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

한국 전통 발효식품에서 분리한 인산가용화 효모의 특성

박인철[1]* · 김정선[1] · 정주애[1,2] · 유재홍[1]

[1]국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과, [2]단국대학교 미생물학과

Characterization of Phosphate Solubilizing Yeasts from Korean Traditional Fermented Foods

In-Cheol Park[1]*, Jeong-Seon Kim[1], Joo Ae Jung[1,2] and Jae-Hong Yoo[1]

[1]*Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea*
[2]*Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea*

ABSTRACT : Of 1,100 yeast strains which were isolated from various Korean fermented foods, screened for phosphate solubilization, five strains showed the ability to solubilize tricalcium phosphate. The 26S rDNA domain D1-D2 sequence analysis revealed the identification of strain Y393 and Y524 as *Pichia anomala* (99.8 and 100% identity, respectively), Y669 as *Pichia farinosa* (100% identity), Y901 as *Candida versatilis* (100% identity), and Y1101 as *Pichia subpelliculosa* (100% identity). All the phosphate solubilizing strains showed mesophilic characteristics. The temperature range for growth of 4 strains was 20~35°C and *P. farinosa* Y669 was able to grow up to 45°C. The strain *C. versatilis* Y907 was able to grow at pH range of 5.0~6.0 and showed halophilic characteristics with tolerance to 15% of NaCl concentration. The Phosphate solubilizing yeast strains were survived well in bed soil for 8 weeks which were maintained densities of 10^7~10^8 cfu/g. The highest phosphate solubilizing activity was observed in *P. subpelliculosa* Y1101. It solubilized 697.2 ug/mL of phosphorus from tricalcium phosphate with decrease in pH from 6.8 to 4.37 after 11 days of inoculation.

KEYWORDS : ***Candida versatilis*, Phosphate solubilizing yeasts, *Pichia anomala*, *Pichia farinosa*, *Pichia subpelliculosa***

서 론

인(P)은 식물체의 핵산, 인지질 등의 중요 구성 성분이며 식물의 생장과 분화 과정에서 가장 중요한 역할을 하는 영양 성분 중의 하나로서 살아있는 모든 식물체와 토양에서 발견된다. 인은 식물체내에서 에너지 전환, 광합성, 당 및 전분의 전환과 식물체 내의 영양분 이동에 관여하며, 식물체의 유전형질을 계승하고 유지하는 데 있어서 필수적인 역할을 하는 물질이다(Na *et al.*, 2009). 그러나 토양 중에 존재하는 인의 95~99%에 달하는 매우 많은 부분은 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산이다(Vassileva *et al.*, 1998). 농업에서 토양의 인산 부족은 식물의 생장을 제한하는 가장 중요한 화학 인자 중의 하나이다. 따라서 인산염의 형태로 매년 많은 양의 인산 시비가 이루어지고 있으나 대부분은 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 불용화됨으로 식물이 이용할 수 없을 뿐 아니라 토양의 침식과 수질오염의 원인이 되어 환경오염과 경제적 문제를 일으키게 된다(Goldstein, 1986; Omar, 1998).

인산 가용화 미생물은 불용성 인산염을 미생물 스스로는 물론 작물이 이용할 수 있도록 하는 기능을 가지고 있는 미생물이다. 미생물에 의한 인산 가용화의 기작은 착화물의 생성, sulphidric, nitric 및 carbonic acid 등에 의하여 일어나기도 하지만 미생물이 분비하는 gluconic acid, 2-keto-bluconic acid, lactic, isovaleric, isobutyric, acetic, glycolic, oxalic, malonic, succinic acid와 같은 유기산에 의하여 주로 일어나는 것으로 알려져 있다(Suh and Kwon, 2008). 인산 가용화 미생물로는 *Bacillus, Pseudomonas, Erwinia, Agrobacterium, Serratia, Flavobacterium, Enterobacter, Micro-*

Kor. J. Mycol. 2013 December, **41**(4): 218-224
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.4.218
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

***Corresponding author**
E-mail: pinc@korea.kr

Received October 12, 2013
Revised November 8, 2013
Accepted November 17, 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.

coccus, Azotobacter, Bradyrhizobium, Salmonella, Alcaligenes, Chromobacterium, Arthrobacter 등의 다양한 세균과 *Streptomyces* 등의 방선균, *Penicillium, Aspergillus, Rhizopus, Fusarium, Sclerotium* 등의 사상균이 보고되어 있으며 (Zhao and Lin, 2001), 효모 중에서는 토양에서 분리한 *Candida, Geotrichum, Rhodotorula, Williopsis* 등 소수의 종에서만 인산 가용화 활성이 확인되었다(Alfred, 2011). 최근 토양 서식 효모는 토양의 영양성분 순환에 관여하여 식물의 생장을 강화하고 토양의 구조 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 농업 분야에서의 역할이 재조명되어 농업적 활용을 위한 연구가 증가하고 있다(Alfred, 2011).

