

Hericium erinaceum 액체배양 생성물의 Acetyl-cholinesterase 저해 활성과 항산화 활성

¹정재현 · †이신영

† 강원대학교 생물공학과, ¹충주대학교 식품공학과
(접수 : 2006. 7. 12., 게재승인 : 2007. 1. 12.)

AChE Inhibitory Effect and Antioxidative Activity of Submerged Cultured Products from *Hericium erinaceum*

Jae-Hyun Jung¹ and Shin-Young Lee†

† Department of Biotechnology and Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Biotechnology, Faculty of Life Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

(Received : 2006. 7. 12., Accepted : 2007. 1. 12.)

The water-soluble or ethanol-soluble materials extracted from fruit bodies and cultured products (mycelium and broth) of *H. erinaceum* were prepared, and their inhibitory effect on acetylcholinesterase (AChE) activity from *Electrophorus electricus* was investigated. Inhibition of 75-85% for AChE activity at concentration of 10 mg/ml was obtained and the mechanism was due to general non-competitive inhibition. Especially, the supernatant of culture broth by ethanol treatment, exhibited a strong inhibition activity of 94% at 10 mg/ml. The samples from fruit body, mycelium and broth (supernatant and precipitate by ethanol treatment) which were extracted from *H. erinaceum*, were very effective to inhibit the initial stage oxidation of a linoleic acid at concentration of 0.1 mg/ml. The antioxidative activity of these samples were superior than rutin, vitamin C and tocopherol as antioxidative standards by FTC (ferric thiocyanate) method, and also showed the very strong antioxidative activity of 95% without significant difference of the samples by TBA-RS (thiobarbituric acid-reactive substance) method.

Key Words : *Hericium erinaceum*, mycelium, culture broth, fruitbody, hot water or ethanol extract, AChE inhibition, antioxidative activity

서 론

Kawagishi 등(1-4)은 노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum*)에 신경 성장인자 (NGF)의 합성유도 촉진활성을 나타내는 자실체 유래의 페놀 관련 화합물 (hericenone C, D, E, Y-A-8-c)이나, 균사체 유래의 erinacine A-I 등에 의한 중추신경 재생과 Alzheimer형 치매의 개선 효과를 밝혀 이들의 치료제로서의 이용가능성을 보고한 바 있다.

현재 자실체 유래의 hericenone 류는 천연물의 탐색에서 얻어진 최초의 화합물로 아드레날린과 비슷한 정도의 활성을 보이는데, 특히, Furukawa and Kawagishi(5)는 균사체

유래 erinacine A-I가 자실체 유래의 hericine C-H로 명명된 화합물 군과는 전혀 다른 구조의 것으로 지금까지 알려져 있는 물질 중에서 가장 강력한 활성을 보이는 부류로 보고하였다.

통상 치매 (Alzheimer's Disease: AD) 병증에서 전뇌의 콜린성 신경세포의 손실 및 위축은 이들 신경세포에 대한 목표 영역이 되는 choline acetyltransferase (ChAT)와 acetylcholinesterase (AChE) 활성의 감소를 초래하는 것으로 보고되었다(6, 7). 따라서 ChAT와 AChE 활성의 감소는 치매의 정도 및 AD의 뇌 병리학적 극인 (hallmark)이 되며, Gasparin 등(8)은 AD의 인지 역작용 및 기타 양상이 뇌피질 및 해마에서의 콜린성 접합부에서의 기능 소실로부터 매개되므로 소실된 콜린성 기능을 대체하는 제재들이 이 질병의 관리에 유효하다고 하였다. 결국, acetylcholine (ACh) 수준의 향상이 AD에서의 인지 결핍증상을 향상시키는데 도움을 주는 것이 제안되었고(9), 최근에는 콜린성 신경전달을 증강시키는 AChE (EC 3.1.1.7)의 저해제가 Alzheimer 치료제로 승인

† Corresponding Author : Department of Biotechnology and Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6273, Fax : +82-33-243-6350

E-mail : sylee@kangwon.ac.kr

된 유일한 화합물이 되었다.

그 동안 천연 자원으로부터의 AChE 저해제들은 많은 연구자들에 의해 다수 보고되었으나(10, 11) 버섯 유래 성분들에 대한 조사는 거의 보고된 바 없다.

한편, 지질 과산화는 AD에 있어 신경손상의 잠재적 원인으로 제안되어 왔으며, 실제로 β -amyloid₂₅₋₃₅(A β)-유도 지 과산화 산물인 4-hydroxynonenal (4-HNE)와 malondialdehyde (MDA)가 AD에서 검지되었다(12). A β 에 기인한 신경사멸은 4-HNE를 경유하여 전파됨이 제안되었는데, 4-HNE는 AD 뇌에서 특히, AD에서 가장 현저한 해부병리학적 변화를 나타내는 amygdala 및 해마 영역에서 증가된다(13). 따라서 항산화제는 AD에 대한 잠재적 치료제로서 제안되어 왔다.

비타민 E는 neocortical snaptosomal 막의 지질 및 조성에서 AD의 A β 유도 변화를 보호하는데(14), 특히 Gwebu 등(15)은 비타민 E가 vascular smooth muscle 세포에서 A β 의 세포독성을 약화시킴을 보였다고 하였다.

일반적으로 항산화제는 지질의 산화 과정에서 라디칼의 발생 그 자체를 억제하는 형 (예방적 항산화 물질: preventive antioxidant)과 발생한 라디칼을 포착하는 형 (연쇄 절단형 항산화 물질: chain breaking antioxidant)의 2종으로 나뉜다. 전자로서는 효소계의 항산화 물질 등이 있으며, 후자의 형으로는 페놀계 항산화 물질이나 아민류, thiol 류 등이 있는데, *H. erinaceum*에 대해서는 유리 라디칼 소거능 및 연쇄 절단형 항산화 물질로서의 항산화능이 알려진 바 없다.

이상으로부터 버섯 유래 기능성 식품의 제품화 연구 일환으로, 지금까지 체계적으로 연구된 바 없는 *H. erinaceum*의 액체배양 생성물을 시료로 이의 AChE 저해활성과 항산화 활성을 평가, 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험의 공시 균주는 본 연구실에 보관중인 노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum*)이며, PDA (Potato-Dextrose Agar) 배지에 사면배양하여 보존하였다. 액체배양의 배지는 glucose 30 g/L, yeast extract 2 g/L, polypeptone 2 g/L (또는 yeast extract 2 g/L, polypeptone 2 g/L, malt extract 10 g/L), KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L, pH 5.5)이었고, 이 때 pH는 필요시 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH로 조절하였다. 전 배양은 500 mL 플라스크를 사용하여 접종비 5%, 온도 25°C, 진탕속도 100 rpm으로 10일간 실시하였고, 본 배양은 자체 제작한 3 L 용량의 air-lift fermenter system에서 역시 접종비를 5%로 하여 온도 25°C, 통기속도 2.5 vvm으로 4일간 배양하였다.

시료의 조제

생리활성의 측정에 사용한 시료는 *H. erinaceum*의 자실체 및 상기 배양법으로 생산한 액체배양 생성물 (균사체와 배양여액)로, 각각 다음과 같이 처리하여 시료로 하였다. 즉, 자실체는 3배량의 물 (또는 75% ethanol)로 수욕조에서 환류냉각하면서 3회 추출한 후 여과하여 잔사는 그대로

여액은 감압 농축 (Brix 12°)하여 건조한 다음 시료로 하였다. 균사체 경우도 자실체와 마찬가지로 3배량의 물로 수욕조에서 환류냉각하면서 3회 추출한 후 여과하고 여액을 감압 농축 (Brix 12°)하여 건조한 다음 균사체 추출물 시료로 하였으며, 여액에 ethanol을 첨가한 후 얻어진 침전물 [Mycelium/Et-OH(P)]도 시료로 하였다. 배양 여액의 경우는 그대로 (culture broth) 또는 배양 여액에 2배량의 ethanol을 첨가하고 원심분리한 다음 얻어진 침전물 [Broth/Et-OH(P)]과 상징액 [Broth/Et-OH(S)]을 각각 시료로 하였다.

