

RESEARCH ARTICLES

항염증 물질 생산 능력이 우수한 야생효모의 선별 및 이들의 균학적 특성

배상민, 한상민, 이종수*

배재대학교 바이오·의생명공학과

Screening of Anti-inflammatory Compound-producing Wild Yeasts and Their Microbiological Characteristics

Sang-Min Bae, Sang-Min Han, Jong-Soo Lee*

Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea

*Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr

Abstract

To screen for potent anti-inflammatory compound-producing yeasts, we evaluated nitric oxide production inhibitory activities in RAW 264.7 macrophage cells using cell-free extracts from 182 non-pathogenic yeasts. *Rhodotorula graminis* YJ36-1 and *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 showed high inhibitory activities of 57.4% and 47.0%, respectively. The microbiological characteristics of these yeasts were investigated. *Rhodotorula graminis* YJ36-1 formed ascospores and pseudomycelium. This species grew well at 25°C in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium, vitamin-free medium, and 5% NaCl-containing YPD medium. *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 was an asporogenous yeast and did not form pseudomycelium. This strain also grew well at 30°C in YPD medium, vitamin-free medium, and 5% NaCl-containing YPD medium.

Keywords: Anti-inflammatory, Nitric oxide inhibitor, RAW264.7, Wild yeast

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 September, 45(3): 212-223
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170025>

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Received: 19 June, 2017

Revised: 9 August, 2017

Accepted: 20 August, 2017

© 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

염증은 생체 피부 등의 여러 조직에 강한 열이나 강알칼리, 강산 등의 외부 자극원이나 조직의 손상, 감염성 병원체의 침입 등의 다양한 원인에 의하여 유발되며 이러한 염증으로부터 인체를 보호하는 기전 중의 하나가 염증반응이다[1, 2]. 염증반응은 대식세포, 혈관 평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등 여러 세포에서 여러 가지 외부 자극이나 병원체 등에 의해 손상된 조직을 치유하기 위해 국소에서 일어나는 복잡한 생체반응이며 cytokine 등이 관여한다[2]. 그러나 계속된 염증 반응은 조직이 불게 붓고 열이 나며 본래의 기능을 상실하여 통증을 유발하게 되고 점막손상을 촉진 할 뿐만 아니라, 암, 류머티스 관절염, 동맥경화, 위염,

천식 등을 유발할 수 있다[1]. 또한, 염증반응을 통하여 생성된 nitric oxide는 신호전달과 체내방어, 신경독성 등의 다양한 생리기능성과 종양이나 세균들을 제거하는 기능을 수행한다. 그러나 nitric oxide가 체내에 과도하게 생성, 축적 되면 조직의 손상이나 혈관의 투과성 증가에 의한 부종 등의 염증반응을 활성화시키고 나아가 염증유발물질들의 생합성을 증진시켜 염증을 심화시키므로 인체에 피해를 주게 된다[3]. 따라서 염증 반응에서 염증유발물질인 interferon- γ , interleukin1- β 등의 cytokine과 nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 등의 발현 또는 생성 억제를 통하여 nitric oxide와 prostaglandin E₂의 생성을 억제시키므로 항염증 효과를 확인할 수 있다. 지금까지 항염증 물질생산에 관한 연구로는 적하수오[4], 홍삼[5], 홍자단[6] 등과 목질진흙버섯[7, 8], 차가버섯(자작나무시루뻨버섯) [9, 10], 말굽버섯[11] 등의 버섯[1, 3, 12] 및 키위[13], 밀배아유[14], 진두발[15] 등 주로 약용식물과 천연물 등의 추출물에서 항염증 효과에 관하여 연구, 보고되었다. 한편, 효모는 진균류의 일종으로 최근 이로부터 다양한 대사산물의 생산과 이들에 대한 응용성들이 연구되어 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해물질[16-18]과 항치매성 B-secretase 저해물질[19]과 acetylcholine esterase 저해 물질[20], 혈전용해 활성물질[21], 혈관신생 억제물질[22], 미백성 Tyrosinase 저해물질 [23], 정미성 리보핵산 물질[24]과 killer 독성물질[25]과 같은 다양한 생리 기능성 물질 생산과 이들의 특성들이 보고되었다. 그러나, GRAS균이면서 오래 전부터 전통 발효식품 등에 널리 사용되어 오고 있는 효모로부터 항염증 물질의 생산과 산업적 응용에 관해서는 아직 연구되지 않았다. 따라서 효모를 이용하여 새로운 항염증물질을 생산하고자 본 연구에서는 필자 등이 최근 몇 년간 야생화 등에서 분리, 동정한 효모 중 비병원성 효모들의 무세포추출물을 제조한 후 이들의 lipopoly-saccharide에 의해 활성화된 RAW264.7 macrophage 세포에서 생성되는 nitric oxide 생성 억제활성을 측정하여 항염증 효과를 가진 우수효모 균주를 선발하였다. 또한 이들의 미생물학적 특성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

