

대전광역시와 충청남도 밭 토양으로부터 야생효모의 분리 및 동정

한상민¹ · 한재원¹ · 배상민¹ · 박원종² · 이종수^{1*}

¹배재대학교 바이오·의생명공학과, ²공주대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Wild Yeasts from Soils of Fields in Daejeon Metropolitan City and Chungcheongnam-do, Korea

Sang-Min Han¹, Jae-Won Han¹, Sang-Min Bae¹, Won-Jong Park² and Jong-Soo Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea

²Department of Food Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

ABSTRACT : This study focused on isolation and identification of wild yeasts from soils in fields near mountains and elucidation of its yeast distribution. Several kinds of yeasts were isolated from various soils of Daejeon metropolitan city and Chungcheongnam-do in Korea and identified by BLAST search of nucleotide sequences of internal transcribed spacer (ITS) region including 5.8S rRNA and D1/D2 region of 26S rDNA. Ninety-seven strains of 20 species from 61 soil samples were isolated, of which *Cryptococcus podzolicus* (11 strains), *Debaryomyces hansenii* (6 strains), and *Trichosporon asahii* (6 strains) were dominant species.

KEYWORDS : Isolation, Identification, Field, Soils, Wild yeasts

서론

효모는 주로 자낭포자를 형성하는 자낭균류와 담자포자를 형성하는 담자균류 및 포자를 형성하지 않는 불완전균류에 속하며 대부분이 비병원성 균들이다. 이들의 일부는 오래 전부터 주류와 장류 등의 전통 발효 식품제조에 이용되고 있다[1].

최근 진핵 생물의 유전자 발현을 위한 분자생물학적 연구에서 host로서 매우 중요하게 이용되고 있을 뿐만 아니라 혈관신생억제물질[2], 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해물질[3, 4], 혈전용해 활성물질[5], 항치매성 β -secretase 저해물질[6]과 acetylcholinesterase 저해물질[7], 미백성 tyrosinase 저해물질[8], 효모 핵산물질의 생리기능성[9] 핵산물질 등 고부가가치의 건강 소재 생산 균주로서 효모에 관한 연구가 진행되고 있다.

한편, 지금까지 효모는 주로 발효식품 등에서 분리되어 *Saccharomyces cerevisiae* 등의 일부만이 발효식품산업에 응용되고 있다. 최근 필자 등은 우리나라 자연 환경의 효모 종 다양성을 확립하고 나아가 국내외 미기록이나 신종 효모를 발굴하기 위하여 야생화에서 1850균주의 효모들을 분리 동정하였고 43균주의 미기록 효모들을 발굴하여 보고하였다[10-19]. 또한 이들 가운데 비병원성 효모들을 선별하여 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성을 보고하였다[20].

본 연구에서는 토양 중의 효모 분포 특성을 조사하기 위해 우선 대전광역시와 충청남도 12개 지역의 산 인근 밭 토양을 수집하여 야생효모들을 분리, 동정하였다.

Kor. J. Mycol. 2016 March, 44(1): 1-7
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.1.1>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received December 5, 2015
 Revised December 12, 2015
 Accepted March 3, 2016

©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.

