

RESEARCH ARTICLE

향신료 재배 토양으로부터 분리한 국내 미기록 야생효모들의 균학적 특성 및 생리활성

한상민¹, 김지윤¹, 김창무², 이종수^{1,*}¹배재대학교 바이오 의생명공학과, ²국립생물자원관 미생물자원과

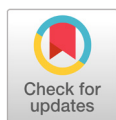
Characteristics of Unrecorded Wild Yeasts Obtained from the Soil of Spices Plant Fields and its Physiological Functionality

Sang-Min Han¹, Ji-Yoon Kim¹, Changmu Kim², Jong-Soo Lee^{1,*}¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea²Microorganism Resources Division, National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Republic of Korea

*Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr

ABSTRACT

The goal of this study was to characterize unrecorded wild yeasts from soils of spices plants fields and further, to elucidate its anti-demential activities and tyrosinase inhibitory activity. *Piskurozyma taiwanensis* R4-1 (NIBRFGC000502619), *Nadsonia starkeyi-henricii* R6-2 (NIBRFGC000502618), and *Canadida friedrichii* M12-6 (NIBRFGC000502615) isolated from soil of garlic field represented newly recorded yeast strains in Korea. *Vishniacozyma peneaus* I2-9 (NIBRFGC000502617) and *Cryptococcus aspenensis* I21-1 (NIBRFGC000502616) from soil of ginger field represented also newly recorded yeast strains, and microbiological characteristics of its fifteen yeast strains were investigated. All of these unrecorded yeasts exhibited oval-global shape and have ascospores except *Canadida friedrichii* M12-6. *Piskurozyma taiwanensis* R4-1 and *Canadida friedrichii* M12-6 grew well in vitamin-free medium, and *Piskurozyma taiwanensis* R4-1 was halotolerant growing in 10% NaCl-containing yeast extract peptone dextrose (YPD) broth. After prepared cell-free of the unrecorded wild yeasts, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activities as anti-dementia activity and tyrosinase inhibitory activity as whitening activity were determined. Cell-free extract from *Canadida friedrichii* M12-6 had the highest tyrosinase inhibitory activity of 14.4%.

Keywords: Physiological functionality, Soil, Spice plant field, Unrecorded wild yeasts

OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2019 March, 47(1): 75-81
<https://doi.org/10.4489/KJM20190009>**Received:** November 26, 2018**Revised:** January 9, 2019**Accepted:** January 15, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

지금까지의 효모는 주로 술과 누룩 등의 발효제나 된장, 메주 등 전통 발효식품의 주, 부원료로부터 분리, 보고[1] 되었으나, 최근 필자 등은 우리나라 자연환경에 존재하는 야생효모의 종 분포 특성을 조사하고 이들로부터 산업적 유용 효모를 선별하고자 한라산, 덕유산 등의 우리나라 주요 산과 제주도, 울릉도 등의 섬 및 도시와 농촌 등지의 야생화와 토양 및 각종 부식물 등으로부터 약 1,600여 종의 야생효모를 분리하고 동정하여 보고하였다. 또한 이들 중 비병원성 효모에 대하여 대체의약 소재 개발을 위한 생리활성 우수 효모를 선별하여 보고하였고 아직까지 국내에서 보고되지 않은 미기록/신종으로 87균주의 야생효모를 선별한 후 이들의 미생물학적 특징을 보고하였다 [2-16].

이와 같이 자연계에서 분리된 다양한 야생효모는 지역 간의 기후 등의 차이로 인한 야생화와 토양 등의 시료 간에 독특한 종 분포 특성이 있었고 토양에서도 산림지역, 논이나 밭 토양 간에 물성이나 부식물 함양 등의 차이로 인한 야생효모의 분포 특성이 다를 것으로 추정되었다. 따라서 재배 작물간의 야생효모 분포 특성을 알아보기 위해 전보[17]에서는 일반 농작물과는 다른 독특한 환경의 인삼과 당귀 등의 약용식물 재배지의 토양 등의 효모 종 분포 특성을 조사한 결과 인삼밭 토양에서는 *Rhodotorula glutinis*가 가장 많이 분리되었고 당귀밭에서는 *Cyberlindnera saturnus* 야생효모가 많이 분리, 동정되었다.