본 연구는 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있는 안전하고 효율적인 환경친화형 토양개량 미생물제를 개발하기 위한 기초연구로, 예로부터 식품으로 섭취하여 인체에 안전하며 고유의 미생물이 서식할 가능성이 높은 우리나라 전통 발효 식품재료에서 분리한 효모로부터 인산 가용화능을 지닌 균주를 선발하여 생리적 특성과 인산 가용화 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

인산 가용화 효모의 선발

인산 가용화 활성 검정 균주는 메주, 된장 등의 장류 및 누룩 등 우리나라의 전통 발효식품에서 분리하여 국립농업과학원에 보존 중인 효모 약 1,100 균주를 사용하였다. 인산 가용화 효모의 선발은 0.5%의 tricalcium phosphate가 포함된 Pikovskaya's 고체배지를 사용하였으며 배지 조성은 glucose 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, KCl 0.02%, $MnSO_4$ 0.5%, $Ca_3(PO_4)_2$ 0.5%, Agar 1.8%로 조제하였으며 pH는 7.0으로 조정하였다(Pikovskaya, 1948). Pikovskaya's 고체배지에 96 pin Microplate Replicator (Boekel Scientific, USA)로 균주를 접종하고 28°C에서 5일간 배양하여 균체 주위에 불용성 인산이 용해되어 투명 환을 형성하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Pikovskaya's 고체배지에서 투명환 형성 여부를 수회 반복하여 활성을 확인하여 선발하였다.

인산 가용화 효모의 동정

효모의 동정은 ribosomal DNA 염기서열 분석으로 수행하였다. rDNA PCR 증폭을 위한 genomic DNA는 Sambrook과 Russell(2001)의 방법을 변형하여 분리하였다. Genomic DNA의 분리를 위한 효모균은 Yeast Mold (YM) agar 배지에 3일간 배양한 균체를 멸균된 접종 loop로 긁어 1.5 mL의 소형 원심관에 넣은 후 멸균수로 현탁하여 12,000 rpm으로 3분간 원심 분리하여 균체만 모았다. 집균된 균체는 Triton/SDS 용액 0.2 mL에 현탁하고 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 0.2 mL과 glass bead (300 mesh) 0.3 g을 첨가하여 3분간 vortexing하여 cell을 파쇄하였다. 이 용액에 0.2 mL의 TE buffer (pH 8.0)를 첨가하여 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상청액을 새로운 원심 tube에 옮기고 0.1 배량의 5 M sodium acetate (pH5.2)와 2.5 배량의 ethanol을 첨가하여 혼합하고 –70°C에 15분간 보관한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척하여 실온에서 건조시킨 후 40 uL의 TE buffer (pH 8.0)에 용해하여 PCR 증폭 실험에 사용하였다.

효모의 동정을 위하여 26S rDNA D1-D2 영역을 PCR 증폭하고 염기서열을 분석하였다. 26S rDNA D1-D2 영역의 PCR 증폭을 위한 primer는 Kurtzman과 Robnett(1998)이 효모의 계통분류학적 분류에 사용한 NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') primer를 합성하여 사용하였다. PCR 반응은 50 uL volume으로 하였으며 dNTP 0.2 mM, Taq DNA polymerase 2.5 unit가 되도록 조제한 반응액을 94°C에서 5분간 template DNA를 denature 시킨 후 denature 94°C, 1분, annealing 55°C, 1분, extension 72°C, 1분의 조건으로 35 cycle 증폭하였고 최종적으로 72°C에서 10분간 extension 시켰다. PCR 증폭 여부는 1.2%의 agarose gel에 전기영동하여 확인하고 증폭된 PCR 산물은 PCR purification kit (Solgent co.)로 정제하여 염기서열 분석에 사용하였다.

각 균주의 염기서열은 Lasergene ver. 8.1.4 (DNASTAR Inc.) 프로그램을 이용하여 GenBank database의 염기서열과 비교 분석하여 동정하였으며, MEGA5.1 program을 이용하여 계통분류학적 위치를 분석하였다.