AChE 저해 활성의 측정

Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7)의 활성은 AChE가 acetylthiocholine을 가수분해할 때 생성되는 반응산물인 thiocholine이 DTNB (5,5'-dithionitrobenzoic acid)와 반응하여 황색의 NTB (2-nitrobenzoic acid)를 생성하므로, 이를 412 nm에서의 흡광도로 측정하는 Ellman 등(16)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 0.2 mM DTNB (5,5'-dithionitrobenzoic acid) 1.5 ml와 정제 효소 (*Electrophorus electricus*, Sigma) 0.1 ml (단백질 농도 0.13 μ g/ml)를 가한 반응 혼합물을 37°C에서 10분간 반응시켰다. 이 때, DTNB의 최종 농도는 각각 0.125 mM이었다. 별도로 5 mM의 acetylthiocholine iodide 0.2 ml (최종농도 0.5 mM)와 각 시료 0.2 ml를 넣어 역시 37°C에서 incubation하였다. 이를 반응 혼합물에 넣어 37°C에서 반응시켰으며 개시 직후부터 412 nm에서의 흡광도 증가 (Δ OD)를 측정하였다. 이 때, 흡광도는 매 2분마다 측정하여 반응이 직선적으로 일어나는지를 확인하였다.

한편, K_M 및 V_{max}은 서로 다른 기질 농도를 사용하여 AChE 활성을 측정하고 Lineweaver-Burk plot에 의해 결정하였으며(17), 50% 효소저해에 요구되는 화합물의 농도 (IC₅₀)는 효소저해의 용량-반응곡선 (dose-response curve)의 선형 평가에 의해 계산하였다(18). 아울러, 저해속도상수 (K_i)는 서로 다른 저해제 농도로 얻은 Lineweaver-Burk plot의 기울기 또는 절편 값과 저해제의 농도를 도시하여 구하였다(17).

모든 자료는 평균 \pm SD로 나타내었으며, 통계분석은 SAS (Statistical Analysis System, USA)를 사용하여 Student's t test로 수행하였다(19).

항산화 활성의 측정

항산화 활성은 지질의 과산화로 생성되는 지질 hydroperoxide에 의해 2가 철이 3가 철로 산화되고, 이 3가 철이 thiocyanic acid ammonium과 반응하여 적색의 Rhodan-철 [Fe(SCN)₃]이 생성되므로 이를 비색정량하여 지질의 과산화도를 측정하는 방법인 Rhodan-Fe (FTC)법과, 과산화 지질의 분해에 의해 생성되는 MDA (malondialdehyde)와 MDA 유사물질이 산성조건하에서 2분자의 TBA (2-thio- barbituric acid)와 결합하여 생성되는 적색 물질을 비색정량하여 지질 과산화도를 측정하는 방법인 TBA 방법을 사용하여 측정하였다.

Rhodan-Fe (FTC)법: 지질의 과산화 초기에 생성되는 지질 hydroperoxide의 정량을 위해 사용하였으며, 다음과 같이 측정하였다(20). 0.11 M linoleic acid 20 mL와 0.1 M

phosphate buffer (pH 7.0) 20 mL의 혼합액에 적정 시료액 (질소 함유량이 1 mg이 되는 양)을 50 mL로 하였다. 이 시험액을 45°C의 항온조에서 차광 보존하면서 경시적으로 시험액 0.1 mL를 취하여 75% ethanol 4.7 mL에 가하였으며, 여기에 30% NH₄SCN 0.1 mL와 20 mM FeCl₂-3.5% HCl 0.1 mL를 가하여 3분간 방치한 후, 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

TBA-RS법: TBA-RS (thiobarbituric acid-reactive substances)는 지질의 과산화 후기에 생성되는 MDA (malonaldehyde) 및 carbonyl 화합물로 지질 과산화의 지표물질이다. 본 실험에서는 modified thiobarbituric acid법(21)을 사용하였으며, 다음과 같이 측정하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)와 ethanol 혼합용매 (4 : 1 v/v)에 linoleic acid를 0.03 M이 되도록 첨가하여 기질 용액을 조제하고, 이 기질 용액 20 mL를 screw cap 시험관에 취하였다. 여기에 0.1 M phosphate buffer 19.2 mL와 1% 시료 용액 0.8 mL를 첨가하여 40 ± 1°C의 항온기에서 7일간 진탕하였다. 24시간 간격으로 반응액 2 mL를 취하고 여기에 35% TCA (trichloroacetic acid) 용액 1.0 mL와 0.75% TBA (2-thiobarbituric acid) 수용액 2.0 mL를 가하여 잘 혼합한 후, 100°C의 항온수조에서 40분간 반응시켰다. 급냉하여 3000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상정액의 적색소 분획을 흡광도를 532 nm 및 600 nm에서 측정하였다. 이때, 표준곡선은 MDA (malonaldehyde bis (dimethyl acetal)) 0.246 mg을 100 ml 증류수에 녹이고 0.01 N HCl로 희석하여 (1 : 75 ~ 1 : 300) 작성하였다. MDA 상당량의 TBA-RS 농도는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{MDA equivalent (n mol/ml)} = [(A_{532} - A_{600}) / 157,000] \times 10^6$$

전자공여능 (electron donating ability: EDA)의 측정

전자공여능은 Blois의 방법(22)을 변형하여 측정하였다. 시료 0.2 ml에 4.1 × 10⁻⁵ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma D-9132) 용액 1.0 ml를 가한 다음 10초 동안 진탕한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 전자공여능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 다음 식에 의해 계산하여 백분율로 표시하였다.

$$\text{EDA (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

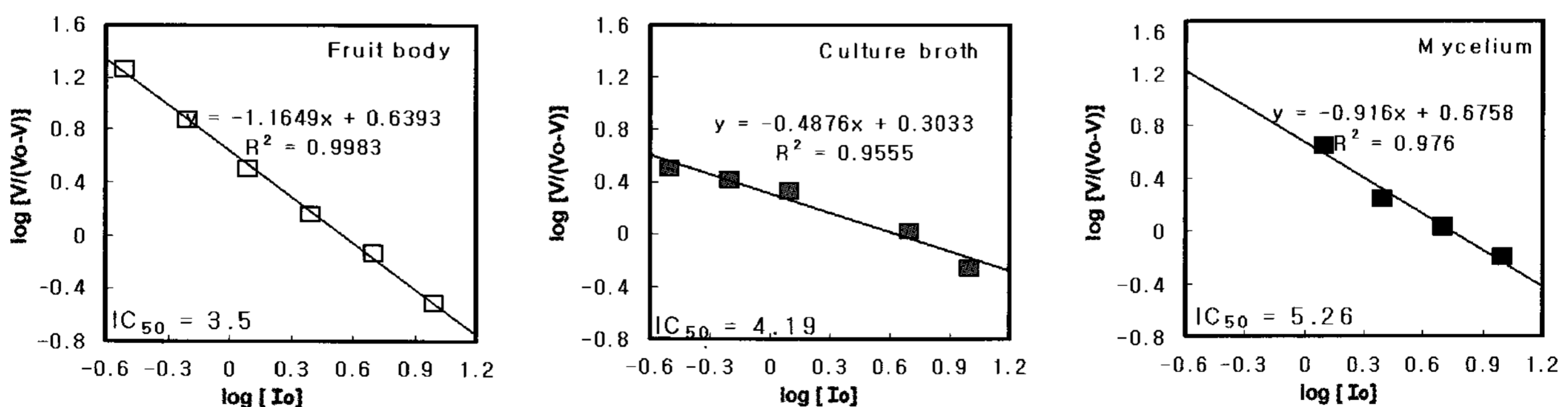


Figure 2. The concentration value of water extracts of fruit body and cultured products from *Hericium erinaceum* for 50% inhibition against acetylcholinesterase (V: initial velocity with inhibitor, Vo: initial velocity without inhibitor, Io: concentration of inhibitor).

