

제주도 토양에서 효모의 분리 및 동정

한상민 · 배상민 · 한재원 · 김지윤 · 이종수 · 김하근*

배재대학교 바이오 · 의생명공학과

Isolation and Identification of Yeasts from Jeju Island Soils

Sang-Min Han, Sang-Min Bae, Jae-Won Han, Ji-Yoon Kim, Jong-Soo Lee and Ha-Kun Kim*

Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea

ABSTRACT : Significant differences in annual precipitates on Jeju island have been reported depending on the location. We collected soil samples from east and west areas of Jeju Island to identify yeasts by plating on yeast peptone dextrose plates and subsequent analysis for the polymerase chain reaction amplified D1/D2 region of 26S rDNA of colonies. As a result, 20 yeast strains of 12 species were isolated from 7 different sampling sites in east area and 13 yeast strains of 6 species from 5 different sampling sites in west area. Some differences in yeast flora were observed depending on the sample collection sites having different annual precipitates.

KEYWORDS : D1/D2 region of 26S rDNA, Jeju Island soil samples, Yeast identification

효모는 드물게 질병을 일으킨다고 보고되기도 [1] 하지만, 전통적으로 식음료 발효에 사용되는 중요한 미생물이다 [2]. 최근 우리나라 생물자원을 확보하기 위한 노력의 일환으로 토양 [3], 야생화 [4], 매주 [5] 등 다양한 원천에서 효모를 분리하기 위한 시도가 있었다. 26S rDNA의 D1/D2 지역을 연쇄증합반응으로 증폭하면 약 600 nucleotides (nt) 길이의 DNA 조각을 얻을 수 있는데 [6], 이곳에서 일어난 염기서열 변이를 비교함으로써 효모 동정을 쉽게 행할 수 있다.

제주도는 연평균기온이 15.4°C에서 16.6°C로 기온의 연교차나 일교차가 육지에 비하여 작으며, 해양성기후를 보인다. 1981년부터 2010년까지 30년 간의 자료를 평균한 기상청 국가기후데이터센터 (<http://sts.kma.go.kr>)의 자료에 따르

면, 제주도의 연 강수량은 지역별로 큰 차이를 보인다. 즉, 제주도 동부지역(성산)이 1,966.8 mm로 최다강수량을 보이며 이는 서부지역(고산)의 연 강수량 1142.8 mm나 북부지역인 제주시의 연 강수량 1,497.6 mm에 비해 상대적으로 많다. 특히 월별로는 여름에 강수량이 집중되어 북부에 위치한 제주시는 7월부터 9월까지 각각 239.9, 262.5, 221.6 mm의 강수량을 보이며, 서부지역인 고산은 7월부터 9월까지 각각 178.0, 201.8, 116.2 mm의 강수량을 기록하였다. 남부지역에 속하는 서귀포는 5월부터 9월까지 각각 205.8, 276.9, 309.8, 291.6, 196.6 mm의 강수량을 보이며, 동부지역인 성산은 6월부터 9월까지 각각 223.7, 283.2, 360.6, 228.4 mm으로 서부와 북부지역보다 많은 강수량을 보였다.

제주도 야생화에서 분리한 효모의 종 다양성에 대한 연구는 이미 보고한 [9] 바 있으며, 본 연구에서는 제주도 동부지역과 서부지역에서 채취한 토양에서 서식하고 있는 야생효모들을 분리, 동정하였다. 지역적 기후 자료의 차이를 고려하여 2015년 7월 초에 제주도에서 강수량이 상대적으로 많은 동부지역 7곳 (Fig.1, A~G site), 강수량이 상대적으로 적은 서부지역 5곳 (Fig.1, H~L site)에서 표층 5 cm 이하에서 5~10 g의 토양을 무균적으로 채취하였다. 채취한 토양시료는 50 mL 멸균 튜브에 넣어 분석 전까지 냉장고에 보관을 하였고, 멸균된 증류수 10 mL을 사용하여 채취된 토양을 30분간 진탕하여 현탁시켰다. 앰피실린 (50 µg/mL) 이 들어 있는 yeast extract peptone dextrose (YPD) 한천배

Kor. J. Mycol. 2015 December, 43(4): 267-271
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.4.267>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received December 5, 2015
 Revised December 8, 2015
 Accepted December 10, 2015

©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.

