한 국 균 학 회 지 The Korean Journal of Mycology Research Note

대전 계족산과 충남 오서산 및 전북 백암산 주위 야생화들로부터 효모의 분리 및 동정

민진홍 · 류진주 · 김하근* · 이종수

배재대학교 바이오 · 의생명공학과

Isolation and Identification of Yeasts from Wild Flowers in Gyejoksan, Oseosan and Beakamsan of Korea

Jin-Hong Min, Jin-Ju Ryu, Ha-Kun Kim* and Jong-Soo Lee

Department of Biomedicinal Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

ABSTRACT : Yeasts isolated from wild flowers of Gyejoksan in Daejeon city, Oseosan in Chungchungnamdo, and Baekamsan in Jeollabukdo, Korea were identified by comparison of nucleotide sequences for PCR-amplified D1/D2 region of 26S rDNA or internal transcribed spacer (ITS) 1 and 2 including 5.8S rDNA using BLAST. Twelve yeast strains of ten species and seventeen yeast strains of ten species were isolated from wild flowers of Gyejoksan and Oseosan, respectively. And thirty seven yeast strains of twenty four species were isolated from wild flowers of Baekamsan. Total thirty four yeast species were isolated from three different sample collection areas, but only nine species were overlapped from the at least two different sampling areas: *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus flavus*, *Metschnikowia* sp., *Pseudozyma aphidis*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces carnicolor*, and *Sporobolomyces ruberrimus*. Among them only *Cryptococcus aureus* was occurred from all three different collection sites. Other twenty five species were restricted to specific collection site suggesting that each area has distinctive yeast flora.

KEYWORDS : Identification, rDNA analysis, Wild flower, Yeast flora

국내에서는 주로 전통 주류나 장류 등의 발효식품, 혹은 일부 누룩 등의 발효제에서 알코올발효 효모(Kim *et al.*, 1999), 항고혈압성 물질 생산 효모(Kim *et al.*, 2004), 혈전 용해물질 생산 효모(Jang *et al.*, 2011) 그리고 killer toxin 생산 효모(Lee *et al.*, 1999) 등이 분리, 선발되어 그 중 일부가 산업적으로 이용되고 있다(Lee *et al.*, 1996). 또한 최근 *Pichia burtonii* 등이 시판 막걸리에서 동정되어 보고되었다(Min *et al.*, 2012b). 그렇지만 자연환경에 서식하고 있는 야생 효모들을 분리하여 동정하고 이들을 산업적으로 응용하려는 시도는 국내외적으로 거의 보고되어 있지 않다. 따라서 전통적으로 수행해 온 식품으로부터 효모를 동정하는 접근방식 대신 자연환경으로부터 신규 효모들을 분리, 동정함으로써 새로운 국내 미기록 효모들 및 국내외에 보고되지 않은 신종 효모들을 발굴하고 동시에 이들에 대해 고부가가치의 의약 산업이나 건강 식품산업 등에 응용할 수 있는 잠재성을 검토할 필요성이 대두되고 있다. 이런 목적을 달성하기 위해 본 연구진은 전보(Min *et al.*, 2012a)에서 대전과 충남의 일부 지역에서 하천 및 야산 등지에 서식하고 있는 야생화들로부터 다양한 효모들을 분리하고 이들을 동정하여 보고한 바 있다. 본 연구에서는 대전의 계족산, 충남 홍성의 오서산 그리고 전북 정읍 백암산에 식생하고 있는 진달래 등을 비롯한 다양한 야생화들을 수집하여 이들에 서식하고 있는 효모를 분리하고 동정하였다.

대전 계족산과 충남 홍성 오서산 및 전북 정읍 백암산

Kor. J. Mycol. 2013 March **41**(1): 47-51
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.1.47
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

***Corresponding author**
E-mail : hakun@pcu.ac.kr

Received March 5, 2013
Revised March 19, 2013
Accepted March 20, 2013

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.

일대에서 2012년 봄에 개화한 꽃(화분) 37점 각각을 멸균 튜브에 채취한 후, 5 mL의 멸균수를 넣고 1시간 동안 진탕하여 현탁액을 얻었다. 현탁액 일부를 스트렙토마이신(50 g/mL)과 앰피실린(50 g/mL)이 들어 있는 Yeast extract-peptone dextrose 한천배지에 도말하고 30°C에서 48시간 배양함으로써 효모 균락들을 얻었다(Min *et al*., 2012a).