여기서 A는 무첨가구의 흡광도이고, B는 시료 첨가구의 흡광도이다.

결과 및 고찰

AChE의 저해 효과

본 연구에서는 *H. erinaceum*의 자실체 및 균사체 배양생성물들이 rat brain homogenate의 AChE와 매우 유사한 *Electrophorus electricus* 유래 AChE(23)의 활성에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다.

자실체와 균사체의 열수 추출물 및 배양 여액 모두 1~10 mg/ml 농도 범위에서 농도 의존적으로 AChE에 대한 저해 활성을 보였으며, 10 mg/ml의 농도에서 75~85%의 저해를 보였다. 자실체 추출물은 균사체 추출물이나 배양 여액보다 다소 높은 저해활성을 나타내었다.

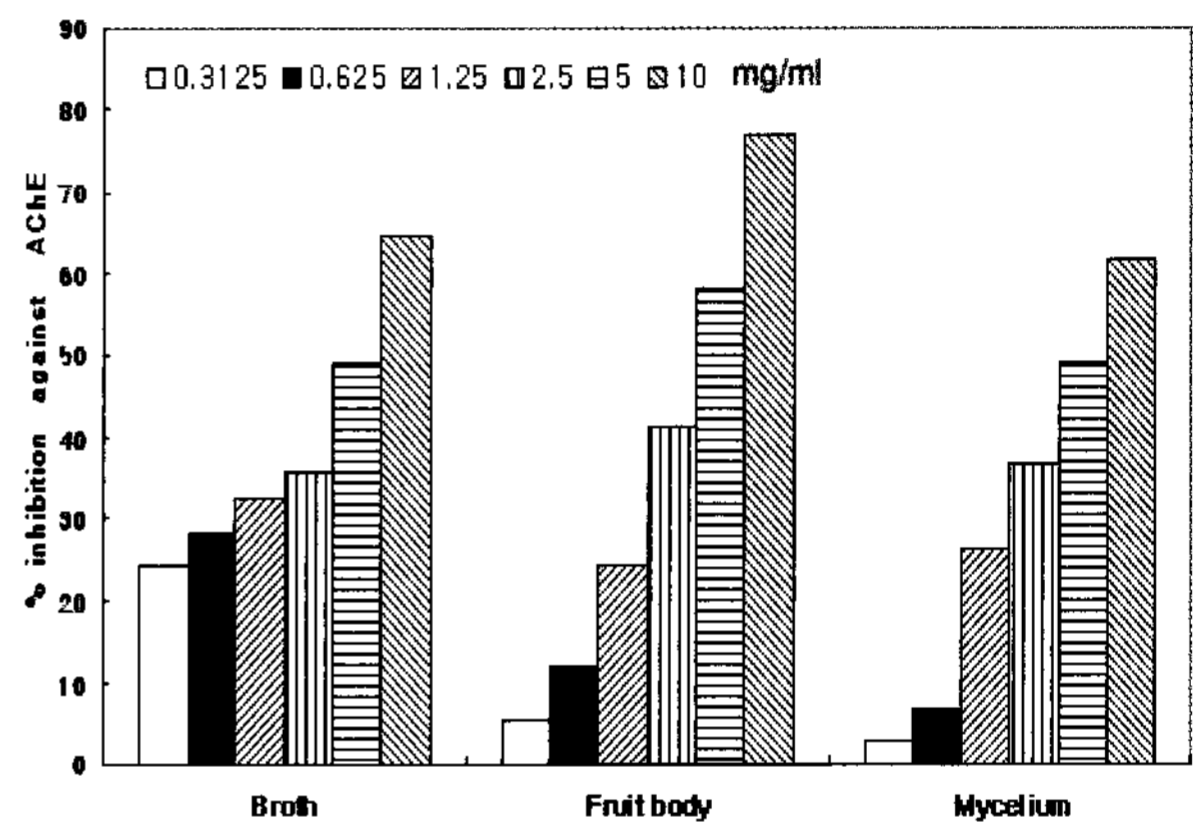


Figure 1. Inhibitory effect of fruit body and cultured products (mycelium, broth) of *Hericium erinaceum* on acetylcholinesterase activity.

Fig. 2에서와 같이, 효소활성을 50% 저해하는데 요하는 농도를 구한 결과, 배양 여액은 4.19 mg/ml, 자실체는 3.5 mg/ml, 균사체는 5.26 mg/ml이었다.

하지만 Fig. 3에서와 같이 추출물의 ethanol 침전물과 상정액의 AChE 저해활성을 조사한 결과, 침전물보다는 상정액의 저해활성이 현저히 높아서 ethanol 용해성의 저분자 물질이 저해활성의 유효 성분일 것으로 생각되었다.

특히, 배양여액의 EtOH 침전물 및 상정액은 이들보다

더 높은 저해활성을 나타내었는데, 배양여액의 EtOH 침전 후의 상정액은 10 mg/ml의 농도에서 약 94%의 매우 높은 저해활성을 보였다.

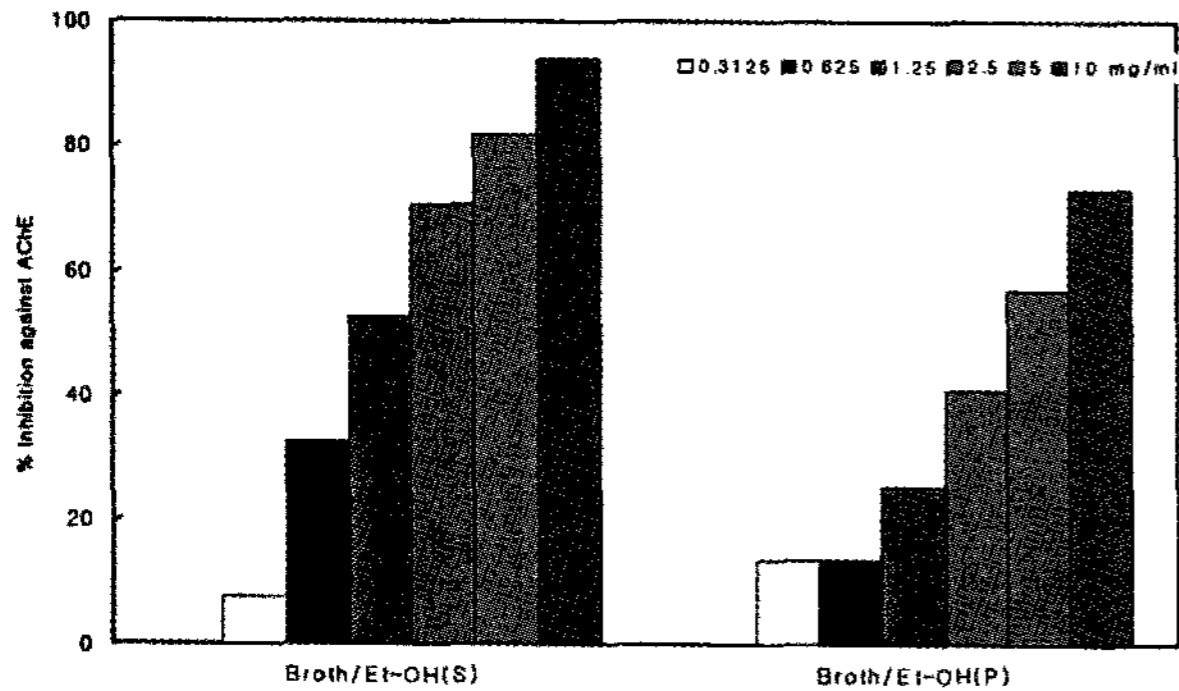


Figure 3. Inhibitory effect of fruit body and cultured products (broth/EtOH: supernatant) and broth/EtOH: precipitate) of *Hericum erinaceum* on acetyl-cholinesterase activity.

