

서울특별시 허브공원 토양으로부터 야생 효모의 분리, 동정 및 미기록 효모의 특성

한상민 · 이종수*

배재대학교 바이오 · 의생명공학과

Isolation and Identification of Wild Yeasts from Soils of an Herb Park in Seoul Metropolitan City and Characteristics of Unrecorded Yeasts

Sang-Min Han and Jong-Soo Lee*

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

ABSTRACT : This study focused on the isolation of wild yeasts from the soils of an herb park in Seoul, Korea, and characterization of unrecorded yeasts. Fifteen yeast strains of nine species were isolated and identified. Among them, strains of the *Cryptococcus* genus, such as *Cryptococcus laurentii* (2 strains), *Cryptococcus saitoi* (two strains), *Cryptococcus podzolicus* (2 strains), and *Cryptococcus* sp. (2 strains) were dominant. *Candida boleticola* SU14-2, *Candida novakii* SU6-2 and *Cryptococcus podzolicus* SU18-3 were also screened as newly recorded yeasts in Korea. *Candida novakii* SU6-2 formed ascospores and a pseudomycelium, and *Candida boleticola* SU14-2 grew well in the 5% NaCl-containing yeast extract-peptone-dextrose medium.

KEYWORDS : Herb park, Isolation and Identification, Soils, Unrecorded, Wild yeasts

서 론

‘효모’의 어원은 알코올 발효시 발생하는 거품의 의미를 갖는 gist에서 유래한 것으로 분류학상의 용어는 아니고 주로 출아법으로 무성생식을 하는 단세포 진균류 중의 한 미생물 군이다. 또한 효모는 분류학상 크게 유포자효모와 무포자효모로 구분하기도 하지만 발효형식에 따라 상면발효효모와 하면발효효모, 인공적으로 계대배양하는 배양효모와 자연계에 존재하는 야생효모, 물질생성과 이용에 따

라 색소효모, 지질효모, 석유효모, 양조효모, 약용효모, 사료효모 등으로 다양하게 구분하기도 한다.

산막효모와 *Cryptococcus*속 균, *Candida*속 균 중의 일부 병원성 효모 외에 대부분의 효모들이 비 병원성으로 오래 전부터 전통 발효식품 제조 등에 이용되고 있고 따라서 지금까지 효모는 주로 주류와 장류 등의 발효식품이나 주류용 발효제와 메주 등 이들의 주, 부원료 등에서 분리, 동정 되어왔다[1].

최근 필자 등은 우리나라 자생 생물조사, 발굴 연구의 일환으로 전국 산이나 섬 등의 야생화들에서 다양한 야생 효모들을 분리, 동정하여 보고하였다[2-11]. 이들 분리 균주 중에서는 *Cryptococcus*속 균들이 가장 많았고 *Cryptococcus aureus*를 포함하는 23균주들이 산 지역과 섬의 야생화들에서 공통적으로 분리되었으며 전체 균주 중 *Metschnikowia reukaufii*가 10% 이상으로 가장 많았다. 또한 이들 야생효모들은 야생화의 종류와 이들의 개화 위치 및 장소와 시기 등에 따라 종 다양성이 달랐다[11]. 필자 등은 이들 중 국내 미기록 효모들을 선별하여 이들의 미생물학적 특성을 조사하여 보고하였고[10, 12], 이들의 산업적 응용성을 제시하고자 비 병원성 효모들을 선별하여 항통풍 xanthine oxidase 저해활성 등 다양한 생리기능성들을 측정하

Kor. J. Mycol. 2016 June, 44(2): 108-112
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.2.108
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

Received May 27, 2016

Revised June 13, 2016

Accepted June 16, 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.

여 보고하였다[4, 8, 9, 11-13].

