

전라북도 덕유산 일대의 야생화에서 효모의 분리 동정 및 생리기능성

한상민 · 현세희 · 이종수*

배재대학교 바이오 · 의생명공학과

Isolation and Identification of Yeasts from Wild Flowers in Deogyu Mountain and their Physiological Functionalities

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

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

ABSTRACT : Several kinds of yeasts were isolated from wild flowers collected from Muju resort of Deogyu mountain in Korea and identified by comparison of nucleotide sequences of D1/D2 region of 26S rDNA using BLAST. Totally twenty-two strains of eight species were isolated and *Cryptococcus magnus* (9 strains) and *Cryptococcus flavescentes* (6 strains) were dominant species. The supernatant and cell-free extracts were prepared and their antioxidant activity, anti-gout xanthine oxidase inhibitory activity and whitening tyrosinase inhibitory activity were investigated. Anti-gout xanthine oxidase inhibitory activities of *Sporobolomyces phaffii* JS00583 and *Rhodotorula graminis* JS00581 were 40.4% and 39.1%, respectively and also was 36.1% whitening tyrosinase inhibitory activity in the supernatant of *Cryptococcus magnus* JS00570.

KEYWORDS : Deogyu mountain, Isolation, Physiological functionality, Wild flowers, Yeasts

서 론

효모는 미생물 분류학상 자낭포자와 일부 담자포자를 형성하는 유포자 효모와 포자를 형성하지 않는 무포자 효모로 구분된다. 효모는 대부분이 비병원성 균들로서 일부는 알코올 발효력 등이 강하여 오래 전부터 주류 등의 전통 발효 식품 제조에 이용되어 왔고[1] 최근에는 각종 비타민 등의 생리활성 물질과 정미성 핵산물질과 그 유도체 그리고

균체와 사료 단백질 생산 자원 등으로 이용되고 있다[2-9].

지금까지 대부분의 효모들은 전통 발효식품이나 메주, 누룩 등에서 분리되어 이들의 일부가 주류제조 등에 응용되고 있다[10, 11]. 그러나 꽃이나 과일, 토양 등 자연 환경에 분포하고 있는 야생 효모들을 발굴하여 이들의 다양성을 확인하고 나아가 고부가가치 의약 산업이나 건강 식품 산업 응용에 관한 연구는 많이 실시되지 않았다. 하지만 최근 계족산, 오서산 및 백암산 등의 산들[12]과 제주도[13], 울릉도[14, 15], 옥지도[16] 및 선유도[17, 18] 등 섬들의 야생 꽃들에서 효모들을 분리 동정한 연구가 보고되고 있다.

본 연구에서는 전라북도 덕유산 무주 리조트 일대에서 2014년 7월에 수집한 야생화들에서 효모들을 분리 동정 하였다. 또한 이들의 다양한 생리기능성을 측정하여 고부가가치 건강소재 생산 우수 효모들을 선별하였다.

재료 및 방법

실험재료

DNA 증폭을 위한 polymerase chain reaction (PCR) 반

Kor. J. Mycol. 2015 March, 43(1): 47-52
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.1.47
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

Received January 29, 2015

Revised March 13, 2015

Accepted March 24, 2015

©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.

응은 Gene Amp PCR system 9700(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였고 DNA 정제 시 Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA)와 PCR Purification Kit (QIAGEN)를 사용하였다. Xanthine oxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), tyrosinase (Sigma-Aldrich), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich)를 사용하였고, 대부분의 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

효모의 분리 및 동정

전라북도 덕유산 무주 리조트 일대에서 2014년 7월에 수집한 야생화들에서 다음과 같이 야생 효모들을 분리하였다. 먼저 수집한 야생화에 멸균수를 넣고 1시간 동안 진탕시킨 후 이들 현탁액을 streptomycin (50 µg/mL)과 ampicillin (50 µg/mL)을 함유한 YPD (10 g/L yeast extract, 20 g/L dextrose, 20 g/L pepton, 15 g/L agar) 한천배지에 도말하여 30°C에서 2일 동안 배양한 후 생육한 효모들을 분리하였다.

