

RESEARCH ARTICLE

대전광역시 월평공원과 전북 격포해수욕장 주변 야생화와 토양들로부터 야생효모의 분리 및 국내 미기록 효모들의 특성과 생리 활성

장지은, 박선정, 이종수*
배재대학교 바이오의약학부

Isolation of Wild Yeasts and Characterization of Physiological Functionalities of Unrecorded Wild Yeasts Obtained from Flowers and Soils of the Wolpyung Park, Daejeon City and Gykpo Beach, Buan, Jeollabuk-do in Korea

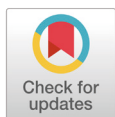
Ji-Eun Jang, Seon-Jeong Park and Jong-Soo Lee*
Faculty of Biomedicine and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea

*Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr

ABSTRACT

This study aimed to isolate wild yeasts obtained from flowers and soil of the Wolpyung park, Daejeon city and Gykpo beach, Buan, Jeollabuk-do in Korea, and to further characterize previously unrecorded wild yeast strains. In total, 88 strains of 62 different species of wild yeasts were isolated from 75 samples obtained from the Wolpyung park. Among these, six strains of *Trichosporon moniliiforme* and four strains each of *Papiliotrema flavescens* and *Candida melibiosica* were isolated. Additionally, 39 strains of 30 different species of wild yeasts were isolated from 35 samples collected from the Gykpo beach. Among the 127 isolated wild yeast strains, 10 strains, including *Apiotrichum porosum* ASCM32-1, were previously unrecorded. All the 10 previously unrecorded yeasts were oval or global in shape, and three strains, including *Candida athensensis* WP4-90-3, formed spores. Three strains, including *Vishniacozyma taibaiensis* WP13-2, were halophilic yeasts which grew in 15% NaCl-containing YPD (yeast extract-peptone-dextrose) medium. Five strains, including *C. athensensis* WP4-90-3, showed 15% ethanol resistance. Cell-free extracts from *Candida oleophila* WP5-19-1 and *Wickerhamomyces anomalus* HO9-2 showed the highest β -glucuronidase inhibitory activity (49.0%) and neutrophil elastase inhibitory activity (38.4%), respectively.

Keywords: β -Glucuronidase inhibitory activity, Gykpo beach, Neutrophil elastase inhibitory activity, Unrecorded wild yeasts, Wolpyung park



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

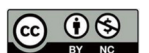
Kor. J. Mycol. 2021 March, 49(1): 87-100
<https://doi.org/10.4489/KJM.20210009>

Received: February 08, 2020

Revised: February 16, 2021

Accepted: March 08, 2021

© 2021 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

야생효모는 주로 전통 발효식품으로부터 분리되었고[1,2], 근래에 꽃과 토양 등의 자연환경으로부터 비병원성과 일부 병원성, 발효성과 색소 생성 효모, 생리 활성 우수 효모 등 다양한 야생효모들이 분리, 동정되었다[3-29].

최근 사람들의 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 많은 사람들이 여러 가지 편의 시설과 운동기구들이 설치되고 있는 주거지 부근의 도시공원과 호수나 바다 해변을 자주 이용하게 되었고 따라서 이들 지역의 환경 오염이 문제 되고 있다.

대전광역시 서부에 위치한 월평공원은 서쪽으로는 갑천 누리길과 자연 호수 공원이 있어 비교적 습도가 높고 야생화들과 각종 조류들, 물고기 등이 많아 많은 사람들이 찾는 청정 도시공원이다. 또한 동쪽으로는 연자산을 끼고 내원사와 주변 근린공원, 배재대학교가 있어 4계절 수많은 시민들이 찾고 있는 대형 도시공원이다. 또한, 전라북도 부안의 변산반도에 있는 격포항과 격포해수욕장은 주변 경관과 낙조가 아름답고 채석강이 있어 특히 여름철에 수많은 사람들이 다녀가는 서해안 유명 해변이다. 이들 도시공원과 호수, 해변 등은 각기 다른 기후환경으로 특징적인 미생물 종 다양성을 형성할 것으로 추정되어 그동안 필자 등은 국내 동해안과 남해안 등의 유명 섬, 호수, 해변들[4,6,8,10,15-17,21,22,25,27,29]과 도심 속의 공원들[12]의 야생효모 분포 특성을 조사하여 보고하였다.

본 연구는 대전광역시 월평공원과 전라북도 부안군의 격포항을 중심으로 한 격포해수욕장 주변 야생화와 토양 중의 야생효모의 종 분포 특성을 알아보기 위해 실시되었다. 이를 위해 대전광역시 월평공원 갑천 누리길과 내원사 주변, 전북 부안의 격포 해수욕장의 토양과 야생화 및 식물체 부식물들을 시료로 하여 야생효모들을 분리, 동정하였고 이들 중 국내 미기록 효모들을 선별하여 균학적 특성을 조사하였다. 또한 이들 중 비병원성 균주들을 선별하여 미기록 효모들과 함께 이들의 주요 생리 활성으로 급성 폐 손상 억제 관련 호중구 elastase 저해활성과 대장암 발병 억제 관련 β -glucuronidase 저해활성 등을 측정하였다

재료 및 방법

배지, 효소 및 시약

실험에 사용한 배지로는 Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA) 사 제품의 yeast extract-peptone-dextrose (YPD), yeast extract-malt extract (YM), potato-dextrose (PD) 등을 사용하였다. β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31)는 *Escherichia coli*로부터 생산된 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 사 제품을 사용하였고 호중구 elastase (EC 3.4.21.37)는 Merck Millipore (Billerica, MA, USA) 사 제품을 사용하였다.

기질로 사용한 N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitro-anilide와 ρ -nitrophenyl-D-glucuronide는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 사 제품을 사용하였다. 스트렙토마이신과 엠펜실린 등의 항생 물질은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 사 제품을 사용하였고, 기타 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다.

야생 효모의 분리 및 동정

대전광역시 월평공원(36°19'58.6"N, 127°21'40.3"E)과 전라북도 부안군 격포해수욕장 주변 (35°37'45.5"N, 126°28'10.1"E)의 야생화와 토양들을 2020년 3월과 8월에 모두 3회 110점을 무균적으로 채취하여 멸균 튜브에 넣고, 5 mL의 멸균 수를 첨가한 후 2시간 동안 진탕하였다. 이들 현탁액 일부를 스트렙토마이신(100 μ g/mL)과 엠펜실린(100 μ g/mL)이 들어 있는 YPD (yeast extract-peptone-dextrose) 한천배지에 도말하고 30에서 48시간 배양한 후 형성된 효모 집락들을 분리하였다[21].