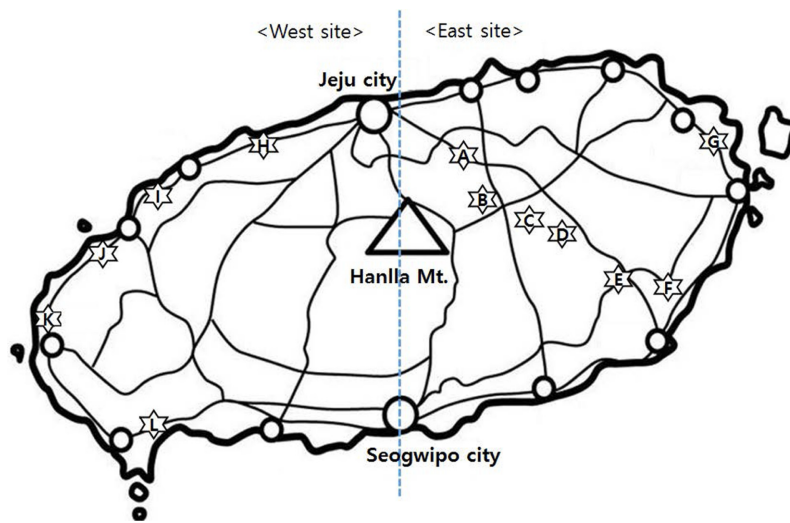


Fig. 1. Distribution of sampling sites in Jeju Island, Korea. Sites A to G are belonged to east area and sites H to L are belonged to west area.

지 여러 장에 토양 시료 현탁액 0.1 mL씩을 도말한 후 30°C에서 48시간 배양하여 효모 균락을 얻었다[7]. 동일한 배지를 사용하여 희선배양을 2차례 반복하여 균락을 분리함으로써 순수배양체를 얻었다. LN1 (5 GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3)과 NL4 (5 GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3) 프라이머를 사용하여 콜로니 polymerase chain reaction (PCR) 반응을 수행하여 26S rDNA D1/D2 부위를 증폭시켰다[7]. 증폭된 PCR 반응물들을 1.5% (w/v) 아가로스 겔에서 전기영동을 수행함으로써 0.6 kb 크기의 DNA들이 증폭되었음을 확인하였다. QIAEX II 겔 추출 키트(QIAGEN, Germantown, MD, USA)로 증폭된 DNA를 회수하여 염기서열 결정에 사용하였다. 회수된 DNA의 염기서열 결정은 코스모젠텍(Seoul, Korea)에서 ABI 3730xl DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 분석하였다. 분석된 염기서열은 BLAST로 데이터베이스에 축적되어 있는 염기서열들과의 상동성을 조사하였다[7]. 본 연구를 통해 얻은 효모의 염기서열 정보들은 BankIt을 통해 GenBank에 등록하였다(Table 1, 2).

제주도 동부지역에서 채취한 토양에서 효모의 분리

제주도 표선면과 성산읍을 비롯한 동부지역 7곳에서 토양을 채취하여 효모를 분리하여 동정한 결과는 Table 1과 같다. 시료를 채취한 7곳 중 봉개동 4.3 평화공원(Fig. 1, A site)과 절물자연휴양림 (Fig. 1, B site)에서 채취한 시료를 제외한 5곳에서 12종에 속하는 20균주를 분리하였다.

분리된 12종 중 *Cryptococcus adeliensis*, *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus sp.*, *Hannaella oryzae*, *Pseudozyma aphidis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus* 등 9종의 효모들은 본 연구진에 의해 내륙의 과일이나 꽃 등에서 여

러 차례 분리되어 보고된바 있다[4, 8-14]. 반면에 *Candida sake*, *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon moniliiforme*는 제주도 채집 탐사에서 처음 분리된 균주들이다. 이들 중 *Trichosporon moniliiforme*는 폐놀을 살리실산으로 혹은 살리실산을 폐놀로 가역적으로 전환시키는 반응이 존재한다고 알려져 있다[15].