분리 효모의 26S rDNA의 D1/D2 부위를 다음과 같이 PCR로 증폭시켜 염기서열을 분석하였고, 이들 염기서열들은 BLAST를 이용하여 상동성을 확인하였다. 즉, 26S rDNA의 D1/D2부위를 증폭하기 위해 NL-1(5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3')과 NL-4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3') primer를 사용하였다 [19]. Gene Amp PCR system 9700을 이용한 PCR 반응은 10X Taq buffer 2.5 µL, 10 mM dNTP 각각을 0.5 µL씩, 20 pmol NL1 primer와 20 pmol NL4 primer를 각각 0.5 µL, 혼합액에 Taq DNA polymerase (5 U/µL) (SolGent, Daejeon, Korea) 0.25 U를 첨가하여 95°C에서 30초(denaturation), 55°C에서 30초(annealing), 72°C에서 1분(extension)을 한 주기로 반응시킨 후 동일한 주기를 총 30회 반복하여 증폭시켰다.

PCR 산물은 1.5% agarose gel 전기영동으로 확인하였고 증폭된 DNA는 Gel Extraction Kit와 PCR Purification Kit를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 이들 염기서열을 BLAST (NCBI) 프로그램 [20]을 사용하여 상동성을 확인 비교하여 최종 동정하였다.

배양 상등액과 무세포 추출물의 제조 및 생리기능성 측정

분리 효모들을 YPD 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액과 세포 배양물을 각각 분리하였다. 세포 배양물은 다시 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.3)에 현탁시킨 후 초음파 균체파쇄기(Vibra Cell; SONICS & Materials, Newtown, CT, USA)로 파쇄하고 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 무세포 추출물을 얻었다. 상등액과 무세포 추출물은 동결

건조하여 생리기능성 분석에 사용하였다.

항산화 활성(전자공여능)은 Kim 등 [21]의 방법에 따라 동결건조 시료를 무균수에 1 mg/mL로 용해시킨 시료 60 µL에 DPPH 12.5 mg을 에탄올 100 mL에 용해시킨 DPPH 용액 240 µL를 첨가한 후 10분간 반응시킨 다음 525 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구의 값과 비교하여 활성을 계산하였고 3반복의 평균값으로 표시하였다[21].

미백성 tyrosinase 저해활성은 Jang 등 [22]의 방법에 따라 동결건조 시료를 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 6.8)에 1 mg/mL로 용해시킨 시료 25 µL에 5 mM L-DOPA 50 µL, 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 6.8)를 혼합한 후 tyrosinase 40 U를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 475 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조구의 값과 비교하여 활성을 계산하였고 3반복의 평균값으로 표시하였다[22].

Xanthine oxidase (XOD)저해활성은 Hyun 등 [23]의 방법에 따라 먼저 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 10 mg/mL 위의 동결건조 시료를 용해시킨 시료 100 µL를 1 mM xanthine 용액 200 µL와 0.05 U xanthine oxidase 100 µL에 혼합하고 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 600 µL 첨가하여 1 mL로 정용한 후 37°C에서 5분간 각각 반응시켰다. 1 N HCl 200 µL를 가하여 반응을 정지시키고 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 침전된 단백질을 제거하였다. 배양 상등액과 무세포 추출물 중에 함유되어 있는 uric acid 함량을 분광분석기(UV-1601; Shimadzu, Kyoto, Japan)로 292 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 후 다음과 같이 각각의 xanthine oxidase 저해활성을 계산하였다. 생리기능성 측정은 3반복으로 실시하여 평균값으로 표시하였다.

Xanthine oxidase 저해활성(%) =

$$[1 - \{A(\text{시료구}) - B(\text{시료구 Blank}) / C(\text{대조구})\}] \times 100$$

결과 및 고찰

덕유산 무주 리조트 야생화들에서 효모의 분리 및 동정

전라북도 덕유산 무주 리조트 일대에서 2014년 7월 초 수집한 27점의 야생화들에서 모두 8종 22균주의 효모들을 분리 동정하였고(Table 1) 이들의 phylogenetic tree는 Fig. 1과 같다.