분리 효모들의 동정을 위하여 먼저 이들의 26S rDNA의 D1/D2 부위와 5.8S rDNA의 ITS(internal transcribed spacer) 부위의 염기서열들을 결정한 후 이들의 염기서열들을 NCBI의 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)를 사용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 효모들과의 상동성을 비교하여 분자생물학적 유연관계를 분석하여 동정하였다[21].

국내 미기록 효모들의 선별 및 특성

위와 같이 분리한 야생효모들을 대상으로 국립생물자원관 DB와 한국 진균 관련 학술자료들을 이용하여 국내 미기록 효모들을 선별하였다. 이들 미기록 야생 효모 균주들의 형태학적 특성과 배양학적 특성은 일반 미생물 실험법에 따라 조사하였고, 탄수화물의 자화성과 발효성은 최소배지를 이용한 생육 측정과 이산화탄소 생성 유무를 확인하여 측정하였다[22].

호중구 elastase저해활성과 β -glucuronidase저해 활성

위와 같이 분리한 야생효모들 중 비병원성 야생 효모 40균주와 국내 미기록 효모 10균주들을 선별하여 이들을 YPD 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 무세포 추출물을 제조한 후 아래와 같이 급성 폐 손상 억제 관련 호중구 elastase저해활성과 대장암 발병 억제 관련 β -glucuronidase저해활성을 측정하였다.

호중구 elastase 저해 활성; Lee 등[30]이 사용한 방법에 따라 96-well plate에 기질로 0.01 M Tris-HCl (pH 7.5)에 녹인 1.4 mM N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitro-anilide 용액 40 μ l와 위와 같이 제조한 야생 효모 무세포추출물 시료 50 μ l를 분주한 후, 0.01 U elastase 용액 5 μ l을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 그 후 0.2 mg/ml soybean trypsin inhibitor 용액 100 μ l를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 VERSE MAX tunable microplate reader (Molecular Devices, Germany)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식에 의하여 호중구 elastase 저해 활성(%)을 계산하였다.

$$\text{Neutrophil elastase inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{treatment}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

$$\left(\begin{array}{l} A_{\text{treatment}} : \text{처리구의 } 405\text{nm 흡광도} \\ A_{\text{control}} : \text{대조구의 } 405\text{nm 흡광도} \end{array} \right)$$

β-Glucuronidase 저해 활성; 위와 같이 제조한 야생 효모 무세포 추출물 시료 100 μℓ에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 280 μℓ와 10 mM p-nitrophenyl-D-glucuronide 20 μℓ, β-glucuronidase (0.4 unit/ml) 100 μℓ를 혼합 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.25N NaOH 500 μℓ를 가하여 반응을 정지시킨 다음 원심분리(2000 rpm, 10min)한 후 상등액을 취한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[31].

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{C_{\beta\text{-nitrophenol}} - S_{\beta\text{-nitrophenol}}}{C_{\beta\text{-nitrophenol}}} \times 100$$

$$\left(\begin{array}{l} S_{\beta\text{-nitrophenol}} : \text{시험구의 p-nitrophenol 함량(ppm)} \\ C_{\beta\text{-nitrophenol}} : \text{대조구의 p-nitrophenol 함량(ppm)} \end{array} \right)$$

결과 및 고찰

대전광역시 월평공원과 전북 격포해수욕장 주변 야생화와 토양들로부터 야생효모들의 분리 및 동정

대전광역시 월평공원 갑천 누리길과 내원사 주변의 야생화와 토양 75점에서 모두 88균주의 야생효모들을 분리, 동정하였다 (Table 1). 이들 중 *Candida athensensis* WP4-90-3을 포함하는 *Candida* 속 균이 14종 19균주로 가장 많았고 이들 중에는 현재 알코올 발효와 빵 효모 등으로 이용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*와 내염성 효모로 장류 숙성 등에 관여하는 *Zygosaccharomyces rouxii* 등 유용 균주들과 *Candida albicans* 같은 병원성 효모 균주들이 포함하는 많은 야생효모들이 분리되어 자연환경의 효모 종 다양성을 확인할 수 있었다.

또한 전북 부안의 격포해수욕장과 격포항 주변 야생화와 토양 35점에서 야생효모 30종 39균주들이 분리되어 위의 도시공원의 시료 수 대비 야생 효모들의 분리 총 균 수가 비슷하였다 (Table 2). 이 결과는 일반적으로 해수욕장과 항구는 특유의 다습한 환경과 바람, 비교적 높은 염도 및 대체로 유기물이 적은 모래 토양 등 효모들의 서식이 불량한 환경임에도 불구하고 많은 야생효모들이 분리된 것으로 야생 효모의 종 분포 특성의 하나로 추정된다.

국내 미기록 야생 효모들 선별 및 특성

도시공원과 해수욕장 주변 야생화와 토양 등으로부터 분리한 야생효모들 중 *Apiotrichum porosum* ASCM32-1(NIBRFEC000506483), *Apiotrichum scarabaeorum* WP49-1(NIBRFEC000506081), *C. athensensis* WP4-90-3(NIBRFEC000506484), *Candida berkhoutiae* WP34-2(NIBRFEC000506472), *Candida bracarensis* WP35-1(NIBRFEC000506473), *Cyberlindnera amylophila* GP19-1(NIBRFEC000506460), *Kazachstania gamospora* WP9-1(NIBRFEC000506077), *Meyerozyma*

carpopbila BN-17-1(NIBRFEC000506078), *Tetrapisispora namnaensis* WP4-89-1(NIBRFEC000506485), *Vishniacozyma taibaiensis* WP13-2(NIBRFEC000506076) 등 10균주(국립생물자원관 NIBR번호)들이 국내 미기록 효모들로 최종 선별되었으며 이들의 형태적, 배양적 특징과 이들의 phylogenetic tree는 각각 Table 3과 Figs. 1, 2와 같다.

Table 1. Wild yeasts isolated from flowers and soils of Wolpyung park in Daejeon city, Korea.