효모 및 실험재료

실험에 사용한 효모는 배재대학교 생물공학연구실에서 2012년부터 울릉도 등의 주요 섬과 덕유산 등의 주요 산들의 야생화에서 분리, 동정한 야생효모 중 비 병원성 효모 182 균주를 사용하였다[26-30]. Dulbecco's Modified Eagle 배지(HyClone, South Logan, UT, USA)와 Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 등을 세포배양에 사용하였다. lipopolysaccharide (*E. coli* B0111:B4; Sigma-Aldrich)와 Griess시약 등을 nitric oxide (NO) 정량에 사용하였으며, 기타 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

효모 배양 및 무세포 추출물 제조

비병원성 야생효모 182 균주를 yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 침전된 cell pellets을 얻었다. 다시 Tris-HCL buffer로 3번의 세척 후 bead를 이용하여 세포를 파쇄한 다음 원심분리한 후 상층액을 모아 동결건조하여 무세포 추출물을 제조하였다.

세포배양

대식세포 계열인 RAW 264.7 세포를 한국세포주은행에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 10% Fetal Bovine Serum과 1% penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle 배지에 세포를 접종하여 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 약 80~90%의 세포들이 생육하였을 때 계대배양을 하였다[1, 31].

Nitric oxide 생성 저해율 측정

RAW 264.7 세포에서 생성되는 활성질소인 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 측정하였다[1]. 먼저 RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/mL로 48-well plate에 150 μ L를 분주하고 2시간 후에 효모 무세포 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 μ g/mL로 30 μ L씩, lipopolysaccharide (LPS)를 1 μ g/mL로 30 μ L씩 분주한 후 37°C에서 CO₂ incubator로 24시간 배양하였다. 활성화시킨 RAW 264.7 세포배양액 100 μ L를 96-well plate에 옮겨 Griess 시약 100 μ L와 혼합하여 상온에서 10분간 반응 시킨 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 함량을 NaNO₂의 표준곡선을 이용하여 측정하였다[1, 3]. 또한 아래와 같이 NO 생성 저해율을 계산 하였다.

$$\text{NO 생성 저해율(\%)} = [(C - T) / C] \times 100$$

(T: 시료첨가구의 A₅₄₀, C: 무첨가구의 A₅₄₀)

결과 및 고찰

효모 무세포 추출물들의 nitric oxide 생성 저해활성

우리나라 주요 섬에서 분리하여 선별한 비병원성 효모들의 무세포 추출물들의 NO 생성 저해활성을 측정한 결과는 Table 1, 2와 같다. 먼저 전라북도 선유도 분리 효모 균주들에서는 *Metschnikowia reukaufii* SY20-7, *Rhodotorula ingeniosa* SY1-1, *Yarrowia lipolytica* SY51-1, SY51-3 균주들의 무세포 추출물들이 30% 이상의 NO 생성 저해활성을 보였고 이들 중 *Metschnikowia reukaufii* SY20-7이 38.7%로 가장 높은 NO 생성 저해활성을 보였다.