한편, 토양으로부터 효모의 분리 연구로 최근 Han 등 [14]이 제주도 동부지역 토양에서 *Candida sake* 등 20균주 12종의 효모를, 서부지역에서는 *Williopsis saturnus* 등 13균주 6종의 야생효모들을 각각 분리하여 보고하였다. 또한 대전광역시와 충청남도 지역 밭 토양에서는 *Cryptococcus podzolicus*를 포함하는 *Cryptococcus* 속 균들이 우점균임을 보고하였다[15]. 본 연구에서는 다양한 토양에서의 효모 종 분포특성 조사의 일환으로 서울특별시 H동의 허브공원 주위의 토양을 수집하여 야생효모들을 분리, 동정하였고 이들 중 국내에 아직까지 보고되지 않은 효모 균주들을 선별하여 균학적 특성을 조사하였다.

서울특별시 H동의 허브공원 인근 표층 2 cm 이하 토양 1 g 내외를 멸균 스페툴라로 채취하여 멸균튜브에 넣고, 3 mL의 멸균수를 첨가한 후 1시간 동안 진탕하여 현탁액을 얻었다. 현탁액 일부를 Min 등[3]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 집락들을 분리하였다.

효모들의 동정은 5.8S rDNA를 포함하는 internal transcribed spacer 부위와 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열을 조사한 후 이들 염기서열들을 NCBI의 BLAST를 사용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 효모들과의 분자생물학적 유연관계를 분석하여 동정하였다.

또한 이들 분리효모들을 PubMed 등의 학술정보 DB와 국내 균학 관련 학술지 등을 이용하여 국내 미보고 효모들을 선별하였다. 이들을 potassium acetate-yeast extract-dextrose (SM) 배지에서 배양하고 glucose-peptone-yeast extract (GPY) 고체배지에서 배양 후 효모 세포 염색법 등

으로 이들의 포자와 의균사 형성 유무 등의 형태적 특징과 배양적 특성을 조사하였다[12].

허브공원 토양으로부터 효모의 분리 및 동정

서울특별시 H동에 있는 허브공원의 토양 29점을 임의로 수집하여 효모들을 분리, 동정한 결과는 Table 1과 같다. 토양시료 29점에서 모두 9종 15주의 야생효모들이 분리, 동정되어 기 보고된 야생화 시료에서 보다[2, 3, 5, 8] 적게 분리되었다. 이들 중 *Cryptococcus laurentii*와 *Cryptococcus podzolicus*, *Cryptococcus saitoi* 등이 각각 2주씩 분리되는 등 *Cryptococcus* 속 균이 8균주로 가장 많았고 지금까지 자연환경에서 많이 분리되지 않은 *Saccharomyces cerevisia*가 2균주 분리, 동정되었다.

이러한 분리 결과는 필자 등이 최근 충청남도 지역의 토양에서 분리한 효모들 중에는 *Cryptococcus* spp.가 26%로 가장 많았고 *Trichosporon asahii*를 포함하는 *Trichosporon* spp.가 16%로 많이 분포한다는 보고[15] 및 지리적으로 위치가 매우 다른 제주지역 토양에서도 *Cryptococcus* 속 균이 우점균으로 많이 분리되었다는 Han 등[14]의 보고와도 유사한 경향이였다.

또한 주로 발효 식품이나 사료 등에 많이 분포하는 것으로 알려진 *Saccharomyces*속과 *Candida*속 균이 특이하게 허브공원 토양시료에서 분리된 것은 사람들의 왕래가 활발한 도시 인접 공원으로 이들에 의한 토양오염에 의한 것으로도 추정된다.

지금까지 전통 발효식품에 이용되고 있는 효모들은 대부분이 이들 발효식품이나 부원료, 발효제 등에서 분리된 것들로서 분리 자원의 한계성으로 새로운 효모균주의 개발에 어려움이 있다. 따라서 앞으로 본 연구와 더불어 필