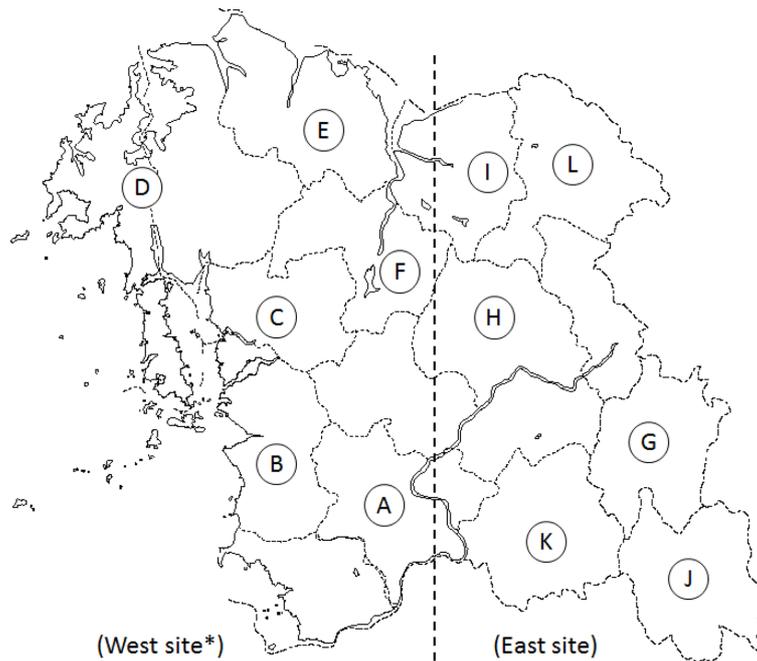


Fig. 1. Soil sampling sites in Chungcheongnam-do including Daejeon-si, Korea. A, Buyeo-gun; B, Boryeong-si; C, Hongseong-gun; D, Taean-gun; E, Dangjin-si; F, Yesan-gun; G, Daejeon-si; H, Gongju-gun; I, Asan-si; J, Geumsan-gun; K, Nonsan-si; L, Cheonan-si.

재료 및 방법

효모의 분리 및 동정

대전광역시를 포함하는 충청남도 12개 지역(Fig. 1)의 산 인근의 밭 표층 2 cm 이하 토양 2 g 내외를 멸균 스페툴라로 채취하여 멸균튜브에 넣고, 5 mL의 멸균수를 첨가한 후 1시간 동안 진탕하여 현탁액을 얻었다. 현탁액 일부를 Min 등[10]의 방법에 따라 스트렙토마이신(50 µg/mL)과 앰피실린(50 µg/mL)이 들어 있는 yeast extract-peptone-dextrose 한천배지에 도말하고 30°C에서 48시간 배양한 후 형성된 효모 집락을 분리하였다.

효모의 동정은 5.8S rDNA를 포함하는 internal transcribed spacer (ITS) 부위와 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열 상동성 비교법을 이용하여 전보[10]와 같이 실시하였다. 이와 같이 얻은 염기서열들을 NCBI의 BLAST를 사용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 효모들과의 분자생물학적 유연관계를 분석하여 동정하였다. 또한 본 연구를 통해 얻은 효모의 염기서열 정보들은 BankIt을 통해 NCBI의 GenBank에 등록하였다(KU316697-KU316793).

결과 및 고찰

대전광역시와 충청남도 밭 토양으로부터 효모의 분리 및 동정

대전광역시와 공주시, 금산군, 천안시, 아산시, 논산시

등 충청남도 동부지역 토양 38점을 수집하고 효모를 분리하여 동정한 결과는 Table 1과 같다. 38개의 시료에서 모두 70주 49종의 효모를 분리, 동정하였고 이들 중 *Trichosporon* 속이 15균주, *Cryptococcus* 속이 13균주로 가장 많았고 금산군 진악산 주위 토양에서 분리한 *Trichosporon asahii*와 논산시 관록사 주위 토양에서 *Debaryomyces hansenii*가 각각 5주씩 단일종으로 가장 많이 분리되었다.

충청남도 부여군과 보령시, 예산군, 홍성군, 당진시, 태안군 등 서부지역 토양 23점 시료에서 효모를 분리 동정한 결과(Table 1) 다른 지역과 특이하게 분리균주 27주 17종 중에서 *Cryptococcus podzolicus*가 10균주로 전체의 약 40%를 차지하였고 *Rhodotorula mucilaginosa*도 3균주가 분리되었다.

대전광역시와 충청남도 밭 토양 중의 효모의 분포특성

위와 같이 대전광역시를 포함하는 충청남도 전 지역의 토양에서 분리된 효모들의 phylogenetic tree는 Fig. 2와 같고 이들의 분포특성을 종합한 결과는 Table 2와 같다. *C. podzolicus* 11균주를 포함한 *Cryptococcus* spp.가 총 25균주(26%)로 가장 많았고 *T. asahii*를 포함하는 *Trichosporon* spp.가 16균주(16%), *D. hansenii* 6균주를 포함하는 *Debaryomyces* spp.가 9균주(약 9%)순으로 많이 분포하고 있었다.

또한 대전광역시를 포함하는 충청남도 동부지역 토양에서는 *T. asahii* 5주를 포함하는 *Trichosporon* 속 균이 15주

로 가장 많이 분리되었고 당진시 등의 서부지역에서는 *C. podzolicus*를 포함하는 *Cryptococcus*속 균이 12주로 가장 많이 분리, 동정되었다(Table 2, Fig. 3). 또한 이들 충청남도 동부와 서부지역에서는 *C. podzolicus*를 포함하는 6종의 야생효모들이 공통적으로 분리되었다.

