

효모 탐색을 위한 Pyrolysis Mass Spectrometry의 활용

신기선* · 신용국¹ · 권오유² · 이상한³

생명공학연구소 유전자은행, ¹조선대학교 단백질소재연구센터
²충남대학교 의과대학 해부학교실, ³생명공학연구소 첨단생물소재연구센터

Application of Pyrolysis Mass Spectrometry on Yeast Screening

Kee-Sun Shin*, Yong-Kook, Shin¹, O-Yu Kwon² and Sang-Han Lee³

Korean Collection for Type Cultures, KRIBB, Taejon 303-345, Korea

¹Research Center for Proteinous Materials and Department of Pharmacology, School of Medicine,
Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

²Department of Anatomy, School of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-131, Korea

³Center for Advanced Biomaterials, KRIBB, Taejon 303-345, Korea

Abstract

To develop the effective microbial screening method, pyrolysis mass spectrometry (PyMS) fingerprinting was evaluated as a tool that discriminate various yeast strains. The target yeast strains were isolated from industrial wastewater. Seventeen environmental isolated yeast strains were examined by pyrolysis mass spectrometry and sequencing analysis of the large subunit rRNA gene D1/D2 region. The PyMS results were compared with those of sequencing analysis. Taxonomic correlations were observed between the PyMS data and the sequencing results. It was concluded that PyMS provides a rapid, reliable and cost-reducing method for discrimination of the yeast strains.

Key words – Pyrolysis mass spectrometry, yeasts, screening

서 론

최근 생명공학의 발전과 더불어 연구의 기초가 되는 미생물 균주의 확보에 대한 중요성이 널리 인식되고 있으며, 미생물 탐색에 대한 관심과 필요성이 증대되고 있는 실정이다. 고도의 부가가치를 창출하는 유용한 미생물 대사 산물 탐색 분야는 기존의 의약품을 변형시켜 경쟁력 있는 신규 유도체로 만드는 방법과 새로운 골격의 신물질을 발굴하

여 이용하는 두 가지 방향으로 진행되어 오고 있는데, 최근 들어서는 다수의 연구자가 후자의 방법으로 선회하고 있는 실정이다.

기존 물질과 전혀 다른 골격을 가진 신물질의 발굴은 생산 미생물의 신규성이 요구되며, 신규로 미생물을 효과적으로 찾기 위해서는 희소한 분류군을 target으로 하여 중복되지 않는 다양한 균주들을 분리하여 분석할 필요가 있다 [1,2,3]. 그러므로 균주 탐색과정에서 분리된 균주들을 빠른 시간 안에 적은 비용과 노력으로, 각 서로 다른 분류군 별로 구별(differentiation)하는 것은 탐색과정을 효율적으로 수행하기 위하여 매우 중요하다.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel 042-860-4624, Fax : 042-860-4625
E-mail ksshin@mail.krribb.re.kr

Pyrolysis Mass Spectrometry (PyMS)는 whole-organism fingerprinting의 한 방법으로 다양한 세균[4,5,6], 곰팡이 [7,8]와 식물 [9]에서 속 (genus), 종 (species), 아종 (subspecies)들을 그룹화하는 화학분류학적 수단 (chemotaxonomic tool)으로 널리 이용되어져 왔다. 이와 같은 목적으로 이용되는 PyMS분석은 시료 준비의 간편성, 짧은 분석시간, 저렴한 분석비용 등 다양한 장점들을 가져 균주 탐색에 적용시 많은 시간과 비용을 절감할 수 있으리라 사료되며, Kurtzman과 Robnett [10,11] 및 Fell 등 [12]은 효모 균주를 대상으로 large subunit rDNA D1/D2 영역의 뉴클레오타이드 염기서열을 분석하여 효모 균주 동정을 위한 데이터베이스를 구축한 바 있다.

