

Short Communication

Open Access

## 야생 참나리(*Lilium lancifolium* Thunb.)로부터 분리한 효모의 분자계통학적 분석

김종식<sup>1\*</sup>, 김대신<sup>2</sup>

<sup>1</sup>경북해양바이오산업연구원, <sup>2</sup>세계유산·한라산연구원

### Phylogeny of the Yeast Species Isolated from Wild Tiger Lily (*Lilium lancifolium* Thunb.)

Jong-Shik Kim<sup>1\*</sup> and Dae-Shin Kim<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Gyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry, Ulsan, 767-813, Korea, <sup>2</sup>World Heritage and Mt. Hallasan Research Institute, Jeju, 690-700, Korea)

Received: 10 January 2015 / Revised: 11 February 2015 / Accepted: 3 June 2015

Copyright © 2015 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

#### Abstract

**BACKGROUND:** Yeast isolates associated with the leaves, stems, and flowers of the tiger lily needed to be identified using isolation methods that have previously been used effectively in yeast biotechnology. A culture-based approach was necessary for the isolation of many yeast strains associated with tiger lily.

**METHODS AND RESULTS:** In this study, the homogenized leaves, stems, and flowers of tiger lily were spreaded onto GPY medium containing chloramphenicol, streptomycin, Triton X-100, and L-sorbose. A total of 82 yeast strains from the leaves, 94 and 97 yeast strains from the stems and flowers were isolated, respectively. Yeast isolates were identified by phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer region sequencing. The yeast species isolated from the leaves comprised of 31 isolates of the genus *Pseudozyma*, 28 of *Aureobasidium pullulans*, and 11 of the genus *Cryptococcus*. Those isolated from the stems comprised of 40 of *A. pullulans* and 11 of *Cryptococcus*, and 95 of *A. pullulans* While, 1 isolate each of the genera

*Rhodotorula* and *Metschnikowia* were isolated from the flowers.

**CONCLUSION:** We identified site-specific yeast communities associated with tiger lily. These yeast isolates may have high potential for application in the field of biotechnology.

**Key words:** *Aureobasidium pullulans*, ITS gene, Tiger lily, Yeast

#### 서론

참나리는 백합과(*Liliaceae*), 백합속(*Lilium*)에 속하는 숙근성 다년초로서 남한지역 전역에 분포하며, 일본, 중국에도 분포한다(Lee, 1996; Lee, 2003). 전 세계적으로 약 100 여 종이 알려져 있고, 꽃은 7-8월에 피며, 길은 황적색 바탕에 흑자색 점이 있고, 화피편은 뒤로 말리며 1개의 암술이 길게 돌출되어 꽃 밖으로 나오며, 화분은 흑갈색이다. 인경은 기관지염, 급성폐렴 등 민간의약과 식용으로도 널리 사용되어 왔다(Jeknić *et al.*, 2012).

효모는 일반적으로 토양, 수생환경, 식물잎, 곤충, 극한 환경 등의 다양한 환경에서 서식하는 것으로 알려져 있으며(Botha, 2011; Fonseca and Inacio, 2006; Raspor and Zupan, 2006), 약품, 주류, 효소, 음료, 제빵, 농업 및 산업에 중요한 영향을 미치는 등, 인류의 식생활에 많은 이익을 주고

\*Corresponding author: Jong-Shik Kim  
Phone: +82-54-780-3451; Fax: +82-54-780-3469;  
E-mail: soilmicrobiome@gmail.com

있다(Deak, 2009; Tamang and Fleet, 2009). 이와 같은 효모들을 대량으로 분리하기 위해서 선행연구에서 세균과 곰팡이의 배양을 억제하고 효모만을 분리하는 기술을 알로에 잎에 정착하는 효모를 분석하여 확인하였다(Choi et al., 2013).