이와 같이 충청남도 동부지역과 서부지역 토양의 효모 종 분포특성 차이가 있는 것은 이들 지역 토양의 물리화학적 성질과 시료 채취 당시 동부지역(5~6월)과 서부지역(7~8월)의 평균 온도와 습도 차이가 있기 때문으로 보인다.

한편, 이들의 분포 특성을 필자 등이 충청남도의 계족산, 오서산, 대둔산 등의 야생화에서 분리한 효모[10]와 비교하였을 때 *Cryptococcus* 속 균이 공통적으로 야생화와 토양시료에서 다수 분포하고 있었다. 그러나 야생화에서 거의 분리되지 않은 *Trichosporon* 속 균(전체 16%, Fig. 1)과 *Williopsis* 속 균, *Barnettozyma* 속 균과 *Fibulobasidium* 속 균과 *Tetrapisispora* 속 균들이 토양에서만 특이적으로 분리되었다.

Table 1. Yeasts species isolated from soils of fields of Chungchengnam-do including Daejeon metropolitan city, Korea

Putative speceis	Isolated No.	Related Genebank No.	Identity (%)	Remarks (Collection sites)
<i>Candida zeylanoides</i>	YM10-1	JX441602.1	602/613(98%)	Daejeon-si
<i>Cryptococcus</i> sp.	YM15-3	HG532103.1	611/619(99%)	
<i>Rhodotorula minuta</i>	YM19-3	EU583491.1	595/598(99%)	
<i>Trichosporon</i> sp.	YM1-2	JX103142.1	612/618(99%)	
	YM16-1	JX103142.1	611/618(99%)	
<i>Trichosporon xylopinii</i>	YM16-7	HQ005758.1	587/596(98%)	Gongju-gun
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	GJ4-1	FJ743620.1	633/640(99%)	
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	GJ9-1	AB281295.1	574/581(99%)	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	GJ2-1	HM627056.2	569/571(99%)	
	GJ2-3	HM627056.2	611/616(99%)	
<i>Hanseniaspora vineae</i>	GJ6-1	FJ196743.1	586/593(99%)	
<i>Pichia guilliermondii</i>	GJ8-2	FJ432597.1	608/613(99%)	
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	GJ8-1	HQ670686.1	613/618(99%)	
<i>Sporobolomyces phaffii</i>	GJ2-5	AY070011.1	597/601(99%)	
<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	GJ5-2	AF398489.1	567/569(99%)	
<i>Williopsis saturnus</i>	GJ5-1	AJ507804.1	612/618(99%)	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	NS1-4	KC111444.1	605/614(99%)	
	NS5-5	KC111444.1	609/613(99%)	
	NS6-1	KC111444.4	608/613(99%)	
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	NS1-3	AB281295.1	565/568(99%)	
<i>Hannaella oryzae</i>	NS12-4	JQ754134.1	635/640(99%)	
<i>Rhodospiridium fluviale</i>	NS12-3	KJ507301.1	604/614(98%)	
<i>Sporobolomyces phaffii</i>	NS10-7	AY070011.1	596/602(99%)	
	NS10-4	AY070011.1	595/601(99%)	
	NS10-6	AY070011.1	591/301(99%)	
<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	NS14-2	EU289352.1	552/552(100%)	
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	NS19-2	JX111949.1	635/641(99%)	
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	NS5-7	AF189873.1	618/627(99%)	
	NS10-3	AF105392.1	622/627(99%)	
<i>Trichosporon xylopinii</i>	NS5-1	HQ005757.1	617/617(100%)	
	NS6-6	HQ005757.1	608/617(99%)	
	NS10-5	HQ005757.1	581/581(100%)	
<i>Williopsis californica</i>	NS12-5	DQ377655.1	629/634(99%)	

Table 1. Yeasts species isolated from soils of paddy fields of Chungchngnam-do including Daejeon metropolitan city, Korea (continued)