인산 가용화 효모의 생리적 특성 분석

인산가용화 효모의 생리적 특성을 분석하기 위하여 생육온도, pH, NaCl 내성을 조사하였다. 생육 온도는 96 well micro plate를 이용하여 액체배양으로 실시하였다. 100 uL의 YM broth에 각 균주를 10^3/mL의 농도로 접종하고 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C의 항온기에 정치배양하면서 8시간 간격으로 균주의 생육정도를 측정하였다. 생육 측정은 Plate Reader (Molecular Devices Spectra Max 340)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. pH별 생육 측정은 Gomori(1955)의 완충액으로 pH 2~10으로 조정한 YM broth를 사용하였고, NaCl 내성 실험은 NaCl을 최종 농도 5, 10, 15, 20%가 되도록 첨가한 YM broth에 각 균주를 접종한 후 Bioscreen C (Labsystem Oy, Finland)를 이용하여 28°C에서 3일간 배양하여 균주의 생육 정도를 측정하였다. 생육 정도는 각 처리별로 3 반복으로 수행하여 얻은 흡광도의 평균값으로 하였다.

인산 가용화 효모의 토양내 생존력 검정

선발된 효모의 토양 내에서의 생존력 검정은 실험실 내에서 원예용 상토(서울바이오, 한국)를 이용하여 실시하였

다. 상토 50 g을 식물 배양용 사각 플라스틱 용기(72×72×100 mm)에 넣어 121°C에서 30분간 고압 증기 멸균시킨 후 24시간 YM broth에 배양한 인산가용화 균주의 배양액 5 mL을 0.85%의 NaCl 용액 25 mL에 희석하여 상토에 고르게 혼합하였다. 접종한 효모의 농도는 serial dilution법으로 희석한 희석액을 YM 배지에 도말하여 생균수를 계수하여 환산하였다. 균주를 혼합한 상토는 28°C에서 8주간 보관하면서 1주일 간격으로 생균수를 조사하였다. 생균수의 조사는 상토 1 g을 취하여 serial dilution 법으로 10^4배까지 희석하여 YM 고체 배지에 도말하여 28°C에 2일간 배양 후 생장된 균체를 계수하여 상토 1 g 당 생균수를 조사하였다. 계수는 3 반복으로 실시한 평균값을 Log 값으로 표시하였다.

유리인산 농도 측정

인산가용화 활성을 나타내는 균주를 0.5%의 tricalcium phosphate가 포함된 100 mL의 Pikovskaya's 액체배지에서 28, 150 rpm의 조건으로 진탕배양하면서 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13일 간격으로 배양액을 10 mL씩 취하여 pH와 유리인산의 양을 측정하였다. pH는 휴대용 pH meter (Horiba D-54)를 이용하여 측정하였으며, 유리인산의 양을 측정하기 위하여 각 배양액 2 mL을 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상청액을 0.45 um의 일회용 멸균 필터(Pall Corporation)로 여과하여 균체와 불용성 잔류물을 제거하였다. 배양액 중의 유리인산 농도는 Phosphate Colorimetric Assay Kit (BioVision Incorporated)를 이용하여 반응시키고 Plate Reader를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 얻어진 각 시료의 흡광도를 인산 표준용액으로 작성한 standard curve와 비교하여 유리 인산의 농도를 계산하였다. 유리 인산량 환산에 사용한 인산 표준용액은 토양화학분석법(농촌진흥청)에 준하여 KH_2PO_4으로 50 mg P/L 저장액을 조제하고 농도별로 희석하여 사용하였다.

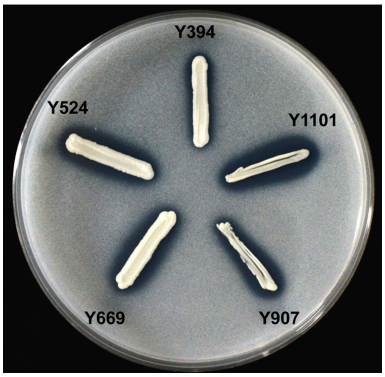

Fig. 1. Phosphate solubilization by yeast strains, as indicated by hallow formation around colonies on medium containing 0.5% of tricalcium phosphate.

결과 및 고찰

인산 가용화 효모의 선발 및 동정

발효식품에서 분리한 효모 약 1,100 균주를 대상으로 Pikovskaya's 고체 배지에서 인산가용화 활성을 검정하여 불용성 인산 tricalcium phosphate 분해능을 보이는 24균주를 1차 선발하였다. 선발한 24균주는 수회 반복하여 활성을 확인하여 인산 가용화 활성이 우수한 것으로 판단된 5균주를 최종 선발하였는데, 분리원별로는 전통 발효법으로 발효된 메주에서 분리한 균주가 1균주(Y394), 누룩에서 분리된 균주가 2균주(Y524, Y669)였으며, 된장(Y907) 및