한천배지에서 균락을 이룬 효모들의 동정은 26S rDNA의 D1/D2 부위 혹은 ITS1/5.8S rDNA/ITS2 부위의 염기서열 상동성 비교법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. PCR을 수행하기 위해 먼저 분리한 효모들의 DNA를 Genomic DNA prep kit for yeast(SolGent, Daejeon, Korea)로 추출하였다. 추출한 효모 DNA를 주형으로 사용하여 26S rDNA의 D1/D2 부위를 증폭하기 위해 NL1(5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3')과 NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3') 프라이머들을, 그리고 ITS1/5.8S rDNA/ITS2 부위를 증폭하기 위해서는 ITS1(5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3')과 ITS4(5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') 프라이머들을 PCR 반응 혼합물에 가하여 DNA를 증폭시켰다. PCR 반응이 종료된 후 1.5% 아가로스 젤을 이용한 전기영동으로 증폭된 DNA들을 확인하고, 다시 이 PCR 산물을 Gel extraction kit(QIAGEN)로 정제하여 이들의 염기서열을 코스모젠텍사(Seoul, KOREA)에 의뢰하여 ABI 3730xl DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석된 염기서열은 ClustalX2 프로그램을 사용하여 정렬하였다(Min *et al*., 2012a).

얻은 염기서열들은 NCBI의 BLAST를 사용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 효모들과의 분자생물학적 유연관

Table 1. Yeasts species isolated from wild flowers collected in Gyejoksan in Daejeon city, Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity(%)	Amplified regions
1	*Cryptococcus aureus*	74-D-1	HQ832810.1	529/529(100)	ITS
2	*Cryptococcus flavus*	341-D-1	EU177572.1	639/639(100)	D1/D2
3	*Debaryomyces hansenii*	72-D-4	JQ026331.1	321/327(98)	ITS
4	*Filobasidium floriforme*	343-D-1	GQ352532.1	643/643(100)	D1/D2
5	*Hannaella oryzae*	344-D-1	JQ754139.1	640/640(100)	D1/D2
6	*Pseudozyma aphidis*	72-D-2	JN940465.1	395/395(100)	ITS
7	*Rhodosporidium paludigenum*	91-D-2	JQ425404.1	573/582(98)	ITS
		91-D-1	HQ670676.1	607/607(100)	ITS
8	*Rhodotorula glutinis*	73-D-2	AM60642.1	607/607(100)	ITS
		344-D-2	JQ917424.1	576/578(99)	D1/D2
9	*Rhodotorula minuta*	73-D-1	JQ665425.1	335/335(100)	ITS
10	*Sporobolomyces ruberrimus*	73-D-3	JN104560.1	337/338(99)	ITS

Table 2. Yeasts species isolated from wild flowers collected in Oseosan in Chungchungnamdo, Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity(%)	Amplified regions
1	*Candida* sp.	383-CO-1	AY833088.1	647/648(99)	D1/D2
2	*Cryptococcus aureus*	380-CO-2	AY822609.1	603/607(99)	D1/D2
3	*Cryptococcus flavescens*	371-CO-2	JX049434.1	600/603(99)	D1/D2
		373-CO-1	JX049434.1	598/601(99)	D1/D2
		377-CO-1	JX049434.1	597/601(99)	D1/D2
		378-CO-1	JX049434.1	600/604(99)	D1/D2
		379-CO-1	JX049434.1	599/604(99)	D1/D2
		382-CO-2	FJ743610.1	602/606(99)	D1/D2
		383-CO-2	FJ743610.1	604/607(99)	D1/D2
4	*Cryptococcus* sp.	376-CO-3	AB462335.1	576/580(99)	D1/D2
5	*Metschnikowia* sp.	379-CO-3	JX257178.1	511/514(99)	D1/D2
6	*Meyerozyma guilliermondii*	371-CO-1	JQ686905.1	574/574(100)	D1/D2
7	*Pseudozyma rugulosa*	380-CO-1	JN940523.1	610/615(99)	D1/D2
8	*Rhodotorula mucilaginosa*	380-CO-3	FN428899.1	572/575(99)	D1/D2
9	*Rhodotorula nothofagi*	374-CO-2	FJ743617.1	590/592(99)	D1/D2
		376-CO-2	FJ743617.1	590/592(99)	D1/D2
10	*Sporobolomyces carnicolor*	374-CO-1	AY070008.1	566/567(99)	D1/D2