참나리로부터 효모의 분석은 거의 연구되지 않았으며 그 결과가 유용할 것이며, 효모 바이오테크놀로지의 기초자료로서 활용될 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 참나리 잎과 줄기, 꽃으로부터 기존에 확립된 효모 분석법을 이용하여 효모 균집 분석을 수행하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 참나리로부터 효모 분리

본 연구에 사용된 참나리는 2011년 7월에 울진(N 36° 59' 54.49" and E 129° 24' 17.28")에서 채취하였다. 채취된 참나리는 크린벤치내에서 멸균된 가위와 핀셋을 사용하여 각각 잎과 꽃, 줄기 세 부분으로 나누어 효모 분리를 위한 시료로 준비하였다. 각 부위별 시료는 0.1 M potassium phosphate buffer를 사용하여 3회 washing 하여 멸균된 용기에 실험 전까지 보관하였다. 효모 분리용 배지는 GPY agar (4% glucose, 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 1.5% agar) 를 이용하여 배양하였다. 특히 효모의 생육에 영향을 미치지 않고 세균의 억제를 위해서 Choi et al. (2013)가 제시한 바와 같이, 각각의 배지에 chloramphenicol과 streptomycin을 100 mg/L씩을, 그리고 곰팡이 생육을 억제하기 위해서 Triton X-100 0.1%와 L-sorbose 0.4%를 첨가하였다.

먼저 GPY 고체배지를 멸균하여, 245×245×25 mm 크기의 사각 플레이트(Nunc Bio-Assay Dish, Thermo Scientific, Roskilde, Denmark)에 분주하여 고체배지를 준비하였다. 각 부위별 시료를 파쇄하기에 알맞은 크기로 잘게 절제한 다음 멸균된 용기에 넣고 최종 볼륨이 10 mL이 되도록 10 mM potassium phosphate buffer를 첨가하여 준 후 멸균된 homogenizer (T10 basis, IKA, Germany)를 이용하여 파쇄하였다. 각 부위별 파쇄된 참나리 원액 1 mL를 미리 준비한 배지에 도말한 후 25°C에서 2~5일간 배양하여 효모를 분리하였다.

### ITS (internal transcribed spacer) 영역의 염기서열 분석 및 분자계통학적 분석

염기서열은 Choi et al. (2013)과 같은 방법으로 수행하였는데, 간단히 설명하면, 배양된 효모 콜로니수가 약 50~100 콜로니의 플레이트로부터 전체의 효모를 분리하였고 배양된 각각의 플레이트에서 육안으로 효모만 선별하여 단일균주를 얻기 위해 3차까지 순수분리를 실시하였다. 염기서열은 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에서 분석을 수행하였는데, 단일 균주들은 Bio-Rad사의 InstaGene (Matrix Hercules, CA, USA)로 Genomic DNA를 추출하였으며, EF-*Taq* DNA Polymerase (Solgent, Daejeon, Korea)로 PCR하여, 시퀀싱은 PRISM