이들 가운데 *Cryptococcus magnus* 9균주, *Cryptococcus flavesens* 6균주, *Cryptococcus* sp. 2균주 등 대부분이 병원성으로 알려진 *Cryptococcus*속 균들이 주로 분리되었으며, 시료 수에 비하여 비교적 적은 효모들이 분리되었다. Fig. 1의 동정된 균주들 중 *Cryptococcus* sp. JS00577와 *Cryptococcus* sp. JS00578은 각각 *Cryptococcus flavesens*, *Cryptococcus magnus*들과 근연 관계가 있어 이들 균주들로 동정이 가능한 것으로 추정된다. 또한 Table 1의 동정된 효

Table 1. Yeast species from wild flowers collected in Deogyu mountain, Korea

No.	Putative species	Strain	Related GenBank sequence no.	Identity (%)
1	<i>Cryptococcus flaveszens</i>	JS00562	FJ743610.1	636/643(99)
		JS00563	KC845934.1	419/429(98*)
		JS00564	KC783404.1	372/380(98*)
		JS00565	JX049434.1	603/606(99)
		JS00566	JX049434.1	598/602(99)
		JS00567	FJ743610.1	635/640(99)
2	<i>Cryptococcus magnus</i>	JS00568	JX188126.1	639/645(99)
		JS00569	KF891470.1	561/570(98*)
		JS00570	JX188126.1	605/607(99)
		JS00571	KC494726.1	473/481(98*)
		JS00572	JX188126.1	640/643(99)
		JS00573	JX188126.1	634/643(99)
		JS00574	KC442262.1	404/411(98*)
		JS00575	KJ507249.1	437/448(98*)
3	<i>Cryptococcus</i> sp.	JS00576	KF891470.1	573/577(99)
		JS00577	FJ527163.1	568/569(99)
4	<i>Metschnikowia koreensis</i>	JS00578	KJ507269.1	600/602(99)
		JS00579	KJ507292.1	544/553(98*)
5	<i>Metschnikowia</i> sp.	JS00580	JX257178.1	549/553(99)
6	<i>Rhodotorula graminis</i>	JS00581	EU563930.1	612/618(99)
7	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	JS00582	JQ219311.1	603/614(98*)
8	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	JS00583	FJ527108.1	542/546(99)

*Additional biochemical and physiological characteristics of these yeasts have to be investigated for perfect identification.

모들 중 상동성이 98%를 보인 *Cryptococcus flaveszens* JS00563 등 8균주들의 정확한 동정을 위해서는 이들의 다양한 생리 생화학적 특성 조사가 추가로 필요할 것으로 생각된다.

이와 같이 시료 수에 비하여 효모들이 적게 분리된 것은 몇몇 고온성 효모들을 제외한 대부분의 효모들이 30°C 미만에서 잘 생육하고 수분활성도가 0.90 이상에서는 생육이 어려운 점 등으로 볼 때 시료 채취 시기가 고온 다습한(32°C, 80% 상대습도) 장마철이었고 비교적 고산지대에서 시료 야생화를 수집하였기 때문인 것으로 추정된다. 또한 대체로 협막을 갖고 있으면서 병원성을 띄는 균들로 알려진 [24] *Cryptococcus*속 균이 많이 분리된 것은 하천, 연못가, 야산 등지[25]와 울릉도와 옥지도 [15] 등의 야생화에서도 이들 균들이 많이 분리된 것과 같은 경향을 나타냈다.

분리 효모들의 생리기능성

덕유산 무주 리조트 주위의 야생화들에서 분리 동정한 8종 22균주 효모들의 생리기능성을 배양 상등액과 무세포 추출물로 구분하여 측정한 결과는 Table 2와 같다.