경상남도 욕지도 분리 효모 균주들에서는 *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2, *Rhodotorula graminis* YJ36-1, *Rhodotorula nothofagi* YJ1-1, YJ22-2 균주들의 추출물들이 30% 이상의 NO 생성 저해활성을 보였고 *Rhodotorula graminis* YJ36-1의 무세포추출물이 57.4%로 가장 높았다. 경상북도 울릉도 분리 효모 균주들에서는 *Metschnikowia koreensis* UL32-1의 무세포추출물이 32.7%를 보였고 *Sporobolomyces carnicolor* UL32-3이 37.2%의 NO 생성 저해활성을 보였을 뿐 여타의 균주들은 30% 미만의 저해활성을 보였다.

그러나 대전광역시 계족산, 충청남도 오서산, 전라북도 덕유산, 전라남도 백암산 등의 분리효모 균주들에서는 30% 이상의 NO 생성 저해활성을 보이는 균주들은 없었다(Table 3).

이상의 결과들을 종합하였을 때 유포자효모인 *Rhodotorula graminis* YJ36-1와 무포자효모인 *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2균주의 무세포추출물들이 각각 57.4%와 47.0%의 비교적 높은 NO 생성 저해활성을 보여 항염물질 생산 우수 효모균주들로 최종 선발하였다.

Table 1. Inhibitory activities of nitric oxide production from cell-free extracts of wild yeasts isolated in flowers of Seonyudo and Yokjido, Korea

No.	Putative species	Isolate no.	Nitric oxide inhibitory activity (%)
1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	SY8-1	21.8
		SY8-2	13.1
2	<i>Kazachstania servazzii</i>	SY14-3	17.8
3	<i>Kazachstania unispora</i>	SY14-1	24.2
4	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	SY20-1	11.5
		SY20-7	38.7
		SY32-1	18.3
		SY33-1	17.5
		SY33-7	18.4
		SY38-1	9.0
		SY38-2	25.5
		SY44-6	23.9
		SY44-7	21.9
		SY46-5	n.d*
		SY46-7	8.4
5	<i>Occultifur externus</i>	SY5-2	25.7
6	<i>Pichia holstii</i>	SY20-2	19.3
7	<i>Pichia scolyti</i>	SY3-1	24.7
		SY3-4	21.8
8	<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	SY4-2	n.d
		SY4-5	n.d
9	<i>Rhodotorula ingeniosa</i>	SY1-1	33.2
10	<i>Rhodotorula minuta</i>	SY47-2	16.4
		SY47-4	20.6
11	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	SY7-3	15.6
12	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	SY34-2	n.d
		SY34-4	14.2
		SY42-4	21.7
13	<i>Yarrowia lipolytica</i>	SY51-1	45.3
		SY51-3	37.5
14	<i>Fibulobasidium inconspicuum</i>	YJ52-1	25.4
15	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	YJ38-1	27.2
		YJ38-3	24.3
16	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	YJ12-1	23.7
		YJ13-1	24.2
		YJ30-1	26.5
		YJ35-2	24.5
		YJ39-2	29.7
		YJ42-3	22.6
		YJ45-3	22.7
		YJ51-2	27.6
17	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	YJ34-3	24.0
		YJ34-2	47.0

Numbers 1~13 indicate yeasts isolated from Seonyudo and numbers 14~27 yeasts from Yokjido.

*n.d, not detected.

Table 1. Inhibitory activities of nitric oxide production from cell-free extracts of wild yeasts isolated in flowers of Seonyudo and Yokjido, Korea (Continued)

No.	Putative species	Isolate no.	Nitric oxide inhibitory activity (%)
18	<i>Pichia scolytii</i>	YJ14-2	15.3
19	<i>Pseudozyma</i> sp.	YJ37-2	29.2
20	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	YJ41-4	25.0
21	<i>Rhodotorula glutinis</i>	YJ35-4	4.6
		YJ42-4	25.8
		YJ54-2	25.8
22	<i>Rhodotorula graminis</i>	YJ48-2	4.1
		YJ20-3	20.6
		YJ36-1	57.4
23	<i>Rhodotorula minuta</i>	YJ27-1	13.3
24	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	YJ39-1	23.5
		YJ4-4	26.9
		YJ5-2	11.2
		YJ16-1	17.2
		YJ19-1	20.3
		YJ37-1	20.5
		YJ38-4	22.7
		YJ42-2	2.8
		YJ46-1	29.4
		YJ34-7	30.1
25	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	YJ1-1	43.3
		YJ22-2	40.9
26	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	YJ10-3	n.d
27	<i>Rhodotorula</i> sp.	YJ38-2	22.1

Numbers 1~13 indicate yeasts isolated from Seonyudo and numbers 14~27 yeasts from Yokjido.