Table 1에서와 같이 분리된 20균주 중에서 *Cryptococcus podzolicus*종이 8균주가 분리되어 가장 흔하게 분리되는 종이었다. *Cryptococcus podzolicus*종은 *Cryptococcus laurentii*와 함께 토양 효모로 토양에서 흔히 분리되는 것으로 알려져 있다[16]. 이들 *Cryptococcus podzolicus*종 8균주 중 7균주는 GenBank accession number FN428938.1 서열과 동일하거나 혹은 거의 유사함을 보였지만 클론 12E-4는 이들과 상이하여 AF0754581.1의 서열과 4개의 nt 차이를 보여서 GenBank에 새로이 KT895970으로 등록 번호를 부여 받았다. 이 균주는 신종일 가능성에 대한 추후 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

제주도 서부지역에서 채취한 토양에서 효모의 분리

제주의 애월읍 및 한림읍을 비롯한 서부지역 5곳에서 토양을 채취하여 효모를 분리하여 동정한 결과는 Table 2와 같다. 시료를 채취한 5곳 중에서 고산(Fig. 1, K site)과 대정(Fig. 1, L site)에서 채취한 시료에서 효모를 분리하는데 실패하였으며, 이들을 제외한 3곳에서 6종에 속하는 13균주를 분리하였다.

분리된 6종의 효모들 중 *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Cryptococcus podzolicus* 등 4종의 효모들은 제주도 동부지역에서도 공통적으로 분리되었다. 이들 4종의 효모 중 *Cryptococcus podzolicus*를 제외한 3종은 전술한 바와 같이 본 연구

Table 1. List of yeast species isolated from soil samples collected in the east region of Jeju Island, Korea

Isolated clones	GenBank accession No.	Putative species name	Related GenBank accession No.	Identity (%)	Sampling date	Sampling sites
4F-1	KT895963	<i>Candida sake</i>	AJ749828.1	602/605(99%)	2015-07-02	Seongsan-eup
3D-3	KT895964	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	JX188117.1	641/641(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
10D-1	KT895965	<i>Cryptococcus aureus</i>	EU304246.1	630/630(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
9E-1	KT895966	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FJ743631.1	640/640(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
12E-1		<i>Cryptococcus laurentii</i>	FJ743631.1	640/640(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
1G-1	KT895967	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FN428938.1	615/616(99%)	2015-07-02	Gujwa-eup
1G-3	KT895968	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FN428938.1	616/616(100%)	2015-07-02	Gujwa-eup
2G-1	KT895969	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FN428938.1	616/617(99%)	2015-07-02	Gujwa-eup
3E-1		<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FN428938.1	615/616(99%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
3G-2		<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FN428938.1	616/616(100%)	2015-07-02	Gujwa-eup
3G-3		<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FN428938.1	616/616(100%)	2015-07-02	Gujwa-eup
12E-4	KT895970	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	AF075481.1	624/628(99%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
12E-5		<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FN428938.1	616/616(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
14C-1	KT895971	<i>Cryptococcus</i> sp.	AY422719.1	627/627(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
14C-2	KT895972	<i>Hannaella oryzae</i>	JQ754134.1	640/640(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
4F-2	KT895973	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JN940519.1	648/648(100%)	2015-07-02	Seongsan-eup
18C-2	KT895974	<i>Rhodotorula glutinis</i>	AM160642.1	617/617(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
3E-2	KT895975	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AF335987.1	614/614(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon
1G-2	KT895976	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	AF105392.1	626/626(100%)	2015-07-02	Gujwa-eup
2C-2	KT895977	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149.1	616/616(100%)	2015-07-02	Pyoseon-myeon

Table 2. List of yeast species isolated from soil samples collected in the west region of Jeju Island, Korea