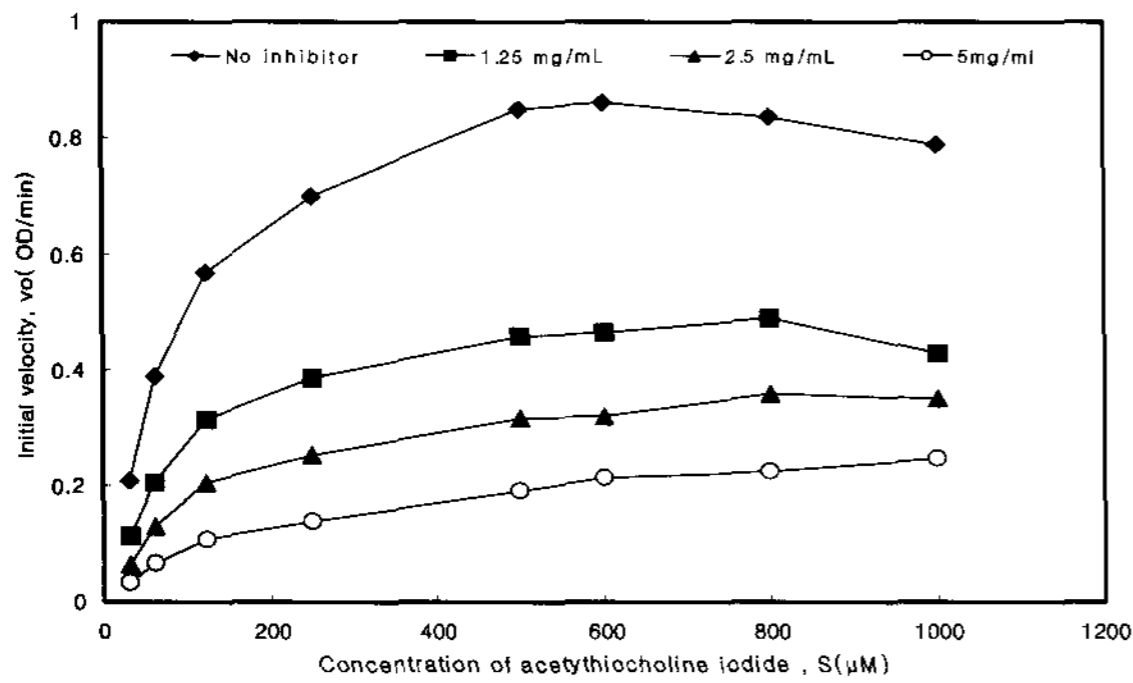


Figure 4. Acetylcholinesterase activity as function of acetylthiocholine iodide concentration in the absence and in the presence of different concentrations of sample (Broth/EtOH(S)).

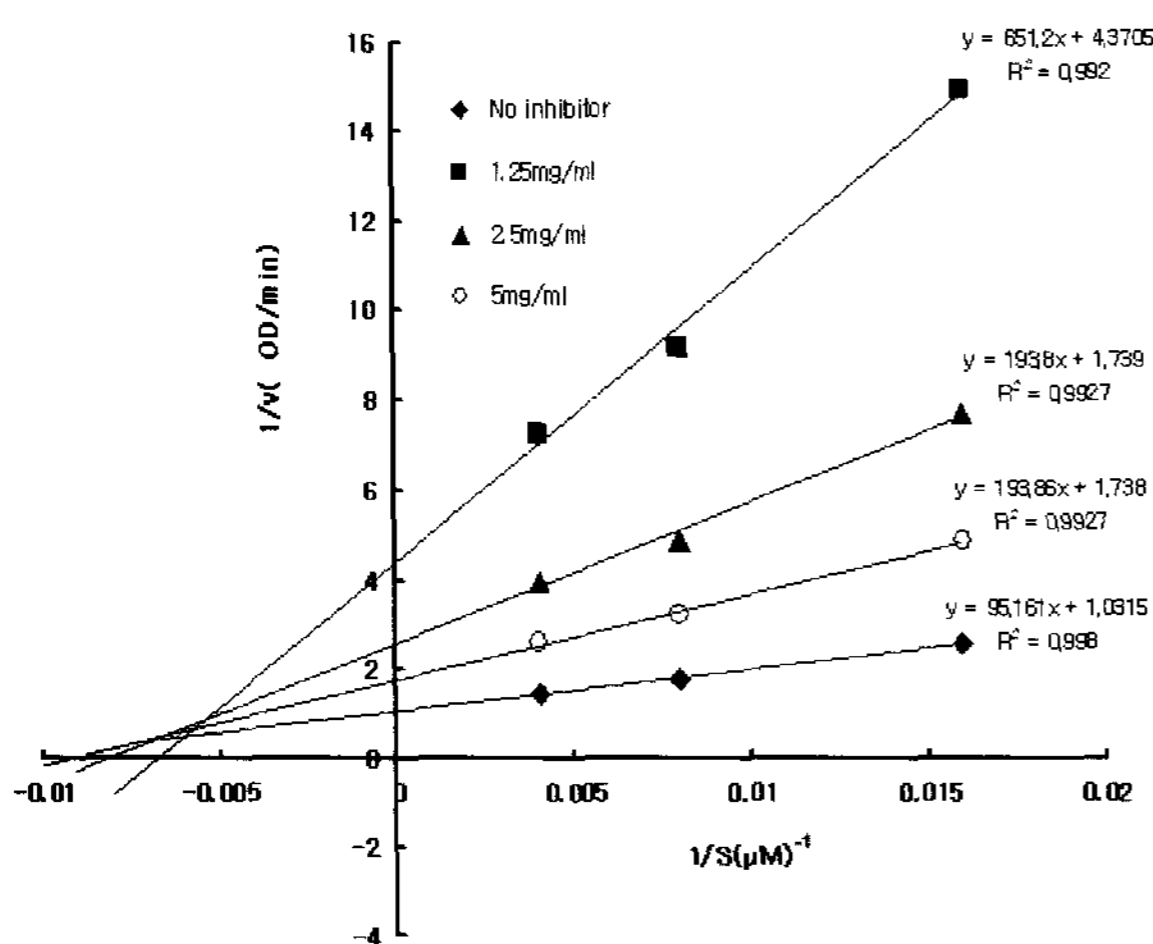


Figure 5. Lineweaver-Burk plots of the results of Fig. 33 in substrate concentrations of 62.6-500 μM .

한편, 대표적 예로서 비교적 높은 저해 활성을 보인 배양여액의 EtOH 침전물에 대한 저해제 농도를 달리한 기질

농도와 초기 효소반응속도의 관계 및 Lineweaver-Burk plot의 결과는 각각 Fig. 4 및 5와 같다.

그림에서 볼 수 있는 바와 같이, AChE에 대해 일반적 비경쟁적 저해 (general non-competitive or mixed inhibition)를 보였는데, 다른 시료들도 이와 비슷한 저해현상을 보였다. FDA에서 최초로 AChE 저해제로 승인받아 현재 널리 사용되는 tacrine의 경우도 비경쟁 저해제인 것으로 보고되었다(11).