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 써서 ABI PRISM 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 분석하였다. ITS영역의 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer (White et al., 1990)를 사용한 염기서열 분석 결과를 NCBI로부터 reference 균주의 염기서열을 검색하였으며, Clustal W 프로그램을 이용하여 alignment하였다. 계통도는 MEGA version 5.2 (Tamura et al., 2011)의 neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)를 이용하여 완성하였으며, 균주의 염기서열 정보를 DDBJ/GenBank에 등록하여 accession numbers (꽃: AB998270-AB998366, 잎: AB998367-AB998448, 줄기: AB998449-AB998542)를 부여받았다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 유용 효모의 바이오테크놀로지 응용을 위하여 다수의 야생효모를 분리하였다. 이를 위해서 참나리에 서식하는 효모 균주를 분리하고 계통분류학적인 분석을 실시하였다. 그 결과, 참나리 잎에서는 82 균주, 줄기에서 94 균주, 꽃에서는 97 균주를 각각 분리하였다. ITS 유전자의 염기서열 분석을 통한 계통학적 분석 결과, 참나리 잎에서는 82 균주가 *Aureobasidium pullulans* (28 균주), *Pseudozyma* (31 균주), *Rhodospiridium* (2 균주), *Sporobolomyces* (1 균주), *Candida* (6 균주), *Bulleromyces* (2 균주), *Cryptococcus* (11 균주)로 구성됨이 확인되었다 (Fig. 1). 줄기에서는 총 94 균주를 분리하였는데, 각각 *A. pullulans* (40 균주), *Pseudozyma* (5 균주), *Rhodospiridium* (5 균주), *Sporobolomyces* (3 균주), *Rhodotorula* (1 균주), *Cryptococcus* (23 균주), *Candida* (11 균주), *Bulleromyces* (4 균주), *Metshnikowia* (2 균주)로 분포되었다 (Fig. 2). 또한 꽃에서는 97 균주를 분리하였는데, *A. pullulans* (95 균주), *Metshnikowia* (1 균주), *Rhodotorula* (1 균주)로 분포됨이 확인되었다(Fig. 3). 흑효모(Black yeast)인 *A. pullulans*는 분석한 참나리의 잎, 줄기, 꽃 모든 부위에서 정착하고 있음이 본 연구에서 밝혀졌다. 특히 꽃에서는 97 균주 중 95 균주가 *A. pullulans*라는 결과를 얻었다. *A. pullulans* 효모 중의 유용성에 대해서는 pullulan (Singh et al., 2008), (poly) malic acid (Manitchotpitit et al., 2012), lipase (Leathers et al., 2013), laccase (Rich et al., 2011), biocontrol (Mari et al., 2012), siderophores (Ma et al., 2012), biosurfactants (Kim et al., 2015)를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 특히 참나리의 꽃으로부터 분리한 *A. pullulans*가 생물계면활성제를 생산한다는 것이 처음으로 밝혀졌으며, 새로운 당지질계 화합물인 glycerol-liamocin이 그 중의 하나임이 규명되었다 (Kim et al., 2015). 이와 같이 *A. pullulans*의 유용성이 밝혀지면서 그 활용이 기대되며, 더 많은 연구가 요구되는데, 참나리 꽃이 갖고 있는 독특한 성질과도 관련이 있을