*n.d, not detected.

Table 2. Inhibitory activities of nitric oxide production from cell-free extracts of wild yeasts isolated in flowers of Ulleungdo and Jeju island, Korea

No.	Putative species	Isolate no.	Nitric oxide inhibitory activity (%)
1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	UL19-1	19.4
2	<i>Kuraishia capsulata</i>	UL40-2	16.2
3	<i>Metschnikowia koreensis</i>	UL28-3	16.3
		UL32-1	32.7
		UL37-1	n.d*
		UL38-2	n.d
		UL48-1	24.1
4	<i>Metschnikowia reukauffii</i>	UL22-1	17.5
		UL22-3	13.7
		UL28-1	20.7
		UL3-1	n.d
		UL45-2	n.d
5	<i>Metschnikowia viticola</i>	UL19-3	n.d
6	<i>Meyerozyma caribbica</i>	UL10-1	2.5
		UL5-1	n.d

Numbers 1~17 indicate yeasts isolated from Ulleungdo and numbers 18~28 yeasts from Jeju island.

*n.d, not detected.

Table 2. Inhibitory activities of nitric oxide production from cell-free extracts of wild yeasts isolated in flowers of Ulleungdo and Jeju island, Korea (Continued)

No.	Putative species	Isolate no.	Nitric oxide inhibitory activity (%)
7	<i>Pichia guilliermondii</i>	UL47-1	9.5
8	<i>Pichia mexicana</i>	UL26-1	25.2
		UL29-4	17.5
		UL16-2	21.2
		UL7-3	2.4
		UL8-3	26.4
9	<i>Pichia scolytii</i>	UL23-2	24.7
		UL25-2	19.3
		UL33-1	25.2
		UL9-2	28.3
10	<i>Pichia silvicola</i>	UL6-1	19.3
		UL25-3	29.0
11	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	UL29-2	19.4
12	<i>Rhodospiridium fluvialeno</i>	UL15-3	10.1
13	<i>Rhodotorula glutinis</i>	UL25-6	8.1
		UL26-3	n.d
		UL31-3	1.1
		UL42-3	6.0
14	<i>Rhodotorula graminis</i>	UL20-3	13.2
		UL9-3	0.3
		UL6-4	1.8
		UL35-3	13.6
		UL36-4	7.3
15	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	UL17-2	24.8
		UL46-4	19.2
16	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	UL42-5	26.0
17	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	UL32-3	37.2
18	<i>Debaryomyces hansenii</i>	80-J-2	15.1
		89-J-2	12.5
19	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	67-J-3	8.5
20	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	66-J-1	n.d
21	<i>Nakazawaea holstii</i>	63-J-1	n.d
		83-J-1	5.8
22	<i>Pichia guilliermondii</i>	89-J-1	12.4
23	<i>Pseudozyma aphidis</i>	66-J-2	17.0
		77-J-1	n.d
		64-J-1	n.d
		94-J-3	10.2
24	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	84-J-1	16.7
		86-J-2	19.4
		90-J-2	15.0
25	<i>Pseudozyma</i> sp.	71-J-1	29.2

Numbers 1~17 indicate yeasts isolated from Ulleungdo and numbers 18~28 yeasts from Jeju island.

*n.d, not detected.

Table 2. Inhibitory activities of nitric oxide production from cell-free extracts of wild yeasts isolated in flowers of Ulleungdo and Jeju island, Korea (Continued)

No.	Putative species	Isolated no.	Nitric oxide inhibitory activity (%)
26	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	86-J-1	25.8
		89-J-3	10.9
		92-J-2	10.1
		94-J-2	7.8
27	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	63-J-2	n.d
		65-J-1	3.3
		70-J-1	4.2
		87-J-1	n.d
		94-J-1	7.8
28	<i>Starmerella bombicola</i>	95-J-2	6.8
		80-J-1	n.d

Numbers 1~17 indicate yeasts isolated from Ulleungdo and numbers 18~28 yeasts from Jeju island.