No.	Putative species	Isolated No.	Related GenBank No.	Identity(%) ¹⁾
1	<i>Apiotrichum scarabaeorum</i>	WP49-1	AF444710.1	604/608(99%)
2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AWP3-3 HP-29-1	KC160604.1 KC160604.1	541/541(100%) 574/575(99%)
3	<i>Bulleromyces albus</i>	AWP2-3	KC433819.1	568/568(100%)
4	<i>Candida albicans</i>	HWP5-19-2	KJ624029.1	612/612(100%)
5	<i>Candida apicola</i>	Y-1-1	JN004197.1	479/479(100%)
6	<i>Candida athensensis</i>	WP4-90-3	FJ196739.1	517/517(100%)
7	<i>Candida berkhoutiae</i>	WP34-2	EF460636.1	456/458(99%)
9	<i>Candida bracarensis</i>	WP35-1	MH545924.1	586/591(99%)
8	<i>Candida intermedia</i>	WP35-2 HH4-1 AH3-1	FJ455102.1 KX609389.1 FJ455102.1	503/503(100%) 512/512(100%) 526/531(99%)
10	<i>Candida metapsilosis</i>	O9-1	MG009551.1	596/600(99%)
11	<i>Candida oleophila</i>	WP5-19-1	AF178052.1	574/574(100%)
12	<i>Candida palmioleophila</i>	HWP4-66-2	JQ650231.1	537/537(100%)
13	<i>Candida parapsilosis</i>	WP4-56-1a	KP852497.1	570/575(99%)
14	<i>Candida pseudohaemulonii</i>	HWP4-58-1	EF177490.1	468/468(100%)
15	<i>Candida pseudolambica</i>	HWP33-1 HP-11-1	KU316731.1 KU316731.1	540/540(100%) 567/570(99%)
16	<i>Candida sake</i>	AHP17-2 HP-13-2	FJ468465.1 MF462787.1	558/558(100%) 566/567(99%)
17	<i>Candida zeylanoides</i>	AWP4-81-1 WP14-5	KU316697.1 JX441613.1	546/546(100%) 577/580(99%)
18	<i>Citeromyces matritensis</i>	O-9-1	KY296062.1	608/616(99%)
19	<i>Cryptococcus aureus</i>	AWP1-2 WP38-4 HHP14-1	HQ641274.1 KT895965.1 EU177572.1	553/556(99%) 572/572(100%) 608/609(99%)
20	<i>Cryptococcus laurentii</i>	WP27-1 AWP9-1 NWP12-1 HWP12-1	KU316736.1 KP789312.1 KU316735.1 KU316755.1	572/572(100%) 593/593(100%) 596/597(99%) 598/599(99%)
21	<i>Cryptococcus magnus</i>	AWP5-9-4	AY242120.1	643/643(100%)
22	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	WP4-75-5	KU316771.1	579/579(100%)
23	<i>Cryptococcus pseudolongus</i>	WP5-33-1	EU289374.1	568/569(99%)
24	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	AWP11-1	KU316725.1	567/567(100%)
25	<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>	DM13-1	AF335988.1	638/639(99%)
26	<i>Debaryomyces hansenii</i>	NH3-1 WP4-76-1 AWP48-1 WP13-1	KU316787.1 KU316760.1 FJ485702.1 KU316787.1	543/543(100%) 543/543(100%) 549/553(99%) 578/581(99%)
27	<i>Hannaella oryzae</i>	AWP12-1 HP-15-3	JN544025.1 JN544025.1	576/576(100%) 592/596(99%)
28	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	B12-3	KU316705.1	610/614(99%)
29	<i>Hanseniaspora vineae</i>	HG14-1	DQ655685.1	564/565(99%)

Table 1. Continued.

No.	Putative species	Isolated No.	Related GenBank No.	Identity(%) ¹⁾
30	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	WP14-7	EF643590.1	519/520(99%)
31	<i>Issatchenkia terricola</i>	HWP5-36-3	AB436451.1	553/554(99%)
32	<i>Kazachstania gamospora</i>	WP9-1	AB198189.1	553/553(100%)
33	<i>Kazachstania humilis</i>	AWP49-1	KF606996.1	505/505(100%)
		WP4-70-1	GU138470.1	545/545(100%)
34	<i>Kazachstania servazzii</i>	CK-15-2	KY107945.1	615/615(100%)
35	<i>Kodamaea ohmeri</i>	WP5-7-1	FM180533.1	536/536(100%)
36	<i>Lachancea fermentati</i>	WP4-92-1	KM234440.1	532/532(100%)
37	<i>Lachancea thermotolerans</i>	AWP4-55-1	KT922390.1	594/594(100%)
38	<i>Meyerozyma caribbica</i>	AHP23-1	MF979202.1	546/546(100%)
		HHP11-1	MF979202.1	546/546(100%)
		HP-28-4	MF979202.1	571/575(99%)
39	<i>Meyerozyma carpophila</i>	BN-17-1	FM180531.1	601/601(100%)
40	<i>Microbotryozyma collariae</i>	WP5-21-3	AB831085.1	533/537(99%)
41	<i>Moesziomyces aphidis</i>	WP31-3	KY992087.1	579/579(100%)
		AHP14-1	KY992087.1	612/617(99%)
		HWP1-1	KY992087.1	616/624(99%)
42	<i>Oenothera odorata</i>	AWP3-1	JX975678.1	577/577(100%)
43	<i>Papiliotrema aspenensis</i>	WP4-77-3	KX621788.1	580/580(100%)
44	<i>Papiliotrema aurea</i>	NHP14-1	KT895965.1	603/609(99%)
45	<i>Papiliotrema flavescens</i>	HP-21-1	MF448286.1	567/567(100%)
		AWP11-2	MF448286.1	597/598(99%)
46	<i>Rhodospordiobolus azoricus</i>	AWP30-1	AF459700.1	523/523(100%)
47	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	WP5-19-3	KC006668.1	620/620(100%)
48	<i>Rhodotorula paludigena</i>	AWP4-52-2	KU316709.1	556/556(100%)
49	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WP5-3	KX428529.1	579/581(99%)
50	<i>Saitozyma podzolica</i>	WP4-65-2	KU167696.1	576/576(100%)
51	<i>Satumispora diversa</i>	WP4-66-1	JQ672608.1	514/515(99%)
52	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	WP17-1	KU316748.1	576/580(99%)
		AHP8-2	KU316748.1	577/581(99%)
		HHP8-1	KU316748.1	578/581(99%)
53	<i>Sporobolomyces camicolor</i>	AWP31-3	KU316784.1	537/537(100%)
		WP31-5	KU316784.1	541/541(100%)
54	<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	WP4-68-1	KU316722.1	553/553(100%)
55	<i>Tetrapisispora namnaoensis</i>	WP4-89-1	AB499028.1	521/521(100%)
56	<i>Tetrapisispora nanseiensis</i>	WP4-69-1	KU316776.1	554/554(100%)
57	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	WP48-2	KY296072.1	556/556(100%)
58	<i>Vanrija humicola</i>	WP4-95-1	KY110010.1	565/565(100%)
		AWP4-77-2	KU316773.1	571/571(100%)
59	<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	WP13-2	JQ968529.1	566/566(100%)
				(Continued)
60	<i>Vishniacozyma tephrensis</i>	WP1-3	JN400781.1	564/566(99%)
61	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	HWP5-3	KT972096.1	579/584(99%)
		HO9-2	HF952838.2	611/616(99%)
62	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	O-5-7	LT631809.2	584/586(99%)