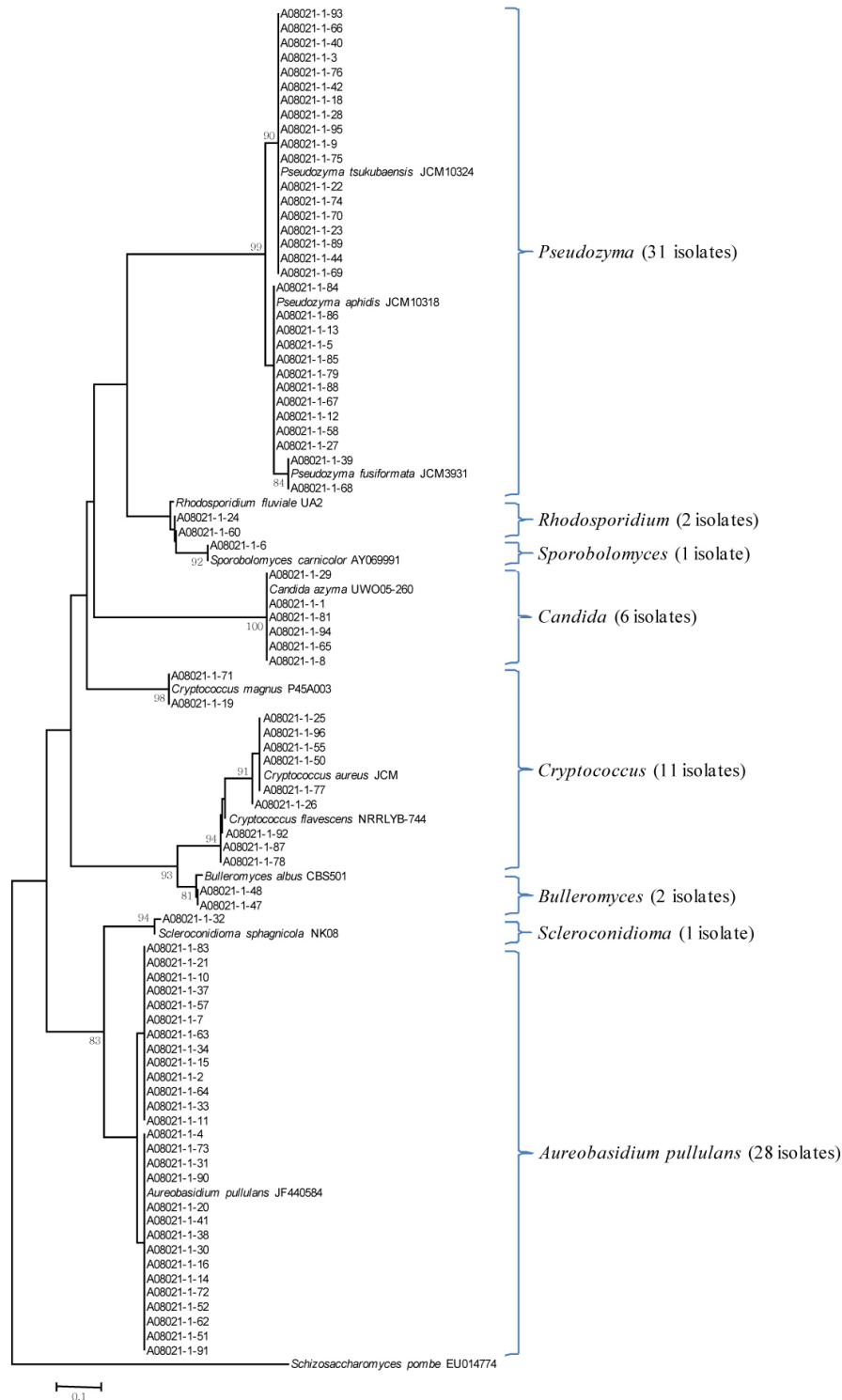


Fig. 1. A phylogenetic tree of yeast isolates based on ITS gene using sequences obtained from cultivated representative isolates from the leaves of tiger lily. Strains from this study are in bold font. The numerals represent the confidence levels from 1000 replicate bootstrap samplings.

것으로 유추된다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 참나리 꽃에 정착하는 효모의 군집이 극히 단순한데, 이는 본 연구에서 처음으로 밝히는 사실이다. 특히 잎에서는 8 종류의 효모가 그리고 줄기에서는 9 종류의 효모가, 꽃에서는 3 종류의 효모가 정착하고 있어 효모 군

집 구조 분석에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 요구된다. 특히 유용 알로에인 *Aloe vera*와 *A. saponaria*의 잎으로부터 세균과 곰팡이를 억제하고 효모만을 분리하는 스크리닝 방법으로 *A. vera*에서는 *Meyerozyma*가 우점하였으며, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*가 검출되었으며, *A. saponaria*에서는



Fig. 2. A phylogenetic tree (1,000 bootstrap replicates) of ITS sequences of yeast isolates from the stems of tiger lily.

*Rhodosporidium*이 우점하였으며, *Sporobolomyces*가 검출되었다(Choi *et al.*, 2013). 또한 참나리에서는 *Pseudozyma*와 *A. pullulans*, *Cryptococcus*, *Candida* 등이 우점하였는데, 이는 식물에 따른 효모의 정착 패턴이 다를 가능성을 시사한다. 효모의 식물 표면에서의 정착에 관여하는 인자에 대해서는 연구가 더 진행되어야 하지만, 토양형, 식물의 종류 및 생육,

기후, 수분, 바람, 햇빛 등 많은 요인에 의한 것으로 추론된다(Fonseca and Inacio, 2006; Maksimova *et al.*, 2009). 이들에 대한 보다 많은 정보가 축적되었을 때 참나리 또는 대상 식물 고유의 기능과 정착하고 있는 효모 기능의 상호관계의 규명 또는 그 기능의 바이오테크놀로지에서의 활용이 가능할 것이다.