본 연구는 공단폐수로부터 효모 균주들을 분리하여 각 균주의 PyMS 결과를 분석하고, 이 결과를 28S rDNA의 부분염기서열을 이용한 균주 동정 결과와 비교, 분석함으로써 적은 비용으로 단시간에 탐색한 균주들을 동일한 분류군끼리 그룹화 할 수 있는 도구로써 PyMS 분석결과를 평가하여 효율적인 신규미생물 탐색방법으로 응용하려는 데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

균주분리

실험에 사용한 균주 분리는 다음과 같이 실시하였다. 대구 공단의 3개 지역에서 채집한 5개의 폐수 시료 각 1ml을 멸균한 생리식염수 9ml과 현탁한 후, 10⁴까지 연차적으로 희석한 다음, 각각의 현탁액 0.1ml을 YM agar 배지 (1% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 2% agar)에 도말하여 25°C에서 배양하였다. 실험에 사용한 YM agar 배지는 세균의 생육을 방지하기 위하여 1 M HCl을 첨가하여 pH를 3.8로 조정하여 사용하였다 [13]. 3일 후 배양된 균주 각각을 YM agar 배지에서 single colony isolation 방법으로 순수분리하고, 광학현미경 관찰을 통해 실험에 사용할 16개의 효모 균주들을 선별하였다.

PyMS분석

PyMS분석을 위한 시료의 준비는 Timmins 등 [7,8]이 기술한 방법으로 준비하였다. 준비한 시료의 pyrolysis mass spectrometry분석은 Horizon Instrument PyMS-200X (Hor-

izon Instruments Ltd, Heathfield, UK)를 사용하여 Timmins 등 [7,8]의 방법으로 분석하였다.

PyMS 분석결과 도출된 각 균주의 정량적인 pyrolysis mass spectra는 퍼센트값으로 표준화하고 principal component analysis [14,15]로 처리하였다. 이와 같이 얻어진 data는 NTSYS program package [16]를 이용하여 SHAN clustering program으로 그룹화하고 그 결과를 Tree display program을 이용하여 dendrogram으로 나타내었다.

Large subunit rDNA의 partial sequencing

DNA분리와 large subunit rDNA의 D1/D2 영역의 PCR 증폭은 Kurtzman과 Robnett [10]의 방법으로 수행하였다. 증폭한 단편들은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 사용하여 정제하였다. Sequencing 반응은 ABI TaqDye-Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하였으며, 생산된 DNA 단편들은 ABI 310 DNA sequencer (Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다.

실험에 이용한 효모균주의 동정은 각 균주의 large subunit rDNA의 D1/D2 영역의 서열을 The National Center for Biotechnology Information (NCBI)- GenBank에 수록되어 있는 뉴클레오타이드 염기서열 데이터베이스와 유사도를 비교하여 동정하였다[10].

또한 실험한 균주들이 나타내는 분자 진화적인 관계를 살펴보기 위하여 multiple-sequence alignment program인 clustal w [17]를 사용하여 염기 서열들을 정렬하였으며, phylip program package [18]를 이용하여 unrooted phylogenetic tree를 그려 균주들 사이에 존재하는 진화적 관계를 나타내었다.

결과 및 고찰

균주 동정

Kurtzman과 Robnett[11]은 약 500종의 효모 균주를 대상으로 large subunit rDNA D1/D2 영역의 염기배열을 비교 분석하여 같은 종 (species)내 strain의 경우 이 영역의 뉴클레오타이드 치환 (nucleotide substitutions)이 1% (약 3-4개 bp)를 넘지 않는다는 것과 이 영역의 염기배열 결정으로 대부분의 효모를 동정할 수 있다는 것을 보고하였다. 그러므로 본 보고에서 분리된 균주의 동정은 Kurtzman

등의 연구결과를 적용하여, 분리한 균주의 large subunit rDNA의 D1/D2 영역 염기배열을 결정하고 NCBI에 수록된 뉴클레오타이드의 데이터베이스와 비교하였다. 비교결과 분리균주와 염기배열의 유사도가 99%가 넘는 균주를 선별하여 이를 기준으로 동정하였으며 동정한 결과는 Table 1에 정리하였다. 공단폐수로부터 분리한 16개의 효모 균주를 동정한 결과 *Rhodotorula mucilaginosa* 5주, *Pichia guilliermondii* 2주, *Trichosporon asahii* 2주, *Dipodascus capitatus* 4주, *Candida rugosa* 2주와 미동정 균주 1주 (Y16)로 나타났다.

