

RESEARCH ARTICLE

Lipopolysaccharide로 유도한 RAW 264.7 세포에 대한 *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2와 *Rhodotorula graminis* YJ36-1의 항염활성과 Nitric Oxide 생성 저해물질의 생산

배상민, 한상민, 이종수*

배재대학교 바이오·의생명공학과

Anti-inflammatory Activity of Wild Yeasts, *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 and *Rhodotorula graminis* YJ36-1, on Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide in RAW 264.7 Cells Through the Inhibition of Nitric Oxide and Cytotoxic Effects

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

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 December, 45(4): 336-344
https://doi.org/10.4489/KJM.20170039

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Received: 17 October, 2017

Revised: 24 November, 2017

Accepted: 25 November, 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.

Abstract

The anti-inflammatory effects of cell-free extracts from wild yeasts, *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 and *Rhodotorula graminis* YJ36-1, caused by the inhibition of nitric oxide (NO) activity and cytotoxic effects were determined. Cell-free extracts from these two yeast strains had dose-dependent inhibitory effects on the production of lipopolysaccharide-induced NO and there were no cytotoxic effects on the treated cells or negative effects on their proliferation. Their cell-free extracts were also shown to have inhibitory effects on pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and prostaglandin-E₂, in a dose-dependent manner. Maximal inhibitory activity on NO production occurred in cell-free extracts of *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 cultivated at 30°C for 24 hr and *Rhodotorula graminis* YJ36-1 cultivated at 25°C for 24 hr in the yeast extract-peptone-dextrose (YPD) media.

Keywords: Anti-inflammatory effects, Lipopolysaccharide-induced nitric oxide, RAW 264.7 cells, *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2, *Rhodotorula graminis* YJ36-1

서론

신체 조직 손상이나 감염성 병원체의 침입 등 여러 가지 원인에 의한 염증으로부터 인체를 방어하는 염증 반응 중에는 interferon- γ 와 interleukin-1 β 등의 cytokine과 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂등을 생성하게 된다[1-4].

이들 가운데 NO가 체내에 많이 축적되면 유전자의 돌연변이와 조직의 손상 및 부종 등의 염증 반응을 활성화시키고 염증 매개체의 생합성 증진에 의한 염증 심화를 유도하여 인체에 큰 피해를 준다[5]. 그러므로 염증 매개물질로 알려진 interferon- γ , tumor necrosis factor- α , interleukin1- β 및 interleukin-6와 같은 cytokine의 발현억제와 NO와 prostaglandin E₂의 생성 억제 정도를 측정하여 항염효과를 검증할 수 있다[5, 6].

한편, 효모는 진핵 세포를 가진 고등 미생물이면서 빠른 생육과 비교적 단순한 영양 요구성 등의 특성이 있어 산업적으로 매우 유용하여 오래 전부터 많이 이용되어 오고 있고 최근 효모로부터 다양한 건강 소재들이 연구, 개발되고 있다[7-16]. 그러나, 효모와 같은 부류의 진핵 미생물인 버섯으로부터 항염성 물질의 추출과 이들의 특성에 관하여 최근 많이 보고되고 있으나[17-22], 아직까지 generally recognized as safe (GRAS) 효모로부터 항염증 물질의 생성에 관한 연구는 미흡하여 필자 등이 야생 효모들 중 비병원성 효모 균주들중 항염활성이 우수한 효모를 선발하여 이들의 특성을 보고하였을 뿐이다[23].

따라서 본 연구에서는 전보[23]에서 항염활성 우수 효모로 선발한 *M. guilliermondii* YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1의 무세포 추출물을 제조하여 이들의 lipopolysaccharide로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 항염성 NO 생성 저해활성과 세포독성 및 cytokines인 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 prostaglandin E₂ 생성에 미치는 영향 등을 측정하였고 두 효모들의 NO 생성 저해물질 생산 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

효모 및 실험 재료

실험에 사용한 효모는 전보[23]에서 항염물질 생산 우수 효모로 선발한 *M. guilliermondii* YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1들을 사용하였다. 세포배양에는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; HyClone, South Logan, UT, USA), Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), streptomycin/penicillin, phosphate buffered saline (PBS) 등을 사용하였다.