¹⁾Homology of D1/D2 region in 26S rDNA

Table 2. Wild yeasts isolated from flowers and soils of Gykpo beach in Buan of Jeollabuk-do, Korea.

No.	Putative species	Isolated No.	Related GenBank No.	Identity(%) ¹⁾
1	<i>Apiotrichum porosum</i>	ASCM32-1	KU167688.1	580/580(100%)
2	<i>Barnettozyma californica</i>	SCM19-1	DQ377655.1	633/633(100%)
3	<i>Candida melibiosica</i>	HGP26-1	MN203651.1	500/500(100%)
		SCM30-2	MN203651.1	509/511(99%)
4	<i>Candida orthopsilosis</i>	GP26-1	FJ432622.1	561/562(99%)
5	<i>Candida pseudohaemulonii</i>	GP34-1	EF177490.1	492/492(100%)
		AGP34-1	EF177490.1	492/492(100%)
6	<i>Candida vartiovaarae</i>	ATC37-1	KU316734.1	613/619(99%)
7	<i>Cryptococcus flavus</i>	GP14-1	EU177572.1	589/590(99%)
8	<i>Cryptococcus friedmannii</i>	GP24-4	KT427565.1	562/562(100%)
9	<i>Debaryomyces hansenii</i>	AGP2-1	KU316715.1	566/566(100%)
10	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	HGP22-1	KY952846.1	563/563(100%)
11	<i>Microbotryozyma collariae</i>	AGP26-2	AB831085.1	534/537(99%)
12	<i>Moesziomyces aphidis</i>	GP9-1	KY992087.1	589/589(100%)
		AGP5-1	KY992087.1	589/589(100%)
		HCPD8-2b	KY992087.1	589/589(100%)
13	<i>Oenothera odorata</i>	GP5-2	JX975678.1	599/600(99%)
14	<i>Cyberlindnera amylophila</i>	GP19-1	DQ409158.1	566/567(99%)
15	<i>Pichia kudriavzevii</i>	HGP2-1	KU862645.1	559/559(100%)
16	<i>Pichia mexicana</i>	AGP22-1	EF042031.1	488/488(100%)
17	<i>Pichia scolytii</i>	GP1-1	U45788.1	502/506(99%)
		AGP14-2	U45788.1	502/506(99%)
18	<i>Pseudozyma antarctica</i>	GP26-2	JQ650240.1	597/598(99%)
		AGP31-1a	JQ650240.1	597/598(99%)
19	<i>Pseudozyma aphidis</i>	GP9-3	KC763347.1	583/583(100%)
		AGP36-4	KC763347.1	583/583(100%)
		AGP34-3	JX049426.1	593/593(100%)
20	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	AGP14-1	LC333508.1	589/590(99%)
21	<i>Rhodospodium fluviale</i>	AGP34-2	KJ507301.1	577/577(100%)
22	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AGP20-1	LC125984.1	533/533(100%)
23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HGP40-1	MF966571.1	570/572(99%)
24	<i>Sampaiozyma ingeniosa</i>	AHW10-1	AJ749834.1	596/600(99%)
25	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	HGP8-1	EU523635.1	567/567(100%)
26	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	GP24-5	KJ756740.1	534/534(100%)
		AGP24-2	KJ756740.1	534/534(100%)
27	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	HW20-1	FJ468458.1	572/573(99%)
28	<i>Tricholoma matsutake</i>	GP37-1	KJ936989.1	532/532(100%)
29	<i>Trichosporon asahii</i>	HGP22-2	KU316753.1	596/598(99%)
30	<i>Ustilago trichophora</i>	GP23-3	AJ236141.2	596/600(99%)

¹⁾Homology of D1/D2 region in 26s rDNA

형태적, 배양학적 특성: 이들 미기록 효모들은 주로 구형~타원형으로 모두 출아에 의해 영양 증식을 하였고 *V. taibaiensis* WP13-2와 *K. gamospora* WP9-1의 8종의 미기록 효모들은 포자를 형성하지 않은 무포자 효모들이었으며 10균주 모두의 균사를 생성하지 않았다.

또한, *C. berkhoutiae* WP34-2 균주 외 모든 균주들은 YPD 배지와 YM 배지에서 생육하였고 *C. athensensis* WP4-90-3 등 4균주들은 비타민을 첨가하지 않은 YPD 배지에서 생육하지 못하였다. *V. taibaiensis* WP13-2와 *K. gamospora* WP9-1, *T. namnaensis* WP4-89-1 균주들은 15% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 호염성 효모들이었고, *Cy. amylophila* GP19-1 균주는 40°C에서도 생육하는 고온성 효모로서 이들은 내염성 효소와 내열성 효소 등 산업적으로도 유용한 대사산물들을 생산할 것으로 추정된다.

Table 3. Microbiological characteristics of unrecorded wild yeasts from flowers and soils of Wolpyung park in Daejeon city and Gykpo beach in Buan of Jellabuk-do, Korea.