Table 3. Yeasts species isolated from wild flowers collected in Baekamsan in Jeollabukdo, Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity(%)	Amplified regions
1	*Auriculibuller fuscus*	393-JB-1	AM748525.1	624/631(99)	D1/D2
2	*Bullera japonica*	405-JB-1	AF444760.2	618/619(99)	D1/D2
3	*Bulleromyces albus*	395-JB-2	DQ377658.1	640/640(100)	D1/D2
		399-JB-2	DQ377658.1	640/640(100)	D1/D2
4	*Cryptococcus aureus*	391-JB-2	EU304246.1	629/630(99)	D1/D2
		408-JB-1	EU304246.1	630/630(100)	D1/D2
5	*Cryptococcus dimennae*	407-JB-4	JN400759.1	635/639(99)	D1/D2
6	*Cryptococcus flavescens*	388-JB-1	FJ743610.1	640/640(100)	D1/D2
		389-JB-1	FJ743610.1	640/640(100)	D1/D2
		390-JB-2	FJ743610.1	639/640(99)	D1/D2
		387-JB-2	FJ743610.1	640/641(99)	D1/D2
7	*Cryptococcus flavus*	407-JB-3	FJ743627.1	638/640(99)	D1/D2
8	*Cryptococcus laurentii*	123-Z-1	FJ743631.1	619/640(97)	D1/D2
9	*Cryptococcus magnus*	391-JB-4	AY242120.1	642/643(99)	D1/D2
10	*Cryptococcus* sp.	117-Z-1	FM178286.1	640/640(100)	D1/D2
11	*Dioszegia takashimae*	407-JB-1	DQ003331.1	633/639(99)	D1/D2
		408-JB-2	DQ003331.1	632/639(99)	D1/D2
12	*Filobasidium floriforme*	394-JB-1	GQ352532.1	643/643(100)	D1/D2
		396-JB-1	GQ352532.1	643/643(100)	D1/D2
13	*Hannaella oryzae*	401-JB-1	JQ754139.1	640/640(100)	D1/D2
14	*Metschnikowia* sp.	397-JB-2	JX257178.1	551/553(99)	D1/D2
		387-JB-1	AB462344.1	501/505(99)	D1/D2
		404-JB-1	JX257178.1	551/553(99)	D1/D2
15	*Pseudozyma antarctica*	123-Z-4	AB566343.1	648/648(100)	D1/D2
16	*Pseudozyma aphidis*	121-Z-2	JN942666.1	439/441(99)	D1/D2
17	*Rhodosporidium fluviale*	391-JB-3	FJ515261.1	611/616(99)	D1/D2
		399-JB-1	FJ515261.1	612/616(99)	D1/D2
18	*Rhodotorula glutinis*	115-Z-1	HQ670677.1	611/612(99)	D1/D2
		115-Z-4	HQ670677.1	611/612(99)	D1/D2
19	*Rhodotorula* sp.	409-JB-1	EU678935.1	587/589(99)	D1/D2
20	*Sporidiobolus pararoseus*	405-JB-3	JQ219311.1	612/614(99)	D1/D2
21	*Sporobolomyces carnicolor*	402-JB-1	JN940713.1	604/604(100)	D1/D2
		387-JB-3	JN940713.1	604/604(100)	D1/D2
22	*Sporobolomyces oryzicola*	407-JB-2	AF189990.1	629/629(100)	D1/D2
23	*Sporobolomyces phaffii*	404-JB-2	AY070011.1	601/601(100)	D1/D2
24	*Sporobolomyces ruberrimus*	121-Z-1	AY015439.1	595/598(99)	D1/D2
		121-Z-3	AY015439.1	588/602(97)	D1/D2

계를 비교 분석함으로써 동정하였고, 그 결과는 Table 1, Table 2 그리고 Table 3에 정리하였다.

계족산에서 수집한 7종의 야생화들로부터 얻은 현탁액을 항생제가 함유된 한천배지에 도말하여 생육시킨 효모 균락들을 분석한 결과, 10종의 효모 12균주를 분리할 수 있었다(Table 1). 오서산에서 수집한 9종의 야생화들로부터 얻은 현탁액을 항생제가 함유된 한천배지에 도말하여 생육시킨 효모 균락들을 분석한 결과, 10종의 효모 17균주를 분리하였다(Table 2). 백암산에서 수집한 21종의 야생화들로부터 효모들을 분리하여 동정한 결과, 모두 24종에 속하는 효모들 37균주를 분리하였다(Table 3).