Isolated clones	GenBank accession No.	Putative species name	Related GenBank accession No.	Identity (%)	Sampling date	Sampling sites
5H-1	KT895978	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FJ743631.1	640/640(100%)	2015-07-03	Hwabuk 1-dong
6I-2	KT895979	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FN428938.1	616/616(100%)	2015-07-03	Aewol-eup
9I-1	KT895980	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EU285542.1	613/613(100%)	2015-07-03	Aewol-eup
6J-1	KT895981	<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	AF398489.1	577/577(100%)	2015-07-03	Hallim-eup
7H-1		<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	AF398489.1	577/577(100%)	2015-07-03	Hwabuk 1-dong
2J-2	KT895982	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149.1	615/616(99%)	2015-07-03	Hallim-eup
3I-1		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149.1	616/616(100%)	2015-07-03	Aewol-eup
3J-1	KT895983	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149.1	616/616(100%)	2015-07-03	Hallim-eup
3J-2		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149.1	616/616(100%)	2015-07-03	Hallim-eup
3J-3		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149.1	616/616(100%)	2015-07-03	Hallim-eup
4J-2		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149.1	616/616(100%)	2015-07-03	Hallim-eup
5J-1		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN868149.1	615/616(99%)	2015-07-03	Hallim-eup
4I-3	KT895984	<i>Williopsis saturnus</i>	EU293426.1	612/613(99%)	2015-07-03	Aewol-eup

진에 의해 여러 차례 분리되어 보고된 바 있다[4, 8-13].

본 연구진이 최근 수년간 전국에 걸쳐 실시하고 있는 채집 탐사에서 *Tetrapisispora iriomotensis*와 *Williopsis saturnus*는 분리된 적이 없었던 효모들로 *Tetrapisispora iriomotensis*는 일본의 난세이섬의 토양 및 식물에서 분리된 바 있

다[17]. Table 2에서와 같이 제주도 서부지역에서 채취한 토양에서 분리된 13균주 중 7균주는 *Wickerhamomyces anomalus*[8]로 이들은 GenBank accession number FN868149.1 서열과 동일하거나 혹은 거의 유사함을 보였다.

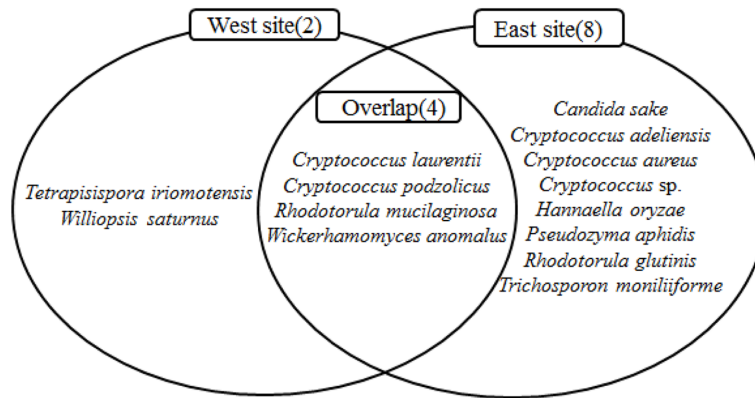


Fig. 2. Yeast diversity of soil samples collected from Jeju Island, Korea.

분리 효모들의 지역별 분포 특성

위와 같이 제주도 동부지역에서 20균주 12종, 서부지역에서 13균주 6종의 효모들이 분리되었다. 동부지역과 서부지역에서 공통적으로 분리된 효모들은 *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Cryptococcus podzolicus* 등 4종이었다(Fig. 2). 반면에 *Candida sake*, *Cryptococcus adeliensis*, *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus sp.*, *Hannaella oryzae*, *Pseudozyma aphidis*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon moniliiforme* 등 8종의 효모는 동부지역에서만 분리되었으며, *Tetrapispora iriomotensis*와 *Williopsis saturnus* 등 2종은 서부지역에서만 분리되었다(Fig. 2). 지역적인 차이에 기인한 제주도 자생버섯의 종 다양성의 차이가 보고된 것[18]과 같이, 제주도 서부지역과 동부지역의 큰 강수량 차이로 인해 지역적으로 독특한 생태적 특성을 갖게 되고 따라서, 지역별로 효모 중 분포에서 이러한 차이를 보였을 가능성이 있을 것으로 보인다.

