

우리나라 일부 해안 지역 야생화들로부터 분리한 효모들의 분자 생물학적 동정

민진홍¹ · 이형범² · 이종수¹ · 김하근^{1*}

¹배재대학교 바이오 · 의생명공학과, ²전남대학교 응용생명공학부

Identification of Yeasts Isolated from Wild Flowers Collected in Coast Areas of Korea Based on the 26S rDNA Sequences

Jin Hong Min¹, Hyang Burm Lee², Jong Soo Lee¹ and Ha Kun Kim^{1*}

¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

²Division of Applied Bioscience & Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

ABSTRACT : Several yeast colonies were isolated from wild flowers collected from East, West and South coast areas of Korea by plating of flower suspensions on the YPD plates containing antibiotics, streptomycin and ampicillin. Polymerase chain reactions (PCR) were performed for the amplification of D1/D2 region of 26S rDNA for those colonies. PCR-amplified nucleotide sequences were compared using BLAST for their identification. As results, 27 yeast strains belonged to 15 species were isolated from wild flowers collected at Donghae, where is located in eastern coast of Korea. Also, 34 strains belonged to 17 species were isolated from wild flowers of Daechon, where is located in western coast of Korea. In addition, 22 strains belonged to 13 species were isolated from wild flowers collected at Wando, where is located in southern coast of Korea. Among those 45 species isolated from 3 different collection sites, only 4 species including *Cryptococcus laurentii*, *Metschnikowia koreensis*, *Pseudozyma rugulosa*, and *Rhodotorula mucilaginosa* were found from all 3 different collection sites. And 5 species including *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus flavus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia guilliermondii*, and *Rhodospiridium fluviale* were overlapped from the at least 2 different collection sites. Other 23 species were found only in a specific collection sites implying that each area has distinctive yeast flora.

KEYWORDS : D1/D2 region of 26S rDNA, Eastern coast, Southern coast, Western coast, Yeast identification

효모는 전통적으로 전통 주류나 장류 등의 생산에 이용되어왔다(Kim *et al.*, 1999). 효모는 또한 값이 저렴한 배지에서 쉽게 배양할 수 있는 단세포 진핵생물이므로, *Pichia*

등은 단백질을 과량 발현시키는 시스템으로서 최근에 중요하게 사용되고 있다(Cai and Gros, 2003). 이밖에도 효모는 진핵생물을 연구하기 위한 모델로서도 중요한 역할을 하고 있다(Oslan *et al.*, 2012). 우리나라의 자연환경에 서식하고 있는 새로운 효모들을 분리, 동정하여 이들을 자원화하고, 이들로부터 고부가가치의 의약 산업이나 건강 식품산업 등에 활용할 수 있는 신소재 개발 응용연구는 매우 중요하다(Kim *et al.*, 2004). 식물은 효모의 공통적인 서식처로 잘 알려져 있기 때문에, 다양한 효모들이 나무껍질, 잎, 또는 꽃에서 발견되고 있다(Wang *et al.*, 2008). 식물체에 있는 효모의 다양성을 연구하기 위해 꽃, 과일 및 나무껍질 혹은 수분에 관여하는 곤충들을 수집하여 이들로부터 효모를 분리 동정하는 연구들이 국내외에서 간헐적으로 수행되어 왔다. 한반도에 자생하고 있는 효모들을 포괄적으로 탐색 조사하여 발굴된 효모들을 생물자원화하기 위한

Kor. J. Mycol. 2013 September, 41(3): 185-191

<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.3.185>

pISSN 0253-651X

© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: hakun@pcu.ac.kr

Received July 19, 2013

Revised September 17, 2013

Accepted September 18, 2013

©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.

목적으로, 국내 여러 지역에서 수집한 야생화를 대상으로 이들에 서식하고 있는 다양한 효모들의 분포를 탐색하고 있다. 이러한 연구의 일환으로서, 대전 일부 지역의 하천과 야산 등지에서 수집한 야생화들로부터 다양한 효모들을 분리하고 이들을 동정하여 보고한 바 있으며 (Min *et al.*, 2012), 대전 계족산, 충남 홍성의 오서산 일대, 그리고 전북 정읍 백암산에 식생하고 있는 다양한 야생화들로부터 효모를 분리하고 동정하여 보고한 바 있다 (Min *et al.*, 2013). 본 연구에서는 동해안의 동해시, 서해안의 대천시, 그리고 남해안의 완도군에서 야생화들을 수집하여, 이들에 서식하고 있는 효모들을 분리하고, 이들을 분자생물학적 방법으로 동정하여, 그 결과를 보고하는 바이다.