본 연구는 독특한 향미 성분을 함유한 향신료의 재배지에서 분리한 야생효모 중 국내 미기록 효모를 선별하여 이들의 균학적 특성을 조사하고 이들로부터 건강 소재 개발을 위한 산업적 자료를 얻기 위하여 실시되었다. 이를 위해 먼저 오랫동안 향신료를 재배해 오고 있는 충남 금산의 마늘 등의 4가지 향신료 재배지의 토양 등으로부터 분리한 야생효모 중 5종의 국내에 보고되지 않은 야생효모를 선별하여 이들의 균학적 특성을 조사하였다. 또한 이들의 무세포 추출물을 제조한 후 주요 생리활성으로 항치매성 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase 저해활성과 미백성 tyrosinase 저해활성 등을 측정하였다

재료 및 방법

국내 미기록 효모의 선별 및 균학적 특성

필자 등이 충남 금산의 양파와 도라지, 마늘과 생강 등의 재배지 토양 시료에서 분리, 동정한 126종의 야생효모를 대상으로 국립 생물자원관 DB와 한국 진균 관련 학술자료를 이용하여 국내 미기록 효모를 선별한 후 일반 미생물 실험방법 등을 이용하여 이들의 몇 가지 균학적 특성 등을 조사하였다 [9, 11].

야생효모의 생리활성 측정

무세포 추출물 제조: 국내 미기록 야생효모를 yeast extract peptone dextrose (YPD) 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 8,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 세포 배양물을 얻었다. 세포 배양물은 다시 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.3)에 현탁시킨 후 초음파 균체파쇄기(Vibra cell; SONICS & Materials, Newtown, CT, USA)로 파쇄하고 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 무세포 추출물을 얻었다. 무세포 추출물을 동결건조시킨 후 이를 0.1M sodium phosphate 완충용액(pH 7.3)에 10 mg/

mL로 용해시켜 생리활성 측정용 시료로 사용하였다[8].

야생효모의 생리활성 측정: 항치매성 Acetylcholinesterase (AChE) 저해활성은 각 well plate에 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.3) 110 μ L, acetylcholinesterase (0.8 unit/mL) 30 μ L, 기질(2 mM acetylthiocholine chloride) 30 μ L, 2 mM DTNB 20 μ L, assay buffer에 1 mg/mL로 용해시킨 sample 10 μ L를 혼합하여 37°C에서 6분 동안 반응시킨 후 A VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 415 nm에서 흡광도를 측정한 후 아래와 같이 AChE 저해활성을 계산하였다 [7, 18].

Acetylcholinesterase / Butyrylcholinesterase 저해활성(%) =

$$1 - \frac{S_{6min} - C_{0min}}{C_{6min} - C_{0min}} \times 100$$

(C, 대조구의 흡광도; S, 시료구의 흡광도)

Butyrylcholinesterase (BChE) 저해활성은 무세포 추출물 50 μ L 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.3) 70 μ L, BChE (0.8 unit/mL) 30 μ L, DTNB (2 mM) 20 μ L를 혼합한 후 2 mM acetylcholine chloride 30 μ L을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하여 위와 같은 AChE