계족산, 오서산, 그리고 백암산에서 분리된 이들 효모들은 모두 34종으로서 2곳 이상의 시료 채취 장소에서 동시에 발견된 효모는 *Cryptococcus* 속, *Pseudozygoma* 속, *Rhodotorula* 속, *Sporobolomyces* 속에 속한 9종의 효모들이다(Table 1, 2, 3). 이들은 *Cryptococcus* sp., *C. aureus*, *C. flavescens*, *C. flavus*, *Metschnikowia* sp., *Pseudozyma aphidis*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces carnicolor*, *S. ruberrimus*로서, 특히 *Cryptococcus* 속에 속하는 *C. aureus*는 3개의 지역에서 모두 분리된 유일한 효모이다. 하지만

*C. aureus*는 계족산에서 분리된 *Debaryomyces hansenii*, *Rhodosporidium paludigenum* 등과 함께 해양 효모로서 알려져 있고, 효율이 좋은 inulinase를 생산하는 것으로 보고되어서(Sheng *et al*., 2007), 그 유전자가 클로닝된 바 있다(Cao *et al*., 2013). 또한 *C. aureus*는 꽃에서 분리되어 보고된 적이 없으므로, 야생화에서 흔히 분리되는 *C. aureus*의 특성에 대해 추가적인 연구가 필요하다. 계족산과 백암산에서 분리된 *C. flavus*는 브라질에서 생산되는 과일로부터 전분 함유 배지를 이용하여 전분 분해능을 갖는 효모들을 스크리닝하는 도중에 분리되었는데(Wanderley *et al*., 2004), 이 보고는 *C. flavus*가 식물에 정상적으로 서식하는 효모임을 시사하고 있다. *Pseudozygoma* 속의 *P. aphidis*는 당지질을 생산하는 특성을 갖고 있기 때문에 이를 이용하여 탄소원으로서 대두유를 이용한 바이오 반응기를 사용하여 생물계면활성제로서 활용하기 위해 mannosylerythritol lipid를 생산하는 조건이 검토된바 있다(Rau *et al*., 2005). 하지만 식물에서 흔하게 분리되는 *Pseudozyma aphidis*는 인체에서는 드물게 분리되지만, *Pseudozyma aphidis*가 버킷 림포종 환자에서 호흡기 감염을 일으키는 기회성병원균(opportunistic yeast)으로 작용한다고 최근에 보고된바 있다(Parahym *et al*., 2013). *Rhodotorula* 속은 시료를 채취한 3곳으로부터 총 5종이 분리되었다. 그 중 계족산과 백암산에서 채취한 야생화로부터 분리된 *R. glutinis*는 (Table 1, 3) 카로티노이드를 생산하는 종으로서 전세계적으로 식물에 흔히 존재한다고 알려져 있다(Slavikova *et al*., 2007).

계족산과 백암산에서 분리된 *Rhodosporidium* 속 중에서 해양 효모로 알려진 *R. paludigenum*은 $CaCl_2$를 함께 섞어 체리 토마토가 곰팡이에 의해 수확을 한 후 부패되는 것을 막는데 있어서 화학 살균제 대용으로 사용할 수 있는 잠재성을 갖고 있다는 흥미로운 보고가 있다(Wang *et al*., 2010).

*Sporobolomyces ruberrimus*는 글리세롤과 황산 암모니움을 이용하여 지방산 및 카로티노이드 생산에 관한 연구가 보고된바 있다(Razani *et al*., 2007). 이 밖에도 오서산과 백암산에서 분리된 *Metschnikowia*는(Table 2, 3) 꽃과 과일에서 우점균으로 흔히 존재한다고 보고된바 있다(Slavikova *et al*., 2007).

본 실험은 계족산, 오서산, 백암산 등 세 곳으로부터 시료를 채취하여 효모를 분리 동정한 결과 총 34종을 분리하였지만, 이들 중 9종만이 두 곳 이상의 장소에서 동시에 검출 되었고 나머지 25종은 특정한 지역에서만 분리되었다. 이러한 사실은 계족산, 오서산, 백암산에 서식하는 야생화들 간에는 지역마다 독특한 미생물 다양성이 존재한다고 사료된다.

