

전라북도 선유도일대 야생화에서 분리한 국내 미기록 효모들의 특성 및 생리기능성

현세희, 한상민, 이종수*

배재대학교 바이오·의생명공학과

Received: September 12, 2014 / Revised: November 20, 2014 / Accepted: November 25, 2014

Characteristics and Physiological Functionalities of Unrecorded Yeasts from Wild Flowers of Seonyudo in Jeollabuk-do, Korea

Se-Hee Hyun, Sang-Min Han, and Jong-Soo Lee*

Department of Biomedical Science and Biochemistry Paichai University, Daejeon 302-735, Republic of Korea

Six kinds of newly recorded yeasts such as *Rhodospodium diobovatum* SY4-2, *Cryptococcus bestiolae* SY7-1, *Kazachstania unisporea* SY14-1, *Kazachstania servazzii* SY14-3, *Pichia holstii* SY20-2 and *Cryptococcus tephrensii* SY26-1 were screened from sixty one yeasts derived from wild flowers found in Seonyudo, Gogunsanyeoldo, Jeollabuk-do, Korea. All of them grew in 50% glucose-containing yeast extract-peptone-dextrose (YPD) broth and *Pichia holstii* SY20-2 was also halophile, growing in 20% NaCl-containing YPD broth. All of them, except *Cryptococcus tephrensii* SY26-1, were assimilated to glucose. Cell-free extract from *Kazachstania servazzii* SY14-3 showed the highest 98.6% of α -glucosidase inhibitory activity and maximal production of the α -glucosidase inhibitor was obtained with 24h incubation at 30°C. The antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the unrecorded yeasts were showed 58.6-80.4% in their supernatants.

Keywords: Physiological functionality, Seonyudo, Unrecorded yeasts, Wild flower

효모는 일부 병원성 균을 제외하고 대부분이 전통 발효 식품의 제조에 오래 전부터 사용되어오고 있는 GRAS 균이며 최근 산업용 효소와 다양한 생리기능성 물질생산 및 생명공학분야의 중요한 숙주로 이용되고 있는 유용 미생물이다 [12, 13, 16-20, 23].

지금까지 대부분의 효모들은 전통 발효 식품이나 누룩, 메주 등과 같은 이들의 발효제나 주, 부원료등에서 분리되었고 일부는 꿀과 같이 당을 함유한 식재료등에서 분리, 동정되었다 [15, 19, 20, 23]. 최근 필자 등은 전국 각지의 자연환경에서 서식하고 있는 효모들의 종 다양성을 조사하고 이들로부터 산업적 유용 균주를 선발하고자 도시와 해안 [4, 10, 22, 24], 산 [25] 과 섬 [3, 8, 10] 및 과수원 [5] 과 수목원 [6] 등지의 야생화들로부터 효모들을 분리, 보고하였고, 이들 중 국내 처음 보고되는 미기록 효모 균주들을 선발하여 이들의 특성을 조

사하여 보고하였다 [4, 7, 9]. 또한 전라북도 고군산열도의 선유도 일대에서 채집한 야생화들로부터 61종의 효모들을 분리하여 이들의 26S rDNA의 D1/D2 부위의 염기서열을 확인한 후 NCBI의 BLAST를 사용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 효모들과의 분자생물학적 상동성을 확인하여 동정, 보고하였다 [4, 7, 9].

본 연구에서는 이들 선유도 야생화들에서 분리한 61종의 효모들 중 아직까지 국내에 보고되지 않은 6종의 미기록 효모들을 선별하여 SM (potassium acetate-yeast extract-dextrose) 배지에서 배양한 세포의 염색과 GPY (glucose-peptone-yeast extract) 고체배지에서 배양한 세포의 염색법 등으로 이들의 포자와 의균사 형성 유무등의 형태적 특징과 배양학적 특성을 조사하였다 [7, 9].

또한 미기록 효모들을 30°C에서 24시간 YPD 배지에서 배양한 후 원심분리 (8000 × g) 하여 얻은 배양상등액과 세포를 초음파균체파쇄기로 파쇄하여 얻은 무세포추출물을 각각 동결건조 시킨 후 주요 생리기능성으로 항당뇨성 α -glucosidase 저해활성과 항고혈압성 Angiotensin I-converting enzyme

*Corresponding author

Tel: +82-42-520-5388, Fax: +82-70-4362-6305

E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

(ACE) 저해활성, superoxide dismutase 유사활성, 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성, 미백성 tyrosinase 저해활성과 항산화 활성 등을 전보[3, 7, 9, 13-15]와 같이 측정하였다.