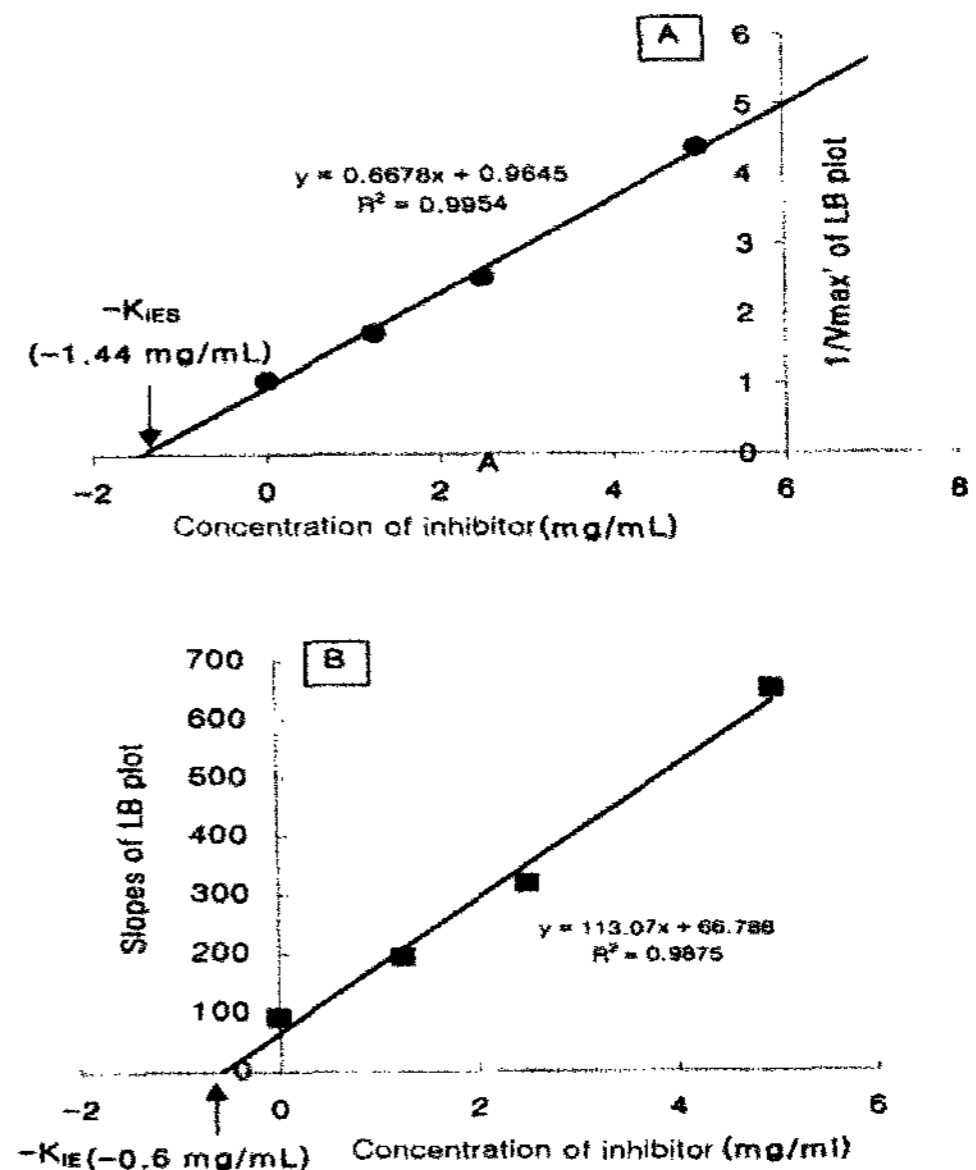


Figure 6. The secondary replots of the Lineweaver-Burk plot. 1/Vmax (A) and slope (B) of LB plot vs concentration of inhibitor for determination of inhibition constants.

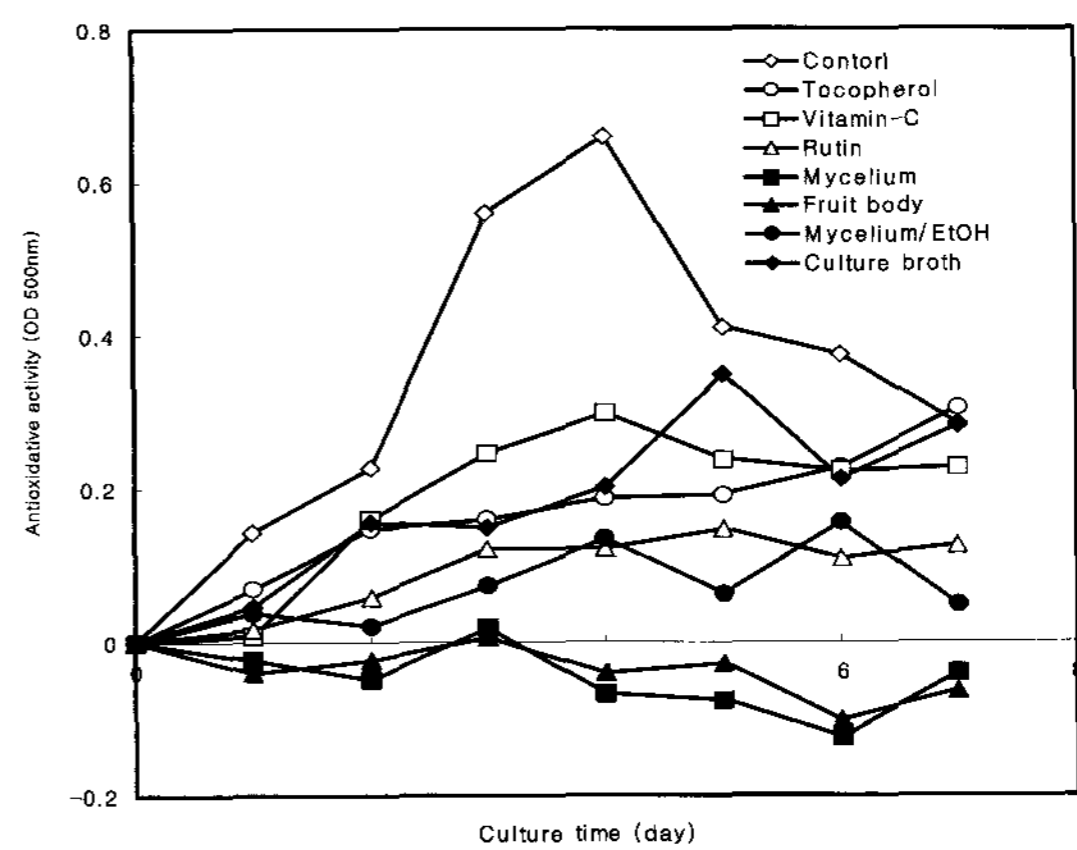


Figure 7. Antioxidative activity of the cultured products of *Hericum erinaceum* and the authentic standards as measured by the FTC method.

또 Fig. 6에서 보는 바와 같이, LB plot의 기울기 또는 절편값과 저해제 농도의 관계로부터 구한 저해상수 (효소 또는 효소-기질 복합체와 저해제의 친화력을 나타내는 정수) 값은 유리 효소 (E) 및 결합효소 (ES)에 대해서 각각 약 0.60 및 1.44 mg/ml이었다.

이는 저해제가 결합 효소보다는 유리 효소에 대한 친화

력이 약 2.4배나 강한 것을 의미하며, 따라서 기질인 acetylcholine의 분해억제에 더욱 유리한 것을 의미한다고 볼 수 있다.

