

대전과 충남 지역에서 채취한 야생화로부터 효모의 분리 및 동정

민진홍¹ · 현세희¹ · 강민구¹ · 이향범² · 김창무³ · 김하근¹ · 이종수^{1*}

¹배재대학교 바이오·의생명공학과, ²진남대학교 응용생명공학부, ³국립생물자원관

Isolation and Identification of Yeasts from Wild Flowers of Daejeon City and Chungcheongnam-do in Korea

Jin-Hong Min¹, Se-Hee Hyun¹, Min-Gu Kang¹, Hyang-Beom Lee², Chang-Mu Kim³,
Ha-Kun Kim¹ and Jong-Soo Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon, 302-735, Korea

²Division of Applied Bioscience & Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³National Institute of Biological Resources, Korea(Environmental Research Complex), Incheon 404-708, Korea

(Received 10, September 2012., Accepted 15, September 2012)

ABSTRACT: Total 50 species, 80 strains: Eighty strains of yeasts were isolated from wild flowers of Daejeon city and its surroundings in Korea. Isolated yeasts were identified by comparison of their PCR-amplified 18s rDNA V₃ region or internal transcribed spacer-2 (ITS-2) genes with BLAST database. Among them, 32 species, 54 strains of yeasts were isolated and identified from wild flowers of Daejeon city, and *Cryptococcus* species were dominant yeasts. Furthermore, 18 species, 26 strains of yeasts were isolated and identified from wild flowers of Geumsan-gun and Nonsan-gun, Chungcheongnam-do in Korea, and also *Candida* species and *Pseudozyma* species were dominant yeasts.

KEYWORDS: 18s rDNA, BLAST database, ITS-2, PCR-amplify, Wild flowers, Yeast

서 론

효모는 분류학상의 명칭은 아니지만 주로 자낭포자 등에 의한 유성생식과 출아에 의한 무성생식을 하는 진균류에 속하는 고등 미생물로서 미생물 분류학상 자낭균류와 일부 담자균류에 속하는 유포자 효모들과 *Cryptococcales* 와 같이 자낭포자나 사출포자를 형성하지 않는 불완전 균류에 분포하고 있다.

효모는 몇 종을 제외한 대부분이 비병원성으로 알코올 발효력과 단백질 분해활성 등이 강한 종류가 있어 아주 오래 전부터 주류와 장류 등의 발효 식품 제조에 이용되어 오고 있고 비타민류, 정미성 핵산과 그 유도체, 균체 식량 및 사료 단백질 생산 자원 등으로도 개발되고 있다. 최근 효모의 각종 대사산물의 생성, 분비 기작이 구명되었고 빠른 생육과 배양이 용이한 잇점 등이 있어 재조합 DNA나 유전 형질들의 귀중한 숙주로도 이용되고 있으며 특히 필자 등에 의하여 효모에서 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해물질 생산(Kim *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2005)이 보고된 후로 효모로부터 항치매성 β -secretase

저해물질(Lee *et al.*, 2007)과 acetylcholine esterase 저해물질(Lee *et al.*, 2008), 혈전용해 활성물질(Jang *et al.*, 2011) 혈관신생억제물질(Jeong *et al.*, 2006), 미백성 tyrosinase 저해물질(Jang *et al.*, 2012), 정미성 리보핵산 물질(Lee *et al.*, 2004)과 killer 독성물질(Lee *et al.*, 1999)과 같은 다양한 의약활성물질이나 생리 기능성 물질에 관한 연구가 속속 보고되고 있다. 그 밖에도 알코올발효 효모(Kim *et al.*, 1999)와 효소생산 효모(Lee *et al.*, 1997a) 및 생리기능성 효모 등의 분리, 선별 연구가 실시되어(Lee *et al.*, 1997b) 일부가 산업적으로 이용되고 있으며 최근에는 시판 막걸리에서 항고혈압활성이 우수한 *Pichia burtonii* 등이 분리, 동정되었다(Min *et al.*, 2012).

지금까지 효모는 주로 전통 발효식품이나 누룩, 곡자, 전분질 원료나 발효액 등에서 분리, 동정되어 이들의 일부가 산업적으로 이용되고 있다. 그러나 우리나라 자연환경에 서식하고 있는 야생 효모들의 microflora를 확인하고 이들을 산업적으로 응용하려는 연구는 거의 실시되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 전국 각지의 자연환경에 서식하고 있는 효모들을 분리, 동정하여 Korea Yeast Mycoflora를 확립하고 미기록 종과 신종을 발굴하며 궁극적으로 이들을 고부가가치의 의약 산업이나 식품산업 등

*Corresponding author <E-mail : biotech8@pcu.ac.kr>

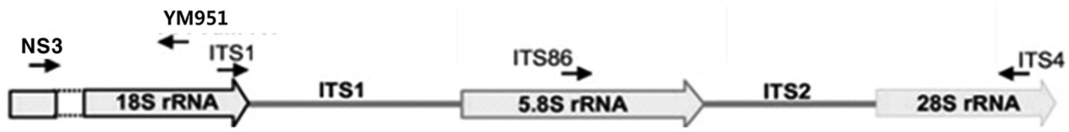


Fig. 1. Internal transcribed spacer genes for identification of yeasts.

