

RESEARCH ARTICLE

대전광역시 옥녀봉과 연자산 나뭇잎으로부터 야생효모의 분리 및 국내 미기록 효모의 특성

한상민, 이종수*

배재대학교 바이오·의생명공학과

Characterization of Unrecorded Yeasts Isolated from Leaves of Trees of Oknyeobong Peak and Yeonjasan Mountain in Daejeon, Korea

Sang-Min Han, Jong-Soo Lee*

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

*Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr

Abstract

Twenty-two yeast strains of 15 species were isolated from the leaves of 20 trees on Oknyeobong Peak, and 24 yeast strains of 12 species were isolated from the leaves of 20 trees on Yeonjasan Mountain in Daejeon city, Korea. *Cryptococcus bestiolae* (5 strains) and *Aureobasidium pullulans* (8 strains) were the predominant isolates from Oknyeobong Peak and Yeonjasan Mountain, respectively. Of a total of 46 yeast strains, *Cryptococcus kuetzingii* JSL508, *Cryptococcus vishniacii* JSL509, and *Dioszegia takashimae* JSL510 from Oknyeobong Peak, and *Plowrightia periclymeni* JSL514, *Erythrobasidium hasegawanium* JSL0193, and *Rhodotorula nothofagi* JSL0196 from Yeonjasan Mountain were determined to be yeast strains that were yet unrecorded in Korea. Morphological and cultural characteristics of these unrecorded yeasts were investigated. *Erythrobasidium hasegawanium* JSL0193 and *Rhodotorula nothofagi* JSL0196 did not form ascospores and pseudomycelia. All the strains, except *Dioszegia takashimae* JSL510, were halotolerant or halophilic, and *Cryptococcus kuetzingii* JSL508 and *Dioszegia takashimae* JSL510 were thermophilic, growing at 37°C.

Keywords: Leaves, Oknyeobong Peak, Unrecorded yeasts, Wild yeasts, Yeonjasan Mountain

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 March, 45(1): 23-30
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170003>

pISSN : 0253-651X
 eISSN : 2383-5249

Received: 14 February, 2017

Revised: 22 February, 2017

Accepted: 22 February, 2017

© 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 대부분 전통발효식품이나 이들의 주, 부원료 등에서 분리되어 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Zygosaccharomyces rouxii* 등이 주류와 일부 장류 등의 제조에 사용되고 있다[1-5]. 또한 최근 필자 등이 전국 자연환경에 분포하고 있는 야생 효모들을 분리하여 한국의 효모 종 다양성을 확립하고 나아가 이들을 고부가 가치의 의약이나 건강산업

등으로의 응용성을 검토하고자 우리나라 하천과 논밭, 주요 섬과 산들의 다양한 꽃들로부터 야생 효모들을 분리 동정하여 이들의 특성과 종 다양성을 제시하였다[6].

본 연구는 대전광역시 서부지역에 위치한 옥녀봉과 연자산 나뭇잎들의 효모 분포를 조사함으로써, 새로운 효모 자원을 확보함과 동시에 나뭇잎과 효모의 생태관계를 연구하기 위한 기초자료를 얻고자 대전광역시 서구 도안동에 있는 옥녀봉과 대전광역시 서구 도마동에 있는 연자산 나뭇잎들로부터 효모들을 분리하여 동정하였다. 또한 이들 분리 효모들 중 국내 미기록 효모들을 선별하여 이들의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

야생효모의 분리는 먼저 이들 시료 나뭇잎들 각각 멸균튜브에 채취한 후, 5 mL의 멸균수를 넣고 1시간 동안 진탕하여 현탁액을 얻었다. 현탁액 일부를 스트렙토마이신(50 µg/mL)과 암피실린(50 µg/mL)이 들어 있는 yeast extract-peptone dextrose 한천배지에 도말하고 30°C에서 48시간 배양한 후 생육된 효모 집락들을 분리하였다. 이들 분리효모의 동정은 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열을 조사한 후 염기서열들을 NCBI의 BLAST를 사용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 효모들과의 분자생물학적 유연관계를 분석하여 최종 동정하였다[7].

위와 같이 대전광역시 연자산과 옥녀봉의 나뭇잎들로부터 분리한 야생 효모들을 대상으로 국립생물자원관 DB와 RISS, PubMed 및 배재대학교 도서관 등의 한국 균학 관련 논문 자료들을 이용하여 국내에 아직까지 보고되지 않은 균주들을 확인하여 국내 미기록 효모로 최종 선별하였다[8]. 선별된 미기록 효모들에 대하여 일반 미생물 실험방법 등을 이용하여 형태학적 특징과 배양 및 생리적 특성 등을 조사하였다[9, 10].

