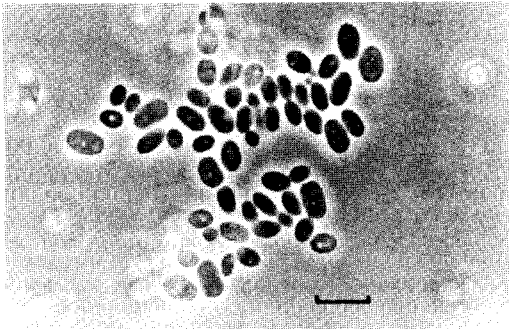


Fig. 4. The cell morphology of H after 2 day's growth in YM-broth.
Bar equals 10 μ m

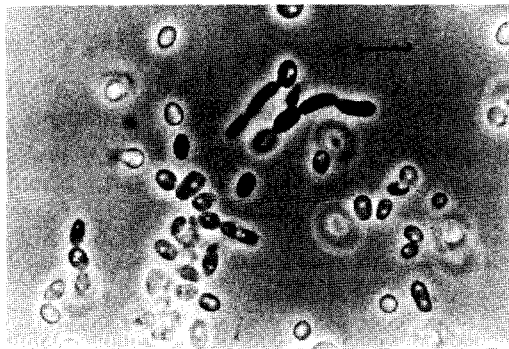


Fig. 5. The cell morphology of H after 6 day's growth in YM-agar.
Bar equal 10 μ m

일치되지 않는 결과를 가져왔다. 또한 SK2 균주는 vitamin free medium에서 성장을 보여주었는데 이러한 실험결과도 문헌과 일치되지 않는 것이었다(3, 4). Fig.2에서는 SK2 균주의 YM-broth에서 48시간 자랐을 때의 세포의 모양을 보여주고 있고 Fig.3에서는 SK2 균주의 potassium acetate agar 배지에서 1주일 자랐을 때 ascospore가 형성된 것을 보여주고 있다. SK2 균주의 ascospore는 malachite green 염색방법에 의해서 확인이 되었다.

돈분 발효액에서 분리된 효모균주 H의 실험결과를 NCYC의 "Compass"에 입력시킨 결과 *Cryptococcus laurentii*로 동정이 되었다. 그러나 문헌에 의한 *Candida edax*의 성질들이 *Cryptococcus laurentii*의 문헌에 의한 성질들 보다 효모균주 H의 실험결과와 더 일치되는 것을 발견할 수 있었다. 즉 *Cryptococcus laurentii*는 rudimentally한 pseudomycelium을 가지고 있고 세포 형태도 cylindrical 하지 않고 ovoidal 형태이다. 또한 효모균주 H의 실험결과를

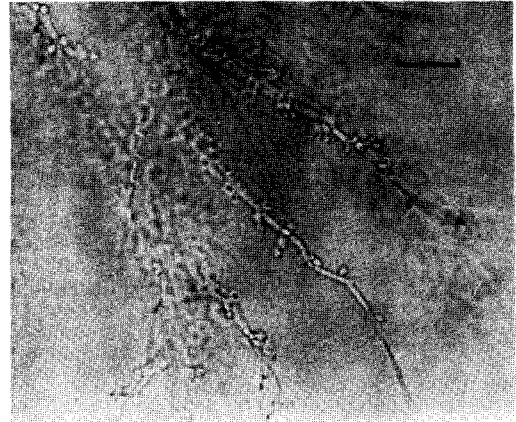


Fig. 6. Pseudomycelium formation of H after 3 week's growth on corn meal agar under cover glass.
Bar equals 40 μ m