NO 정량과 MTT assay에는 LPS (lipopolysaccharide) (E. coli B0111:B4; Sigma-Aldrich), Griess reagent (A 시약은 2.5% 인산에 sulfanilamine를 용해시킨 액, B 시약은 2.5% 인산에 0.1% N-1-naphthylethlenediamine를 용해시킨 액), 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) 등을 사용하였고 prostaglandin E₂와 ELISA (Tecan, San Jose, CA, USA) 등을 사용하였으며, 기타 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

효모 배양 및 무세포 추출물 제조

M. guilliermondii YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1들을 각각 yeast extract-peptone-dextrose

(YPD) 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 cell pellets을 얻었다. 다시 Tris-HCl buffer (100 mM, pH 8.3)로 3번의 세척 후 bead를 이용하여 세포를 파쇄한 다음 원심 분리한 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°C에서 CO₂ incubator로 배양 하였다. 80~90% 정도 모든 세포들이 생육하였을 때 계대배양을 하였다[1, 2].

MTT assay

세포독성을 확인하기 위해 다음과 같이 MTT assay를 실시하였다[24]. RAW 264.7 cell이 1×10^5 cells/mL가 되도록 48-well plate에 100 µL씩 분주하고 효모 무세포 추출물을 각각 100, 250, 500, 750, 1,000 µg/mL로 30 µL씩 분주한 후 37°C에서 CO₂ incubator로 24시간 배양하였다.

이들 세포 배양액을 phenol red가 없는 Dulbecco's Modified Eagle 배양액으로 교체 후 각각의 well에 인산완충용액(pH 7.4)에 1.5 mg/mL로 용해시킨 MTT 용액을 15 µL씩 첨가하고 37°C에서 CO₂ incubator로 4시간 배양하여 MTT를 환원시켰다. 배양액을 원심 분리하여 상등액을 제거하고 각 well에 300 µL의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다[2, 6]. 세포 생존율은 시료 무처리군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = [(C - T)/C] \times 100$$

(T, 시료첨가구의 A₅₉₅; C, 무처리구의 A₅₉₅)

Nitric oxide 생성 저해활성 측정

전보[23]와 같이 RAW 264.7 세포에서 생성되는 활성질소인 NO 함량을 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 먼저 RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/mL로 48-well plate에 150 µL를 분주하고 2시간 후에 효모 무세포 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL로 30 µL씩, LPS를 1 mg/mL로 30 µL씩 분주한 후 37°C에서 CO₂ incubator로 24시간 배양하였다. 활성화시킨 RAW 264.7 세포배양액 100 µL를 96-well plate에 옮겨 Griess 시약 100 µL와 혼합하여 상온에서 10분간 반응 시킨 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 함량을 NaNO₂의 표준곡선을 이용하여 측정하였다. 또한 아래와 같이 NO 생성 저해율을 계산 하였다.

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

(T, 시료첨가구의 A₅₄₀; C, 무첨가구의 A₅₄₀)

TNF- α 생성량 측정

활성화된 RAW 264.7 세포에서 생성되는 염증성 cytokine인 TNF- α 를 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다.

RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/mL로 48-well plate에 분주하고 2시간 후에 효모 무세포 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL로, LPS는 1 mg/mL로 각각 첨가한 후 37°C에서 CO₂ incubator로 24시간 배양하였다. 다시, 세포배양 상등액 100 μ L를 96-well plate에 넣고 각 well 마다 capture antibody를 100 μ L씩 첨가한 다음 4°C에서 12시간 방치한 후 washing buffer (0.05%, Tween 20)로 세척하였다.