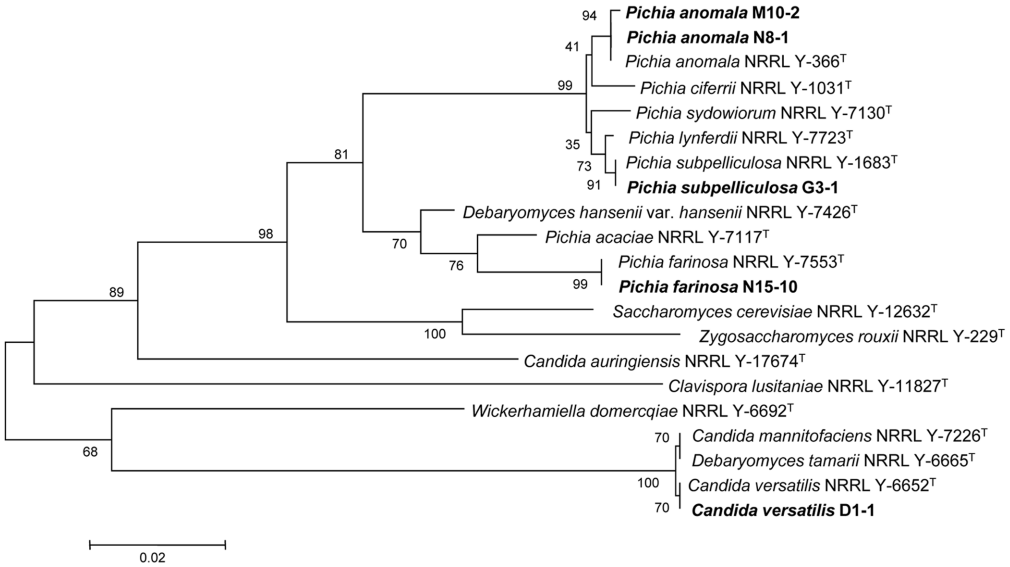

Fig. 2. Phylogenetic positions of phosphate solubilizing yeast strains based on the 26S rDNA domain D1-D2. The phylogenetic tree was constructed by the maximum parsimony method. Numerals indicate bootstrap values, expressed as percentages of 1,000 samples.

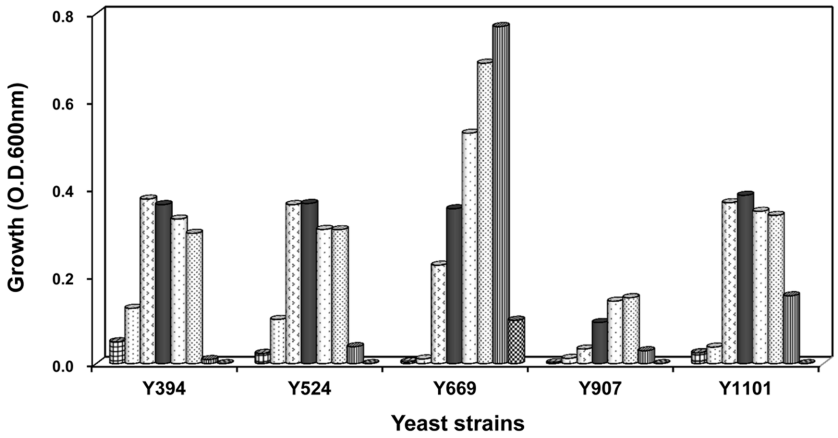

Fig. 3. Effect of cultural temperature on the growth of phos- phate solubilizing yeast strains. The yeast strains were cultured at various temperature in YM broth for 3 days. : 10°C, : 15°C, : 20°C, : 25°C, : 30°C, : 35°C, : 40°C, : 45°C.

고추장(Y1101)에서 분리된 균주가 각각 1균주였다. 최종 선발된 5균주는 0.5%의 tricalcium phosphate가 함유된 Pikovskaya's 고체 배지에 배양했을 때 불용성 인산을 분해하여 투명환을 형성하는 것이 확인되었다(Fig. 1).

이들 균주를 26S rDNA D1-D2 영역의 염기서열을 결정하여 표준균주(type strain)의 염기서열과 상동성을 비교한 결과, Y394는 *Pichia anomala*와 99.8%의 상동성을 나타내었고, Y524는 100% 일치하였다. Y669는 *Pichia farinosa*와 Y907은 *Candida versatilis,* 그리고 Y1101은 *Pichia subpelliculosa*와 100% 일치하였다. 이들 염기서열을 기초로 한 계통도 분석에서도 각 분류군에 속하는 것으로 판단되어 선발한 5균주는 4종으로 동정하였다(Fig. 2).