	<i>Apiotrichum scarabaeorum</i>	<i>Apiotrichum porosum</i>	<i>Candida athensensis</i>	<i>Candida berkhoutiae</i>	<i>Candida bracarensis</i>	<i>Meyerozyma carpophila</i>	<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	<i>Kazachstania gamospora</i>	<i>Cyberlindnera amylophila</i>	<i>Tetrapisporia namnaensis</i>
Characteristics	WP49-1	ASCM32-1	WP4-90-3	WP34-2	WP35-1	BN-17-1	WP13-2	WP9-1	GP19-1	WP4-89-1
	NIBRFGC 000506081	NIBRFGC 000506483	NIBRFGC 000506484	NIBRFGC 000506472	NIBRFGC 000506473	NIBRFGC 000506078	NIBRFGC 000506076	NIBRFGC 000506077	NIBRFGC 000506460	NIBRFGC 000506485
Morphological characteristics										
Shape/size (µm)	Global/0.3×0.3	Global/1.5×1.5	Oval/1.7×1.2	Global/0.3×0.3	Oval/1.2×0.8	Oval/1.5×1.0	Oval/1.3×1.2	Global/1.4×1.4	Oval/1.2×1.0	Oval/1.6×1.1
Vegetative reproduction	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding	Budding
Spore/pseudomycelium	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-	-
Cultural characteristics										
Growth on YPD/YM/PD media	+++/+/+	+/+/+	+++/+/+	++/-	+++/+/+/+	+++/+/+/+	++/+/+/+	++/+/+/+	+++/+/+/+	+/+/+
Color on YPD medium	Cream	White	Cream	White	White	White	Cream	White	White	White
Growth										
- vitamin-free medium	+	-	-	-	++	++	++	+	++	-
- 10/20% glucose YPD medium	-	-	+++	+/-	+++	+/+	+/+	+++	+++	+/+
- 5/15% NaCl YPD medium	-	-	+/-	-	-	-	+/+	+/+	-	+/+
- 5/10% ethanol YPD medium	+/-	+/-	+++	-	+++	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
- heavy metal resistance	Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺	Fe ²⁺ , Pb ²⁺	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺	Li ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺	Li ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Hg ²⁺	Li ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Pb ²⁺ , Hg ²⁺	Li ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺	Li ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺	Li ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺	Li ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺
Growth on temp/pH	15-30°C /pH4-7	20-30°C /pH6-7	20-30°C /pH4-8	20-30°C /pH6-7	20-30°C /pH4-8	20-30°C /pH4-7	15-30°C /pH4-8	15-30°C /pH4-8	20-40°C /pH6-7	20-30°C /pH4-8

+: Growth; -: No growth; YPD: Yeast extract-peptone-dextrose; YM: Yeast extract-malt extract; PD: Potato dextrose.

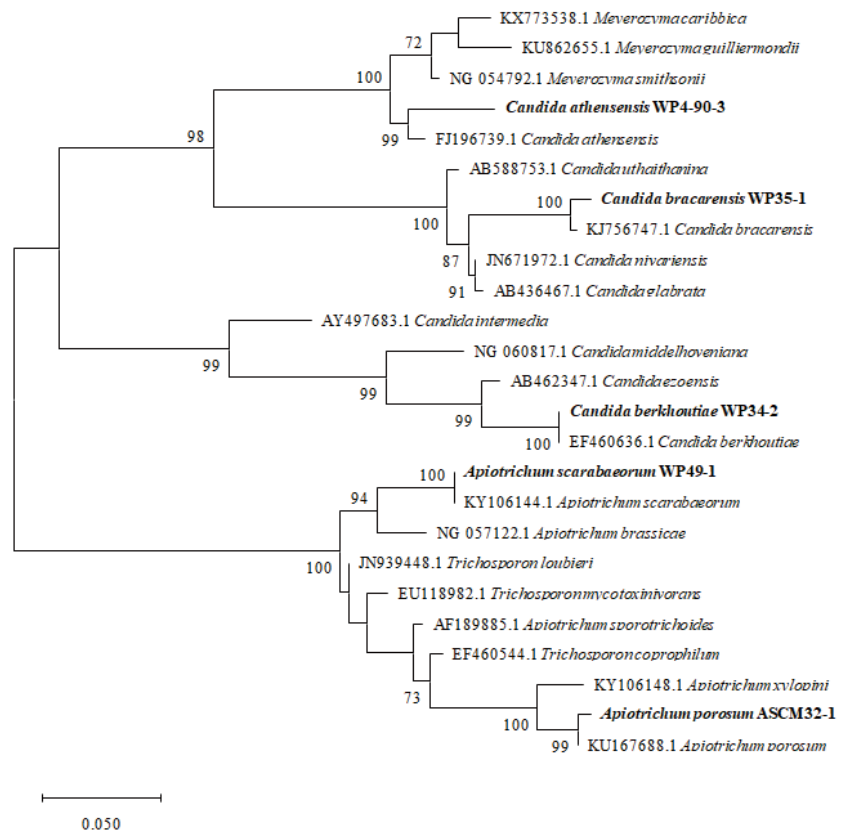


Fig. 1. Phylogenetic tree of the unrecorded yeasts isolated from soils and flowers of Gykpo beach in Buan of Jellabuk-do, Korea, based on the nucleotide sequences of large subunit 26S ribosomal DNA D1/D2 and 5.8S ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA 7. The bar indicates the number of substitutions per position.