여기에 Reagent diluent (1%, BSA) 200 μ L를 넣고 37°C에서 incubator로 1시간 반응시킨 후 세척한 다음 시료와 표준용액을 각각 100 μ L 넣고 37°C에서 incubator로 2시간 반응시킨 후 다시 한번 세척하였다. 다시, Streptavidin-HRP를 100 μ L 넣고 세척한 후 기질인 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)를 100 μ L 첨가하고 37°C에서 40분 반응시킨 뒤 stop solution 50 μ L를 넣어 반응을 중지시킨 후 분광분석기로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Prostaglandin E₂ 생성량 측정

LPS로 활성화시킨 RAW 264.7에서 발현되는 COX-2의 작용에 의한 prostaglandin E₂의 생성량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/mL로 48-well plate에 분주하고 2시간 방치시킨 후 효모 무세포 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL씩, LPS는 1 mg/mL씩 각각 첨가한 후 37°C에서 CO₂ incubator로 24시간 동안 배양한 다음 세포배양 상등액 150 μ L를 취하여 prostaglandin E₂의 생성량을 측정하였다.

결과 및 고찰

전보[17]에서 항염활성 우수 균주로 선발된 *M. guilliermondii* YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1들의 무세포 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL로 LPS에 의해 활성화 된 RAW 264.7 세포에 처리했을 때 생성되는 NO 함량을 측정한 결과는 Fig. 1A와 같다.

먼저, *M. guilliermondii* YJ34-2 무세포 추출물을 100 mg/mL와 250 mg/mL 첨가했을 때 각각 43.5 ($\pm$ 0.9) μ M과 42.5 ($\pm$ 0.6) μ M의 NO를 생성하여 무처리 대조구보다 약간 감소하였고 750 mg/mL 과 1,000 mg/mL 처리시 36 ($\pm$ 0.3) μ M과 21.9 ($\pm$ 1.9) μ M의 NO를 생성하여 대조구 대비 NO 생성량이 농도 의존적으로 감소하여 항염증 효과를 보였다.

또한, *R. graminis* YJ36-1도 *M. guilliermondii* YJ34-2와 유사한 경향이었으나, 무세포 추출물을 750 mg/mL과 1,000 mg/mL 처리시 각각 15.7 ($\pm$ 0.7) μ M과 11.5 ($\pm$ 0.5) μ M를 생성하여 *M. guilliermondii* YJ34-2의 무세포 추출물보다 대조구 대비 NO 생성량이 더 크게 감소하여 항염 효과가 더 우수하였다.

한편 *R. graminis* YJ36-1와 *M. guilliermondii* YJ34-2의 세포독성을 확인하기 위하여 이들의 무세포 추출물들이 mouse의 대식세포(RAW 264.7 cell)에 미치는 영향을 MTT assay 방법을 이용하여 측정하였다(Fig. 2). *M. guilliermondii* YJ34-2 무세포 추출물들을 100,

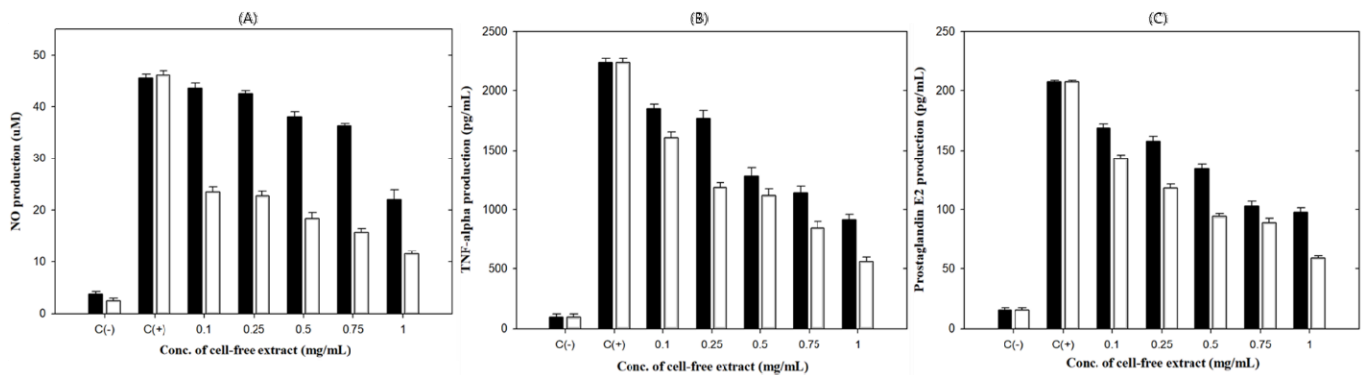


Fig. 1. Effect of concentration (Conc.) of cell-free extracts from *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 (■) and *Rhodotorula graminis* YJ36-1 (□) on the production of nitric oxide (A); Tumor necrosis factor- α (B); prostaglandin E₂ (C).