이들 가운데 충남 천리포 해안 야생화에서 국내 미기록종으로 처음 보고한 [26] 종과 동일한 *Sporobolomyces phaffii* JS00583과 *Rhodotorula graminis* JS00581의 배양 상등액에서 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성이 각각 40.4%와 39.1%를 보였다. 이 결과는 서울시 구로구 구로동 일대 야생화에서 분리한 *Peudozyma hubeiensis* 228-S-1[13]과 국내 미기록종으로 보고한 *Cryptococcus uzbekistanensis* YJ10-4[16]의 무세포 추출물들의 xanthine oxidase 저해활성(19.6%, 11.9%)보다는 높았으나 선유도 야생화에서 분리한 *Metschnikowia reukaufii* SY44-6[18]의 배양 상등액의 49.6%보다는 낮은 xanthine oxidase 저해활성이었다.

한편 *Cryptococcus magnus* JS00570의 배양 상등액이 36.1%의 미백성 tyrosinase 저해활성과 15% 미만의 항산화 활성을 보였으며 분리 균주들의 무세포 추출물들의 항산화 활성은 *Cryptococcus magnus* JS00575 (13.1%) 외에는 모두 활성이 없었다. 이상의 결과들을 종합하였을 때 이들 효모 중 비병원성인 *Sporobolomyces phaffii* JS00583과 *Rhodotorula graminis* JS00581의 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성이 비교적 우수하여 xanthine oxidase 저해물질 생