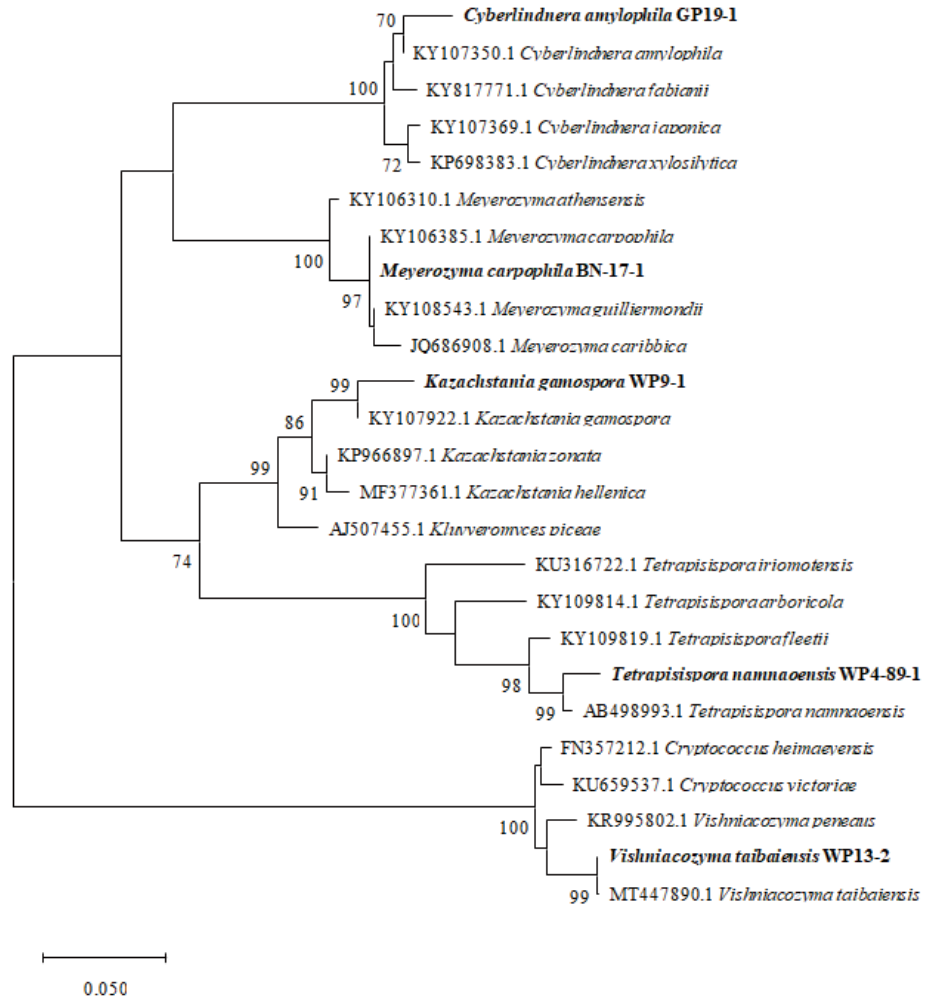


Fig. 2. Phylogenetic tree of the unrecorded yeasts isolated from soils and flowers of Wolpyung park in Daejeon city, Korea, based on the nucleotide sequences of large subunit 26S ribosomal DNA D1/D2 and 5.8S ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA 7. The bar indicates the number of substitutions per position.

에탄올과 증금속에 대한 내성: 10주의 국내 미기록 야생효모들의 에탄올과 증금속들에 대한 내성을 조사한 결과는 Table 3와 같다. *C. berkhoutiae* WP34-2의 모든 균주들이 5% 에탄올 함유 YPD 배지에서 생육하였고 특히, *C. athensensis* WP4-90-3 등 5균주들은 10% 에탄올을 함유한 YPD 배지에서 생육하여 강한 에탄올 내성을 보였다.

한편, 미기록 야생 효모들의 Pb, Hg, Li, Co, Cu, Fe 등의 2가 중금속 이온들에 대한 내성을 조사한 결과 균주마다 다양한 중금속 내성을 보였고 *A. porosum* ASCM32-1의 9균주 모두 Cu^{2+} 에 대하여 400 ppm 내성을 보였다. 특히, *C. athensensis* WP4-90-3 균주는 다른 미기록 효모들에 비하여 많은 중금속들에 대한 내성을 갖고 있었다 (Table 3).

탄소원들에 대한 자화성과 발효성: 미기록 야생효모들의 탄소원으로 당류와 당알코올 및 유기산들에 대한 자화성과 발효성을 조사한 결과 Table 4와 같이 *A. porosum* ASCM32-1 균주 외에 모든 미기록 효모들이 포도당을 자화를 시켰고 *A. scarabaeorum* WP49-1 균주만이 lactose를 자화시켰다. *C. athensensis* WP4-90-3 균주는 xylose를 자화시키면서 발효시켰고 cellobiose도 자화시켜 목질 자원

이나 식물 섬유소 등을 이용한 바이오 연료 생산에 응용성이 있을 것으로 추정되어 추가의 연구가 요구된다. 한편 모든 미기록 효모들이 탄소원으로 구연산을 이용할 수 있었으나 초산은 모두 이용하지 못하였다.

국내 미기록 효모들과 비병원성 효모균들의 호중구 elastase저해 활성과 β-glucuronidase저해 활성

위와 같이 대전광역시 월평공원과 격포해수욕장 주변에서 분리한 야생 효모들 중 국내 미기록 효모들과 비병원성 야생 효모 43균주들의 무세포추출물들을 제조하여 장내 유용 균주들에 대한 유해 효소로 알려진 β-glucuronidase에 대한 저해 활성과 급성 폐 손상 억제에 관련된 호중구 elastase 저해 활성을 측정하였다 (Table 5, 6).

Table 4. Assimilation and fermentation of sugars and sugar alcohols.

Sugars / Sugar alc	Strain No.									
	(Assimilation/fermentation)									
	<i>Apiotrichum scarabaeorum</i>	<i>Apiotrichum porosum</i>	<i>Candida athensensis</i>	<i>Candida berkhoutiae</i>	<i>Candida bracarensis</i>	<i>Meyerozyma carpophila</i>	<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	<i>Kazachstania gamospora</i>	<i>Cyberlindnera amylophila</i>	<i>Tetrapisispora namnaoensis</i>
	WP49-1	ASCM32-1	WP4-90-3	WP34-2	WP35-1	BN-17-1	WP13-2	WP9-1	GP19-1	WP4-89-1
	NIBRFGC 000506081	NIBRFGC 000506483	NIBRFGC 000506484	NIBRFGC 000506472	NIBRFGC 000506473	NIBRFGC 000506078	NIBRFGC 000506076	NIBRFGC 000506077	NIBRFGC 000506460	NIBRFGC 000506485
glucose	+/-	-/-	++/-	+/++	+/-	++/++	-/-	++/+	+/++	++/+
fructose	+/-	-/-	++/-	+/+	+/+	+/++	+/-	+/-	+/++	+/-
galactose	-/-	-/-	++/-	-/-	-/-	+/++	+/-	-/-	-/-	++/++
mannose	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
sucrose	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++/+	-/-	+/-
lactose	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
maltose	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-
raffinose	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	++/-	+/-	+/-	-/-	+/-
cellobiose	+/-	-/-	++/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-
xylose	-/-	-/-	+/++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
starch	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
mannitol	-/-	-/-	++/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-
sorbitol	-/-	-/-	++/-	+/-	-/-	-/-	++/-	-/-	-/-	-/-
citric acid ^a	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++
acetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: assimilated or fermented; -: not assimilated or fermented. ;^a: Only assimilation of citric acid and acetic acid were investigated

Table 5. Anti-acute lung injury human neutrophil elastase inhibitory activities and anti-colon β-glucuronidase inhibitory activities of cell-free extracts from unrecorded wild yeasts.