동해안의 동해시, 서해안의 대천시, 남해안의 완도에서 2013년 봄에 개화한 꽃들을 50 ml 크기의 멸균튜브에 각각 채취하였다. 여기에 멸균수 5 ml을 넣고 1시간 동안 진탕하여 현탁액을 제조하였다. 현탁액을 직접 또는 필요한 경

우 희석액 일부를 스트렙토마이신(50 g/ml)과 앰피실린(50 g/ml)이 들어 있는 YPD (yeast extract peptone dextrose) 한천배지에 도말하고, 이를 30°C에서 48시간 동안 배양하여 효모 균락들을 얻었다 (Min *et al.*, 2013). YPD 한천배지에서 균락을 형성한 효모들을 접종 루프를 사용하여 각각 YPD 한천배지에 희석배양하여 순수배양체를 얻었다. 이들 효모를 동정하기 위해 26S rDNA의 D1/D2 영역을 PCR (polymerase chain reaction) 반응으로 증폭하였다. 이 때 PCR을 수행하기 위한 주형 DNA는 효모의 염색체 DNA를 분리하는 대신, 효모 균락을 이쑤시개로 소량 취하여 반응에 사용하였다. DNA를 증폭시키기 위한 프라이머는 LN1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3')과 NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3')를 사용하였다 (Min *et al.*, 2013). PCR 반응이 종료된 후, 1.5% (w/v) 아가로스 젤 전기영동을 수행하여 증폭된 DNA들을 확인하고, PCR 산물을 QIAquick gel extraction kit (Qiagen)를

Table 1. Yeasts species isolated from wild flowers collected in Donghae where is located in eastern coast of Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity (%)
1	<i>Candida silvae</i>	250-JW-1	DQ377641.1	581/583 (99)
2	<i>Cryptococcus aureus</i>	242-JW-2	EU304246.1	628/630 (99)
3	<i>Cryptococcus flavus</i>	244-JW-1	EU177572.1	638/639 (99)
4	<i>Cryptococcus laurentii</i>	245-JW-2	HQ327003.1	630/640 (98)
5	<i>Cryptococcus terrestris</i>	250-JW-2	EF599104.1	616/617 (99)
6	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	240-JW-1	JN248600.1	611/615 (99)
		239-JW-1	EU004081.1	613/615 (99)
7	<i>Metschnikowia koreensis</i>	246-JW-1	AF296438.1	532/532 (100)
8	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	245-JW-1	HM627129.1	545/546 (99)
9	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	243-JW-1	JQ686903.1	611/612 (99)
10	<i>Pichia guilliermondii</i>	248-JW-3	FJ432597.1	613/613 (100)
11	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	241-JW-1	JN940523.1	648/648 (100)
		241-JW-3	JN940523.1	648/648 (100)
		242-JW-3	JN940523.1	636/648 (99)
		243-JW-2	JN940523.1	645/648 (99)
		246-JW-2	JN940523.1	647/648 (99)
		248-JW-1	JN940523.1	647/648 (99)
		248-JW-4	JN940523.1	647/648 (99)
		251-JW-1	JN940523.1	647/648 (99)
12	<i>Rhodospiridium fluviale</i>	238-JW-1	FJ515261.1	609/611 (99)
		247-JW-2	FJ515261.1	608/611 (99)
13	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	248-JW-2	HQ871906.1	611/613 (99)
14	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	249-JW-1	JQ219312.1	611/614 (99)
15	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	239-JW-2	JN940713.1	602/604 (99)
		240-JW-2	JN940713.1	604/604 (100)
		241-JW-2	JN940713.1	604/604 (100)
		242-JW-1	JN940713.1	604/604 (100)

사용하여 다시 회수하였다. 회수한 D1/D2 DNA의 염기서열은 코스모젠텍사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 Sanger의 방법에 의해 LN1과 LN4를 각각 프라이머로 사용하여 반응시킨 후, ABI 3730xl DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석된 D1/D2 염기서열은 Clustal X2 프로그램을 사용하여 정렬한 후 (Thompson *et al.*, 1997), NCBI의 BLAST를 이용하여 데이터베이스에 축적되어 있는 효모들과의 서열간의 상동성을 비교분석함으로써 동정하였다(Altschul *et al.*, 1997). 그 결

과는 Table 1, Table 2, 그리고 Table 3에 정리하였다.