Table 1. Yeast species isolated from soil of herb park in Seoul, Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genebank No.	Identity (%)
1	<i>Candida boleticola</i>	SU14-2	EU289343.1	542/544 (99%)
2	<i>Candida novakii</i>	SU6-2	EU289378.1	534/541 (99%)
3	<i>Cryptococcus laurentii</i>	SU17-2	FJ743631.1	633/641 (99%)
		SU9-1	FJ743631.1	633/640 (99%)
4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	SU18-3	KC494735.1	571/582 (98%)
		SU19-2	KC494735.1	570/582 (98%)
5	<i>Cryptococcus saitoi</i>	SU11-3	KJ507267.1	625/641 (98%)
		SU12-1	HM627083.1	575/588 (98%)
6	<i>Cryptococcus</i> sp.	SU1-5	KF916572.1	475/475 (100%)
		SU3-1	KF916572.1	474/475 (99%)
7	<i>Hanseniaspora vineae</i>	SU5-1	FJ196743.1	584/592 (99%)
8	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	SU13-2	EF656465.1	572/575 (99%)
		SU13-3	EF656465.1	573/576 (99%)
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SU2-1	CP006468.1	605/617 (98%)
		SU2-3	CP006468.1	606/616 (98%)

Table 2. Microbiological characteristics of three unrecorded yeasts isolated from soils of herb park in Korea

	<i>Candida boleticola</i> SU14-2	<i>Candida novakii</i> SU6-2	<i>Cryptococcus podzolicus</i> SU18-3
Morphological characteristics			
Shape	O	O	E
Vegetative reproduction	B	B	B
Size (μm)	0.9 × 1.0	0.7 × 0.8	0.7 × 1.8
Ascospore	-	+	-
Pseudomycelium	-	+	-
Cultural characteristics			
Growth on YM/PD media	+++/>++	+++/>+	+++/>+
Growth/color on YPD medium	+++/>W	+++/>W	++/>W
Growth on Vitamin-free medium	-	-	-
Growth on 50% glucose-YPD medium	-	-	-
Growth on 5%/20% NaCl-YPD medium	+/>-	-/>-	-/>-
Growth on temp/pH range	25~30°C/pH 7~8	25~30°C/pH 7~8	25~30°C/pH 4~7

O, oval-shaped; E, ellipsoidal-shaped; B, budding; +++, very good growth; ++ or +, good growth; -, no growth; W, white color; YM, yeast extract-malt extract medium; YPD, yeast extract-peptone-dextrose medium; PD, potato-dextrose medium.

자 등이 지금까지 분리한 야생 효모들에 대한 각종 효소활성과 발효성 및 다양한 생리기능성 검증 등을 통하여 새로운 건강식품 개발에 대한 산업적 응용 연구가 필요하다.

국내 미기록 효모들의 선별 및 특성

위와 같이 허브공원 토양에서 분리, 동정한 15종의 야생 효모들에 대하여 다양한 문헌 등을 이용하여 국내 기록 여부를 조사한 결과 *Candida boleticola* SU14-2와 *Candida novakii* SU6-2, *Cryptococcus podzolicus* SU18-3이 국내 미기록종으로 확인되었다.

이들의 형태학적, 배양학적 특성을 조사한 결과 Table 2와 같이 *Candida*속 2균주는 난형으로 출아법에 의하여 영양증식을 하였고 yeast extract-malt extract (YM)와 yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 배지에서 잘 성장하였다. 그러나 *Candida boleticola* SU14-2는 자낭포자와 의균사를 형성하지 않았고 5% NaCl을 함유한 YPD배지에서 잘 생육하는 호염성 효모이었다.

또한 *Cryptococcus podzolicus* SU18-3은 타원형으로 자낭

포자와 의균사를 형성하지 않았고 출아에 의한 무성 생식을 하였다. YPD 배지보다 peptone과 dextrose가 malt extracts로 대체되어 좀더 다양한 생육요소들을 함유하고 있을 것으로 추정되는 YM 배지에서 더 잘 생육하였고 생육 pH는 4.0~7.0으로 내산성을 보였다.

한편 이들 미기록 효모들의 계통수는 Fig. 1과 같으며 *Candida boleticola* SU14-2는 *Candida boleticola* U45771.1과 근연균이었고 *Candida novakii* SU6-2는 *Candida novakii* EU289378.1과, *Cryptococcus podzolicus* SU 18-3은 *Cryptococcus podzolicus* FN428938.1과 근연균이었다.