No.	Putative species	Isolated No.	HNE ¹⁾ inhibitory activity(%)	β-Glucuronidase inhibitory activity(%)
1	<i>Apiotrichum scarabaeorum</i>	WP49-1	n.d ²⁾	n.d
2	<i>Apiotrichum porosum</i>	ASCM32-1	n.d	n.d
3	<i>Candida athensensis</i>	WP4-90-3	n.d	n.d
4	<i>Candida berkhoutiae</i>	WP34-2	n.d	n.d
5	<i>Candida bracarensis</i>	WP35-1	n.d	5.6±0.3
6	<i>Meyerozyma carpophila</i>	BN-17-1	13.5±0.9	n.d
7	<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	WP13-2	6.7±0.7	3.5±1.5
8	<i>Kazachstania gamospora</i>	WP9-1	n.d	27.7±0.7
9	<i>Cyberlindnera amylophila</i>	GP19-1	n.d	n.d
10	<i>Tetrapisispora namnaoensis</i>	WP4-89-1	n.d	9.5±0.6

¹⁾ HNE; Human neutrophil elastase, ²⁾ n.d; not detected

β -Glucuronidase 저해 활성은 *Candida oleophila* WP5-19-1의 무세포 추출물이 49.0%로 가장 높았고 미기록 효모인 *K. gamospora* WP9-1의 무세포 추출물도 27.7%를 보였다. 일반적으로 장내 유균(Probiotics)들의 β -glucuronidase, tryptophanase, azoreductase, nitroreductase 활성이 높아지면 아민류와 같은 독성물질과 변이원 등이 생성되고, 이들이 장 점막에 손상을 주어 대장암 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[31]. 따라서 β -glucuronidase 활성을 저해시키거나 효소 생성을 억제시킴으로 발암원의 생성을 억제하는 것이 바람직하다. 지금까지 β -glucuronidase 저해에 관한 연구로는 한방식품[32], 버섯[33,34] 등에서 이들의 효소 저해 활성이 조사되었을 뿐 효모에서는 아직까지 연구되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서 선발된 β -glucuronidase 저해 활성 우수 효모는 앞으로 대장암 예방이나 치료 소재 개발을 위한 산업적 응용 자원으로 귀중하게 활용될 것으로 사료된다.

한편, 급성 폐 손상 억제 관련 호중구 elastase 저해활성은 *Wickerhamomyces anomalus* HO9-2가 38.4%로 가장 높았고 *M. carpophila* BN-17-1 무세포 추출물도 13.5%를 보였으나 여타의 효모들은 대부분 활성이 없거나 낮았다. 호중구 elastase는 만성 폐쇄성 폐 질환과 포낭성 섬유증 및 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 호중구 elastase 저해 물질을 이용한 급성 폐 손상 예방 소재 개발 연구는 다양한 꽃들에서 여러 가지 phytochemical들을 추출해서 이들의 활성을 조사되었고[35], 일부 버섯 추출물[30]에서 활성이 확인되었을 뿐 대체로 미흡하다. 따라서 본 연구에서 선발된 호중구 elastase 저해 활성 우수 효모는 앞으로 급성 폐 손상 예방이나 치료제 생산에 유용하게 응용될 것으로 사료된다.

적요

많은 사람들이 다녀가는 도시공원과 해변 환경의 효모 특성을 알아보기 위해 대전광역시 월평공원 갑천 누리길과 내원사 주변의 야생화와 토양 75점에서 모두 88균주의 야생 효모들을 분리, 동정하였다. 또한 전북 부안의 격포해수욕장과 격포항 주변 야생화와 토양 35점에서 30균주의 야생 효모들을 분리하였다. 이들 분리 야생 효모들 중 *A. porosum* ASCM32-1, *A. scarabaeorum* WP49-1, *C. athensensis* WP4-90-3, *C. berkhoutiae* WP34-2, *C. bracarensis* WP35-1, *Cy. amylophila* GP19-1, *K. gamospora* WP9-1, *M. carpophila* BN-17-1, *T. namnaoensis* WP4-89-1, *V. taibaiensis* WP13-2 등 10종의 국내 미기록종 후보 균주들을 선별하여 균학적 특성을 확인하였다. 이들 미기록 효모들은 주로 구형~타원형으로 모두 출아방식으로 영양 증식을 하였고 *V. taibaiensis* WP13-2와 *K. gamospora* WP9-1, *C. athensensis* WP4-90-3 외 7종의 미기록 효모들은 자낭포자를 형성하지 않은 무포자 효모들이었으며 *A. porosum* ASCM32-1만이 의균사를 생성하였다. 대부분의 균주들은 YPD 배지와 YM 배지에서 생육하였고 *V. taibaiensis* WP13-2와 *K. gamospora* WP9-1, *T. namnaoensis* WP4-89-1 균주들은 15% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 호염성 효모들이었고, *Cy. amylophila* GP19-1 균주는 40°C에서도 생육하였다. *C. athensensis* WP4-90-3 균주 등 5균주들이 10% 에탄올 내성을 보였고 *C. athensensis* WP4-90-3 균주는 Li^{2+} 등 많은 중금속들에 대해서 내성을 보였다. 국내 미기록 효모들과 비병원성 야생 효모 균주 무세포추출물들의 β -glucuronidase 저해 활성은 *C. oleophila* WP5-19-1의 무세포 추출물이 49.0%로 가장 높았고 미기록 효모인 *K. gamospora* WP9-1의 무세포 추출물도 27.7%를 보였다. 호중구 elastase 저해 활성은 *W. anomalus* HO9-2가 38.4%로 우수하여 건강 소재로 생산에 매우 유용한 균주로 활용될 것으로 기대된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the project(NIBR202002116) on the survey of Korean indigenous species of the National Institute of Biological Resources under the Ministry of Environment, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Lee JS, Lee SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25:448-53.
2. Lee JS, Choi YJ, Kwon SJ, Yoo JY, Chung DH. Screening and characterization of osmotolerant and gas-producing yeasts from traditional Doenjang and Kochujang. *Food and Biotechnol* 1996;5:54-8.
3. Min JH, Ryu JJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Gyejoksan, Oseosan and Baekamsan of Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:47-50.
4. Hyun SH, Mun HY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation of yeasts from wild flowers in Gyonggi-do province and Jeju island in Korea and the production of anti-gout xanthine oxidase inhibitor. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
5. Hyun SH, Lee JK, Park WJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of yeasts from fruits and flowers of orchard in Sinam-myeon of Yesan-gun, Chungcheongnam-do, Korea *Kor J Mycol* 2014;42:21-7.
6. 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.
7. Hyun SH, Min JH, Kim SA, Lee JS, Kim HK. Yeasts associated with fruits and blossoms collected from Hanbat arboretum, Daejeon, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:178-82.
8. 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.
9. Han SM, Hyun SH, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Deogyu mountain and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:47-52.
10. Han SM, Hyun SH, Lee HB, Lee HW, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers collected around Jangseong lake in Jeollanam-do, Republic of Korea, and characterization of the unrecorded yeast *Bullera coprosmaensis*. *Mycobiol* 2015;43:266-71.
11. Han SM, Han JW, Bae SM, Park WJ, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from soils of paddy fields in Daejeon metropolitan city and Chungcheongnam-do, Korea. *Kor J Mycol* 2016;44:1-7.
12. Han SM, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from soils of an herb park in Seoul metropolitan city and characteristics of unrecorded yeasts. *Kor J Mycol* 2016;44:108-115.
13. Han SM, Lee SY, Kim HK, Lee JS. Characterization of wild yeasts Isolated from leaves obtained from Mt. Daedun and Mt. Chilgap, Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:31-42.
14. Han SM, Lee JS. Characterization of unrecorded yeasts Isolated from leaves of trees of Oknyeobong peak and Yeonjasan mountain in Daejeon, Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:23-30.
15. Han SM, Kim HK, Lee HB, Lee JS. Isolation and identification of wild yeasts from freshwaters and soils of Nakdong and Yeongsan river, Korea, with characterization of two unrecorded yeasts. *Kor J Mycol* 2016;44:350-54.