결과 및 고찰

대전광역시 옥녀봉과 연자산 나뭇잎들로부터 야생효모의 분리 및 동정

대전광역시 옥녀봉에서 편백(*Chamaecyparis obtusa*), 소나무(*Pinus densiflora*), 박달나무(*Betula schmidtii*), 매자나무(*Berberis koreana*), 동백나무(*Camellia japonica*), 개암나무(*Corylus heterophylla*), 철쭉(*Rhododendron schlippenbachii*), 밤나무(*Castanea crenata*) 등에서 채취한 20점의 나뭇잎들로부터 15종에 속하는 22균주의 야생효모를 분리하였다(Table 1). 이들 가운데 *Cryptococcus bestiolae*의 5균주를 포함한 *Cryptococcus*속 균이 모두 7균주로 가장 많았고 *Candida*속 균도 3균주가 분리되었다.

또한, 대전광역시 연자산의 소나무, 박달나무, 은행나무(*Ginkgo biloba*), 동백나무, 먼나무(*Ilex rotunda*), 목서(*Osmanthus fragrans*), 호랑가시나무(*Ilex cornuta*), 철쭉, 밤 나무들의 잎 20점을 수집하여 이들로부터 야생효모들을 분리하여 동정한 결과 Table 1과 같이 모두 12종 24균주의 야생효모들을 분리하였다. 이들 중 *Aureobasidium pullulans*의 8균주를 포함한 *Aureobasidium*속 균이 9균주로 가장 많았고 위의 옥녀봉 나뭇잎들로부터 분리된 효모들과 같이 *Cryptococcus*속 균이 5균주로 역시 많이 분리되었다.

위와 같이 나뭇잎에서 가장 많이 분리된 *Cryptococcus*속 균들은 필자 등[11-17]이 우리나라 주요 산이나 하천, 들녘의 야생화들에서도 가장 많이 분리된 효모들로서 자연계의 꽃이나

Table 1. Yeasts isolated from tree leaves of Oknyeobong Peak and Yeonjasan Mountain in Korea

No.	Putative species	Isolated no.	Related Genebank sequence	Identity (%)	Remarks
1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JSL801	KX893325.1	567/572 (99%)	Oknyeobong Peak
		JSL813	AY213693.1	578/578 (100%)	
2	<i>Candida ghanaensis</i>	JSL816	GU373764.1	599/605 (99%)	
		JSL818	GU373764.1	598/602 (99%)	
3	<i>Candida intermedia</i>	JSL802	KJ794657.1	608/609 (99%)	
4	<i>Cryptococcus bestiolae</i>	JSL803	NG_042482.1	589/591 (99%)	
		JSL804	NG_042482.1	507/513 (99%)	
		JSL810	NG_042482.1	603/607 (99%)	
		JSL811	NG_042482.1	528/535 (99%)	
		JSL812	NG_042482.1	513/517 (99%)	
5	<i>Cryptococcus kuetzingii</i>	JSL508	AF137602.1	595/596 (99%)	
6	<i>Cryptococcus vishniacii</i>	JSL509	JN400780.1	639/655 (98%)	
7	<i>Debaryomyces hansenii</i>	JSL805	JQ916047.1	596/601 (99%)	
8	<i>Dioszegia takashimae</i>	JSL510	DQ003331.1	597/611 (98%)	
9	<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	JSL818	AM748534.1	519/523 (99%)	
10	<i>Lachancea thermotolerans</i>	JSL814	JX129903.1	593/598 (99%)	
		JSL815	JX129903.1	598/602 (99%)	
11	<i>Metschnikowia viticola</i>	JSL806	KT922837.1	607/609 (99%)	
12	<i>Meyerozyma caribbica</i>	JSL807	LC134045.1	516/520 (99%)	
13	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	JSL808	KU316708.1	608/609 (99%)	
		JSL800	KU316708.1	587/590 (99%)	
14	<i>Rhodospordium fluviale</i>	JSL809	KJ507301.1	519/525 (99%)	
15	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	JSL817	KT895982.1	523/534 (98%)	
16	<i>Aureobasidium proteae</i>	JSL0178	KT427631.1	577/582 (99%)	Yeonjasan Mountain
17	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JSL0179	KX893325.1	605/607 (99%)	
		JSL0180	AY213693.1	588/590 (99%)	
		JSL0181	KX893324.1	594/598 (99%)	
		JSL0182	KX893324.1	595/597 (99%)	
		JSL0183	KX893329.1	607/610 (99%)	
		JSL0184	AY213693.1	605/607 (99%)	
		JSL0185	AY213693.1	596/600 (99%)	
		JSL0186	AY213693.1	584/585 (99%)	
18	<i>Candida</i> sp.	JSL0187	EF550331.1	586/594 (99%)	
19	<i>Cryptococcus bestiolae</i>	JSL0188	NG_042482.1	590/591 (99%)	
		JSL0189	NG_042482.1	584/588 (99%)	
20	<i>Cryptococcus flavescens</i>	JSL0190	AB698750.1	594/597 (99%)	
21	<i>Cryptococcus flavus</i>	JSL0191	EU177572.1	580/593 (98%)	
		JSL0192	FN428891.1	562/574 (98%)	
22	<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	JSL0193	KM246121.1	534/540 (99%)	
23	<i>Metschnikowia koreensis</i>	JSL0194	AF296438.1	559/559 (100%)	
		JSL0195	KJ507292.1	593/593 (100%)	
24	<i>Plowrightia periclymeni</i>	JSL514	FJ215702.1	567/569 (99%)	
25	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	JSL0196	KC006840.1	615/623 (99%)	
26	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	JSL0197	FJ527108.1	517/523 (99%)	
27	<i>Sydowia polyspora</i>	JSL0198	GQ412729.1	586/592 (99%)	
		JSL0199	GQ412729.1	599/601 (99%)	
		JSL0200	GQ412728.1	514/517 (99%)	