Y16균주는 D1/D2 영역의 염기배열 분석결과를 데이터베이스와 비교해 보았으나 99% 이상의 염기배열 유사도를 나타내는 균주를 찾지 못하였다. Y17 균주를 동정하기 위하여 현미경관찰과 형태 및 생리적 특성을 조사해 본 결과 yeast-like fungi중 하나인 *Trichosporonoides*속 [19]의 특성들과 부합되어 *Trichosporonoides*속 균주로 동정되었다.

Pyrolysis Mass Spectrometry

공단 폐수 시료로부터 분리한 16개의 효모 균주에 대한 PyMS 결과를 토대로 작성한 균주들 사이의 연관관계는

Table 1. Identification result of isolated yeast strains on the basis of D1/D2 region sequence similarity comparison

Samples	Results	Reference strains
Y1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (same)	CBS 482
Y2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2 bp)	CBS 482
Y3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (same)	CBS 8383
Y4	<i>Pichia guilliermondii</i> (same)	KCTC 7832
Y5	<i>Dipodascus capitatus</i> (same)	NRRL Y-17686
Y6	<i>Trichosporon asahii</i> (same)	CBS 2479
Y7	<i>Trichosporon asahii</i> (same)	CBS 2479
Y8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (1 bp)	CBS 482
Y9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (same)	CBS 8383
Y10	<i>Pichia guilliermondii</i> (same)	KCTC7832
Y11	<i>Dipodascus capitatus</i> (same)	NRRL Y-17686
Y12	<i>Dipodascus capitatus</i> (same)	NRRL Y-17686
Y13	<i>Candida rugosa</i> (4 bp)	NRRL Y-95
Y14	<i>Candida rugosa</i> (4 bp)	NRRL Y-95
Y15	<i>Dipodascus capitatus</i> (same)	NRRL Y-17686
Y16	Yeast-like fungi (NI)	-

The words in the brackets show number of nucleotide substitution compared with reference strains. Bp; base pair, NI; not identified.

dendrogram으로 나타내었다(Fig. 1). 분석결과 16개의 효모 균주들은 PyMS 결과의 유사도 0.7을 기준으로 3개의 그룹으로 나누어졌다.

첫 번째 그룹은 *Rhodotorula mucilaginosa*로 동정된 5균주를 포함하고 있었고, 두번째 그룹은 *Pichia guilliermondii*, *Trichosporon asahii*, *Dipodascus capitatus*, *Candida rugosa*등 10균주의 다양한 분류군을 포함하고 있었으며, 세번째 그룹은 Yeast-like fungi에 속하는 1균주로 구성되어 있었다.

PyMS 분석결과와 동정결과를 비교해 보면, 염기 배열 분석으로 같은 분류군으로 동정된 균주들이 PyMS 결과로 작성한 dendrogram에서도 밀접이 연관되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 PyMS 분석으로 *Candida* 종 및 brewing yeast들을 그룹화한 Timmins등 [7,8]의 결과와 *Carnobacterium* 균주들을 대상으로 실험한 Manchester등[20]의 결과와 동일하게 pyrolysis mass spectrum이 각 균주의 분류학적 특성을 반영할 수 있음을 나타내며, 다양한 효모 균주를 대상으로 하는 PyMS 분석이 이들을 유사한 분류군으로 그룹화 할 수 있음을 시사하였다.