이들 국내 미기록 효모들에 대한 국외 연구는 주로 응용 연구가 이루어져 Botes 등[16]은 epoxide hydrolases를 생산하는 *Cryptococcus laurentii*와 *Cryptococcus podzolicus*에 관해 발표하였고 Schulze 등[17]은 지질을 생산하는 *Cryptococcus podzolicus*를 토양으로부터 분리하여 이들의 특성을 조사하였으며 Shubakov [18]는 *Cryptococcus podzolicus*로부터 β-xylosidase 생산에 관하여 보고하였다. 또한 Péter 등[19]은 부식 목재로부터 자낭균류 친화성 효모

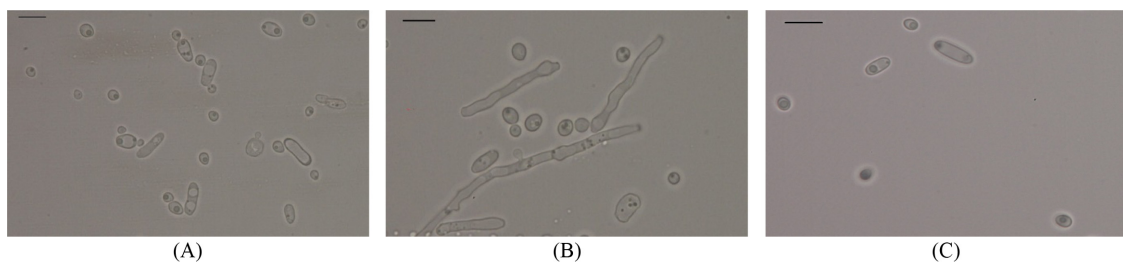


Fig. 1. Microscopic features of the three unrecorded yeasts, *Candida boleticola* SU14-2 (A), *Candida novakii* SU6-2 (B), *Cryptococcus podzolicus* SU18-3 (C) (scale bar = 2 μm).