인산가용화 효모로는 토양에서 분리한 *Williopsis californica* (Falih and Wainwright, 1995), *Candida tropicalis, Geotrichum candidum, G. capitatum, Rhodotorula minuta, R. rubra* (Al-Fatih, 2005)와 수목의 근권에서 분리한 *Rhodotorula* sp. (Mundra *et al.*, 2011) 균주에서 인산 가용화 활성을 확인하여 보고하였으나, 본 연구에서 분리한 4종에 대한 인산가용화 활성은 보고된 바 없다.

인산 가용화 효모의 생리적 특성

선발한 인산가용화 효모 5균주에 대한 생리적 특성을 확인하기 위하여 생육 온도와 생육 pH, NaCl 내성을 조사하였다. 배양 3일 후 조사한 생육 온도는 5균주 모두 20~35°C의 범위에서 잘 자라는 중온성 효모였다. 균주별로는 *Pichia farinosa*로 동정된 Y669 균주는 40°C에서 가장 생육이 우수하였고 45°C에서도 생장이 가능하였다. 고추장에서 분리한 *P. subpelliculosa* Y1101 균주는 40°C까지 생육이 가능하였으며 *Candida versatilis* Y907 균주의 생육 속도는 5균주 중 가장 저조하였다(Fig. 3). 온도 실험 결과 *P. farinosa* Y669 균주는 45°C에서도 생장하므로 미생물 비료 등 고온 환경에서 적용시 더 유리할 것으로 판단된다.

생육 pH는 4~7의 범위에서 생육이 우수하였고, *P. anomala* Y394, Y524 균주는 3~8, *P. subpelliculosa* Y1101는

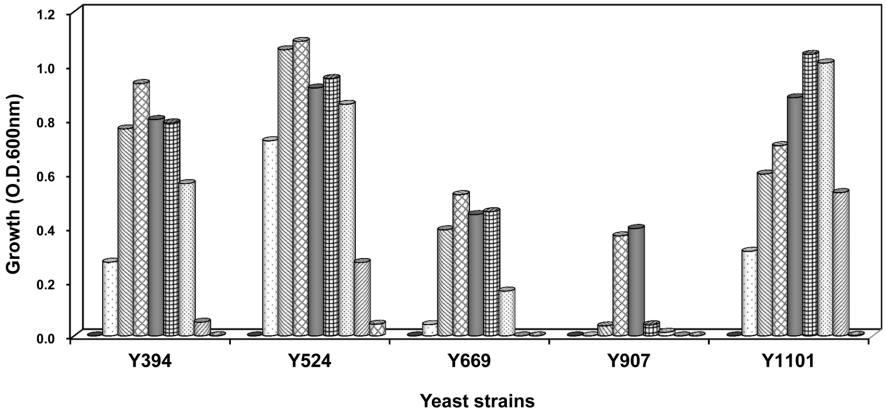

Fig. 4. Effect of initial pH of medium on the growth of phosphate solubilizing yeast strains. The yeast strains were cultured at various pH in YM broth for 3 days. : pH2, : pH3, : pH4, : pH5, : pH6, : pH7, : pH8, : pH9, : pH10.

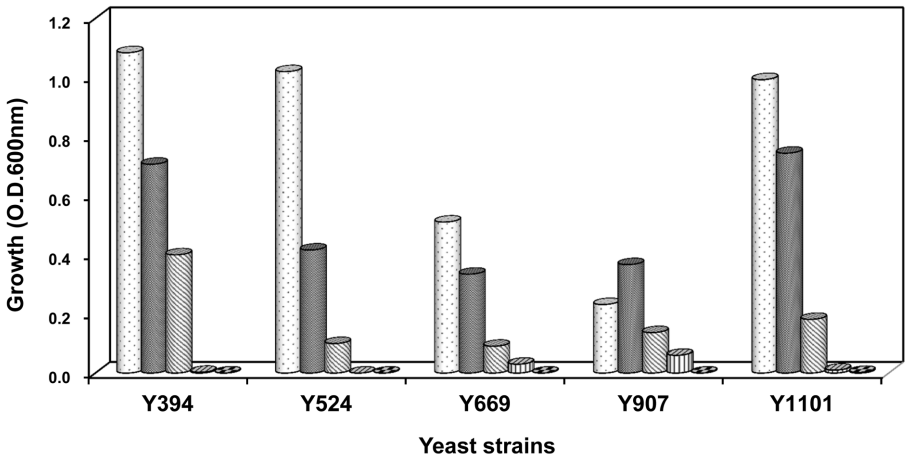

Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the growth of phosphate solubilizing yeast strains. The yeast strains were cultured at various NaCl concentration in YM broth for 3 days. : 0%, : 5%, : 10%, : 15%, : 20%.