항산화 활성에 미치는 영향

본 실험에서는 버섯 유래 시료들의 항산화 활성을 조사하기 위해 linoleic acid를 기질로 한 지질과산화에 대하여 조사하였다. Fig. 7은 FTC 법으로 측정된 각종 시료 (자실체와 균사체의 열수 추출물, 균사체 추출물의 ethanol 침전물 및 배양여액 시료)의 지방과산화에 대한 억제 효과이다.

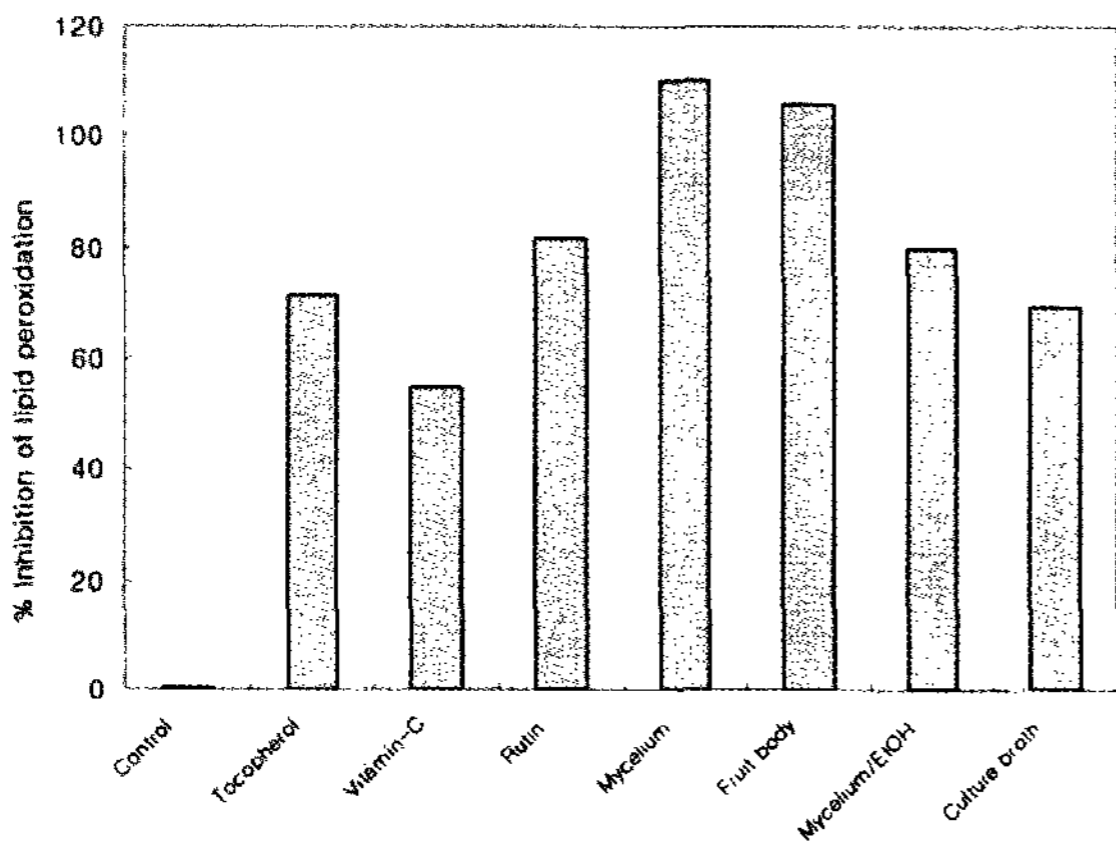


Figure 8. Inhibition effect of lipid peroxidation by using FTC method. Inhibition effect was calculated at 4 day of lipid peroxidation.

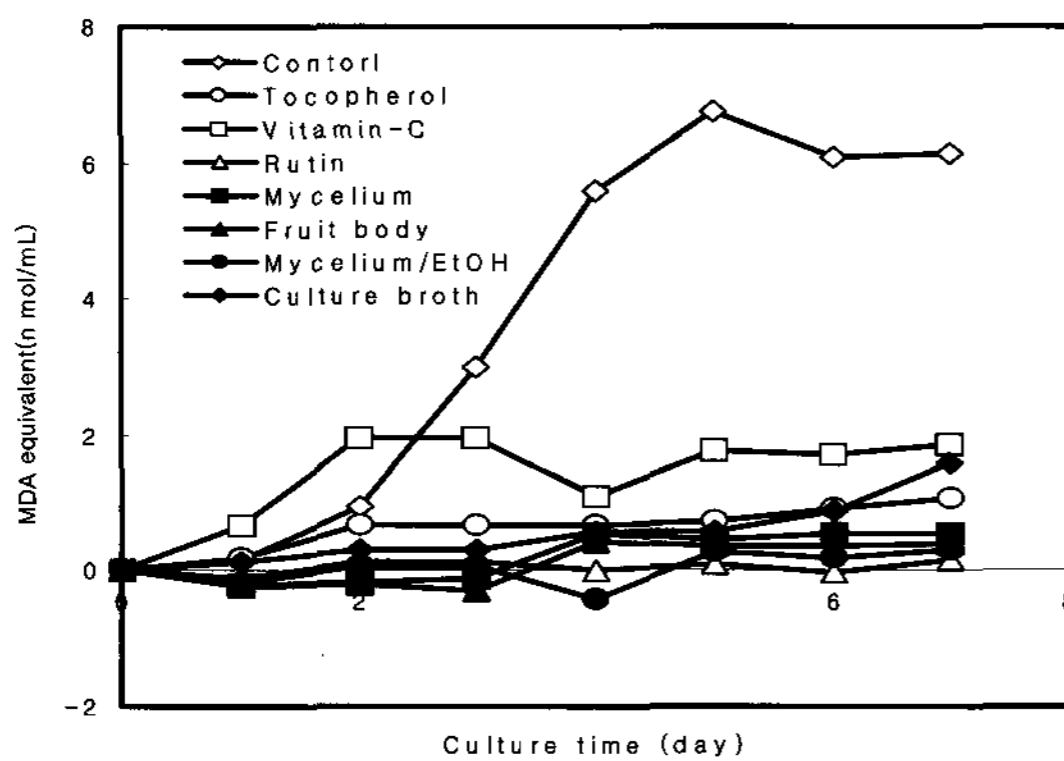


Figure 9. Antioxidative activity of the cultured products of *Hericium erinaceum* and the authentic standards as measured by the TBA-RS method (MDA: malonedialdehyde).

FTC 법은 지질 과산화 초기의 변화를 보는데 적합한 방법으로 시료를 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양 경과에 따라 500 nm에서의 흡광도 값이 배양 4일까지 급격히 증가하였으며, 이후 다시 급격히 감소하였다. 반면, 항산화 표준품 및 시료 처리구들은 배양경과에 따라 서서히 증가하거나 흡광도의 증가가 거의 관찰되지 않았다. 낮은 흡광도는 항산화 활성이 높음을 지적하므로 이러한 결과는 시료들이 항산화 활성을 나타냄을 의미한다. 가장 높은 흡광도를 나타내었던 대조구의 배양 4일째를 기준으로 하여 지질 과산화의 저해율을 보면 Fig. 8에서 보는 바와 같이,

시료들은 0.1 mg/ml의 농도에서 75 이상이었다. 특히, 균사체 및 자실체 추출물은 표준품으로 사용한 비타민 C, 토코페롤 및 rutin보다도 더욱 강력한 항산화활성을 보여 지질의 초기 과산화를 완전히 억제하는 것으로 나타났다.