모든 생리·생화학적인 성질에 있어서 *Cryptococcus laurentii*보다 *Candida edax*에 더 일치되는 것을 알 수 있었다. 이러한 여러가지 이유에 의해서 H균주는 *Candida edax*로 잠정적으로 동정 되었다. 명확한 두 species간의 구분은 Genome DNA의 Guanine과 Cytosin의 G+C mol%로 할 수가 있는데 즉 *Candida edax*의 G+C는 46.8 mol%이고 *Cryptococcus laurentii*의 G+C는 51-59 mol%이다. 현재 효모균주 H의 G+C mol% 정량 실험이 이루어지고 있는데 결과에 따라 확실한 것이 밝혀지리라 본다. H균주는 sorbose, methanol, ribitol, erythritol과 같은 탄소원의 이용도에서 *Candida edax*와 상치된 결과를 보여주었고 urease activity를 가지고 있고, 또한 KNO₃를 이용하지 못하는 점에서 *Candida edax*와 상이한 결과를 보여주었다. (Table 3). Fig. 4와 Fig.5는 YM-broth와 YM-agar에서 자란 H균주의 세포 형태를 보여주고 있다. Cylinder 형태의 세포 모양을 Fig.4에서, rudimentally한 mycelium의 형성을 Fig.5에서 나타내었다. Fig.6은 dalmau plate technique에 의한 corn meal agar 배지에서 cover glass 밑에 형성된 H균주의 pseudomycelium을 보여주고 있다.

Candida sp.로 동정되었던 KCTC 7007 효모의 실험결과들을 NCYC의 "Compass"에 입력시킨 결과 *Candida membranaefaciens*로 동정이 되었다. KCTC 7007 효모의 실험결과들은 문헌에 의한 *Candida membranaefaciens*의 성질들과 비교한 결과 대체적으로 일치되는 것을 발견할 수 있었고 cycloheximide에 대한 저항성, vitamin free media에서의 성장 그리고 urease activity에서 문헌과 상

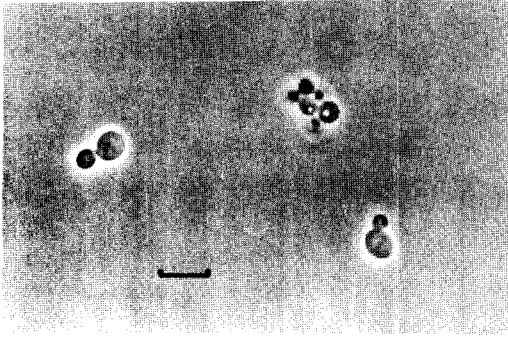


Fig. 7. The cell morphology of KCTC 7007 after 2 day's growth in YM-broth. Bar equals 10 μ m

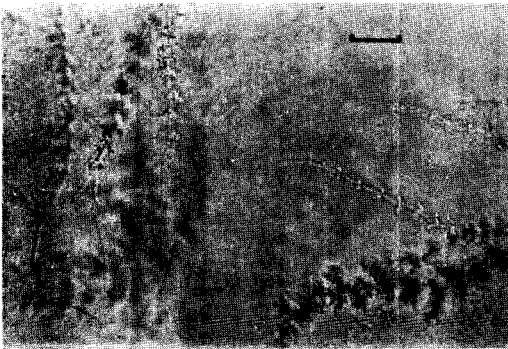


Fig. 8. Pseudomycelium formation of KCTC 7007 after 3 week's growth on corn meal agar under cover glass. Bar equals 40 μ m

치되는 결과를 보여주었다. 그리고 erythritol을 탄소원으로 이용하지 못하는 것이 문헌에 의한 *Candida membranaefaciens*의 성질과 일치되지 않는 점이었다(Table 3). Fig.7에서는 KCTC 7007의 YM-broth에서 48시간 자란 세포형태를 볼 수가 있고 Fig.8에서는 dalmau plate technique에 의한 corn meal agar 배지에서 cover glass 밑에 형성된 KCTC 7007의 pseudomycelium을 관찰할 수가 있다.