계통수 분석

Large subunit rDNA D1/D2 영역의 뉴클레오타이드 염기배열 분석으로 나타난 균주들 사이의 연관관계는 Fig. 2

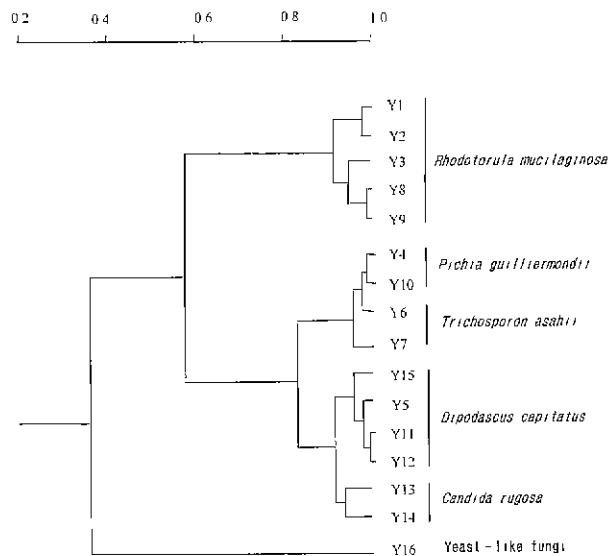


Fig. 1. Dendrogram based on PyMS data showing the relationship among the seventeen yeast strains.

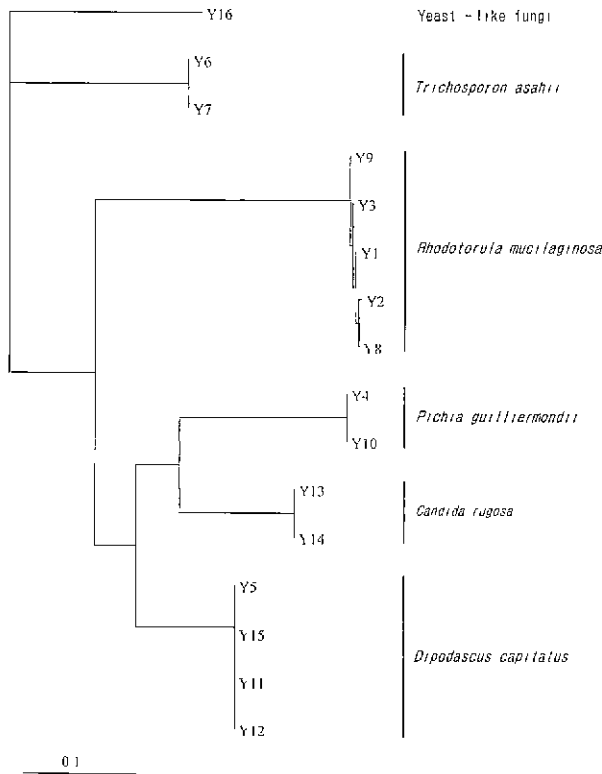


Fig. 2. Unrooted neighbour-joining tree resulting from analysis of D1/D2 regions of large subunit rDNA sequences. The scale bar indicates 0.1 nucleotide substitutions per nucleotide position.

의 계통수 (phylogenetic tree)로 나타내었다. Fig. 2에서 16개의 효모 균주는 PyMS 결과와 유사하게 3그룹으로 분리되었으나, *Trichosporon asahii*로 동정된 Y6과 Y7균주들은 yeast-like fungi인 Y17균주와 가깝게 위치하여 PyMS 결과로 나타낸 dendrogram과 차이를 보였으나, 진화적 관계를 반영하는 계통수에서 보여지는 소그룹 (subgroup) 들 내에 각 균주들의 연관관계는 PyMS분석 결과와 일치하였다. 그러므로 다양한 균주를 효과적으로 확보를 위해서는 PyMS결과를 도식화한 dendrogram에서 나타난 소그룹(subgroup)을 기준으로 실험균주를 선별할 필요가 있음을 알 수 있었다.

분석결과를 종합해 본 결과 PyMS 분석을 통한 효모균주의 분별 (differentiation)은 단시간 내에 저렴한 비용으로 분류학적으로 같은 균주를 찾아내어, 효율적인 탐색을 가능케하는 유용한 균주탐색 방법임을 알 수 있었다.

요 약

효과적인 효모 균주의 탐색방법을 개발하기 위하여, 적은 비용과 노력으로 단시간 내에 다수의 시료를 분석할 수 있는 PyMS방법을 적용하여, 다양한 탐색 균주들을 같은 분류군으로 그룹화 할 수 있는지 평가해 보았다.