3~9의 pH 범위에서 생육이 가능하였으며 *P. farinosa* Y669는 pH 4~8, *C. versatilis* Y907은 pH 5~6의 범위에서만 생육이 확인되었다(Fig. 4). 인산가용화를 일으키는 주요한 요인은 미생물 등이 생성하는 유기산으로서 유기산의 작용에 의하여 토양의 pH가 낮아지고 불용성 인산염이 분해되는 것으로 알려져 있다(Goldstein, 1995; Halder *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1997; Kpomblekou and Tabatabai, 1994). 따라서 pH가 낮은 환경에서 생장이 가능한 *P. anomala* Y394 및 Y524 균주와 *P. subpelliculosa* Y1101 균주가 인산 가용화 미생물제로 활용하는 데 더 적합할 것으로 사료된다.

NaCl 내성 검정에서는 *P. anomala* Y394 및 Y524, *P. farinosa* Y669, *P. subpelliculosa* Y1101 균주가 NaCl 10% 농도까지 생장하여 내성을 나타내었으며, *C. versatilis* Y907 균주는 15%의 농도까지 내성을 보였고 NaCl 무첨가 배지에서보다 5%의 농도에서 생육이 양호한 것으로 미루어 약호염성 균주로 판단된다(Fig. 5). Lages 등(1999)은 42종의 효모 표준 균주를 대상으로 NaCl 내성을 검정한 결과 *P. anomala*는 2 M (11.7%), *P. farinosa*는 3 M (17.5%), *C. versatilis*는 4 M (23.4%)의 NaCl 농도에서 내성을 보이는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 선발한 *P. anomala* Y394와 Y524 균주는 Lages 등의 결과와 유사하였으나 *P. farinosa* Y669는 15%에서 생장이 매우 저조하였고 *C. versatilis* Y907 균주는 20%의 NaCl 농도에서 내성이 없어 차이를 보였다. 선발한 5균주는 10% 이상의 NaCl 농도에서 내성을 나타내어 염류집적 토양에 적용하는 데 문제가 없을 것으로 사료된다.

인산 가용화 효모의 토양내 생존력 검정

인산가용화 미생물은 토양에 존재하는 불용성 인산을 식물체가 이용할 수 있도록 가용화하는 역할을 하므로 토양에 주로 적용하게 된다. 본 연구에서 선발한 인산 가용화 효모는 식품에서 유래한 것이므로 토양 내에서의 생존 여부를 확인하기 위하여 토양에 균 배양액을 혼합한 후 8주 동안 보관하면서 생균의 밀도를 조사하였다. 1.64~4.64×10^7 cfu/g soil의 농도로 접종한 균주의 밀도는 2주까지 1.38~3.73×10^8 cfu/g soil까지 증가하였다가 3주 이후부터는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 균주별로는 *P. anomala* Y394 및 Y524와 *P. farinosa* Y669는 2주까지 밀도가 증가하였다가 그 이후에는 감소하였으나 조사기간 8주까지 최초 접종 밀도보다 약간 높은 수준으로 유지되었다. *C. versatilis* Y907은 2주일 후 최고의 농도를 보였으며 그 이후에도 10^8 cfu/g 수준의 밀도를 나타내어 토양내에서 높은 밀도를 유지하였다. *P. subpelliculosa* Y1101는 접종 1주 후 10^8 cfu/g으로 증가하였다가 5주째부터는 10^7 cfu/g 수준으로 감소되어 8주 후에는 최초 농도보다 약간 낮은 밀도를 나타내었다(Fig. 6). 초기 1~2주 사이에 공시균의 밀도가 높아지는 것은 접종시 포함되어 있던 배지 성분과 상토에 포함된 유기물의 영향으로 접종균의 증식이 일어난 것으로 추측된다. 토양에 적용하는 미생물제가 기능을 발휘하기 위해서

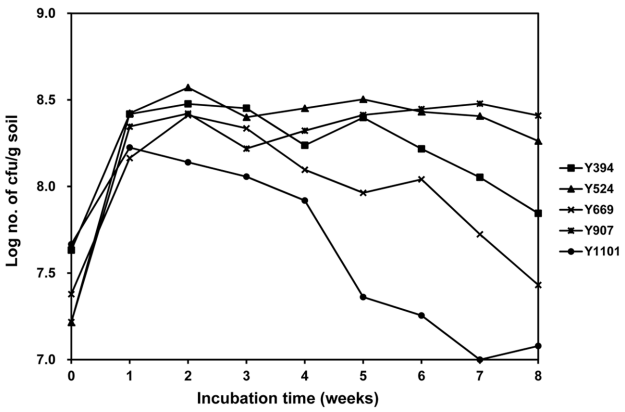

Fig. 6. Changes of yeast cell densities in bed soil. The soil bed inoculated yeast cell suspensions (10^7 cfu/g soil) were incubated at 28°C for 8 weeks. All values are means of triplicates.