*n.d, not detected.

Table 3. Inhibitory activities of nitric oxide production from cell-free extracts of wild yeasts isolated in flowers of Gyejoksan, Oseosan, Deokyusan and Baekamsan, Korea

No.	Putative species	Isolated no.	Nitric oxide inhibitory activity (%)
1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	72-D-4	18.7
2	<i>Filobasidium floriforme</i>	343-D-1	29.6
3	<i>Hannaella oryzae</i>	344-D-1	24.9
4	<i>Pseudozyma aphidis</i>	72-D-2	24.3
5	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	91-D-2	10.9
		91-D-1	5.5
6	<i>Rhodotorula glutinis</i>	73-D-2	23.6
		344-D-2	21.2
7	<i>Rhodotorula minuta</i>	73-D-1	13.2
8	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	73-D-3	18.4
9	<i>Metschnikowia sp.</i>	379-CO-3	2.7
10	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	371-CO-1	5.0
11	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	380-CO-1	16.7
12	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	380-CO-3	14.6
13	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	374-CO-2	17.4
		376-CO-2	15.3
14	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	374-CO-1	24.5
15	<i>Metschnikowia koreensis</i>	DU4-1	16.3
16	<i>Metschnikowia sp.</i>	DU12-3	2.7
17	<i>Rhodotorula graminis</i>	DU12-2	23.6
18	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	DU1-3-1	26.0
19	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	DU15-3	22.2
20	<i>Bullera japonica</i>	405-JB-1	14.6
21	<i>Bulleromyces albus</i>	395-JB-2	18.4
		399-JB-2	11.7

Numbers 1~8 indicate yeasts isolated from Gyejoksan, numbers 9~14 yeasts from Oseosan, numbers 15~19 yeasts from Deokyusan, and numbers 20~35 yeasts from Baekamsan.

*n.d, not detected.

Table 3. Inhibitory activities of nitric oxide production from cell-free extracts of wild yeasts isolated in flowers of Gyejoksan, Oseosan, Deokyusan and Baekamsan, Korea (Continued)

No.	Putative species	Isolated no.	Nitric oxide inhibitory activity (%)
22	<i>Dioszegia takashimae</i>	407-JB-1	13.5
		408-JB-2	9.3
23	<i>Filobasidium floriforme</i>	394-JB-1	12.4
		396-JB-1	12.5
24	<i>Hannaella oryzae</i>	401-JB-1	n.d*
25	<i>Metschnikowia</i> sp.	397-JB-2	n.d
		387-JB-1	n.d
		404-JB-1	2.1
26	<i>Pseudozyma antarctica</i>	123-Z-4	1.2
27	<i>Pseudozyma aphidis</i>	121-Z-2	6.8
28	<i>Rhodospiridium fluviale</i>	391-JB-3	13.8
		399-JB-1	8.7
29	<i>Rhodotorula glutinis</i>	115-Z-1	23.6
		115-Z-4	19.5
30	<i>Rhodotorula</i> sp.	409-JB-1	22.1
31	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	405-JB-3	26.0
32	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	402-JB-1	17.5
		387-JB-3	19.4
33	<i>Sporobolomyces oryzicola</i>	407-JB-2	n.d
34	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	404-JB-2	22.2
35	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	121-Z-1	n.d
		121-Z-3	4.5

Numbers 1~8 indicate yeasts isolated from Gyejoksan, numbers 9~14 yeasts from Oseosan, numbers 15~19 yeasts from Deokyusan, and numbers 20~35 yeasts from Baekamsan.

*n.d, not detected.

지금까지 항염증물질 생산 연구는 주로 약용 식물들과 일부 버섯자실체들의 추출물들을 대상으로 실시되어왔고[4-15, 31], Nguyen 등[3]은 산느타리 버섯의 메탄올 추출물에 함유되어 있는 페놀성 물질이, Park 등[11]은 말굽버섯의 메탄올 추출물에 함유되어 있는 fomentariol 물질이 항염활성을 나타낸다고 보고하였다.