Putative speceis	Isolated No.	Related Genebank No.	Identity (%)	Remarks (Collection sites)
<i>Candida parapsilosis</i>	JW9-2	HE605209.1	612/613(99%)	
<i>Candida pseudolambica</i>	JW2-3	KP087880.1	602/603(99%)	
<i>Candida</i> sp.	JW3-2	AF017235.1	570/570(100%)	
<i>Candida vartiovaarae</i>	DD2-5	HQ025958.1	558/560(99%)	
	DD13-1	EF550315.1	588/594(99%)	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	DD8-1	FJ743631.1	634/642(99%)	
	JW8-5	FJ743631.1	639/640(99%)	
	JW6-5	FJ743631.1	640/640(100%)	
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	JW11-2	U45843.1	570/570(100%)	
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	JW11-4	KC111446.1	615/615(100%)	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	JW11-1	HM627056.2	615/615(100%)	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	JW2-1	AY707865.1	607/607(100%)	
<i>Metschnikowia koreensis</i>	HL2-1	KC160624.1	501/503(99%)	Geumsan-gun
	HL2-2	AF257272.1	533/533(100%)	
<i>Pichia mexicana</i>	HL2-4	DQ409143.1	573/574(99%)	
<i>Pseudozyma aphidis</i>	JW6-4	JN940519.1	645/648(99%)	
<i>Pseudozyma prolifica</i>	HL9-1	AM160639.1	643/647(99%)	
<i>Rhodospordium toruloides</i>	JW5-4	EU159270.1	614/616(99%)	
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	JW11-3	FJ527178.1	545/545(100%)	
<i>Trichosporon asahii</i>	JW1-2	FJ463646.1	640/640(100%)	
	JW5-2	FJ463646.1	640/640(100%)	
	JW5-5	FJ463646.1	640/640(100%)	
	JW8-4	FJ463646.1	640/640(100%)	
	JW10-1	FJ463646.1	640/640(100%)	
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	JW8-1	JX111949.1	640/640(100%)	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	BY 7-1	FJ743631.1	635/641(99%)	
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	BY 1-3	FN428938.1	611/616(99%)	
	BY 14-1-2	FN428938.1	605/617(98%)	
<i>Cryptococcus saitoi</i>	BY 11-1	KJ507267.1	631/639(99%)	Nonsan-si
	BY 19-2	KJ507267.1	631/640(99%)	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	BY 10-1	KC111444.1	605/613(99%)	
	BY 16-1	KC111444.1	607/613(99%)	
<i>Cryptococcus diffluens</i>	TJ4-3	AF335981.1	620/625(99%)	
<i>Cryptococcus saitoi</i>	TJ1-1	KJ507267.1	636/640(99%)	
	TJ1-4	KJ507267.1	634/640(99%)	Cheonan-si
<i>Fibulobasidium</i> sp.	TJ7-2	EU678936.1	547/552(99%)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TJ1-2	EU285542.1	611/613(99%)	
<i>Cryptococcus</i> sp.	BS2-1	FJ743620.1	636/640(99%)	
	BS2-2	FJ743620.1	635/640(99%)	
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	BS3-1	FR716534.1	513/515(99%)	Buyeo-gun
	BS3-3	FR716534.1	513/515(99%)	
	BS4-1	FR716534.1	515/515(100%)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	BS10-2	HE660055.1	607/614(99%)	

Table 1. Yeasts species isolated from soils of paddy fields of Chungchengnam-do including Daejeon metropolitan city, Korea (continued)

Putative speceis	Isolated No.	Related Genebank No.	Identity (%)	Remarks (Collection sites)
<i>Asterotremella humicola</i>	SA1-1	AF189836.1	625/625(100%)	Boryeong-si
<i>Candida cretensis</i>	SA4-1	FR716579.1	535/537(99%)	
	SA2-1	GQ169731.1	608/617(99%)	
<i>Tetrapisispora nanseiensis</i>	SA17-1	AF398487.1	577/578(99%)	
<i>Asterotremella humicola</i>	YB2-1	AF189836.1	625/625(100%)	Hongseong-gun
<i>Cryptococcus pinus</i>	YB17-2	EF672245.1	643/643(100%)	
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	YB10-2	FJ743620.1	639/640(99%)	
	YB11-1	FJ743620.1	640/640(100%)	
	YB13-2	FJ743620.1	639/640(99%)	
	YB20-1	FN428938.1	600/606(99%)	
	YB23-1	FJ743620.1	640/640(100%)	
<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	YB8-4	JN940713.1	604/604(100%)	
<i>Barnettozyma californica</i>	DM3-4	DQ377655.1	633/633(100%)	Dangjin-si
<i>Cryptococcus kuetzingii</i>	DM2-1	AF181504.1	611/611(100%)	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DM2-3	FR686593.2	614/614(100%)	
<i>Pichia galeiformis</i>	DM3-5	AJ749826.1	603/603(100%)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DM2-2	EU285542.1	613/613(100%)	
	SM6-1	EU285542.1	613/613(100%)	
<i>Sporisorium destruens</i>	SM6-2	AY747077.1	641/642(99%)	
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	SM4-1	AF105392.1	626/626(100%)	
<i>Williopsis californica</i>	DM3-2	AJ510200.1	632/632(100%)	