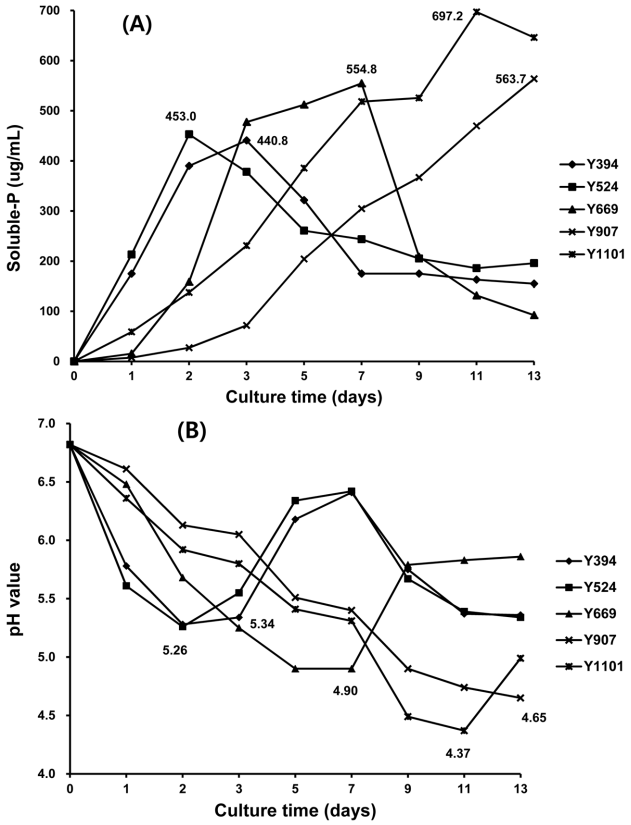

Fig. 7. Changes of free phosphorus concentration (A) and pH value (B) during the cultivation of yeast strains. Yeast strains were cultured in Pikovaskaya's broth medium containing 0.5% of tricalcium phosphate.

는 토양 내에서 미생물의 밀도 유지가 매우 중요하다. 본 연구에서 선발한 인산가용화 효모는 식품에서 분리한 균주이지만 8주까지 10^7~10^8의 밀도로 토양내에서 생존하면서 밀도를 유지하는 것으로 보아 토양 개량이나 미생물 비료 등의 목적으로 토양에 적용이 가능할 것으로 사료된다.

인산 가용화 활성의 정량분석

인산 가용화 활성의 정량분석을 위하여 불용성 인산 tricalcium phosphate가 0.5% 함유된 액체배지에 공시 균주를 배양하면서 tricalcium phosphate가 가용화되어 유리된 인산의 양과 인산 가용화시 일어나는 배양액의 pH의 변화를 측정하였다. 시기별 인산 가용화에 의해 생성된 유리인산의 농도 변화 양상은 균주에 따라 차이가 나타났으며 유리인산의 농도가 높아질수록 pH가 낮아져 유리인산의 양과 pH는 역상관관계를 나타내었다. 균주별 유리인산의 양과 pH의 변화는 *P. anomala* Y394와 Y524 균주의 유리인산량은 각각 접종 2일 후 453 ug/mL (pH 5.26)와 3일 후 440.8 ug/mL (pH 5.34)로 최고치를 나타냈었고, 그 이후에는 완만하게 감소되는 경향을 보였으며, *P. farinosa* Y669 균주는 9일 후 554.8 ug/mL (pH 4.9)로 최고치를 보였다가 그 이후에는 급격히 감소하였다. 반면에 *C. versatilis* Y907은 11일째 697.2 ug/mL (pH 4.37), *P. subpelliculosa* Y1101은 563.7 ug/mL (pH 4.65)로 유리인산의 농도가 최고치에 달했으며 조사기간 동안 유리 인산의 양이 지속적으로 증가하였다(Fig. 7). 실험 균주 중에서는 *P. subpelliculosa* Y1101 균주의 인산 가용화능이 가장 우수하였고, *P. anomala*로 동정된 2균주는 유리인산의 양은 적었으나 2~3일 만에 최고치에 이르러 가장 빠른 인산 가용화 속도를 나타내었다.