본 연구는 비병원성이며 영양요구성이 단순하고 배양이 비교적 용이하여 산업적 응용성이 클 뿐만 아니라 진균으로서 대체의약이나 건강소재 개발에 매우 유리한 효모로부터 항염증물질 생산이 가능함을 처음 제시하고 있다. 현재, 선발 균주들의 세포독성과 이들을 이용한 항염증물질 대량생산 조건의 최적화 및 물질특성 규명 등에 관한 추가의 연구가 진행되고 있다.

항염활성 우수효모들의 미생물학적 특성

항염물질생산 우수균주로 최종 선발된 *Rhodotorula graminis* YJ36-1과 *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2의 계통수는 Fig. 1과 같고 이들의 미생물학적 특성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 두 균주 모두 타원형으로 출아법으로 무성생식 하였고 YPD, YM, PD, vitamin-free 배지에서 잘 생육하였으며 5% NaCl이 함유된 YPD 배지에서 잘 생육하는 내염성 효모들이었다.

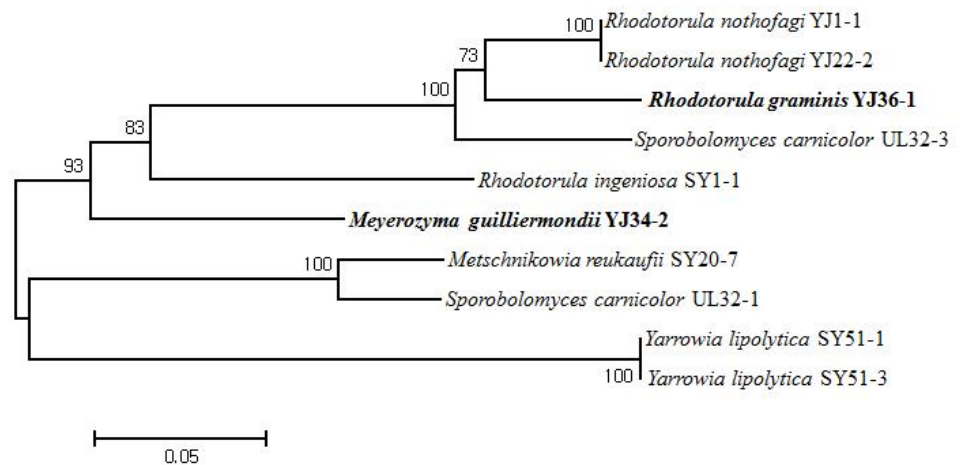


Fig. 1. Phylogenetic tree of the finally selected yeasts, *Rhodotorula graminis* YJ36-1 and *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 based on the nucleotide sequences of the large subunit 26S ribosomal DNA. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MEGA v5.1.

각 균주들의 특성을 보면 *Rhodotorula graminis* YJ36-1는 위균사와 자낭포자를 형성하였고 크기는 $1.5 \times 0.8 \mu\text{m}$ 이었으며 $15\sim 25^\circ\text{C}$ 와 pH 4~8에서 잘 생육하였다. YPD 한천 배지에서 형성된 colony의 색은 핑크색이었고 xylose, D-glucose, D-galactose, D-cellobiose, D-maltose, D-saccharose, D-melezitose, D-raffinose, adonitol, xylitol, glycerol, calcium 2-keto-gluconate, methyl- α D-glucopyranoside 등을 자화시켰으나 이들 모두 발효시키지 못했다.

Meyerozyma guilliermondii YJ34-2는 위균사와 자낭포자를 형성하지 않았고 크기는 $1.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ 이었으며 $15\sim 40^\circ\text{C}$ 와 pH 4~7에서 잘 생육하였다. YPD 한천 배지에서 형성된 colony의 색은 크림색이었고 L-arabinose, xylose, D-glucose, D-galactose, D-cellobiose, D-maltose, D-saccharose (sucrose), D-trehalose, D-melezitose, D-raffinose, adonitol, xylitol, glycerol, calcium 2-keto-gluconate, methyl- α D-glucopyranoside, N-acetyl-glucosamine 등의 탄소원들을 자화시켰으나 L-arabinose, D-glucose, D-saccharose 만을 발효시켰다.