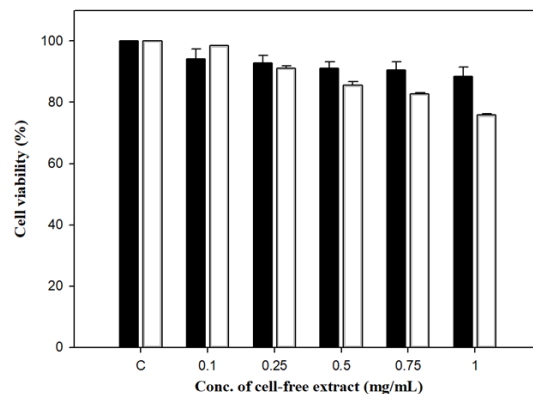


Fig. 2. Cell viability of the 1st screened *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 (■) and *Rhodotorula graminis* YJ36-1 (□). Conc., concentration.

250, 500, 750, 1,000 mg/mL로 처리했을 때 각각의 세포 생존율은 $94.1 (\pm 3.2)$, $92.7 (\pm 2.5)$, $91.2 (\pm 1.9)$, $90.5 (\pm 2.5)$, $88.4 (\pm 3.1)\%$ 를 보여 무세포 추출물의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 감소하였다.

또한, *R. graminis* YJ36-1도 같은 경향으로 각각 $98.4 (\pm 0.1)$, $91.1 (\pm 0.7)$, $85.6 (\pm 1.2)$, $82.8 (\pm 0.4)$, $77.1 (\pm 0.3)\%$ 의 세포생존율을 보여 무세포 추출물의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 감소하였다.

TNF- α 생성에 미치는 영향

두 효모들의 무세포 추출물이 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 생성되는 염증성 cytokine인 TNF- α 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1B와 같다.

RAW 264.7 세포의 LPS 무처리 대조군은 $98 (\pm 24.1)$ pg/mL의 TNF- α 가 생성되었고 LPS 처리 대조군은 $2,245 (\pm 31.8)$ pg/mL이 생성되었다. *M. guilliermondii* YJ34-2의 무세포 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL로 처리한 결과 각각 $1,849 (\pm 38.5)$, $1,770 (\pm 64.5)$, $1,281 (\pm 70.1)$, $1,139 (\pm 57.4)$, $916 (\pm 43.1)$ pg/mL의 TNF- α 가 생성되어 LPS 처리

대조군에 비해 농도 의존적으로 TNF- α 생성량이 감소하였다

또한, *R. graminis* YJ36-1 역시 무세포 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL의 농도로 처리한 결과 각각 1,609 ($\pm$ 48.5), 1,187 ($\pm$ 39.2), 1,118 ($\pm$ 54.8), 845 ($\pm$ 57.1), 559 ($\pm$ 38.1) pg/mL의 TNF- α 가 생성되었으며 *M. guilliermondii* YJ34-2와 동일하게 농도 의존적으로 TNF- α 생성량이 감소하였다.

위와 같이 두 효모 무세포 추출물들이 농도 의존적으로 TNF- α 생성을 억제하는 것으로 보아 이들 효모들이 항염물질을 생성하고 있음을 확인 할 수 있었다.

Prostaglandin E₂ 생성에 미치는 영향

M. guilliermondii YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1의 무세포 추출물들이 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 Cyclooxygenase-2에 의해 생성되는 prostaglandin E₂의 생성에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 1C와 같다.