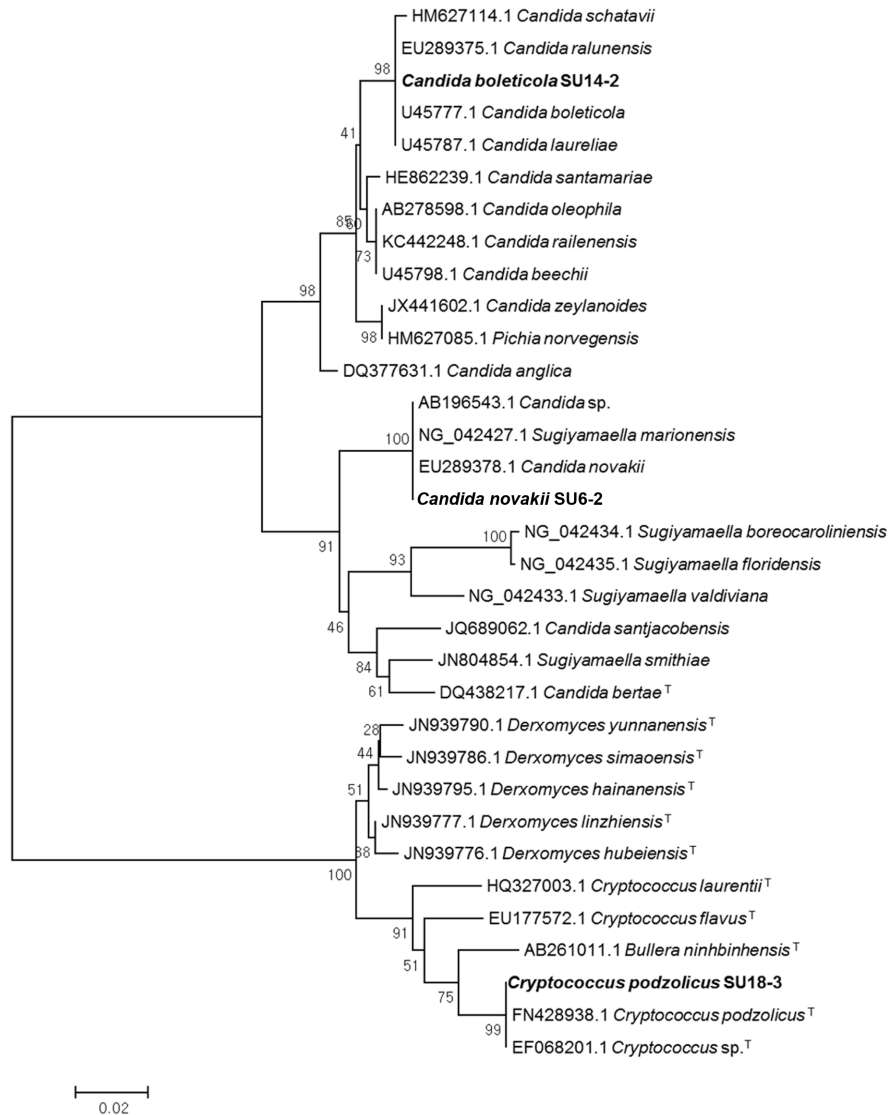


Fig. 2. Phylogenetic tree of the *Candida boleticola* SU14-2, *Candida novakii* SU6-2, *Cryptococcus podzolicus* SU18-3 based on the nucleotide sequences of large subunit 26S ribosomal DNA. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA v5.1.

를 *Candida novakii*를 분리하여 보고한 바 있다.

적 요

우리나라 토양 중의 효모 중 다양성 조사의 일환으로 서울특별시 H동 허브공원 일대 토양 29점을 2015년 5월에 수집하여 9종 15균주의 야생효모들을 polymerase chain reaction 을 이용한 internal transcribed spacer 부위와 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열 상동성 비교법을 이용하여 분리, 동정하였다. 이들 가운데 *Cryptococcus laurentii* 2 균주를 포함하는 *Cryptococcus*속 균이 8균주로 가장 많이 분리되었고 *Saccharomyces cerevisiae*도 2균주 분리되었다. 이들 가운데 아직까지 우리나라 미생물 관련 학술지에 보

고되지 않은 *Candida boleticola* SU14-2와 *Candida novakii* SU6-2, *Cryptococcus podzolicus* SU18-2 등의 미기록 효모들을 선별한 후 이들의 미생물학적 특성을 조사한 결과 *Candida novakii* SU6-2는 자낭포자와 의균사를 형성하였고 *Candida boleticola* SU14-2는 5% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 호염성 효모이었다.

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.

REFERENCES

1. Lee JS, Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25:448-53.
2. Min JH, Ryu JJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Gyejoksan, Oseosan and Baekamsan of Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:47-51.
3. 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.
4. 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. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Hyun SH, Han SM, Lee JS. Characteristics and physiological functionalities of unrecorded yeasts from wild flowers of Seonyudo in Jeollabukdo, Korea. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2014;42:402-6.
13. 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.
14. Han SM, Bae SM, Han JW, Kim JY, Lee JS, Kim HK. Isolation and identification of yeasts from Jeju island soils. *Kor J Mycol* 2015;43:267-71.
15. Han SM, Han JW, Bae SM, Park WJ, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from soils of paddy fields in Daejeon metropolitan city and Chungcheongnam-do, Korea. *Kor J Mycol* 2016;44:1-7.
16. Botes AL, Lotter J, Rhode OH, Botha A. 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. Schulze I, Hansen S, Großhans S, Rudszyk T, Ochsenreither K, Syltatk C, Neumann A. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express* 2014;4:24.
18. Shubakov AA. Production of beta-xylosidase by the yeast *Cryptococcus podzolicus*. *Bioorg Khim* 2000;26:613-6.
19. Péter G, Tornai-Lehocski J, Deák T. *Candida novakii*, sp. nov. a new anamorphic yeast species of ascomycetous affinity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1997;71:375-8.