으로의 응용성을 검토하고자 먼저 대전과 인근지역에서 서식하고 있는 야생 꽃들로부터 효모들을 분리, 동정하였다.

재료 및 방법

효모의 분리

대전, 충남지역의 하천, 연못과 바닷가, 야산, 논과 밭, 과수원 등지에서 2012년 봄에 개화한 꽃(화분)들을 멸균 튜브에 채취하여, 멸균수에 넣고 1시간 진탕 시킨 후 일 정액을 streptomycin(50 µg/ µl)과 ampicillin(50 µg/ µl)을 함유한 yeast extract-peptone dextrose(YEPD) 한천배지에 도말하여 30에서 48시간 배양한 후 생육한 효모들을 분리하였다.

분리 효모의 동정

분리 효모의 동정은 18s rDNA V₃ region 또는 ITS-2 region의 염기서열 상동성 비교 등을 이용하여 다음과 같이 실시 하였다. 먼저 위와 같이 분리한 효모들의 gDNA 를 genomic DNA prep kit for yeast(Sol Gent Co.)로 추출하여 PCR을 위한 주형 DNA로 사용하였다. 분리한 DNA를 18s rDNA universal primer로 NS3(5'ACG GGG GGG CAA GTC TGG TGC CAG CAG CC 3')과 YM951R(5'TTG GCA AAT GCT TTC GC 3') 또는 universal primer로 ITS1(5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3')과 ITS4(5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3')를 이용하고 1차 PCR product를 universal primer 로 ITS86(5'GTG AAT CAT CGA ATC TTT GAA C 3') 과 ITS4를 이용하여 2차 PCR하여 증폭시킨 후 1.5% agarose gel로 전기영동 하여 확인한 다음 이 PCR product 를 gel extraction kit(QIAGEN)로 정제하고 이들 sequence 를 분석하였다(Fig. 1). Alignment는 DNASTAR를 사용하여 florence corpet로 multiple sequence alignment하여 염기 서열을 정렬하였고, NCBI의 BLAST의 database와 염기 서열의 상동성을 조사하였다(Min et al., 2012).

결과 및 고찰

대전지역 야생화들로부터 효모의 분리 및 동정

대전지역 하천 등지에서 자라고 있는 야생화로부터 효 모들을 분리하여 위와 같이 18S rDNA 염기서열분석 또 는 ITS-2 염기서열 분석을 통한 분자생물학적 유연관계

비교분석 방법으로 동정한 결과는 Table 1과 같다. 모두 42점의 분리원으로부터 32종의 효모들을 54균주 분리하 였다.

대전지역 야생화에서는 일반적으로 전통발효식품이나 이 들의 부재료 등에서 우점균으로 보고된(Lee et al., 1997a),

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

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity (%)
1	<i>Acremonium strictum</i>	28-D-2	EF682095.1	307/307(100)
2	<i>Bullera unica</i>	21-D-4	AY887945.1	401/401(100)
3	<i>Candida pimensis</i>	62-D-1	FJ623594.1	342/398(85)
4	<i>Cryptococcus aureus</i>	21-D-3	EF466059.1	401/401(100)
		36-D-1	HQ832810.1	305/305(100)
5	<i>Cryptococcus carnescens</i>	21-D-7	DQ459618.1	399/401(99)
6	<i>Cryptococcus flavescens</i>	29-D-1	AB085797.1	401/401(100)
		36-D-4	AM176646.1	334/338(98)
7	<i>Cryptococcus flavus</i>	42-D-3	EU177576.1	301/301(100)
8	<i>Cryptococcus laurentii</i>	28-D-3	AB032640.1	401/401(100)
9	<i>Cryptococcus magnus</i>	22-D-2	JQ039906.1	288/288(100)
		22-D-5	JF9726701.1	357/357(100)
		26-D-4	AF190008.1	376/376(100)
		29-D-2	AF190008.1	375/376(99)
10	<i>Cryptococcus saitoi</i>	40-D-2	EU149781.1	352/353(99)
11	<i>Cryptococcus</i> sp.	42-D-2	HQ631032.1	355/355(100)
12	<i>Cryptococcus vishniacii</i>	5-D-1	EU723510.1	401/401(100)
13	<i>Debaryomyces hansenii</i>	30-D-1	JQ026331.1	321/327(98)
14	<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	22-D-4	AF444522.1	336/336(100)
16	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	17-D-1	HQ876033.1	385/386(99)
17	<i>Metschnikowia cibodasensis</i>	11-D-1	AB236924.1	200/208(96)
18	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	19-D-1	AB023469.1	378/379(99)