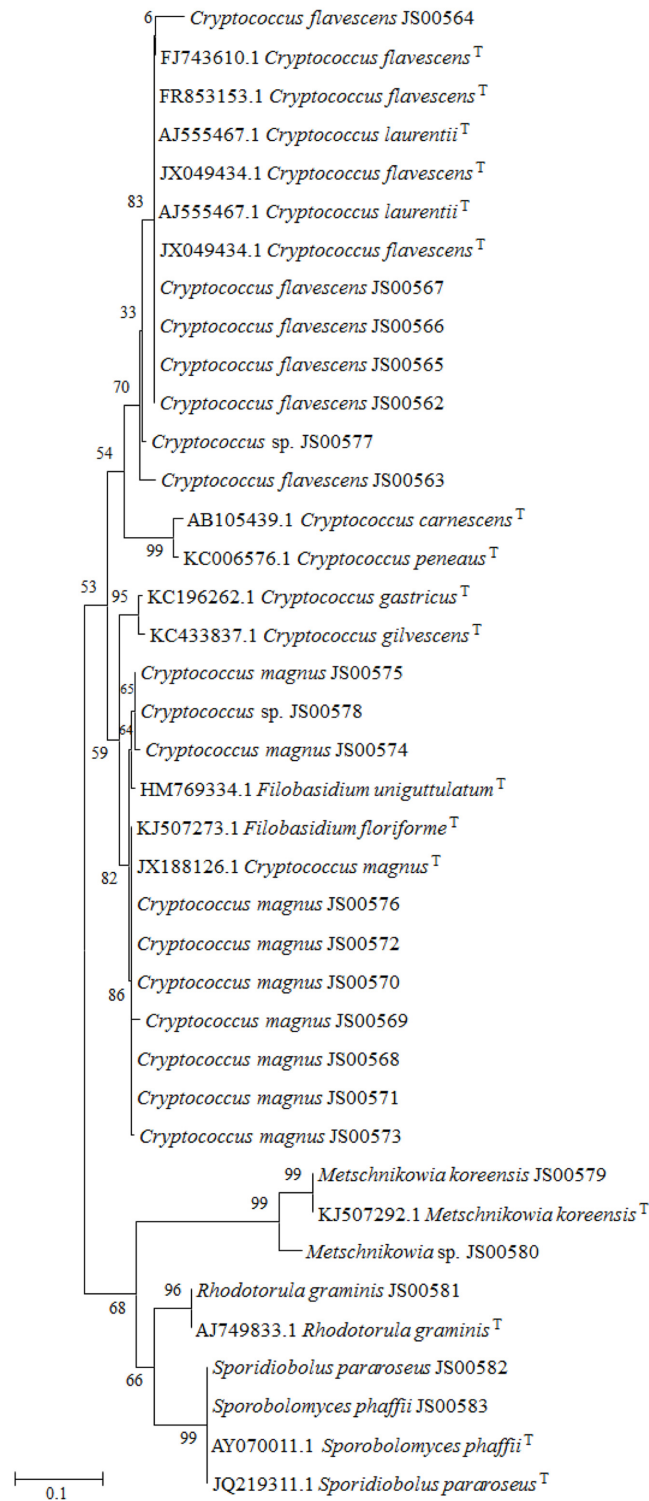


Fig. 1. Phylogenetic tree of yeast strains isolated from wild flowers collected in Deogyu mountain, Korea. The tree was generated by the neighbor-joining method using the Mega 5.1 program.

산에 산업적으로 응용할 수 있을 것으로 생각되어 현재 이들의 대량생산을 위한 배양온도와 배양기간 등의 생산조건을 검토하고 있다.

적 요

덕유산 무주 리조트 일대에서 수집한 야생화 27점에서 효모 8종 22균주를 분리 동정하였다. 이들 균주 중에서

Table 2. Physiological functionalities of the supernatants and cell-free extracts from yeasts from wild flowers in Deogyu mountain, Korea

No.	Putative species	Strain	Antioxidant activity (%)		XOD inhibitory activity (%)		Tyrosinase inhibitory activity (%)	
			Supernatant	Cell-free extract	Supernatant	Cell-free extract	Supernatant	Cell-free extract
1	<i>Cryptococcus flaveszens</i>	JS00562	9.5 ± 0.2	n.d	15.7 ± 0.2	n.d	33.3 ± 0.9	21.9 ± 0.8
		JS00563	n.d	n.d	n.d	12.6 ± 0.1	29.5 ± 0.6	26.0 ± 0.2
		JS00564	n.d	n.d	17.7 ± 0.8	11.5 ± 0.3	31.5 ± 0.5	21.8 ± 0.5
		JS00565	n.d	n.d	29.0 ± 0.2	12.7 ± 0.2	27.7 ± 0.6	19.4 ± 0.1
		JS00566	14.1 ± 1.0	n.d	36.6 ± 0.2	n.d	27.4 ± 0.8	16.1 ± 0.4
		JS00567	n.d	n.d	n.d	n.d	27.2 ± 0.5	17.4 ± 0.9
2	<i>Cryptococcus magnus</i>	JS00568	n.d	n.d	20.4 ± 0.3	18.2 ± 0.8	19.2 ± 0.5	13.5 ± 0.1
		JS00569	11.1 ± 0.7	n.d	28.0 ± 0.1	n.d	10.2 ± 0.9	21.8 ± 0.4
		JS00570	14.0 ± 0.2	n.d	5.5 ± 0.7	29.7 ± 0.1	36.1 ± 1.0	23.6 ± 0.8
		JS00571	n.d	n.d	n.d	22.2 ± 0.1	26.9 ± 0.9	16.2 ± 1.0
		JS00572	13.3 ± 0.1	n.d	27.9 ± 0.2	5.3 ± 0.2	21.7 ± 0.9	18.1 ± 0.6
		JS00573	11.6 ± 0.2	n.d	29.5 ± 0.1	16.1 ± 0.1	29.7 ± 0.9	18.3 ± 0.8
		JS00574	n.d	n.d	23.8 ± 0.6	20.0 ± 0.6	26.7 ± 0.3	23.4 ± 0.6
		JS00575	5.8 ± 0.9	13.1 ± 0.1	20.6 ± 0.8	24.7 ± 0.2	27.3 ± 0.3	31.0 ± 0.1
3	<i>Cryptococcus</i> sp.	JS00576	6.4 ± 0.3	n.d	n.d	19.3 ± 0.1	28.3 ± 0.2	30.3 ± 0.9
		JS00577	14.5 ± 0.1	n.d	28.4 ± 0.1	30.4 ± 0.1	24.6 ± 0.4	20.5 ± 0.7
4	<i>Metschnikowia koreensis</i>	JS00578	n.d	n.d	22.0 ± 0.2	13.5 ± 0.1	24.7 ± 0.5	25.7 ± 0.4
		JS00579	n.d	n.d	11.2 ± 0.7	32.3 ± 0.3	26.4 ± 0.5	18.0 ± 0.7
5	<i>Metschnikowia</i> sp.	JS00580	8.4 ± 0.9	n.d	23.3 ± 0.3	n.d	30.0 ± 0.8	40.5 ± 0.1
6	<i>Rhodotorula graminis</i>	JS00581	14.7 ± 0.4	n.d	39.1 ± 0.1	33.6 ± 0.2	26.3 ± 0.6	22.1 ± 0.2
7	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	JS00582	10.3 ± 0.1	n.d	17.7 ± 0.1	23.1 ± 0.1	9.0 ± 0.6	20.6 ± 0.2
8	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	JS00583	11.9 ± 0.4	n.d	40.4 ± 0.6	26.1 ± 0.3	24.8 ± 0.2	23.8 ± 0.6