RAW 264.7 세포의 LPS 무처리 대조군은 15 ($\pm$ 2.1) pg/mL의 prostaglandin E₂가 생성되었고 LPS 처리 대조군은 207 ($\pm$ 1.3) pg/mL이 생성되었다. *M. guilliermondii* YJ34-2 무세포 추출물들을 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL로 처리한 결과 각각 158.8 ($\pm$ 3.2), 137.7 ($\pm$ 4.4), 114.0 ($\pm$ 3.6), 86.8 ($\pm$ 4.2), 75.7 ($\pm$ 3.7) pg/mL의 prostaglandin E₂가 생성되어 대조군에 비해 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다.

R. graminis YJ36-1 역시 무세포 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL로 처리한 결과 각각 142.8 ($\pm$ 3.4), 118.4 ($\pm$ 2.9), 94.5 ($\pm$ 2.4), 89.0 ($\pm$ 3.7), 58.9 ($\pm$ 1.9) pg/mL의 prostaglandin E₂가 생성되어 *M. guilliermondii* YJ34-2와 동일하게 농도 의존적으로 감소하였다.

위와 같이 두 효모 무세포 추출물들이 농도 의존적으로 prostaglandin E₂ 생성을 저해하는 것으로 보아 이들 두 효모들이 항염물질을 생성하고 있음을 재확인 할 수 있었다.

Nitric oxide 생성 저해물질의 최적 생산 조건

먼저, *M. guilliermondii* YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1의 배지의 종류에 따른 NO 생성 저해 활성을 측정한 결과 *M. guilliermondii* YJ34-2는 YPD 배지와 yeast extract-malt extract (YM) 배지에서 배양하여 얻은 무세포 추출물들이 potato starch-dextrose (PD) 배지에서 배양한 무세포 추출물보다 약 4% 높은 저해활성을 보였고 *R. graminis* YJ36-1은 YPD 배지와 PD 배지에서 배양한 무세포 추출물들이 YM 배지보다 약 3.5% 높은 저해활성을 보였다(data not shown).

두 효모들을 YPD 배지에 접종하여 15~40°C까지 각각의 온도에서 24시간 배양한 후 이들 무세포 추출물들의 NO 생성 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다.

M. guilliermondii YJ34-2를 30°C에서 24시간 배양 후 얻은 무세포 추출물이 약 51%의 최고 NO 생성 저해활성을 보였고 40°C 배양 무세포 추출물에서도 10% 정도의 저해활성을 보여 비교적 내열성이 강할 것으로 추정되었다. 또한, *R. graminis* YJ36-1은 25°C 배양 후 얻은 무세포 추출물이 약 81%의 최고 NO 생성 저해활성을 보였고 20°C 배양 무세포 추출물에서도 약 57% 정도의 저해활성을 보였다. 그러나 30°C 이상과 20°C 이하에서는 생육이 극히 저

조하여 저해활성이 없거나 매우 미약하였다.

한편, 이들 두 효모들의 NO 생성 저해에 미치는 배양시간의 영향을 검토하기 위하여 *M. guilliermondii* YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1들을 YPD 배지에 접종하여 각각 30°C와 25°C에서 48시간까지 각각 배양한 후 이들 무세포 추출물들의 NO 생성 저해활성을 측정하였다 (Fig. 4). *M. guilliermondii* YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1 모두 배양시간이 경과함에 따라 NO 생성 저해활성이 증가하여 24시간 배양 후 얻은 무세포 추출물이 각각 51.6 ($\pm$ 0.3)%와 81.4 ($\pm$ 1.3)%의 가장 높은 NO 생성 저해활성을 보였고 이후에는 다소 낮아졌다.

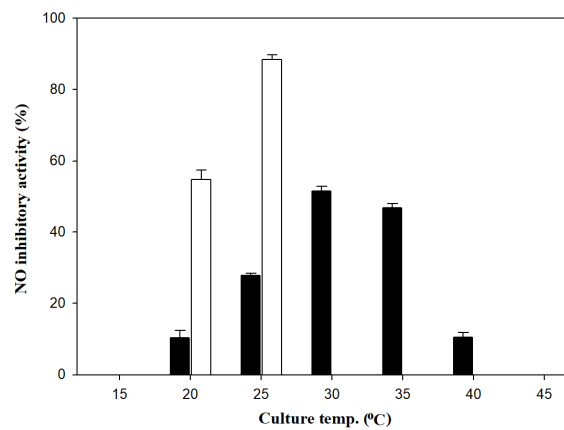


Fig. 3. Effect of cultural temperature (temp.) of *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 (■) and *Rhodotorula graminis* YJ36-1 (□) on the inhibitory activity of nitric oxide (NO) production. *Rhodotorula graminis* YJ36-1 was not grown over 25°C.