Table 2. Ranking of yeasts isolated from soil in Daejeon metropolitan city and Chungchengnam-do, Korea

Ranking	Genus (Isolates)	Species (Isolates)
1	<i>Cryptococcus</i> spp. (25, 26%)	<i>Cryptococcus podzolicus</i> (11)
2	<i>Trichosporon</i> spp. (16, 16%)	<i>Debaryomyces hansenii</i> (6)
3	<i>Debaryomyces</i> spp. (9, 9%)	<i>Trichosporon asahii</i> (5)
4	<i>Candida</i> spp. (8, 8%)	<i>Trichosporon xylopinii</i> (4) <i>Sporobolomyces phaffii</i> (4) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (4) <i>Cryptococcus saitoi</i> (4) <i>Cryptococcus laurentii</i> (4)

적 요

우리나라 토양에서 효모 종 분포특성을 조사하기 위해 먼저 대전광역시를 포함하는 충청남도 전 지역의 밭 토양 61점을 2015년 6월부터 8월까지 수집하여 97균주 20종의 야생효모들을 분리하였고, polymerase chain reaction (PCR)을 통해 internal transcribed spacer (ITS) 부위와 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열 상동성 비교법을 이용하여 종을 동정하였다. 이들 가운데 *Cryptococcus podzolicus*가 11균주를 포함하는 *Cryptococcus* 속 균이 전체

분리 균주 중 16균주(16%)로 가장 많이 분리되었고, 다음으로 *Debaryomyces hansenii*와 *Trichosporon asahii*도 각각 6주씩 분리되었다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea.