동해안의 동해시에서 수집한 27점의 야생화들로부터 얻은 현탁액을 도말하여 얻은 효모 균락들을 분리하여 26S rDNA의 D1/D2 지역 염기서열의 비교를 통해 이들의 동정을 수행한 결과, 전체적으로 15종에 속하는 효모들 27균주를 얻었다(Table 1). 유사한 방법으로 서해안의 대천시 해수욕장 주위에서 수집한 15종의 야생화들로부터는, 총 17종에 속하는 효모들 34 균주가 분리 동정되었다(Table 2). 또한 완도군 대문리에서 수집한 야생화 12점을 분석한 결과,

Table 2. Yeasts species isolated from wild flowers collected in Daechon where is located in western coast of Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity (%)
1	<i>Bulleromyces albus</i>	349-CC-1	DQ377658.1	607/611 (99)
		352-CC-3	DQ377658.1	605/611 (99)
2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	363-CC-2	FJ627991.1	526/528 (99)
3	<i>Cryptococcus aureus</i>	345-CC-1	EU304246.1	629/630 (99)
		346-CC-2	EU304246.1	628/630 (99)
		347-CC-2	EU304246.1	627/630 (99)
		349-CC-2	EU304246.1	630/630 (100)
		362-CC-3	EU304246.1	600/602 (99)
		350-CC-2	EU304246.1	600/602 (99)
4	<i>Cryptococcus flavescens</i>	365-CC-2	FJ743610.1	599/604 (99)
5	<i>Cryptococcus laurentii</i>	364-CC-2	FN428921.1	603/607 (99)
6	<i>Cryptococcus luteolus</i>	347-CC-3	AM160633.1	637/640 (99)
7	<i>Cryptococcus</i> sp.	358-CC-1	AY508880.1	608/617 (99)
		352-CC-2	EF672245.1	643/643 (100)
8	<i>Hannaella oryzae</i>	346-CC-1	JQ754139.1	633/640 (99)
		350-CC-1	JQ754139.1	635/640 (99)
		351-CC-1	JQ754139.1	640/640 (100)
		357-CC-1	EU304246.1	600/602 (99)
9	<i>Hannaella zeae</i>	355-CC-1	JQ754112.1	636/636 (100)
10	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	354-CC-1	AM160628.1	613/615 (99)
		356-CC-2	AM160628.1	613/615 (99)
		359-CC-1	AM160628.1	613/615 (99)
		370-CC-1	AM160628.1	613/615 (99)
11	<i>Metschnikowia koreensis</i>	365-CC-1	AF257272.1	529/532 (99)
12	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	356-CC-1	HM627099.1	495/505 (98)
13	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	369-CC-1	JX067756.1	542/546 (99)
14	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	352-CC-1	JN940523.1	647/648 (99)
		364-CC-1	JN940523.1	645/648 (99)
		368-CC-2	JN940523.1	645/648 (99)
15	<i>Rhodospiridium fluviale</i>	362-CC-2	FJ515261.1	605/611 (99)
		353-CC-2	AY745719.1	607/611 (99)
		362-CC-1	FJ515261.1	604/611 (99)
16	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	361-CC-1	HQ871906.1	612/613 (99)
17	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	368-CC-1	AY070011.1	562/564 (99)

Table 3. Yeasts species isolated from wild flowers collected in Wando where is located in southern coast of Korea

No.	Putative species	Isolated No.	Related Genbank sequence	Identity (%)
1	<i>Cryptococcus flavus</i>	158-JE-3	FJ743627.1	638/640 (99)
2	<i>Cryptococcus laurentii</i>	150-JE-2	FJ743631.1	627/640 (98)
3	<i>Hanseniaspora vineae</i>	150-JE-1	FJ196743.1	591/592 (99)
4	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	145-JE-2	HQ396523.1	588/589 (99)
		147-JE-1	HQ396523.1	588/589 (99)
		151-JE-1	HQ396523.1	588/589 (99)
		152-JE-2	HQ396523.1	588/589 (99)
5	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	150-JE-2	DQ655683.1	568/572 (99)
6	<i>Metschnikowia koreensis</i>	159-JE-3	AF296438.1	532/532 (100)
		160-JE-3	AF296438.1	532/533 (99)
7	<i>Pichia guilliermondii</i>	145-JE-1	EU177579.1	607/607 (100)
		146-JE-1	EU177579.1	607/607 (100)
8	<i>Pichia mexicana</i>	155-JE-3	DQ409143.1	573/574 (99)
9	<i>Pseudozyma aphidis</i>	155-JE-2	FN424100.1	627/627 (100)
		158-JE-2	JN940519.1	648/648 (100)
		160-JE-2	JN940520.1	648/648 (100)
10	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	152-JE-1	AB566327.1	648/648 (100)
11	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	160-JE-1	JN940523.1	648/648 (100)
		163-JE-1	JN940523.1	647/648 (99)
12	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	163-JE-2	FJ743623.1	614/614 (100)
13	<i>Rhodotorula phylloplana</i>	165-JE-1	AM748546.1	605/629 (96)
14	<i>Sporisorium andropogonis</i>	155-JE-1	AY740095.1	642/649 (98)