적 요

제주도 토양에 서식하는 야생효모들의 분포 특성을 조사하기 위해, 동부지역 7곳, 서부지역 5곳에서 토양을 채취하여 효모를 분리한 후, 콜로니 PCR에 의해 증폭된 26S rDNA D1/D2 지역의 염기서열을 결정하여 BLAST를 이용하여 효모를 동정하였다. 동부지역에서 채집한 토양에서 12종에 속하는 20균주를, 서부지역에서 6종에 속하는 13균주를 분리하였다. 분리되는 효모 종은 강수량 차이를 보이는 지역에 따라서 현저한 차이가 있는 것을 알 수 있었다.

Acknowledgements

This work was funded by the project on survey and excavation of Korean indigenous species of National Institute of Biological Resources (NIBR) under the Ministry of Environment.

REFERENCES

1. Palmisano A, Benecchi M, De Filippo M, Maggiore U, Buzio C, Vaglio A. *Candida sake* as the causative agent of spondylodiscitis in a hemodialysis patient. *Spine J* 2011;11:e12-6.
2. Bal J, Yun SH, Song HY, Yeo SH, Kim JH, Kim JM, Kim DH. Mycoflora dynamics analysis of Korean traditional wheat-based nuruk. *J Microbiol* 2014;52:1025-9.
3. Hong SG, Lee KH, Bae KS. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. *J Microbiol* 2002;40:55-62.
4. Hyun SH, Han SM, Kim HK, Lee JS. Yeasts diversity of wild flowers in mountains of Korea and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:137-41.
5. Kim DH, Kim SH, Kwon SW, Lee JK, Hong SB. Mycoflora of soybeans used for meju fermentation. *Mycobiology* 2013;41:100-7.
6. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;73:331-71.
7. Min JH, Kim YH, Kim JH, Choi SY, Lee JS, Kim HK. Comparison of microbial diversity of Korean commercial Makgeolli showing high β-glucan content and high antihypertensive activity, respectively. *Mycobiology* 2012;40:138-41.
8. Hyun SH, Lee JG, Park WJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of yeasts from fruits and flowers of orchard in Sinamyeon of Yesan-gun, Chungcheongnam-do, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:21-7.
9. Hyun SH, Mun HY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation of yeasts from wild flowers in Gyeonggi-do province and Jeju island in Korea and the production of anti-gout xanthine oxidase inhibitor. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
10. Hyun SH, Han SM, Lee JS. Isolation and physiological functionality of yeasts from wild flowers in Seonyudo of Gogunsanyeoldo, Jeollabuk-do, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:201-6.
11. Min JH, Lee HB, Lee JS, Kim HK. Identification of yeasts isolated from wild flowers collected in coast areas of Korea based on the 26S rDNA sequences. *Kor J Mycol* 2013;41:185-91.
12. Min JH, Ryu JJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Gyejoksan, Oseosan and Beakamsan of Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:47-51.

13. Hyun SH, Min JH, Kim SA, Lee JS, Kim HK. Yeasts associated with fruits and blossoms collected from Hanbat arboretum, Daejeon, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:178-82.
14. Han SM, Park WJ, Lee JS. Isolation and diversity of wild yeasts from some cereals. *Kor J Mycol* 2015;43:64-7.
15. Kirimura K, Gunji H, Wakayama R, Hattori T, Ishii Y. 2010. Enzymatic Kolbe-Schmitt reaction to form salicylic acid from phenol: enzymatic characterization and gene identification of a novel enzyme, *Trichosporon moniliiforme* salicylic acid decarboxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:279-84.
16. Botes AL, Lotter J, Rhode OH, Botha A. 2005. Interspecies differences in the enantioselectivity of epoxide hydrolases in *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner and *Cryptococcus podzolicus* (Bab'jeva & Reshetova) Golubev. *Syst Appl Microbiol* 2005;28:27-33.
17. Ueda-Nishimura K, Mikata K. A new yeast genus, *Tetrapispispora* gen. nov.: *Tetrapispispora iriomotensis* sp. nov., *Tetrapispispora nanseiensis* sp. nov. and *Tetrapispispora arboricola* sp. nov., from the Nansei Islands, and reclassification of *Kluyveromyces phaffii* (van der Walt) van der Walt as *Tetrapispispora phaffii* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1915-24.
18. Ko PY, Seok SJ, Lee HB, Ko HS, Jeun YC. Species diversity of spontaneous mushrooms on Jeju Island. *Kor J Mycol* 2014;42: 104-32.