나뭇잎들의 효모 분포특성이 일부 유사한 것으로 추정된다.

국내 미기록 효모들의 선별 및 특성

위와 같이 대전광역시 옥녀봉과 연자산의 나뭇잎들로 분리한 46균주의 야생효모들 중 아직까지 국내에 보고되지 않은 효모들을 선별한 결과 연자산에서 분리한 효모 중에서는 *Plowrightia periclymeni* JSL514와 *Erythrobasidium hasegawanum* JSL0193, *Rhodotorula nothofagi* JSL0196 등 3균주의 야생효모들이 국내 미기록 효모로 선별되었고 *Cryptococcus kuetzingii* JSL508과 *Cryptococcus vishniacii* JSL509, *Dioszegia takashimae* JSL510 등이 옥녀봉에서 분리한 미기록 효모들로 최종 선별되었다.

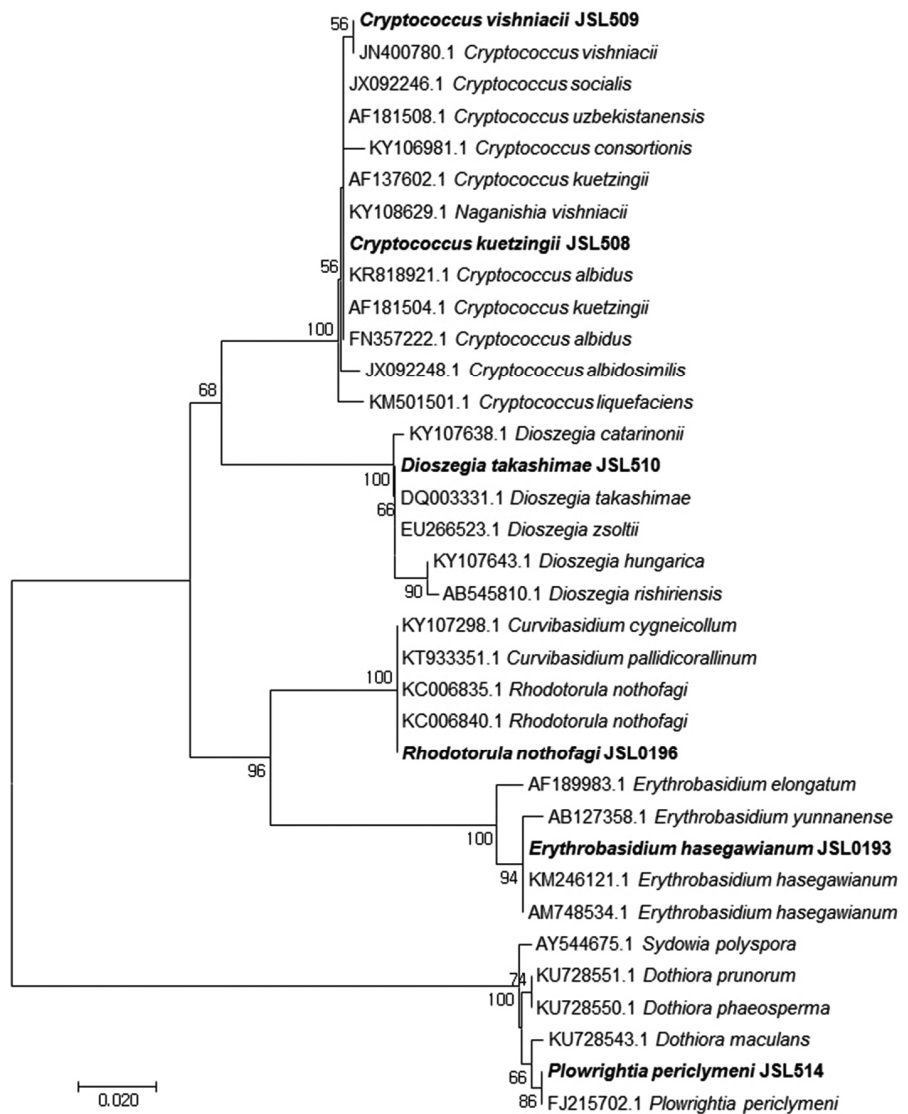


Fig. 1. Phylogenetic tree of six unrecorded yeasts isolated from Oknyeobong Peak and Yeonjasan Mountain based on the nucleotide sequences of 26S ribosomal DNA. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA7. The numbers above or below branches mean the bootstrap supporting values.

이들 미기록 효모들의 계통수는 Fig. 1과 같고 국내에서 이미 보고된 같은 속 균과 26S rDNA의 D1/D2부위의 유전자 염기서열을 비교하였을 때 이들이 국내에 보고되지 않은 균주 들임을 확인할 수 있었다.

한편, 이들 미기록 효모들의 형태적, 배양적 특성을 조사한 결과 Table 2와 같이 형태는 일 반 효모들의 전형적인 구형과 난형이었고 출아법으로 영양증식을 하였으며 *Erythrobasidium hasegawanum* JSL0193과 *Rhodotorula nothofagi* JSL0196만이 무포자 효모이고 의균사를 형성하지 못하였다. *Cryptococcus kuetzingii* JSL508은 yeast extract-peptone-dextrose (YPD)와 yeast extract-malt extract, potato-dextrose 배지에서 생육하지 못하였고 *Dioszegia takashimae* JSL510 외 모든 미기록 효모들이 5~10% NaCl 함유한 YPD 배지에서 생육하는 호염성 또는 내염성 효모들이었다. *Cryptococcus kuetzingii* JSL508과 *Dioszegia takashimae* JSL510은 37°C에서 생육하는 고온성 효모들이었다. 이들 호염성 그리고 고온성 효모들은 앞으로 내염성 또는 내열성의 효소생산 등의 산업적 이용성이 클 것으로 생각되어 이들에 관 한 추가적인 연구가 필요하다.