16. Han SM, Lee SY, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of wild yeasts from the waters and bank soils of Daejeoncheon, Gapcheon, and Yedeungcheon in Daejeon metropolitan city, Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:259-69.
17. Han SM, Kim JY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation and characterization of wild yeasts from water and riverside soils of Geumgang midstream in Gongju City, Korea. *Kor J Mycol* 2018;46:98-104.
18. Han SM, Lee SY, Lee JS. Isolation of wild yeasts from humus-rich soil in city park of Daejeon metropolitan city, Korea, and characterization of the unrecorded wild yeasts. *Kor J Mycol* 2018;46:75-82.
19. Kim JY, Han SM, Lee JS. Isolation and tyrosinase inhibitory activity of wild yeasts obtained from soil in the fields of medicinal plants, Ginseng and Korean angelica. *Kor J Mycol* 2018;46:205-11.
20. Han SM, Kim JY, Kim CM, Lee JS. Characteristics of unrecorded wild yeasts obtained from the soil of spices plant fields and its physiological functionality. *Kor J Mycol* 2019;47:75-81.
21. Han SM, Kim JY, Lee JS. Isolation of wild yeasts from the water and riverside soil of Geumgang midstream in Sejong city, Korea, and characterization of unrecorded wild yeasts. *Kor J Mycol* 2019;47:75-81.
22. Kim HK, Kim JY, Han SM, Kim CM, Lee JS. Microbiological characteristics and physiological functionalities of unrecorded wild yeast strains in the soils of Hajodae and Gyungpodae beaches in Korea. *Kor J Mycol* 2019;47:249-58.
23. Han SM, Hyun SH, Kim NM, Lee JS. Antioxidant activity and inhibitory activities of xanthine oxidase and tyrosinase of yeasts from wild flowers in Korea. *Kor J Mycol* 2015;43:99-103.
24. Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Microbiological characteristics and physiological functionality of new records of yeasts from wild flowers in Yokjido, Korea. *Mycobiol.* 2014;42:198-202.
25. Han SM, Lee SY, Lee HB, Lee JS. Isolation of wild yeasts from soils of reed fields in Seocheon-gun county, Chungcheongnam-do, south Korea, and characterization of unrecorded yeasts. *Kor J Mycol* 2017;45:234-50.
26. Kim JY, Han SM, Park SJ, Jang JE, Lee JS. Isolation and characterization of unrecorded wild yeasts obtained from soils of spice fields and mountains. *Kor J Mycol* 2020;48:151-160.
27. Han SM, Park DJ, Kim JY, Lim HJ, Lee HB, Lee JS. Isolation of wild yeasts obtained from waters and soils of riversides in Sangjubo of Nakdong river and Daechung dam of Geumgang midstream, Korea and characterization of unrecorded wild yeasts. *Kor J Mycol* 2020;48:237-49.
28. Kim JS, Lee M, Kim JY, Heo J, Kwon SW, Yun BS, Kim SJ. Distribution and species diversity of wild yeasts isolated from flowers in Korea. *Kor J Mycol* 2020;48:475-84.
29. Jeon YJ, Park S, Hwang H, Park YH, Cheon W, Goh J, Chung N, Mun HY. Seven yeast strains isolated from freshwaters for the first record in Korea. *Kor J Mycol* 2020;48:523-31.
30. Lee IS, Ryoo IJ, Kwon KY, Ahn JS, Yoo ID. Pleurone, a novel human neutrophil elastase inhibitor from the fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*. *J. Antibiotics* 2011;64:587-9.
31. Oh EH, Park JM., Kim SH, Song IG, Han NS, Yoon HS. Biological activities of *Phellinus linteus* mycelium culture with *Cassiae semen* extract on β -glucuronidase inhibitory activity. *Kor J Food Nutr* 2012;25:620-8.

32. Rhee YK, Kim DH, Han MJ. Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on β -glucuronidase and tryptophanase of human intestinal bacteria. Kor J Food Sci Technol 1998;30:199-205.
33. Kim DH, Choi HJ, Bae EA, Han MJ, Park SY. Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal α -glucosidases. J Fd Hyg Safety 1998;13:20-3.
34. Han MJ, Bae EA, Rhee YK, Kim DH. Effect of mushrooms on the growth of intestinal lactic acid bacteria. Kor J Food Sci Technol, 1996;28:947-52.
35. Li ZP, Kim JY, Ban YJ, Park KH. Human neutrophil elastase (HNE) inhibitory polyprenylated acylphloroglucinols from the flowers of *Hypericum ascyron*. Bioorg Chem 2019;90:103075.