적 요

비병원성 야생효모들로부터 새로운 항염물질을 생산하고자 우리나라 주요 섬과 산에서 분리, 동정한 야생 효모들 중 비병원성 효모들의 무세포 추출물들을 제조하여 이들의 nitric oxide (NO) 생성 저해활성을 측정하였다. 182 균주 중 *Metschnikowia reukaufii* SY20-7, *Rhodotorula ingensiosa* SY1-1, *Yarrowia lipolytica* SY51-1, 51-3, *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2, *Rhodotorula graminis* YJ36-1, *Rhodotorula nothofagi* YJ1-1, YJ22-2, *Metschnikowia koreensis* UL32-1, *Sporobolomyces carnicolor* UL32-3 등 10 균주들의 무세포 추출물들이 30% 이상의 NO 생성 저해활성을 보였다. 이들 중 유포자효모들에서는 *Rhodotorula graminis* YJ36-1가 가장 높은 57.4%의 NO 생성 저해활성을 보였고 무포자효모들에서는 *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2가 47.0%로 가장 높아 항염물질생산 우수효

Table 4. Microbiological characteristics of the finally selected anti-inflammatory yeasts

	<i>Rhodotorula graminis</i> YJ36-1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> YJ34-2
Morphological characteristics		
Shape	O	O
Vegetative reproduction	B	B
Size (μm)	1.5 × 1.0	1.5 × 0.8
Ascospore	+	—
Pseudomycelium	+	—
Cultural characteristics		
Growth on YM/YPD media	++/+++	+++/>++
Growth/color on YPD medium	+++/>P	++/>C
Growth on Vitamin-free medium	++	+++
Growth on 50% glucose-YPD medium	—	—
Growth on 5%/20% NaCl-YPD medium	+/>—	++/>—
Growth on temp/pH range	15~25°C/pH 4~8	15~40°C/pH 4~8
Assimilation/fermentation on carbon sources		
L-arabinose	—	+
Xylose	+/>—	+/>—
D-Glucose	+/>—	+/>+
D-Galactose	+/>—	+/>—
D-Cellobiose	+/>—	+/>—
D-Lactose	—/>—	—/>—
D-Maltose	+/>—	+/>—
D-Saccharose (sucrose)	+/>—	+/>+
D-Trehalose	—	+
D-Melezitose	+	+
D-Raffinose	+/>—	+/>—
Adonitol	+	+
Xylitol	+	+
Inositol	—	—
D-Sorbitol	+	+
Glycerol	+/>—	+/>—
Calcium 2-keto-gluconate	+	+
Methyl-α D-Glucopyranoside	+	+
N-Acetyl-Glucosamine	—	+

YPD, yeast extract-peptone-dextrose; O, Oval; B, Budding; P, Pink; C, Cream.

모로 최종 선별하였다. 선별된 야생효모들의 미생물학적 특성을 조사한 결과 *Rhodotorula graminis* YJ36-1 균주는 자낭포자와 위균사를 형성하였고 25°C에서 잘 생육하였으며 *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2는 자낭포자와 위균사를 형성하지 않았고 30°C, 5%의 NaCl 함유 YPD 배지에서도 잘 생육하였다. 또한, 두 효모 모두 pH 4.0~8.0에서 생육하였고

YM, PD, YPD, 비타민 무함유 배지 등에서 잘 생육하였다.

Acknowledgements

This work was supported by the research grant of Pai Chai University in 2017.