한편, 이들 국내 미기록 효모들에 대한 외국학술지 보고로는 먼저 Inácio 등[18]은 배양 비 의존적 fluorescence in situ hybridization (FISH)법을 이용하여 지중해 식물의 잎에서 *Erythrobasidium hasegawanum*을 분리하였고 *Rhodotorula nothofagi*는 코르크 스토퍼 제 조시 배출되는 오크나무 껍질로부터 처음 분리, 보고되었다[19]. 또한 Mylonakis 등[20]은 선충인 *Caenorhabditis elegans*가 *Cryptococcus kuetzingii* 등의 다양한 효모들을 영양자원

Table 2. Characteristics of six unrecorded yeasts isolated from tree leaves of Oknyeobong Peak and Yeonjasan Mountain in Korea

	<i>Plowrightia periclymeni</i> JSL514	<i>Erythrobasidium hasegawanum</i> JSL0193	<i>Rhodotorula nothofagi</i> JSL516	<i>Cryptococcus kuetzingii</i> JSL508	<i>Cryptococcus vishniacii</i> JSL509	<i>Dioszegia takashimae</i> JSL510
Morphological characteristics						
Shape	E	O	O	O	G	O
Vegetative reproduction	B	B	B	B	B	B
Size (µm)	1.1 × 0.2	1.0 × 1.4	0.8 × 1.2	1.1 × 1.3	1.3 × 1.3	1.5 × 1.1
Ascospore	+	-	-	+	+	+
Pseudomycelium	+	-	-	+	+	+
Cultural characteristics						
Growth on YPD /YM/PD media	++/++/++	+++/+++	+++/++/-	++/-/-	++/++/+	++/+++/-
Color on YPD medium	W	C	C	C	C	O
Growth on vitamin-free medium	-	-	-	-	++	++
Growth on 50% glucose-YPD medium	-	-	-	-	-	-
Growth on 5%/10%/20% NaCl-YPD medium	+/-/-	++/+/-	+/-/-	+/-/-	++/+/-	-/-/-
Growth on temp/pH range	25~30°C /pH 4~7	25~30°C /pH 6~7	25~30°C /pH 6~7	25~37°C /pH 6~7	20~30°C /pH 6~7	25~37°C /pH 4~7