Table 1. Continued

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity (%)
19	<i>Pseudozyma antarctica</i>	38-D-1	JN942669.1	424437(97)
		60-D-1	JN942669.1	435/437(99)
20	<i>Pseudozyma aphidis</i>	1-D-1	JN940465.1	395/395(100)
		60-D-2	HQ832804.1	440/440(100)
		72-D-1	HQ848933.1	440/440(100)
21	<i>Rhodospordium fluviale</i>	26-D-3	FJ515184.1	283288(98)
22	<i>Rhodospordium paludigenum</i>	91-D-1	JQ425404.1	340/346(98)
23	<i>Rhodotorula glutinis</i>	23-D-3	AM160642.1	341/341(100)
		23-D-4	DQ832194.1	341/341(100)
		25-D-1	DQ832194.1	403/403(100)
		34-D-3	AM60642.1	341/341(100)
		60-D-3	AF218986.1	341/341(100)
		61-D-2	AM160642.1	341/341(100)
24	<i>Rhodotorula minuta</i>	34-D-2	JQ665425.1	335/335(100)
25	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	22-D-3	AF444589.1	376/376(100)
26	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	26-D-1	EU547494.2	403/403(100)
27	<i>Sporobolomyces cf. roseus</i>	23-D-2	JN938636.1	403/403(100)
		21-D-5	JN938636.1	403/403(100)
28	<i>Sporobolomyces roseus</i>	21-D-1	JN938994.1	403/403(100)
29	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	21-D-2	JN104560.1	337/339(99)
		28-D-1	JN104560.1	333/338(98)
		35-D-1	JN104560.1	337/338(99)
		36-D-2	JN104560.1	337/338(99)
		36-D-3	AY015439.1	334/338(98)
30	<i>Starmerella bombicola</i>	15-D-1	JQ698924.1	387/389(99)
		15-D-2	HQ111046.1	241/243(99)
		15-D-3	HQ111046.1	240/243(98)
		16-D-1	JQ698924.1	387/388(99)
		16-D-2	AB013558.1	385/390(99)
31	<i>Sydowia polyspora</i>	18-D-2	JQ780656.1	295/295(100)
32	<i>Teratosphaeria pseudosuberosa</i>	24-D-1	GU214611.1	401/401(100)

*Saccharomyces*속과 *Pichia*속균 등은 분리되지 않았고 *Cryptococcus magnus* 4균주를 포함한 *Cryptococcus*속균이

Table 2. Yeasts species isolated from wild flowers collected in Chungcheongnam-do in Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity(%)
1	<i>Bullera unica</i>	8-C-2	AY887945.1	401/401(100)
2	<i>Candida atakporum</i>	47-C-1	HM627108.1	190/204(93)
3	<i>Candida catenulata strain</i>	114-C-1	AY493436.1	402/402(100)
4	<i>Candida multigemmis</i>	50-C-1	FR819711.1	331/331(100)
		53-C-1	FR819711.1	330/331(99)
5	<i>Candida</i> sp.	44-C-1	AY559447.1	320/323(99)
		51-C-1	HM222578.1	260/260(100)
		58-C-1	HM222578.1	260/260(100)
6	<i>Cryptococcus aureus</i>	111-C-2	HQ832810.1	305/305(100)
7	<i>Cryptococcus</i> sp.	55-C-2	AJ345008.1	306/306(99)
8	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	59-C-1	EU494996.1	342/345(99)
9	<i>Lachancea thermotolerans</i>	46-C-1	FJ153217.1	341/343(99)
10	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	53-C-2	HM601457.1	203/207(98)
11	<i>Metschnikowia</i> sp.	58-C-2	AY188370.1	260/260(100)
12	<i>Pichia guilliermondii</i>	105-C-1	EU568971.1	325/325(99)
13	<i>Pseudozyma aphidis</i>	54-C-1	JN942667.1	428/442(97)
		109-C-1	HQ832804.1	427/440(97)
		111-C-1	JN942666.1	438/442(99)
		112-C-1	JN942666.1	439/442(99)
14	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	113-C-1	JN942670.1	435/444(98)
15	<i>Rhodospordium paludigenum</i>	114-C-2	JQ425395.1	342/344(99)
16	<i>Rhodotorula glutinis</i>	56-C-1	AF218986.1	341/341(100)
17	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	45-C-1	HQ670681.1	338/338(100)
		107-C-1	AY015429	328/338(97)
18	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	48-C-1	AY015439.1	337/338(99)
		55-C-1	AY015439.1	334/338(98)

14균주로 제일 많이 분리 되었다. 또한 *Rhodotorula glutinis* 6균주를 포함한 *Rhodotorula*속균이 8균주, *Sporobolomyces ruberrimus* 5균주를 포함한 *Sporobolomyces*속균이 8균주, *Pseudozyma*속균이 5균주, *Starmerella*속균이 5균주 등으로 많이 분리되어 이들이 우점균으로 추정되었다.