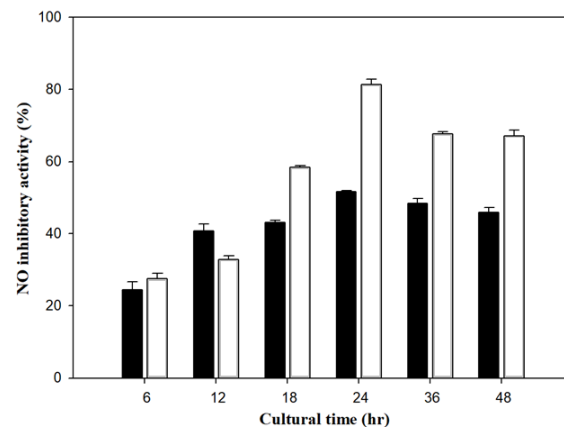


Fig. 4. Effect of cultural time of *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2 (■) and *Rhodotorula graminis* YJ36-1 (□) on the inhibitory activity of nitric oxide (NO) production.

적 요

본 연구에서는 우리나라 주요 산과 섬에서 분리한 비병원성 야생효모들 중 항염 효과가 우수했던 *Meyerozyma guilliermondii* YJ34-2와 *Rhodotorula graminis* YJ36-1의 무세포 추출물들을 제조하여 대식세포 계열 RAW 264.7 세포에 대한 이들의 NO 생성 저해활성과 세포독

성을 조사하였다. NO 생성 저해활성은 농도 의존적으로 높아 *M. guilliermondii* YJ34-2와 *R. graminis* YJ36-1 무세포 추출물을 1,000 mg/mL 처리 시 각각 51.6%와 81.4%를 보여 가장 높았고 RAW 264.7 세포에 대한 세포 생존율도 1,000 mg/mL 처리시 각각 88.4% (± 3.1)와 77.1% (± 0.3)로 가장 높았다. 두 효모들의 무세포 추출물 처리에 따른 prostaglandin E₂ 생성량은 농도 의존적으로 감소하여 각각의 무세포 추출물을 1,000 mg/mL 처리했을 때, tumor necrosis factor (TNF)- α 생성량이 59.2 (± 43.1), 73.2 (± 38.1)%로 감소하였고 prostaglandin E₂의 생성량도 52.8 (± 1.9), 71.2 (± 3.7)%로 감소하여 이 두 효모들의 항균활성을 검증할 수 있었다. 두 효모들의 NO 생성 저해물질 최적 생산조건을 조사한 결과 *M. guilliermondii* YJ34-2를 yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 얻은 무세포 추출물이 가장 높은 51.6 (± 0.3)%의 NO 생성 저해율을 보였고 *R. graminis* YJ36-1를 YPD 배지에 접종하여 25°C에서 24시간 배양하였을 때 81.4 (± 1.3)%의 가장 높은 NO 생성 저해활성을 보였다.

Acknowledgements

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

REFERENCES

1. Kim BW, 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.
2. 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 RAW 264.7 cells. Mycobiology 2015;43:450-7.
3. 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.
4. 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.
5. Jung YS, Eun CS, Jung YT, Kim HJ, Yu MH. Anti-inflammatory effects of *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn leaves extracts. J Life Sci 2013;23:629-36.
6. Lee ES, 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. Korean J Food Preserv 2014;21:740-6.
7. 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.
8. 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.

9. 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.
10. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antimentia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2007;42:83-8.
11. Lee JS, Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25:448-53.
12. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* 2008;36:102-5.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Bae SM, Han SM, Lee JS. Screening of anti-inflammatory compound-producing wild yeasts and their microbiological characteristics. *Kor J Mycol* 2017;45:212-23.
24. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods* 1984;70:257-68.