또, Fig. 9는 TBA-RS법으로 조사한 결과로, FTC법에서와 마찬가지로 대조구는 반응 5일 후 지질과산화의 중간생성물인 MDA가 농도가 최고값에 달하였으며, 이후 다소 감소하면서 그 수준을 유지하였다. 그러나 항산화 표준품 및 시료처리구들은 비타민 C를 제외하면 배양 경과에 따른 MDA의 증가가 거의 없어 항산화 활성이 우수함을 보였다. MDA 생성에서 최고값을 보였던 대조구의 반응 5일 후를 기준으로 각 시료의 지방과산화 저해율을 보면, Fig. 10에서와 같이, 대조구의 20% 이내이었으며, 항산화 억제율은 약 95%에 달하였다.

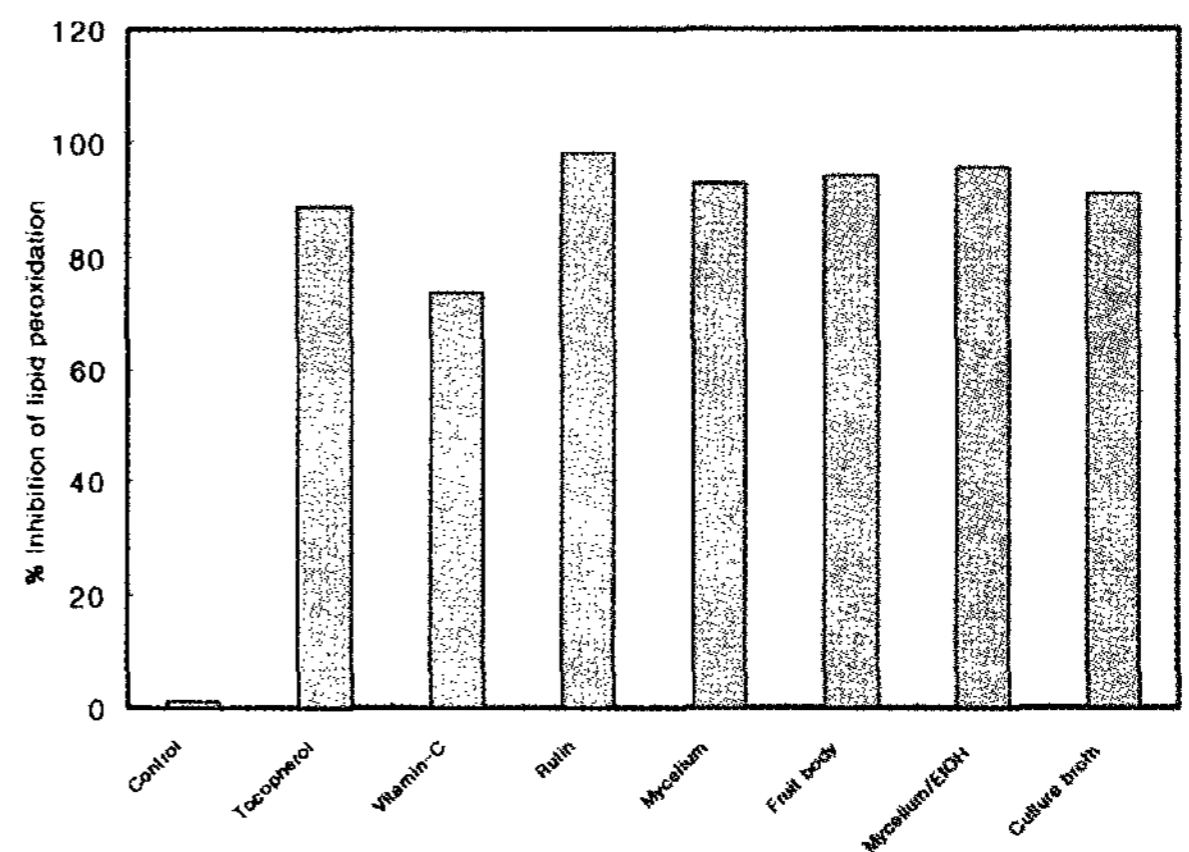


Figure 10. Inhibition effect of fruit body and cultured products of *Hericium erinaceum* on lipid peroxidation by using TBA-RS method (Percentage inhibition effect was calculated as compared with the control activity (0%) at 5 day of lipid peroxidation).

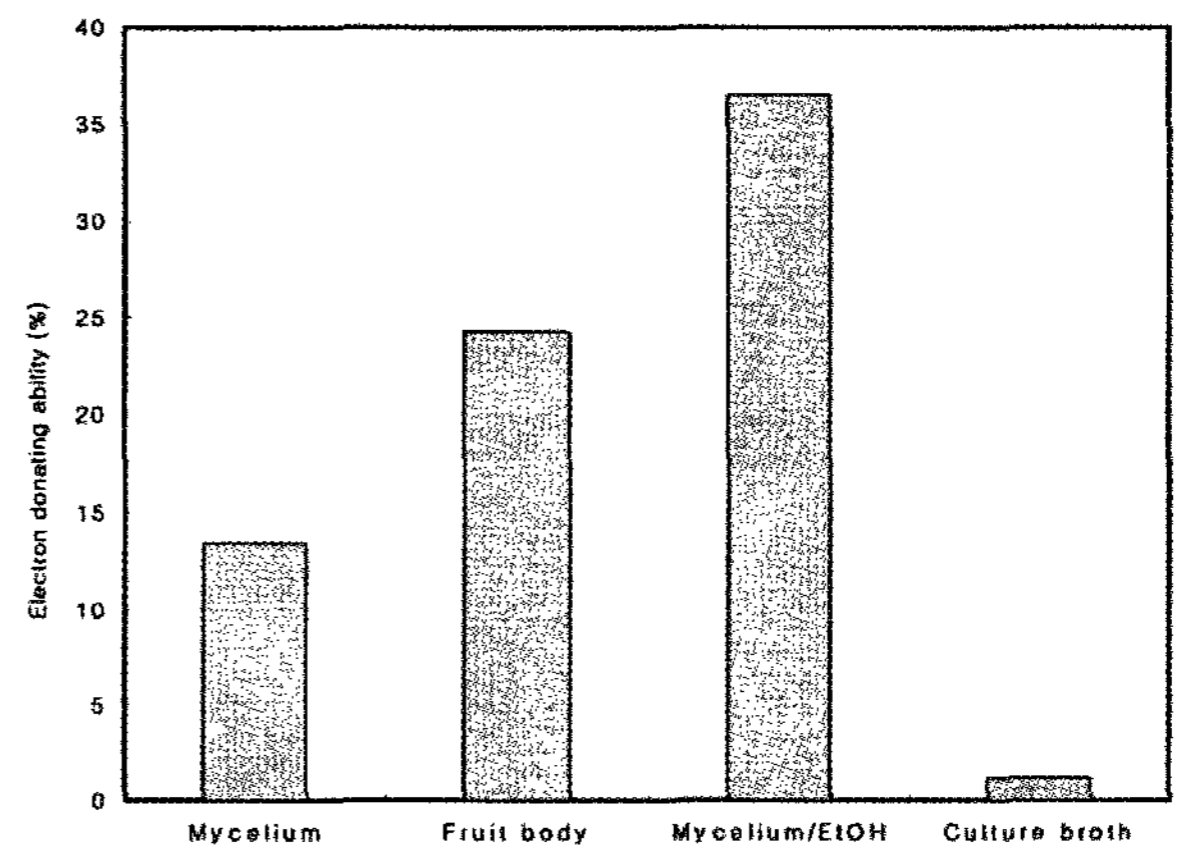


Figure 11. Electron donating ability of *Hericium erinaceum* derived products.