Candida 속으로 밝혀진 기지의 두 균주는 species까지 잠정적으로 동정할 수가 있었는데 *Candida edax*와 *Candida membranaefaciens*의 perfect state는 아직까지 알려지지 않았고 이러한 perfect state의 발견이 앞으로 남은 과제라 할 수 있는데 이를 위하여 여러가지 포자형성의 조건이라든가 mating type의 발견이 선행되어야 하리라 본다(6, 7, 8). 표준 균주로 사용된 35개의 효모 균주들의 생태학적 생리·생화학적 성질들의 실험결과들은 문헌에 의한 성질들과 비교한 결과 대부분의 표준 균주 효모들의 실험결과들은 대부분 문헌과 일치되는 양

성 음성반응의 실험결과를 보여주었다. 몇가지 실험 결과에 있어 일치되지 않는 혹은 유의할 점을 열거하면 carbon assimilation 실험에서 *Saccharomyces diastaticus* (KCTC 1426), *Pichia membranaefaciens*, *Metchnikowia pulcherrima*, *Torulasporea delbrueckii*와 같은 표준 효모 균주는 보통 5가지 이상의 문헌에는 이용되지 않는 탄소원을 이용하는 실험 결과를 보여주었다. 그외의 표준 균주들에 있어서도 탄소원의 이용 실험에 있어 문헌에 이용되지 못하는 것으로 나와 있는 탄소원들을 한 두가지씩 이용하는 경우가 많았다. 이러한 실험결과들이 strain에 의한 성질의 차이인지는 확실히 밝혀지지 않았다. Fermentation 실험의 결과들은 대체적으로 문헌과 일치되는 실험결과를 보여주었고 vitamin free media에서는 몇 표준 균주들의 문헌과 일치되지 않는 결과들을 보여주었다.

요 약

컴퓨터 효모 동정 시스템의 하나인 NCYC의 "Compass"를 이용하여 효모 동정을 실시함으로써 컴퓨터에 의한 효모 동정 시스템의 문제점 파악 및 효모 동정에 중요한 역할을 하는 분류학적 성질을 조사하기 위하여 kefir grain에서 분리된 효모 균주와 돈분 발효액에서 분리된 효모 균주 그리고 KCTC 7007 효모 균주를 사용하여 약 50여가지의 형태학적인, 생리·생화학적인 성질들을 조사하였다. 세 균주의 올바른 동정작업을 위하여 35개의 표준 균주를 사용하여 결과를 문헌과 비교하였다. 미지의 세 효모 균주는 *Saccharomyces exiguus*, *Candida edax*, *Candida membranaefaciens*로 잠정적으로 동정되었으며 컴퓨터 동정 시스템의 사용은 제한된 data의 입력 등의 이유에서 반드시 문헌적인 재래적인 동정작업이 병행되어야 하리라 본다.

참고문헌

1. Barnett, J.A. and R.J. Pankhurst. A new key to the yeasts. North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1974).
2. Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. Yeasts, characteristics and identification. Cambridge Uni. Press, London (1983).
3. Kreger-van Rij, N.J.W. (Ed.). The yeasts. A taxonomic study. 3rd Ed. Elsevier Soc. Publ. Co., Amsterdam (1984).
4. Lodder, J. (Ed.). The yeasts. A taxonomic study.

- 2nd Ed. North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1970).
5. Kreger-van Rij, N.J.W. A comparative ultrastructural study of the ascospores of some *Saccharomyces* and *Kluveromyces* species. *Arch. Microbiol.* **121**: 53-59 (1979).
 6. Wickerham, L.J. Validation of the species *Pichia guilliermondii*. *J. Bacteriol.* **92**: 1269 (1966).
 7. Wickerham, L.J. and K.A. Burton, Occurrence of yeast mating types in nature. *J. Bacteriol.* **63**: 449-451 (1952).
 8. Wickerham, L.J. and K.A. Burton. A Clarification of the relationship of *Candida guilliermondii* to other yeasts by a study of their mating types. *J. of Bact.* **68**: 594-597 (1954).
 9. Fowell, R.R. Sodium acetate agar as sporulation medium for yeasts. *Nature* **170**: 578 (1952).
 10. National Collection of Yeast Cultures. NCYC Computer services (Handbook). Institute of Food Research, Norwich

(Received September 15, 1988)