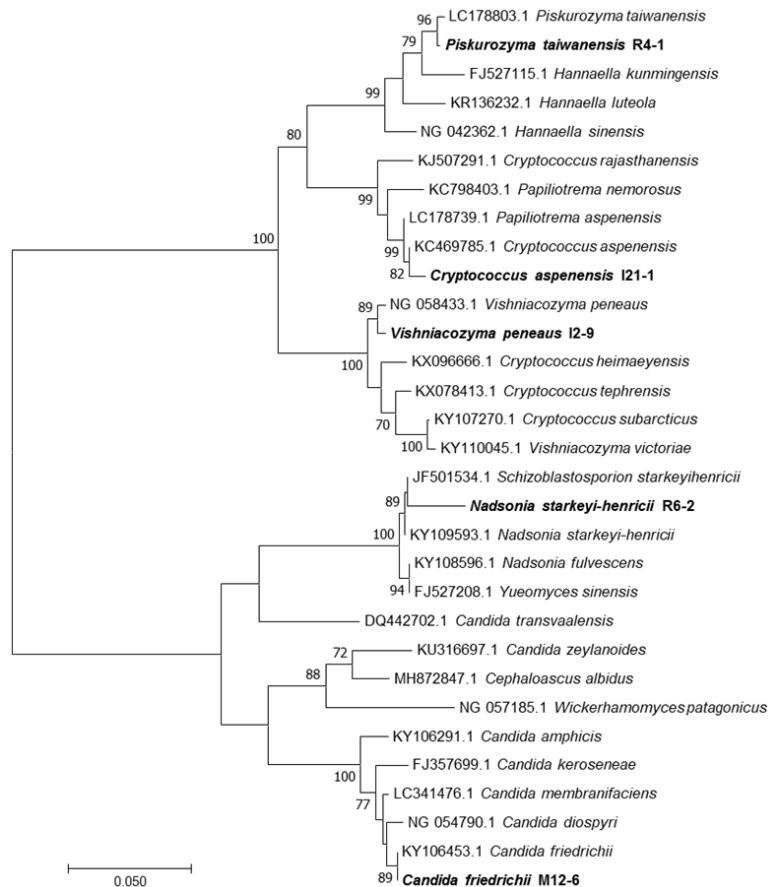


Fig. 1. Phylogenetic tree of unrecorded yeasts isolated from the soil of spice plant fields of Geumsan, Chungnam province, Korea, based on the nucleotide sequences of large subunit 26S ribosomal DNA D1/D2 region. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA7.

저해활성 측정식으로 BChE 저해활성을 계산하였다.

미백성 Tyrosinase 저해활성은 위와 같이 제조한 야생효모 무세포 추출물 시료 25 μ L에 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 6.8) 150 μ L, 1.5 mM L-tyrosinase 50 μ L 혼합 후 37°C에서 ELISA reader를 이용하여 5분간 incubation한 후 tyrosinase 40 U를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 470 nm에서 흡광도를 측정한 후 아래와 같은 식으로 tyrosinase 저해활성을 계산하였다[17].

$$\text{Tyrosinase 저해활성(\%)} = \left[\frac{C - (T - B)}{C} \right] \times 100$$

(C, 대조구의 흡광도; T, 시료구의 흡광도; B, 시료구 blank의 흡광도)

결과 및 고찰

마늘과 생강 재배지 토양으로부터 분리한 국내 미기록 야생효모의 특성

마늘과 생강, 양파와 도라지 등으로부터 분리한 야생효모 중 마늘과 생강 재배지 토양에서 분리한 *Vishniacozyma peneaus* I2-9 (NIBRFGC000502617), *Cryptococcus aspenensis* I21-1 (NIBRFGC000502616), *Piskurozyma taiwanensis* R4-1 (NIBRFGC000502619), *Nadsonia starkeyi-henricii* R6-2 (NIBRFGC000502618), *Canadida friedrichii* M12-6 (NIBRFGC000502615) 등 5균주가 국내 미기록 효모로 최종 선별되었다.

이들의 형태적, 배양적 특징과 phylogentic tree는 각각 Table 1, Fig. 1과 같다. 이들 미기록 효모는 구형~타원형으로 출아에 의해 영양 증식을 하였고 *Vishniacozyma peneaus* I2-9, *Cryptococcus aspenensis* I21-1, *Piskurozyma taiwanensis* R4-1, *Nadsonia starkeyi-henricii* R6-2은 자낭포자를 형성하였다.

Vishniacozyma peneaus I2-9, *Cryptococcus aspenensis* I21-1, *Piskurozyma taiwanensis* R4-1, *Nadsonia starkeyi-henricii* R6-2는 YPD 배지와 yeast extract-malt extracts (YM) 배지, 비타민을 첨가하지 않은

Table 1. Microbiological characteristics of unrecorded wild yeasts from the soil of spice plant fields of Geumsan, Chungnam province, Korea

Strains	<i>Vishniacozyma peneaus</i>	<i>Cryptococcus aspenensis</i>	<i>Piskurozyma taiwanensis</i>	<i>Nadsonia starkeyi-henricii</i>	<i>Canadida friedrichii</i>
Isolated no.	I2-9	I21-1	R4-1	R6-2	M12-6
Morphological characteristics					
Shape	Global	Global	Oval	Global	Oval
Vegetative reproduction	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding
Size (μ m)	1.0 x 1.2	1.2 x 1.4	1.2 x 1.8	1.6 x 1.6	0.9 x 1.3
Ascospore	+	+	+	+	-
Pseudomycelium	-	-	-	-	-
Cultural characteristics					
Growth on YPD/YM/PD media	+++ / +++ / ++	+++ / +++ / +	+++ / +++ / ++	+++ / +++ / +++	- / + / +
Color on YPD medium	Cream	Yellow	Yellow	White	Cream
Growth on Vitamin-free medium	+	+	++	+	++
Growth on 10%/20% glucose-YPD medium	++ / +	++ / +	+++ / +	++ / -	++ / ++
Growth on 5%/15% NaCl-YPD medium	+++ / +	+ / -	+++ / +	+ / -	+ / +
Growth on temp/pH range	20°C~35°C/ pH 5~8	20°C~35°C/pH 5~8	20°C~35°C/pH 5~8	20°C~35°C/ pH 5~8	20°C~35°C/ pH 5~8