Falih와 Wainwright (1995)는 토양에서 분리한 효모 *Williopsis californica*가 28일 만에 42 ug/mL 인산 가용화능을 보였으며, Al-Fatih(2005)는 5종의 토양 유래 효모를 Czapek-Dox 액체 배지에 배양하여 인산 가용화능을 조사한 결과 *Geotrichum capitatum*이 4주 만에 가장 많은 45 ug/mL의 유리인산을 생성한다고 보고하여 본 결과와는 차이를 보였다. 미생물에 인산 가용화는 미생물에서 생성되는 유기산이 주요한 원인이며 생성된 유기산으로 인하여 pH가 낮아지게 된다. Na 등(2009)에 의하면 3종의 인산 가용화 세균의 유기산 분석 결과 *Acinetobacter* sp.의 인산 가용화 과정에서 gluconic acid가 생성되며 *Pseudomonas orientalis*에서는 gluconic acid와 2-gluconic acid가, 그리고 *Enterobacter asburiae*는 succinic acid와 acetic acid가 동시에 생성되는 등 균종에 따라 다양한 유기산이 생성되는 것을 확인하였으며 이들 유기산에 의하여 배양액의 pH가 낮아진다고 보고하였다. 효모의 인산 가용화에 영향을 주는 유기산의 종류는 보고되지 않았으나 배양액의 pH가 낮아질수록 유리인산의 농도가 높아지는 것으로 미루어 효모의 인산 가용화 주요인도 유기산일 것으로 사료된다.

적 요

한국 전통 발효식품에서 분리한 효모로부터 인산 가용화 활성이 우수한 5균주를 선발하였다. 선발한 균주 중 2균주는 *Pichia anomala*로 동정되었고, 3균주는 각각 *Pichia farinosa, Candida versatilis, Pichia subpelliculosa*로 동정되었다. 인산 가용화 효모는 20~35°C의 온도에서 잘 자라는 중온성 효모였으며 *P. farinosa* Y669는 45°C의 고온에서도 생장하였다. *C. versatilis* Y907 균주는 pH 5~6의 좁은 pH 범위에서 생장하였고 15%의 NaCl 농도까지 내성을 나타내는 호염성 균주였다. 그 외 4균주는 pH 4.0~8.0에서 생장하였으며 NaCl 10% 농도에서 내성을 나타내었다. 인산 가용화 균주는 토양에서도 8주 동안 10^7~10^8 cfu/g의 밀도를 유지하며 생존하였다. 분리균주 중 인산 가용화 활성은 *P. subpelliculosa* Y1101가 가장 우수하였으며 배양 11일 후 697.2 ug/mL의 유리인산을 생성하였다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ00858002)의 지원으로 수행된 결

과이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

Al-Fatih, A. M. 2005. Phosphate solubilization in vitro by some soil yeasts. *Qatar Univ. Sci. J.* 25:119-125.

Alfred, B. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biol. Biochem.* 43(1):1-8.

Falih, A. M. and Wainwright, M. 1995. Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycol. Res.* 99(2):200-204.

Goldstein, A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphate: Historical perspectives and future prospects. *Am. J. Altern. Agri.* 1:51-57.

Goldstein, A. H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol. Agri. Hort.* 12: 185-193.

Gomori, G. 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Method. Enzymol.* 1:138-146.

Halder, A. K., Mishra, A. K., Bhattacharyya, P. and Chakrabartty, P. K. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Micorbiol.* 36:81-92.

Kim, K. Y., Jordan, D. and Krishnan, H. B. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:273-277.

Kpomblekou, K. and Tabatabai, M. A. 1994. Effect of organic acid on release of phosphorus from phosphate rock. *Soil Sci.* 158: 442-451.

Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(4):331-371.

Lages, F., Silva-Graça, M. and Lucas, C. 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* 145(9):2577-2585.

Mundra, S., Arora, R. and Stobdan, T. 2011. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:2387-2396.

Na, J. H., Choi, J. H., Jin, R. D., Ko, H. S., Park, R. D. and Kim, K. Y. 2009. Phosphate solubilization and plant growth promotion by crop associated bacteria. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 42: 29-36.

Omar, S. A. 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:211-218.

Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17:362-370.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Small-scale preparations of yeast DNA. In: Molecular Cloning A Laboratory Manual, pp. 4.70-4.71. Eds. Sambrook, J. and Russell, D. W. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Suh, J. S. and Kwon, J. S. 2008. Characterization of phosphate-solubilizing microorganisms in upland and plastic film house soils. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 41: 348-353. (in Korean)

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M. and Vassilev, N. 1998. Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. *J. Biotechnol.* 63:67-72.

Zhao, X. R. and Lin, Q. M. 2001. A review of phosphate-dissolving microorganisms. *Soil Fertilizer* 3:7-11.