XOD, xanthine oxidase; n. d., not detected or below 5%.

Cryptococcus magnus 9균주, *Cryptococcus flaveszens* 6균주와 *Cryptococcus* sp. 2균주 등 *Cryptococcus*속 균들이 가장 많이 분리되었다. 이들 22균주들을 YPD 배지에서 24시간 배양하여 각각의 배양 상등액과 무세포 추출물을 제조한 후 이들의 항산화 활성과 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성 등의 생리기능성들을 측정한 결과, *Sporobolomyces phaffii* JS00583과 *Rhodotorula graminis* JS00581의 배양 상등액이 각각 40.4%와 39.1%의 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성을 보였다. 또한 *Cryptococcus magnus* JS00570의 상등액 역시 36.1%의 미백성 tyrosinase 저해활성을 보였다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea

(NIBR No. 2013-02-001).

REFERENCES

- 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.
- 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.
- Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. Kor J Mycol 2012;40:60-4.
- Jang IT, Kim YH, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. Kor J Mycol 2011;39: 227-8.

5. 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.
6. Jeong SC, Lee DH, Lee JS. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:1904-11.
7. Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 2004;14:1318-23.
8. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new anti-dementia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2007;42:83-8.
9. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* 2008;36:102-5.
10. Lee JS, Lee SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Korean J Microbiol Biotechnol* 1997;25:448-53.
11. Lee JS, Yi SH, Kim JH, Yoo JY. Isolation of wild killer yeast from traditional Meju and production of killer toxin. *Korean J Biotechnol Bioeng* 1999;14:434-9.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Hyun SH, Lee JS. Characteristics and physiological functionalities of unrecorded yeasts from wild flowers of Seonyudo in Jeollabukdo, Korea. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2014;42:402-6.
18. 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.
19. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;73:331-71.
20. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-402.
21. Kim HK, Lee EN, Geum JH, Lee JS. Nutritional characteristics and physiological functionality of polyplant extracts from some vegetables and medicinal plants. *Korean J Food Nutr* 2008;21:410-5.
22. Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor J Mycol* 2012;40:60-4.
23. Hyun KW, Kim JH, Song KJ, Lee JB, Jang JH, Kim YS, Lee JS. Physiological functionality in Geumsan perilla leaves from greenhouse and field cultivation. *Korean J Food Sci Technol* 2003;35:975-9.
24. Chan M, Lye D, Win MK, Chow A, Barkham T. Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis in Singapore: predominance of *Cryptococcus neoformans* compared with *Cryptococcus gattii*. *Int J Infect Dis* 2014;26:110-5.
25. 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.
26. Hyun SH, Lee HB, Kim CM, Lee JS. New records of yeasts from wild flowers in coast near areas and inland areas, Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:74-80.