+, formed; -, not formed; YPD, yeast extract peptone dextrose; YM, yeast extract-malt extracts; PD, potato-dextrose

Table 2. Several physiological functionalities of unrecorded wild yeasts from soils of spices plants fields of Geumsan, Chungnam province, Korea

Unrecorded yeasts	<i>Vishniacozyma peneaus</i>	<i>Cryptococcus aspenensis</i>	<i>Piskurozyma taiwanensis</i>	<i>Nadsonia starkeyi-henricii</i>	<i>Candida friedrichii</i>
Isolated no.	I2-9	I21-1	R4-1	R6-2	M12-6
AChE inhibitory activity (%)	9.9 (± 0.7)	n.d	6.6 (± 1.2)	n.d	n.d
BChE inhibitory activity (%)	6.7 (± 0.6)	5.6 (± 0.6)	n.d	n.d	2.1 (± 0.5)
Tyrosinase inhibitory activity (%)	n.d	n.d	n.d	5.5 (± 0.4)	14.4 (± 1.3)

AChE, acetylcholinesterase; BChE, butyrylcholinesterase; n.d, not detected.

YPD 배지에서도 모두 생육하였으며 *Vishniacozyma peneaus* I2-9 외 4균주 모두 10% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 호염성 효모로서 이들은 야생효모의 내염기작을 밝히는 학술적 연구 뿐만 아니라 내염성 효소 생산 등 산업적으로도 매우 유용한 대사산물을 생산할 것으로 추정되어 이들의 추가 연구가 요구된다.

국내 미기록 효모에 대한 외국 학술지 보고로 *Vishniacozyma peneaus*는 Liu 등[19]에 의하여 *Tremellomycetes*의 분자계통학적으로 재동정 되었고, *Cryptococcus aspenensis*는 태국의 사탕수수 잎에서 처음 분리, 동정되었다[20]. 또한 *Piskurozyma taiwanensis*는 대만의 식물 잎에서 *ballistocnidium*을 형성하는 새로운 야생효모로 분리, 보고[21] 되었고, *Nadsonia starkeyi-henricii*는 Kurtzman 등[22]에 의하여 *Saccharomycotina*와 같은 그룹에 속하는 새로운 효모 균주로 보고되었다.

또한, *Canadida friedrichii*는 태국에서 분리, 보고된 *Candida jarooni* 및 *Candida songkhlaensis*와 밀접하게 관련된 새로운 효모로 처음 보고[23] 되었다.

국내 미기록 야생효모의 생리활성

항치매활성과 미백활성을 가진 건강 소재를 생성하는 야생효모를 선별하기 위하여 위와 같이 선별한 미기록 야생효모의 무세포 추출물을 제조하여 항치매성 actylcholinesterase와 butyrylcholinesterase 저해활성과 미백성 tyrosinase 저해활성을 측정하였다(Table 2). 5주의 미기록 야생효모의 무세포 추출물 중 actylcholinesterase와 butyrylcholinesterase 저해활성은 *Vishniacozyma peneaus* I2-9가 각각 9.9%와 6.7%를 보였을 뿐 대부분 활성이 없거나 5% 미만을 보였다.

미백성 tyrosinase 저해활성은 *Canadida friedrichii* M12-6의 무세포 추출물이 14.4%로 제일 높았고 *Nadsonia starkeyi-henricii* R6-2가 5.5%를 보였으나 전보[17]의 인삼밭 토양에서 분리한 야생효모 *Naganishia globosa* G1-7의 28%와 Han 등[24]의 *Stammerella bombicola* 80-J-1의 저해활성(36.2%)보다는 낮은 활성이었다.