REFERENCES

1. Seo DW, Yi YJ, Lee MS, Yun BS, Lee SM. Differential modulation of lipopolysaccharide induced inflammatory cytokine production by and antioxidant activity of fomentariol in RAW264.7 cells. *Mycobiology* 2015;43:450-7.
2. Kim B, Kim JI, Kim HR, Byun DS. Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoi* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. *Korean J Fish Aquatic Sci* 2014;47:527-36.
3. Nguyen TK, Im KH, Choi J, Shin PG, Lee TS. Evaluation of antioxidant, anti-cholinesterase, and anti-inflammatory effects of culinary mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Mycobiology* 2016;44:291-301.
4. Lee E, Kim H, Yu JM, Cho YH, Kim DI, Shin Y, Cho Y, Kwon OJ, An B. Anti-inflammatory effect of *Polygonum multiflorum* extraction in activated RAW 264.7 cells with lipopolysaccharide. *Kor J Food Preserv* 2014;21:740-6.
5. Choi KM, Hwang SM, Lim JY, Ko ES, Park JH, Moon JH, Lee MJ, Jang JE, Cha JD. Red ginseng ethanol extract suppressed Ag I/II-induced up-expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages. *Microbiol Biotechnol Lett* 2015;43:158-63.
6. Lee JY, Jin KS, Kwon HJ, Kim BW. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Cotoneaster horizontalis* Decne extract. *Microbiol Biotechnol Lett* 2015;43:280-5.
7. Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH, Lim MH, Chang W, Lim S, Choi S, et al. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF-kappaB and MAPKs activation in lipopolysaccharide induced RAW 264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol* 2007;114:307-15.
8. Kim SH, Song YS, Kim SK, Kim BC, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J Ethnopharmacol* 2004;93:141-6.
9. Park YM, Won JH, Kim YH, Choi JW, Park HJ, Lee KT. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J Ethnopharmacol* 2005;101:120-8.
10. Ma L, Chen H, Dong P, Lu X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chem* 2013;139:503-8.
11. Park YM, Kim IT, Park HJ, Choi JW, Park KY, Lee JD, Nam BH, Kim DG, Lee JY, Lee KT. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius*. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1588-93.
12. Shao HJ, Jeong JB, Kim KJ, Lee SH. Anti-inflammatory activity of mushroom-derived hispidin through blocking of NF- κ B activation. *J Sci Food Agric* 2015;95:2482-6.
13. An X, Lee SG, Kang H, Heo HJ, Cho YS, Kim DO. Antioxidant and anti-inflammatory effects of various cultivars of kiwi berry (*Actinidia arguta*) on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J Microbiol Biotechnol* 2016;26:1367-74.
14. Kang BK, Kim MJ, Jeong DH, Kim KB, Bae NY, Park JH, Park SH, Ahn DH. Anti-inflammatory effect of wheat germ oil on lipopolysaccharide-stimulated RAW

- 264.7 cells and mouse ear edema. *Microbiol Biotechnol Lett* 2016;44:236-45.
15. Bae NY, Kim MJ, Kim KB, Park JH, Park SH, Sung NY, Byun EH, Ahn DH. Anti-inflammatory effect of *Chondrus ocellatus* Holmes ethanol extract on lipopolysaccharide induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *Microbiol Biotechnol Lett* 2016; 44:268-77.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Min JH, Kim YH, Kim JH, Choi SY, Lee JS, Kim HK. Comparison of microbial diversity of Korean commercial Makgeolli showing high β -glucan content and high antihypertensive activity, respectively. *Mycobiology* 2012;40:138-41.
 19. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antidementia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2007;42:83-8.
 20. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* 2008;36:102-5.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Lee JS, Hyun KW, Jeong SC, Kim JH, Choi YJ, Miguez CB. Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and physiological activities. *Can J Microbiol* 2004;50:489-92.
 25. Lee JS, Yi SH, Kim JH, Yoo JY. Isolation of wild killer yeast from traditional Meju and production of killer toxin. *Kor J Biotechnol Bioeng* 1999;14:434-9.
 26. Hyun SH, Han SM, Lee JS. Isolation and physiological functionality of yeasts from wild flowers in Seonyudo of Gogunsanyelodo, Jeollabuk-do, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42: 201-6.
 27. Min JH, Ryu JJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeast from wild flowers in Gyejoksan, Oseosan and Beakamsan of Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:47-51.
 28. 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.
 29. 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. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
 30. Han SM, Hyun SH, Lee JS. Isolation and identification of yeast from wild flowers in Deogyu mountain and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:47-52.
 31. Han ES, Oh JY, Park HJ. *Cordyceps militaris* extract suppresses dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and production of inflammatory mediators from macrophages and mast cells. *J Ethnopharmacol* 2011;134:703-10.