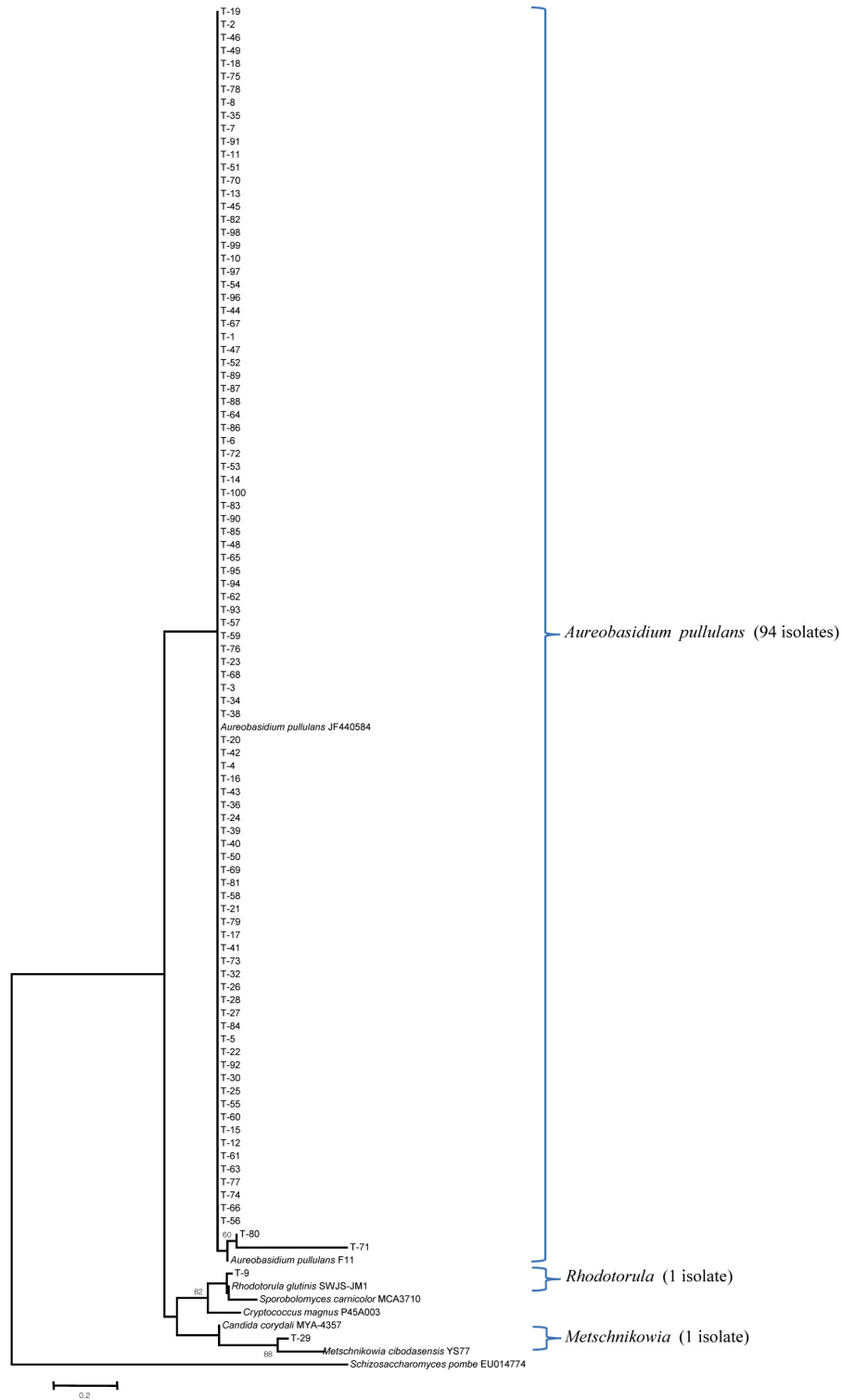


Fig. 3. A phylogenetic tree of the yeast isolates from the flowers of tiger lily and related yeast. Bootstrap values < 75% are not shown.

**요 약**

효모의 유용 기능을 탐색하기 위해서 참나리에 정착하는 효모 군집을 분석하였다. 본 연구에서는 잎에서 총 82 균주, 줄기에서 총 94 균주, 꽃에서는 총 97 균주를 분리하

였다. 분리된 균주를 ITS 1과 4 primer를 사용하여 ITS 영역 염기서열의 계통분석을 실시한 결과, 참나리 잎에서는 *Pseudozyma*가 31 균주, *Aureobasidium pullulans*가 28 균주, *Cryptococcus*가 11 균주, 줄기에서는 *A. pullulans*가 40 균주, *Cryptococcus*가 23균주, *Candida* 11 균주, 꽃