2014년 전라북도 고군산열도의 선유도 일대 야생화들에서

분리, 동정한 61종의 효모[3]들에 대하여 다양한 문헌 등을 토대로 국내 기록여부를 조사한 결과 무포자 효모인 *Cryptococcus bestiolae* SY7-1, *Cryptococcus tephrensis* SY26-1과 유포자 효모인 *Kazachstania unispora* SY14-1,

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the newly reporting yeasts from wild flowers of Seonyudo in Jeollabuk-do, Korea.

	<i>Cryptococcus bestiolae</i> SY7-1	<i>Cryptococcus tephrensis</i> SY26-1	<i>Kazachstania unispora</i> SY14-1	<i>Kazachstania servazzii</i> SY14-3	<i>Pichia holstii</i> SY20-2	<i>Rhodospodium diobovatum</i> SY4-2
Morphological characteristics						
Shape	G*	O	G	G	G	O
Vegetalle reproduction	B	B	B	B	B	B
Size (µm)	1.6 × 1.6	1.2 × 1.8	1.5 × 1.5	1.4 × 1.4	0.9 × 0.9	1.1 × 1.8
Ascospore	-	-	+	+	+	+
Pseudomycelium	-	+	-	-	-	-
Cultural characteristics						
Growth on YM/YPD medium	+++ / +++	+/+++	+++ / ++	++ / +++	+++ / +++	++ / +++
PD medium	+	+	+	-	++	-
Vitamin-free medium	++	+	+	+	+++	++
50% Glucose-YPD medium	+	+	+	+	+	+
5%/20% NaCl-YPD medium	-/-	-/-	-/-	-/-	++/+	+/-
Carbon source assimilation						
D-glucose	+	-	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	-	+
L-arabinose	+	+	-	+	+	-
D-xylose	+	+	-	+	-	+
D-cellobiose	+	+	-	-	+	-
D-lactose	+	+	-	-	-	-
D-saccharose	+	+	-	+	-	+
D-trehalose	+	+	-	+	+	-
D-maltose	+	+	-	+	-	+
N-acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	+	+	-	+	-	+
D-raffinose	+	-	-	+	-	+
Methyl-α-D-glucopyranoside	-	+	-	+	-	-
Calcium 2-keto-D-gluconate	+	-	-	+	-	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+
Adonitol	-	+	-	-	+	+
Inositol	+	+	-	-	-	-
D-sorbitol	+	-	-	-	+	+
Xylitol	-	-	-	-	+	-
Growth range in temp./pH	20-30°C /pH 4-7	20-25°C /pH 6-7	20-30°C /pH 7-8	20-30°C /pH 7-8	20-37°C /pH 6-7	20-30°C /pH 4-10

*O, Oval; G, Globose; B, Budding.

Kazachstania servazzii SY14-3, *Pichia holstii* SY20-2, *Rhodospiridium diobovatum* SY4-2가 국내 미기록종으로 확인되었다.

위와 같이 선별한 국내 미기록 효모 균주들의 형태적 특징을 조사한 결과 모양은 주로 구형과 난형으로 출아법으로 영양증식을 하였으며 *R. diobovatum* SY4-2, *P. holstii* SY20-2는 포자를 형성하였고 *C. tephrensensis* SY26-1만이 이 균사를 형성하였다(Table 1).

선별된 미기록 균주들 모두 yeast extract – malt extract (YM)와 yeast extract peptone dextrose (YPD) 배지와 비타민이 함유되어 있지 않은 배지 등에서 생육하였고, 특히 50% 포도당을 함유한 YPD 배지에서 잘 생육하는 내당성 효모들이었다. 또한, *P. holstii* SY20-2는 20% NaCl을 함유한 YPD 배지에서도 생육하는 극도 호염성 효모이었다. *Cryptococcus tephrensensis* SY26-1만이 포도당을 자화시키지 못하였으나 *Cryptococcus bestiolae* SY7-1과 함께 유당을 자화시켰다. 또한 *Kazachstania unispora* SY14-1은 탄소원에 대한 자화성이 단순하여 단지 포도당과 galactose와 glycerol만을 자화시켰다.