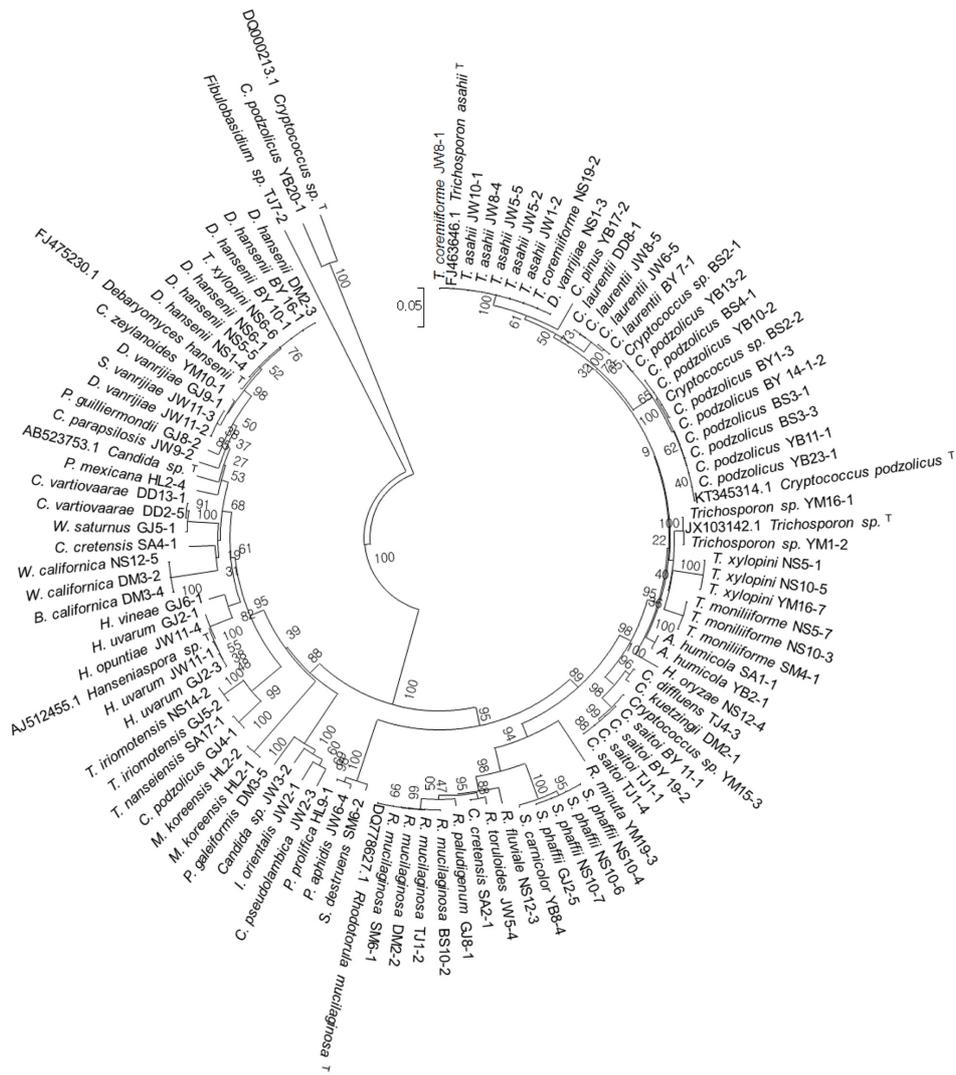


Fig. 2. Phylogenetic tree of yeast strains isolated from soils of Chungcheongnam-do, Korea based on the nucleotide sequences of large subunit 26S ribosomal DNA. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA v5.1.

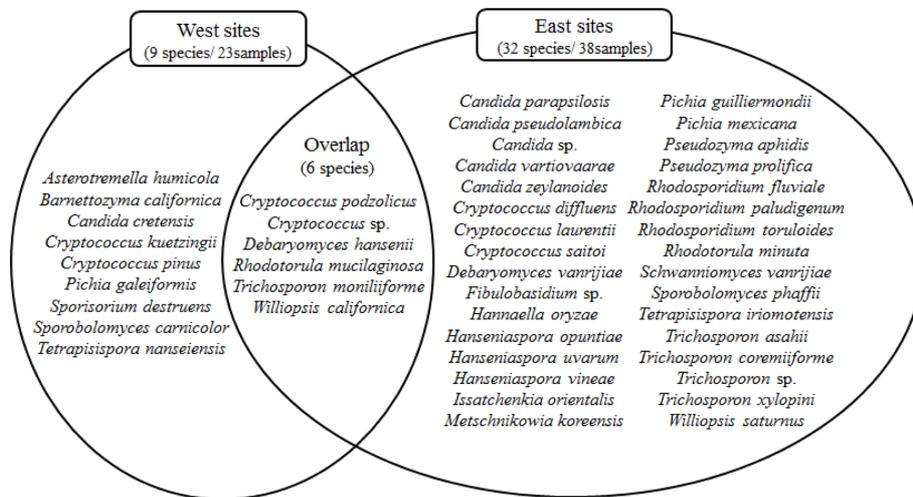


Fig. 3. Yeast distribution of soils collected from Daejeon metropolitan city and Chungcheongnam-do, Korea.

REFERENCES

1. Lee JS, Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25:448-53.
2. Jeong SC, Lee DH, Lee JS. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:1904-11.
3. Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 2004;14:1318-23.
4. 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.
5. Jang IT, Kim YH, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. *Kor J Mycol* 2011;39:227-8.
6. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antidiarrhea β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2007;42:83-8.
7. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* 2008;36:102-5.
8. Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor J Mycol* 2012;40:60-4.
9. Lee JS, Hyun KW, Jeong SC, Kim JH, Choi YJ, Miguez CB. Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and physiological activities. *Can J Microbiol* 2004;50:489-92.
10. 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.
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. Hyun SH, Mun HY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation of yeasts from wild flowers in Gyonggi-do province and Jeju island in Korea and the production of anti-gout xanthine oxidase inhibitor. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
13. Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of yeasts from wild flowers in Ulleungdo and Yokjido, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:28-33.
14. Hyun SH, Lee JK, 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.
15. 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.
16. 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.
17. Han SM, Park WJ, Lee JS. Isolation and diversity of wild yeasts from some cereals. *Kor J Mycol* 2015;43:64-7.
18. Han SM, Hyun SH, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Deogyu mountain and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:47-52.
19. Han SM, Hyun SH, Lee HB, Lee HW, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers collected around Jangseong lake in Jeollanam-do, Republic of Korea, and characterization of the unrecorded yeast *Bullera coprosmaensis*. *Mycobiology* 2015;43:266-71.
20. Han SM, Hyun SH, Kim NM, Lee JS. Antioxidant activity and inhibitory activities of xanthine oxidase and tyrosinase of yeasts from wild flowers in Korea. *Kor J Mycol* 2015;43:99-103.