적 요

국내 자연환경의 효모 균총을 확인함으로써 유용한 효모자원을 확보하기 위한 연구의 일환으로 대전 계족산, 충남 오서산 그리고 전북 백암산 지역에 서식하는 야생화들을 채집하여 이들로부터 효모들을 분리, 동정하였다. 대전의 계족산에서 수집한 야생화로부터는 10종에 속하는 12균주의 효모들을 분리하였고, 충남의 오서산에서 수집한 야생화로부터는 10종의 효모들 17균주를 분리하였다. 또한 전북 백암산의 야생화로부터 모두 24종에 속하는 38균주의 효모들을 분리하였다. 계족산, 오서산, 그리고 백암산에서 모두 발견된 효모는 *Cryptococcus* 속, *Pseudozygoma* 속, *Rhodotorula* 속, *Sporobolomyces* 속에 속하는 9종의 효모들이었다. 특히 3개 지역에서 수집한 야생화들로부터 *Cryptococcus* 속에 속하는 *Cryptococcus aureus*만이 모두 분리되었는데, 이 결과는 각 지역마다 독특한 효모 다양성을 보이고 있음을 시사하는 것이다.

감사의 글

본 연구는 국립 생물자원관의 "자생생물 조사 발굴 연구사업-균류분야(2012)" 과제지원으로 실시된 연구 결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

Cao, T. S., Wang, G. Y., Chi, Z., Wang, Z. P. and Chi, Z. M. 2013. Cloning, characterization and heterelogous expression of the INU1 gene from *Cryptococcus aureus* HYA. *Gene.* 516:255-262.

Jang, I. T., Kim, Y. H., Yi, S. H., Lim, S. I. and Lee, J. S. 2011. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. *Kor. J. Mycol.* 39:227-228.

Kim, J. H., Kim, N. M. and Lee, J. S. 1999. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from traditional meju. *Kor. J. Food & Nutr.* 12:490-495.

Kim, J. H., Lee, D. H., Jeong, S. C., Chung, K. S. and Lee, J. S. 2004. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhinitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Micriobiol. Biotechnol.* 14:1318-1323.

Lee, J. S., Choi, Y. J., Kwon, S. J., Yoo, J. Y. and Chung, D. H. 1996. Screening and characterization of osmotolerant and gas-producing yeasts from traditional Doenjang and Kochujang. *Food Biotechnol., 5*:54-58.

Lee, J. S., Yi, S. H., Kim, J. H. and Yoo, J. Y. 1999. Isolation of wild killer yeast from traditional meju and production of killer toxin. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 14:434-439.

Min, J. H., Hyun, S. H., Kang, M. G., Lee, H. B. Kim, C. M., Kim, H. K. and Lee, J. S. 2012a. Isolation and identification of yeasts from wild flowers of Daejeon city and Chung-cheongnam-do in Korea. *Kor. J. Mycol.* 40:141-144.

Min, J. H., Kim, Y. H., Kim, J. H., Choi, S. Y., Lee, J. S. and Kim, H. K. 2012b. Comparison of microbial diversity of Korean commercial Makgeolli showing high β-glucan content and high antihypertensive activity, respectively. *Mycobiol.* 40:138-141.

Parahym, A. M., da Silva, C. M., Domingos, I. F., Gonalves, S. S.,

Rodrigues, M. M., de Morais, V. L. and Neves, R. P. 2013. Pulmonary infection due to *Pseudozyma aphidis* in a patient with Burkitt lymphoa: first case report. *Diagn Microbiol. Infect Dis*. 75:104-106.

Rau, U., Nguyen, A., Schulz, S., Wray, V., Nimtz, M., Roeper, H., Koch, H. and Lang, S. 2005. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:551-559.

Razani, S. H., Mousavi, S. M., Yeganeh, H. M. and Marc, I. 2007. Fatty acid and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* when using technical glycerol and ammonium sulfate. *J. Microbiol. Biotechnol*. 17:1591-1597.

Sheng, J., Chi, Z.M., Li, J., Gao, L. and Gong, F. 2007. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by crude inulinase. *Proc. Biochem*. 42:805-811.

Slavikova, E., Vadkertiova, R. and Vranova, D. 2007. Yeasts colonizing the leaf surfaces. *J. Basic Microbiol*. 47:344-350.

Wanderley, K. J., Torres, F. A., Moraes, L. M. and Ulhoa, C. J. 2004. Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol. Lett*. 231:165-169.

Wang, Y., Ren, X., Song, X., Yu, T., Lu, H., Wang, P., Wang, J. and Zheng, X. D. 2010. Control of postharvest decay on cherry tomatoes by marine yeast *Rhodosporidium paludigenum* and calcium chloride. *J. Appl. Microbiol.* 109:651-656.