이들 국내 미기록 효모들에 관한 국외 연구로 *Cryptococcus bestiolae*는 Thanh 등[29]이 여주 열매 즙 벌레인 *Conopomorpha sinensis* Bradley로부터 처음 분리하여 몇 가지 특징을 보고하였고, Vishniac [30]는 Iceland에서 *Cryptococcus tephrensensis*를 분리, 보고하였다. 또한, 최근까지 *Saccharomyces unisporus*

로 알려진 *Kazachstania unispora*는 Bessmeltseva 등[1]에 의하여 Sourdough에서 우점균으로 처음 분리, 보고되었고, Limtong 등[21]은 태국의 숲 속 토양에서 처음으로 *Kazachstania unispora*와 *Kazachstania servazzii* 등을 분리하여, 균학적 특징을 보고하였다. *Pichia(Hansenula) holstii*에 관해서는 이당류 합성능[2]과 폐놀 제거용 폐수처리제의 산업적 응용성이 보고되었고[28], Newell 등[26]과 Seshadri 등[27]은 *Rhodospiridium diobovatum*의 일부 생리적 특성에 대하여 보고하였다.

그러나 본 연구에서와 같이 자세한 균학적 특성과 이들의 주요 생리기능성등은 보고되지 않았다. 따라서 이들 각각의 배양상등액과 무세포추출물들의 항당뇨성 α -glucosidase 저해 활성과 항고혈압성 ACE 저해활성, SOD 유사활성, 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성, 미백성 tyrosinase 저해활성 및 항산화활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

항고혈압성 ACE 저해활성은 모든 미기록 효모들의 배양상등액에서 58.6-80.4%로 비교적 높은 활성을 보였고 항당뇨성 α -glucosidase 저해 활성은 무세포추출물에서 미기록 효모 모두 85% 이상의 높은 활성을 보였다(Table 2). 특히 *Kazachstania servazzii* SY14-3은 98.6%로 가장 높은 α -glucosidase 저해활성을 보였으며 이 결과는 필자등이 보고한 *Pichia burtonii* Y257-7 효모의 90.9% [14] 보다도 높은 활성이었다. 따라서, *Kazachstania servazzii* SY14-3를 이용한 α -glucosidase 저해물질 생산 최적조건을 검토한 결과

Table 2. Physiological functionalities of the supernatants and cell-free extracts from the newly reporting yeasts isolated from Seonyudo, Korea.

	α -Glucosidase inhibitory activity (%)		ACE* inhibitory activity (%)		Antioxidant activity (%)		SOD-like activity (%)		XOD inhibitory activity (%)		Tyrosinase inhibitory activity (%)	
	Sup.	Cell-free ext.	Sup.	Cell-free ext.	Sup.	Cell-free ext.	Sup.	Cell-free ext.	Sup.	Cell-free ext.	Sup.	Cell-free ext.
<i>Cryptococcus bestiolae</i> SY7-1	35.7 (± 0.9)	89.4 (± 0.8)	58.6 (± 0.9)	19.3 (± 0.8)	15.5 (± 0.5)	n.d	15.0 (± 0.1)	11.9 (± 0.2)	5.4 (± 0.9)	n.d	23.7 (± 0.2)	11.1 (± 0.2)
<i>Cryptococcus tephrensensis</i> SY26-1	49.4 (± 1.0)	95.0 (± 0.9)	66.4 (± 0.8)	27.3 (± 0.9)	9.5 (± 0.7)	n.d	20.0 (± 0.1)	14.1 (± 0.5)	n.d	9.6 (± 0.4)	24.7 (± 0.2)	5.8 (± 0.1)
<i>Kazachstania unispora</i> SY14-1	n.d	91.9 (± 1.0)	78.2 (± 0.7)	21.8 (± 0.9)	14.3 (± 0.8)	n.d	29.1 (± 0.6)	33.7 (± 0.1)	n.d	n.d	27.4 (± 0.7)	19.2 (± 0.6)
<i>Kazachstania servazzii</i> SY14-3	n.d	98.6 (± 0.2)	77.0 (± 0.8)	42.8 (± 0.6)	12.2 (± 0.4)	n.d	25.3 (± 0.2)	11.7 (± 0.2)	13.6 (± 1.0)	n.d	28.2 (± 0.1)	9.7 (± 0.2)
<i>Pichia holstii</i> SY20-2	n.d	92.3 (± 1.0)	80.4 (± 1.0)	16.9 (± 0.1)	7.9 (± 0.5)	n.d	20.5 (± 0.1)	15.4 (± 0.1)	11.6 (± 1.0)	19.8 (± 1.0)	27.7 (± 0.1)	31.1 (± 0.4)
<i>Rhodospiridium diobovatum</i> SY4-2	52.9 (± 0.2)	86.8 (± 0.9)	64.4 (± 0.9)	14.9 (± 0.6)	n.d	n.d	20.7 (± 0.6)	22.7 (± 0.9)	8.8 (± 0.8)	18.7 (± 1.1)	22.0 (± 0.1)	13.0 (± 0.9)