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

으로 이용할 수 있음을 보고하였고, Apidianakis 등[21]은 *Drosophila melanogaster*가 *Cryptococcus neoformans*을 이용할 수 있지만 *Cryptococcus kutzingii*는 소화시키지 못하였다고 보고하였다. Booth와 Vishniac[22]은 *Cryptococcus vishniacii*가 urease를 생성하였다고 보고하였고, Madhour 등[23]은 *Dioszegia takashimae*와 근연의 효모인 *Dioszegia* sp.의 카로티노이드 생합성에 관하여 보고하였다.

적 요

각종 나뭇잎들의 효모 분포특성을 알아보기 위하여 대전광역시 서부지역에 위치한 옥너봉과 연자산의 나뭇잎들로부터 야생효모들을 분리, 동정하였고 이들로부터 국내 미기록 효모들을 선별하여 균학적 특성을 조사하였다. 옥너봉의 나뭇잎 20점으로부터 15종 22균주의 야생효모를 분리, 동정하였고 *Cryptococcus bestiolae*가 5주로 가장 많이 분리되었다. 또한 연자산 나뭇잎 20점에서는 모두 12종 24균주의 야생효모를 분리하였고 *Aureobasidium pullulans*가 8주로 가장 많았다. 옥너봉과 연자산에서 분리한 야생효모 46균주 중에서 6종 (*Cryptococcus kutzingii* JSL508, *Cryptococcus vishniacii* JSL509, *Dioszegia takashimae* JSL510, *Plowrightia periclymeni* JSL514, *Erythrobasidium hasegawianum* JSL0193, *Rhodotorula nothofagi* JSL0196)을 국내에서 보고되지 않은 미기록 효모들로 최종 선별하였다. 이들의 균학적 특성을 조사한 결과 *E. hasegawianum* JSL0196은 자낭포자와 의균사를 형성하지 않았다. *D. JSL510* 외 모든 미기록 효모들은 내염성 또는 호염성이었고, *C. JSL508*과 *D. JSL510*은 37°C에서 생육하는 고온성 효모들이었다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources, funded by the Ministry of Environment 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. Korean J Appl Microbiol Biotechnol 1997;25:448-53.
2. Jeong SC, Kim JH, Kim NM, Lee JS. Production of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Malassezia pachydermatis* G-14. Mycobiology 2005;33:142-6.
3. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. Mycobiology 2008;36:102-5.
4. 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.
5. Kim JH, Kim NM, Lee JS. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from traditional Meju. Korean J

- Food Nutr 1999;12:490-5.
6. 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.
 7. 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.
 8. Han SM, Lee JS. Microbiological characteristics and physiological functionality of unrecorded yeasts from mountains soils in Daejeon metropolitan city and Chungcheongnam-do, Korea. *Kor J Mycol* 2016;44:138-44.
 9. Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Characteristics of two unrecorded yeasts from wild flowers in Ulleungdo, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:170-3.
 10. Hyun SH, Lee JS. Microbiological characteristics and physiological functionality of new records of yeasts from wild flowers in Yokjido, Korea. *Mycobiology* 2014;42:198-202.
 11. 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.
 12. 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.
 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, 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.
 15. Hyun SH, Lee JG, Park WJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of yeasts from fruits and flowers of orchard in Sinammyeon of Yesan-gun, Chungcheongnam-do, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:21-7.
 16. 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.
 17. Min JH, Hyun SH, Kang MG, Lee HB, Kim CM, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers of Daejeon city and Chungcheongnam-do in Korea. *Kor J Mycol* 2012;40:141-4.
 18. Inácio J, Ludwig W, Spencer-Martins I, Fonseca A. Assessment of phylloplane yeasts on selected Mediterranean plants by FISH with group- and species-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Ecol* 2010;71:61-72.
 19. Villa-Carvajal M, Coque JJ, Alvarez-Rodríguez ML, Uruburu F, Belloch C. Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers. *FEMS Yeast Res* 2004;4:745-50.
 20. Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15675-80.
 21. Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J, Ausubel FM, Calderwood SB, Mylonakis E. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell* 2004;3:413-9.
 22. Booth JL, Vishniac HS. Urease testing and yeast taxonomy. *Can J Microbiol* 1987;

33:396-404.

23. Madhour A, Anke H, Mucci A, Davoli P, Weber RW. Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry* 2005;66:2617-26.