에서는 *A. pullulans*가 95 균주, *Rhodotorula* 1 균주, *Metschnikowia* 1 균주가 분포하였다. 특히, 참나리 잎과 줄기, 꽃 모든 시료에서 *A. pullulans*가 우점하였으며, 꽃에서는 97 균주 중에서 95 균주의 *A. pullulans*가 검출되어 한 종이 절대적으로 우점함을 알 수가 있었다. 참나리 잎에서는 82 균주 중에서 *Pseudozyma*가 31 균주로 가장 우점함을 보였으며, 참나리 줄기에서는 94 분리 균주 중에서 *Cryptococcus*가 23 균주로 두번째로 우점함을 보였다. 참나리의 부위별로 분포양상이 다름을 확인하였다. 향후 이들 효모 균주들의 바이오테크놀로지 분야에 응용을 기대해본다.

### Acknowledgment

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No. NRF-2014R1A2A1A11052888).

### References

- Botha, A. (2011). The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 43(1), 1-8.
- Choi, S. C., Kim, M. U., & Kim, J. S. (2013). Selective isolation and phylogeny of the yeast species associated with *Aloe vera* and *Aloe saponaria*. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 32(3), 240-243.
- Deak, T. (2009). Ecology and biodiversity of yeasts with potential value in biotechnology. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (Ed. Satyanarayana, T., & Kunze, G.), pp. 151-168. Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht, Netherlands.
- Fonseca, A., & Inacio, J. (2006). Phylloplane yeasts. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (ed. Rosa, C. A., & Peter, G.), pp. 263-301. Springer, Berlin.
- Jeknić, Z., Morré, J. T., Jeknić, S., Jevremović, S., Subotić, A. & Chen, T. H. H. (2012). Cloning and functional characterization of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from tiger lily (*Lilium lancifolium* Thunb. 'Splendens'). *Plant and Cell Physiology*, 53(11), 1899-1912.
- Kim, J. S., Lee, I. K., & Yun, B. S. (2015). A novel biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb. *PlosOne*, 10(4), e0122917.
- Leathers, T. D., Rich, J. O., Anderson, A. M., & Manitchotpsit, P. (2013). Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1701-1706.
- Lee, T. B. (2014). *Coloured Flora of Korea*, Vol. I, II. Hayangmunsa, Seoul. p. 1828. (In Korean)
- Lee, W. T. (1996). *Coloured Standard Illustrations of Korean Plants*, Academy Publishing Co., Seoul. p. 624. (In Korean)
- Ma, Z. C., Chi, Z., Geng, Q., Zhang, F., & Chi, Z. M. (2012). Disruption of the pullulan synthetase gene in siderophore-producing *Aureobasidium pullulans* enhances siderophore production and simplifies siderophore extraction. *Process Biochemistry*, 47(12), 1807-1812.
- Maksimova, I. A., Yurkov, A. M., & Chernov I. Y. (2009). Spatial structure of epiphytic yeast communities on fruits of *Sorbus aucuparia* L. *Biology Bulletin*, 36(6), 613-618.
- Manitchotpsit, P., Skory, C. D., Peterson, S. W., Price, N. P., Vermillion, K. E., & Leathers, T. D. (2012). Poly( $\beta$ -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 39(1), 125-132.
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., & Bertolini, P. (2012). Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology & Technology*, 73, 56-62.
- Raspor, P., & Zupan, J. (2006). Yeast in extreme environments. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (ed. Rosa, C. A., & Peter, G.), pp. 370-417. Springer, Berlin.
- Rich, J. O., Manitchotpsit, P., Peterson, S. W., & Leathers, T. D. (2011). Laccase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Rangsit Journal of Arts & Sciences*, 1(1), 41-47.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology & Evolution*, 4(4), 406-425.
- Singh, R. S., Saini, G. K., & Kennedy, J. F. (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 515-531.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology & Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tamang, J. P., & Fleet, G. H. (2009). Yeasts diversity in fermented foods and beverages. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (Ed. Satyanarayana, T., & Kunze, G.), pp. 169-198. Springer Science + Business Media B. V., Dordrecht, Netherlands.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Ed. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J.), pp. 315-322. Academic Press, San Diego, USA.