13종에 속하는 효모 22 균주들이 분리 동정되었다(Table 3). 따라서 동해안의 동해시, 서해안의 대천시, 남해안의 완도군에서 모두 45종 83균주의 효모들을 분리 동정하였다. 이들 45종의 효모들 중 *Cryptococcus laurentii*, *Metschnikowia koreensis*, *Pseudozyma rugulosa*, 그리고 *Rhodotorula mucilaginosa* 등 4종의 효모는 야생화를 수집한 3곳에서 모두 분리되었다. 또한 *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus flavus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia guilliermondii*, 그리고 *Rhodospidium fluviale* 등 5종의 효모는 야생화를 수집한 2곳의 시료 수집 장소에서 분리되었다. 이들의 염기서열들을 BLAST를 이용하여 분석하였을 때, 동해안과 서해안 2곳의 야생화 채취지역에서 7개의 효모 분리균주로서 발견된 *C. aureus*와 동해안, 서해안, 남해안 3곳에서 14개의 효모 분리균주로서 발견된 *P. rugulosa*는 채집 장소에 상관없이 동일한 GenBank의 accession number를 갖고 있었다. 하지만 *P. guilliermondii*, *C. laurentii*, *M. koreensis*, *R. mucilaginosa*, *C. flavus* 및 *R. fluviale* 등은 채집 장소에 따라 서로 다른 GenBank accession number의 염기서열과 일치하였는데, 이는 동일한 종에 속한다고 해도 분리균주마다 약간씩 염기 서열에 차이가 있음을 알 수 있다(Fig. 1, Table 1, Table 2, Table 3). 3 곳의 채집 장소로부터 적어도

2곳 이상에서 분리된 9종의 효모들에 대해 PCR로 증폭하여 결정한 D1/D2 염기서열로 MEGA 5.1 프로그램을 이용하여 계통수를 작성하였다(Fig. 1). 이들 중 *H. uvarum*, *P. guilliermondii*, *M. koreensis* 3종이 Astomycota (phylum)에 속하였으며, 나머지 6종은 Basidiomycota (phylum)에 속하였다. Basidiomycota문에 속하는 이들 6종 중 *C. aureus*, *C. laurentii*, *C. flavus*는 Tremellales목에, *R. fluviale*와 *R. mucilaginosa*는 Sporidiobolales목에 그리고 *P. rugulosa*는 Ustilaginales목에 속하고 있음을 보여 준다(Fig. 1).

Min 등(2013)이 대전 계족산, 충남 홍성의 오서산 일대, 그리고 전북 정읍 백암산에 식생하고 있는 다양한 야생화들로부터 효모를 분리 동정한 결과, *C. aureus*가 3곳의 시료 수집 지역에서 모두 발견되었다고 보고된 바 있다. 이번 연구에서도 *C. aureus*가 동해안과 서해안 2곳에서 발견되는 것으로 보아(Table 1, Table 2), *C. aureus*를 Min 등(2013)이 야생화로부터 분리 동정하여 보고하기 이전에 꽃에서 분리되었다는 보고는 없지만, 우리나라 야생화에서 흔하게 발견되는 효모로 사료된다. 이외에도 Min 등(2013)이 백암산에서 분리하였다고 보고한 *C. laurentii*는 본 연구에서 3곳의 시료 수집 지역에서 모두 발견되었으며, 계족산과 백암산 2곳에서 분리되었었던 *C. flavus*는 이번 연구에서

때문에 양질의 포도주를 제조하는 데 있어 *S. cerevisiae* W-3을 대체할 수 있는 잠재성을 갖고 있는 균주로 평가된 바 있다(Hong and Park, 2013). 동해안과 남해안의 야생화에서 발견된 *P. guilliermondii*는 포도주 발효가 진행되는 동안 휘발성 페놀의 생산을 증가시킴으로써, 양질의 포도주 생산을 방해하는 부패균으로 작용한다고 알려져 있다(Sez et al., 2010).

본 연구에서 동해안, 서해안, 그리고 남해안의 3개 지역의 야생화로부터 총 45종의 효모들을 분리하였다. 이들 중 4종의 효모들은 3개 지역에서 모두, 그리고 5종의 효모들은 적어도 2개 지역에서 함께 발견되었다. 기타 23종의 효모들은 특정한 시료 수집 장소에서만 발견되는 것으로 보아, 각 지역은 독특한 효모 다양성을 갖고 있을 것으로 추측할 수 있다.