본 연구를 통해서 처음으로 대전지역 야생화로부터 *Metschnikowia* 속균과 *Starmerella* 속균 등 학술적으로나 산업적 응용 측면에서 거의 알려져 있지 않은 희귀성 효모들이 20여종이 분리되었다. 또한 공단부근 하천의 진달래에서는 *Sporobolomyces rubberimus*와 *Cryptococcus magnus* 등이 분리되었으나 주택가 근처의 진달래에서는 *Rhodotomula* 속균이 분리된 것 등으로 보아 같은 종류의 야생화라도 하천과 주택가 주변, 야산 등의 서식 환경에 따라 분리되는 효모의 수와 종류가 매우 상이 하였다.

충남지역 야생화들로부터 효모의 분리, 동정

대전에 인접한 충남 금산군과 논산군 등지의 산, 논과 밭, 하천 등지의 28점의 야생화들로부터 모두 18종의 효모들을 26균주 분리 하였다(Table 2). 대전지역에서 분리된 효모들과는 달리 *Candida multigemmis* 2균주를 포함한 *Candida* 속균이 7주, *Pseudozyma aphidis* 4균주를 포함한 *Pseudozyma* 속균이 5균주 등이 우점균으로 분리되었고 대전지역에서도 분리되었던 *Cryptococcus* 속균과 *Metschnikowia* 속균 등도 각각 2균주씩 분리되었다.

적 요

자연환경에서 분포하고 있는 효모의 mycoflora를 확인하고 궁극적으로 이들을 고부가가치의 산업에 응용하기 위한 연구의 일환으로 대전과 인근 충남지역 일부의 야생화들을 채집하여 효모들을 분리, 동정하였다. 대전지역 야생화 42점에서 32종의 효모들을 54균주 분리하였고 이들 중 *Cryptococcus* 속균과 *Phodotomula* 속균 등이 우점균이었으며 *Metschnikowia* 속균과 같이 희귀 효모들을 20여종 분리하였다. 대전 인근의 충남 금산군과 논산군 일부지역의 야생화 28점에서 모두 18종의 효모들을 26균주 분리하였다. 이들 균 중에서 *Candida* 속균과 *Pseudozyma* 속균 등이 우점균으로 분리되었다.

감사의 글

본 연구는 국립 생물자원관의 “자생생물 조사발굴 연구 사업-균류분야(2012)” 과제 지원으로 실시된 연구 결과의 일부로 연구비 지원에 감사 드립니다.

참고문헌

- Jang, I. T., Kim, Y. H., Kang, M. G., Yi, S. H., Lim, S. I. and Lee, J. S. 2012. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Mycol.* 40:60-64.
- 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.
- Jeong, S. C., Kim, J. H., Kim, N. M. and Lee, J. S. 2005. Production of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Malassezia pachydermatis* G-14. *Mycobiology.* 33:142-146.
- Jeong, S. C., Lee, D. H. and Lee, J. S. 2006. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1904-1911.
- Kim, J. H., Lee, D. H., Jeong, S. C., Chung, K. S. and Lee, J. S. 2004. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:1318-1323.
- 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.
- Lee, D. H., Lee, D. H. and Lee, J. S. 2007. Characterization of a new antidiemetic β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology.* 42:83-88.
- Lee, D. H., Lee, J. S., Yi, S. H. and Lee, J. S. 2008. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology.* 36:102-105.
- Lee, J. S., Hyun, K. W., Jeong, S. C., Kim, J. H., Choi, Y. J. and Miguez, Carlos B. 2004. Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and physiological activities. *Can. J. Microbiol.* 50:489-492.
- 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.
- Lee, J. S., Yi, S. H., Kwon, S. J., Ahn, C. and Yoo, J. Y. 1997a. Isolation identification and cultural conditions of yeasts from traditional Meju. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:435-441.
- Lee, J. S., Yi, S. H., Kwon, S. J., Ahn, C. and Yoo, J. Y. 1997b. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:448-453.
- Min, J. H., Kim, Y. H., Kim, J. H., Choi, S. Y., Lee, J. S. and Kim, H. K. 2012. Comparison of microbial diversity of Korean commercial Makgeolli showing high β -glucan content and high antihypertensive activity, respectively. *Mycobiology.* 40:138-141.