이를 위하여 공단 폐수를 시료로 실험에 이용할 16개의 효모 균주들을 분리하였고, 이들의 PyMS 결과와 large subunit rDNA D1/D2 영역의 뉴클레오타이드 염기서열을 분석하였다. 분리한 효모 균주들의 동정은 염기서열결과를 NCBI에 수록된 뉴클레오타이드 데이터베이스와 비교하여 결정하였다. PyMS 분석결과 16개 효모 균주들은 3가지 그룹으로 나누어졌으며, 각 그룹 (group)내 소그룹 (subgroup)들은 동일한 분류군에 속하는 균주들로 구성되어 있었다. 또한 Large subunit rDNA D1/D2 영역의 뉴클레오타이드 염기서열로 작성한 효모 균주들 사이의 진화적 관계를 나타내는 계통수는 PyMS결과를 도식화한 dendrogram 결과와 상응하였다.

결론적으로 효율적인 균주 탐색을 위한 수단 (tool)으로 PyMS 분석 방법을 평가해 본 결과, 다양한 균주들을 단시간 내에 같은 분류군으로 그룹화할 수 있는 유용한 수단임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Shomura, T. 1993. Screening for new products of new species of *Dactylosporium* and other actinomycetes. *J. Actinomycetol.* 7, 88-98.
2. Suzuki, K. 1993. Search and discovery of soil microorganisms which produce new bioactive substances: Selective isolation of microorganisms and their fermentation products. *J. Actinomycetol.* 7, 107-109.
3. Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganism approach. *J. Actinomycetol.* 7, 100-106.
4. Colquhoun, J. A., J. Zulu, M. Goodfellow, K. Horikoshi, A. C. Ward and A. T. Bull. 2000. Rapid characterization of deep-sea actinomycetes for biotechnology screening programmes, *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 359-367.
5. Sisson, P. R., E. Nagy, Z. Koczian, E. Veszelovsky and

- R. Freeman. 1998. Inter-strain comparison by pyrolysis mass spectrometry of *Staphylococcus aureus* isolates associated with nosocomial infection. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 327-330.
6. Goodacre, R., S. J. Hiom, S. L. Cheeseman, D. Murdoch, A. J. Weightman and W. G. Wade. 1996. Identification and discrimination of oral asaccharolytic *Eubacterium* spp. by pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. *Current Microbiology* **32**, 77-84.
 7. Timmins, E. M., D. E. Quain and R. Goodacre. 1998. Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and fourier transform infrared spectroscopy. *Yeast* **14**, 885-893.
 8. Timmins, E. M., S. A. Howell, B. K. Alsberg, W. C. Noble and R. Goodacre. 1998. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and fourier transform-infrared spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 367-374.
 9. Goodacre, R., R. Pygall, D. B. Kell. 1996. Plant seed classification using pyrolysis mass spectrometry with unsupervised learning: The application of auto-associative and Kohonen artificial neural networks *Chemometrics and intelligent laboratory systems* **34**, 69-83.
 10. Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1216-1223.
 11. Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 331-371.
 12. Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti and A. Statzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *IJSEM* **50**, 1351-1371.
 13. Phaff, H. J., W. T. Starmer and C. P. Kurtzman. 1999. *Pichia lachancei* sp. nov., associated with several Hawaiian plant species. *IJSEM* **49**, 1295-1299.
 14. Causton, D. R. 1987. *A Biologist's Advanced Mathematics* Allen and Unwin.
 15. Jolliffe, I. T. 1986. *Principal Component Analysis* Springer-Verlag.
 16. Rohlf, F. J. 1993. *NTSYS-pc: Numerical taxonomic and multivariate analysis system*. Exeter Publ., New York.
 17. Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. Clustal w: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
 18. Felsenstein, J. 1993. *Phylogeny-inference package, version 3.5c*. Seattle: University of Washington.
 19. De Hoog, G. S. and M. Th. Smith. 1998. *Trichosporonoides* Haskins and Spencer. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn, pp. 873-877. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.
 20. Manchester, L. N., A. Toole and R. Goodacre. 1995. Characterization of *Carnobacterium* species by pyrolysis mass spectrometry. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 88-96.

(Received November 20, 2000; Accepted January 12, 2001)