적 요

국내 자연환경으로부터 다양한 효모들을 분리, 동정하고 나아가 이들로부터 유용물질을 생산하는 효모자원을 확보하기 위한 연구의 일환으로 우리나라 동해안, 서해안, 남해안에 서식하는 야생화들을 채집하여 이들로부터 효모들을 분리한 후 분자생물학적 방법으로 동정하였다. 동해시에서 수집한 야생화로부터는 *Candida silvae* 등을 포함한 15종에 속하는 27균주의 효모들을 분리하였다. 서해안의 대천시 해수욕장 주위 야생화에서는 *Bulleromyces albus*를 비롯한 17종 34균주가 분리, 동정되었다. 또한 남해안의 완도군 대문리 주위의 야생화들로부터는 *Cryptococcus flavus*를 포함하여 13종에 속하는 효모 22 균주들이 분리 동정되었다. 전체적으로 우리나라 동해안, 서해안, 남해안의 야생화로부터 모두 45종에 속하는 효모들 83균주를 분리, 동정하였다.

감사의 글

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR NO 2013-02-001).

참고문헌

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Cai, J. and Gros, P. 2003. Overexpression, purification, and functional characterization of ATP-binding cassette transporters in the yeast, *Pichia pastoris*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1610: 63-76.
- Cheng, M. F., Chiou, C. C., Liu, Y. C., Wang, H. Z. and Hsieh, K. S. 2001. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J. Clin. Microbiol.* 39:1608-1611.
- Fidalgo-Jimenez, A., Daniel, H. M., Evrard, P., Decock, C. and Lachance, M. A. 2008. *Metschnikowia cubensis* sp. nov., a yeast species isolated from flowers in Cuba. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2955-2961.
- Gimnez-Jurado, G., Kurtzman, C. P., Starmer W. T. and Spencer-Martins, I. 2003. *Metschnikowia vanudenii* sp. nov. and *Metschnikowia lachancei* sp. nov., from flowers and associated insects in North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1665-1670.
- Hong, S. G., Chun, J., Oh, H. W. and Bae, K. S. 2001. *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1927-1931.
- Hong, Y. A. and Park, H. D. 2013. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. *Food Microbiol.* 34:207-214.
- Kim, J. H., Kim, N. M. and Lee, J. S. 1999. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from traditional meju. *Kor. J. Food Nutr.* 12:490-495. (in Korean).
- Kim, J. H., Lee, D. H., Jeong, S. C., Chung, K. S. and Lee, J. S. 2004. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:1318-1323.
- Lachance, M. A., Bowles, J. M., Anderson, T. M. and Starmer, W. T. 2008. *Metschnikowia shivogae* sp. nov., a yeast species associated with insects of morning glory flowers in East Africa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2241-2244.
- Li, S. S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J. Y., Yan, B., Han, B. Z. and Reeves, M. 2010. Yeast species associated with wine grapes in China. *Int. J. Food Microbiol.* 138:85-90.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E. and Carrau, F. 2012. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157:245-250.
- Min, J. H., Hyun, S. H., Kang, M. G., Lee, H. B. Kim, C. M., Kim, H. K. and Lee, J. S. 2012. Isolation and identification of yeasts from wild flowers of Daejeon city and Chungcheongnam-do in Korea. *Kor. J. Mycol.* 40:141-144. (in Korean).
- Min, J. H., Ryu, J. J., Lee, J. S. and Kim, H. K. 2013. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Gyejoksan, Oseosan and Beakamsan of Korea. *Kor. J. Mycol.* 41:47-51. (in Korean).
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T. and Kitamoto, D. 2006. Discovery of *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:305-313.
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, H. K. and Kitamoto, D. 2007. Characterization of the genus *Pseudozyma* by the formation of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *FEMS Yeast Res.* 7:286-292.
- Oslan, S. N., Salleh, A. B., Rahman, R. N., Basri, M. and Chor, A. L. 2012. Locally isolated yeasts from Malaysia: identification, phylogenetic study and characterization. *Acta. Biochim. Pol.* 59:225-229.
- Sez, J. S., Lopes, C. A., Kirs, V. C., and Sangorrn, M. P. 2010. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 51:170-176.

- Slvikov, E., Vadkertiov, R. and Vrnov, D. 2007. Yeasts colonizing the leaf surfaces. *J. Basic Microbiol.* 47:344-350.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Wang, S. A., Jia, J. H. and Bai, F. Y. 2008. *Candida alocasiicola* sp. nov., *Candida hainanensis* sp. nov., *Candida heveicola* sp. nov. and *Candida musiphila* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species isolated from plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94:257-265.