적요

생리기능성을 조사하기 위하여 먼저 충남 금산의 양파와 도라지, 마늘과 생강 등의 재배지 토양시료에서 분리, 동정한 야생효모 중 마늘 재배지에서 분리한 *Piskurozyma taiwanensis* R4-1 (NIBRFGC000502619), *Nadsonia starkeyi-henricii* R6-2 (NIBRFGC000502618), *Canadida friedrichii* M12-6 (NIBRFGC000502615) 균주와 생강에서 분리한 *Vishniacozyma peneaus* I2-9 (NIBRFGC000502617)와 *Cryptococcus aspenensis* I21-1 (NIBRFGC000502616) 균주의 야생효모를 국내 미기록 효모 균주로 최

종 선별하여 이들의 형태학적, 배양학적 특성 등을 조사하였다. 미기록 균주들은 구형~타원형으로 *Piskurozyma taiwanensis* R4-1, *Nadsonia starkeyi-henricii* R6-2들은 자낭포자를 형성하였다. *Vishniacozyma peneaus* I2-9, *Cryptococcus aspenensis* I21-1, *Piskurozyma taiwanensis* R4-1, *Nadsonia starkeyi-henricii* R6-2는 yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 배지와 yeast extract-malt extracts (YM) 배지, 비타민을 첨가하지 않은 YPD 배지에서도 모두 생육하였으며 *Vishniacozyma peneaus* I2-9 외 4균주 모두 10% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 호염성 효모였다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the project on the survey and excavation of Korean indigenous species of the National Institute of Biological Resources (NIBR 201902113) under the Ministry of Environment, 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. Korean 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. 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.
4. 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.
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, 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Han SM, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from soils of an herb park in Seoul metropolitan city and characteristics of unrecorded yeasts. Kor J Mycol 2016;44:108-12.
12. Han SM, Lee SY, Kim HK, Lee JS. Characterization of wild yeasts isolated from leaves obtained from Mt. Daedun and Mt. Chilgap, Korea. Kor J Mycol 2017;45:31-42.

13. Han SM, Lee JS. Characterization of unrecorded yeasts isolated from leaves of trees of Oknyeobong peak and Yeonjasan mountain in Daejeon, Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:23-30.
14. Han SM, Kim HK, Lee HB, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from freshwaters and soils of Nakdong and Yeongsan river, Korea, with characterization of two unrecorded yeasts. *Kor J Mycol* 2016;44:350-4.
15. Han SM, Lee SY, Kim HK, Lee JS. Characterization of the unrecorded wild yeasts from the water and riverside soils of Daejeoncheon and Gapcheon in Daejeon Metropolitan city, Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:153-9.
16. Han SM, Kim JY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation and characterization of wild yeasts from water and riverside soils of Geumgang midstream in Gongju city, Korea. *Kor J Mycol* 2018;46:98-104.
17. Kim JY, Han SM, Lee JS. Isolation and tyrosinase inhibitory activity of wild yeasts obtained from soil in the fields of medicinal plants, Ginseng and Korean angelica. *Kor J Mycol* 2018;46:315-23.
18. Seo DS, Jang JH, Kim NM, Lee JS. Optimal extraction condition and characterization of antidementia acetylcholinesterase inhibitor from Job's tears (*Coix lachryma-jobi* L.). *Korean J Medicinal Crop Sci* 2009;17:434-8.
19. Liu XZ, Wang QM, Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, Millanes AM, Wedin M, Yurkov AM, Boekhout T, et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud Mycol* 2015;81:85-147.
20. Khunnamwong P, Surussawadee J, Srisuk N, Boonmak C, Limtong S. *Papiliotrema phichitensis* f.a., sp. nov., a novel yeast species isolated from sugarcane leaf in Thailand. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2018;111:2455-61.
21. Nakase T, Tsuzuki S, Takashima M. *Bullera taiwanensis* sp. nov. and *Bullera formosensis* sp. nov., two new ballistoconidium-forming yeast species isolated from plant leaves in Taiwan. *J Gen Appl Microbiol* 2002;48:345-55.
22. Kurtzman CP, Robnett CJ. *Alloascoidea hylecoeti* gen. nov., comb. nov., *Alloascoidea africana* comb. nov., *Ascoidea tarda* sp. nov., and *Nadsonia starkeyi-henricii* comb. nov., new members of the Saccharomycotina (Ascomycota). *FEMS Yeast Res* 2013;13:423-32.
23. Imanishi Y, Jindamorakot S, Mikata K, Nakagiri A, Limtong S, Potacharoen W, Tanticharoen M, Nakase T. Two new ascomycetous anamorphic yeast species related to *Candida friedrichii*-*Candida jaronii* sp. nov., and *Candida songkhlaensis* sp. nov.-isolated in Thailand. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008;94:267-76.
24. 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.