*ACE, angiotensin I-converting enzyme; SOD, superoxide dismutase; XOD, xanthine oxidase
 Sup, Supernatant; Cell-free ext, Cell-free extract
 n.d, not detected or <5%

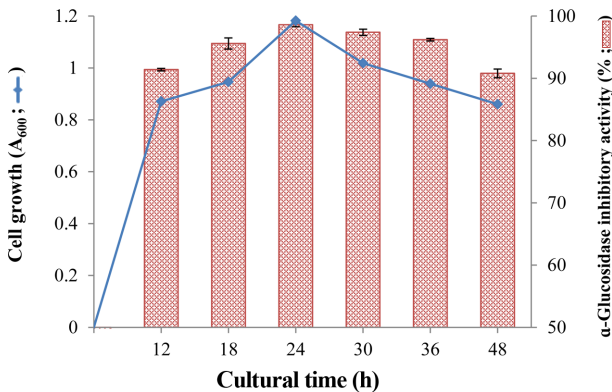


Fig. 1. Effect of cultural time on the growth and α -glucosidase inhibitory activity of *Kazachstania servazzii* SY14-3. Growth and α -glucosidase inhibitory activities of *Kazachstania servazzii* SY14-3 were determined after incubated in YPD medium at 30°C for each time.

Fig. 1과 같이 *Kazachstania servazzii* SY14-3를 YPD배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 얻은 무세포추출물이 98.6%의 높은 저해활성을 보였다.

한편, 항산화활성은 모든 미기록 효모 균주들의 무세포추출물에서 없었고 배양상등액에서도 없거나 15% 이하로 매우 낮았다. 또한, SOD 유사활성, 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성과 미백관련 tyrosinase 저해활성도 배양상등액과 무세포추출물 모두에서 활성이 없거나 30% 미만의 낮은 활성을 보였다(Table 2).

요 약

본 연구에서는 아직까지 우리나라 미생물관련 학술지에 보고되어 있지 않은 *Rhodosporidium diobovatum* SY4-2, *Cryptococcus bestiolae* SY7-1, *Kazachstania unispora* SY14-1, *Kazachstania servazzii* SY14-3, *Pichia holstii* SY20-2와 *Cryptococcus tephrensensis* SY26-1 등 6종의 새로운 국내 미기록 효모들을 전라북도 고군산열도의 선유도 일대 야생화들에서 분리, 동정된 61균주에서 선별하였다. 이들 균주들 모두 구형과 난형으로 50% 포도당을 함유한 YPD 배지에서 잘 생육하였고, *Pichia holstii* SY20-2는 20% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 극도 호염성 효모이었다. *Cryptococcus tephrensensis* SY26-1은 포도당을 자하시키지 못하였으나 *Cryptococcus bestiolae* SY7-1과 함께 유당을 자화시켰다. 6종의 미기록 효모 균주들의 생리기능성을 조사한 결과 이들 균주들의 무세포추출물들의 해당노성 α -glucosidase 저해활성이 86.8-98.6%로 매우 높았고, 특히 *Kazachstania servazzii* SY14-3의 무세포추출물이 98.6%로 가장 높았다. 또한, 미기록 효모 균주들의 배양상등액의 항

고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해활성도 58.6-80.4%로 비교적 높았다.

Acknowledgments

This study was funded by the project on survey and excavation of Korean indigenous species of NIBR under the Ministry of Environment, Republic of Korea.

References

- Bessmeltseva M, Viard E, Simm J, Paalme T, Sarand I. 2014. Evolution of bacterial consortia in spontaneously started rye sourdoughs during two months of daily propagation. *PLoS One*. **9**: e95449.
- Fairweather JK, Karoli T, Ferro V. 2004. The synthesis of phosphorylated disaccharide components of the extracellular phosphomannan of *Pichia (Hansenula) holstii* NRRL Y-2448. *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 6063-6075.
- Hyun SH, Han SM, Lee JS. 2014. Isolation and physiological functionality of yeasts from wild flowers in Seonyudo of Gogunsanyeoldo, Jeollabuk-do, Korea. *Korean J. Mycol.* **42**: 201-206.
- Hyun SH, Lee HB, Kim CM, Lee JS. 2013. New records of yeasts from wild flowers in coast near areas and inland areas, Korea. *Korean J. Mycol.* **41**: 74-80.
- Hyun SH, Lee JG, Park WJ, Lee JS. 2014. Isolation and diversity of yeasts from fruits and flowers of orchard in Sinammyeon of Yesan-gun, Chungcheongnam-do, Korea. *Korean J. Mycol.* **42**: 21-27.
- Hyun SH, Min JH, Kim SA, Lee JS, Kim HK. 2014. Yeasts associated with fruits and blossoms collected from Hanbat arboretum, Daejeon, Korea. *Korean J. Mycol.* **42**: 178-182.
- Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. 2014. Characteristics of two unrecorded yeasts from wild flowers in Ulleungdo, Korea. *Korean J. Mycol.* **42**: 170-173.
- Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. 2014. Isolation and diversity of yeasts from wild flowers in Ulleungdo and Yokjido, Korea. *Korean J. Mycol.* **42**: 28-33.
- Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. 2014. Microbiological characteristics and physiological functionality of new records of yeasts from wild flowers in Yokjido, Korea. *Mycol.* **42**: 198-202.
- Hyun SH, Mun HY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. 2013. 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.* **41**: 383-390.
- Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. 2012. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean J. Mycol.* **40**: 60-64.
- Kang NY, Park JN, Chin JE, Lee HB, Im SY, Bai S. 2003. Construction of an amylolytic industrial strain of *Saccharomyces cer-*

- evisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1847-1851.
13. Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. 2004. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1318-1323.
 14. Kim YH, Shin JW, Lee JS. 2014. Production and anti-hyperglycemic effects of α -glucosidase inhibitor from yeast, *Pichia burtonii* Y257-7. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 219-224.
 15. Kwon SC, Jeon TW, Park JS, Kwak JS, Kim TY. 2012. Inhibitory effect on tyrosinase, ACE and xanthine oxidase, and nitrite scavenging activities of Jubak (Alcohol filter cake) extracts. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 1191-1196.
 16. Lee DH, Lee DH, Lee JS. 2007. Characterization of a new antimentia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Tech.* **42**: 83-88.
 17. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. 2008. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiol.* **36**: 102-105.
 18. Lee JS, Hyun KW, Jeong SC, Kim JH, Choi YJ, Miguez CB. 2004. Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and physiological activities. *Can. J. Microbiol.* **50**: 489-492.
 19. Lee JS, Yi SH, Kim JH, Yoo JY. 1999. Isolation of wild killer yeast from traditional meju and production of killer toxin. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**: 434-439.
 20. Lee JS, Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. 1997. Isolation identification and cultural conditions of yeasts from traditional meju. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 435-441.
 21. Limtong S, Yongmanitchai W, Tun MM, Kawasaki H, Seki T. 2007. *Kazachstania siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 419-422.
 22. Min JH, Hyun SH, Kang MG, Lee HB, Kim CM, Kim HK, Lee JS. 2012. Isolation and identification of yeasts from wild flowers of Daejeon city and Chungcheongnam-do in Korea. *Korean J. Mycol.* **40**: 141-144.
 23. Min JH, Kim YH, Kim JH, Choi SY, Lee JS, Kim HK. 2012. Comparison of microbial diversity of Korean commercial Makgeolli showing high β -glucan content and high antihypertensive activity, respectively. *Mycobiol.* **40**: 138-141.
 24. Min JH, Lee HB, Lee JS, Kim HK. 2013. Identification of yeasts isolated from wild flowers collected in coast areas of Korea based on the 26S rDNA sequences. *Korean J. Mycol.* **41**: 185-191.
 25. Min JH, Ryu JJ, Kim HK, Lee JS. 2013. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Gyejoksan, Oseosan and Beakamsan of Korea. *Korean J. Mycol.* **41**: 47-51.
 26. Newell SY, Hunter IL. 1970. *Rhodosporidium diobovatum* sp. n., the perfect form of an asporogenous yeast (*Rhodotorula* sp.). *J. Bacteriol.* **104**: 503-508.
 27. Seshadri S, Saranya K, Kowshik M. 2011. Green synthesis of lead sulfide nanoparticles by the lead resistant marine yeast, *Rhodosporidium diobovatum*. *Biotechnol. Prog.* **27**: 1464-1469.
 28. Sinigaglia M, Di Benedetto N, Bevilacqua A, Corbo MR, Capece A, Romano P. 2010. Yeasts isolated from olive mill wastewaters from southern Italy: technological characterization and potential use for phenol removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**: 2345-2354.
 29. Thanh VN, Hai DA, Lachance MA. 2006. *Cryptococcus bestiolae* and *Cryptococcus dejecticola*, two new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha sinensis* Bradley. *FEMS. Yeast Res.* **6**: 298-304.
 30. Vishniac HS. 2002. *Cryptococcus tephrensensis*, sp. nov., and *Cryptococcus heimaeyensis*, sp. nov.; new anamorphic basidiomycetous yeast species from Iceland. *Can. J. Microbiol.* **48**: 463-467.