Kasuga 등(24)은 버섯 150종의 에탄올 추출물에 대한 항산화 기능의 스크리닝을 실시한 결과, 이의 약 1/3이 어느 정도 항산화 기능을 가지며, 이 중 27종은 특히 시료 첨가구의 과산화물가 (POV_s)와 대조구의 과산화물가 (POV_c)의 비가 0.2 미만의 강한 항산화 효과를 나타낸다고 하였다.

또 극성이 높은 용매로 추출한 성분의 항산화 효과가 높는데, 주로 버섯의 색소성분일 것으로 추정하였다. 하지만 이들은 *H. erinaceum*에 대해서는 조사하지 않았는데, 본 실험 결과 *H. erinaceum* 시료 중 균사체 추출물은 지질과산화 정도가 대조구의 20% 이내로 매우 강한 항산화 활성을 보여 천연 항산화제로서의 가능성을 보였다.

한편, Fig. 11은 이들 노루궁뎅이 버섯 유래 추출물의 작용 기작을 알아볼 목적으로 전자공여능을 조사한 결과이다. 기대한 바와는 달리 전자공여능은 14-37%에 불과하여 전자공여능과 항산화 활성과의 높은 상관관계는 보이지 않았다. 전자공여체로서의 기능은 페놀성 항산화 물질의 작용기구로 널리 알려져 있는데, 본 시료의 경우는 이와는 다른 기구에 의해 항산화 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

일반적으로 항산화 물질의 대표적인 기능은 free radical 포착제로서의 기능인데, 이의 작용기구로는 수소공여체나 전자공여체로 작용하여 전하이동 복합체를 형성하는 경우 및 연쇄반응으로 생성되는 과산화물을 분해하여 비 free radical성 생성물을 형성하는 경우 등이 알려져 있다.

요 약

*H. erinaceum*은 현재 산업적으로 매우 주목되고 있는 기능성 소재들 중의 하나이다. 본 연구에서는 식용은 물론 각종 약리효과를 나타내는 *H. erinaceum*의 기능성 식품의 제품화 연구 일환으로, 지금까지 체계적으로 연구된 바 없는 *H. erinaceum*의 액체배양을 시도하고, 이 버섯의 액체배양 생성물의 acetylcholinestrage (AChE) 저해활성과 항산화활성의 효과를 자실체와 비교하면서 평가, 규명하고자 하였다. *Electrophorous electricus* 유래 AChE에 대한 저해 활성을 조사한 결과, 자실체 및 배양 생성물 (균사체와 배양여액)은 10 mg/ml 농도에서 75~85%의 저해활성을 보였고, 저해기작은 모두 일반적 비경쟁적 저해 (general non-competitive inhibition)에 의하였다. 특히, 배양여액의 ethanol 침전 상정액은 10 mg/ml의 농도에서 약 94%의 매우 높은 저해활성을 보였다. 한편, linoleic acid를 기질로 한 지질과산화에 대한 노루궁뎅이 버섯 유래 시료들 (자실체와 균사체 추출물, 균사체 추출물의 ethanol 침전물 및 배양여액)의 억제능을 Rhodan-Fe (FTC)법으로 조사한 결과, 균사체와 자실체 추출물은 0.1 mg/ml의 농도에서 지질의 초기 과산화를 완전히 억제하였다. 또 TBA-RS로 조사한 경우도 항산화 표준품으로 사용한 tocopherol, vitamin C 및 rutin보다 우수하였고, 시료들 간의 큰 차이 없이 약 95%의 매우 우수한 지질과산화 억제율을 나타내었다.

REFERENCES

1. Kawagishi, H., M. Ando, K. Shinba, H. Sakamoto, S. Yoshida, F. Ojima, Y. Ishiguro, N. Ukai, and S. Furukawa (1993), Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Hericiu*, *Phytochemistry* **32**(1), 175-178.
2. Kawagishi, H., A. Shimada, R. Shirai, K. Okamoto, F. Ojima, H.

3. Sakamoto, Y. Ishiguro, and S. Furukawa (1994), Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericiu*, *Tetrahedron Letter* **35**(10), 1569-1572.
4. Kawagishi, H., Shimada, A., Hosokawa, S., Mori, H., Sakamoto, H., Ishiguro, Y., Sakemi, S., J. Bordner, N. Kojima, and S. Furukawa (1996), Erinacines E, F and G, stimulators of nerve growth factor(NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericiu*, *Tetrahedron Letter* **37**(41), 7399-7402.
5. Kawagishi, H., Shimada, A., Shizuki, K., Mori, H., Okamoto, K., Sakamoto, H., and S. Furukawa (1996), Erinacines D, a stimulator of nerve growth factor (NGF)- synthesis, from the mycelia of *Hericiu*, *Heterocycl. Commun.* **2**(1), 51-54.
6. Furukawa, S. and H. Kawagishi (1991), Physiological significance and the synthesis-promoting substances of nerve growth factor(NGF), *Chemistry & Biology* **29**(10), 640-646.
7. Hugo, L. H., D. M. Richardo, and C. L. Nibaldo (1996), Tetrameric(G₄) acetyl- cholinesterase: structure, localization, and physiological regulation, *J. Neurochem.* **66**, 1335-1346.
8. Younkin, S. G., B. Goodridge, J. Katz, G. Lockett, D. Nafziger, M. F. Usiak, and L. H. Younkin (1986), Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimer's disease, *Fed. Proc.* **45**, 2980-2988.
9. Gasparin, L., M. Rasshi, G. Binetti, M. Trabucchi, S. B. Solerte, D. Alkon, R. Etcheberrigary, G. Gibson, J. Blass, R. Paoletti, and S. Govoin (1998), Peripheral markers in testing pathophysiological hypothesis and diagnosing Alzheimer's disease, *FASEB J.* **12**, 17-34.
10. Chemnitis, J. M., K. H. Haselmeye, B. D. Gonska, H. Kreuzer, and R. Zech (1996), Indirect parasymphomimetic activity of metoclopramide: reversible inhibition of cholinesterases from human central nervous system and blood, *Pharmacol. Res.* **34**, 65-72.
11. Brufani, M., L. Filocamo, S. Lappa, and A. Maggi (1997), New acetyl- cholinesterase inhibitors, *Drugs Future* **22**, 397-411.
12. Wanda, J. K., J. S. John, and R. C. Neal (1999), Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Ann. Pharmacother.* **33**, 441-450.
13. Markesbery, M. R. and M. A. Lovell (1998), Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging.* **19**, 33-36.
14. Sayre, L. M., D. A. Zelasko, and P. L. R. Harris (1997), 4-hydroxynonenal- derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* **68**, 2092-2097.
15. Kopal, T., R. Subramanian, J. Drake, and R. Prasad (1998), Vitamin E protects against Alzheimer's amyloid peptide(25-35) induced changes in neocortical snaptosomal membrane lipid structure and composition, *Brain Res.* **786**, 270-273.
16. Gwebu, E. T., M. Selassie, N. T. Gwebu, S. Richardson, D. Mathis, J. William, and J. Waden (1997), Cytotoxicity of β -amyloid₍₂₅₋₃₅₎ on vascular smooth muscle cells and attenuation by vitamin E. *In Vitro Cell, Dev. Biol. Anim.* **33**, 672-673.
17. Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone (1961), A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
18. Segel, I. H. (1975), *Enzyme Kinetics*, A Wiley-Interscience Publication, New York, pp.100-160, 161-226.
19. Giacobini, E. (1997), From molecular structure to Alzheimer therapy, *Jpn. J. Pharmacol.* **74**, 225-241.
20. SAS (1988), *Statistical Analysis System, Property software* (Release 6.03 ed.). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
21. Osawa, T. and M. Namiki (1981), A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves, *Agric. Biol. Chem.* **45**(3), 735-739.
22. Du, Z. and W. J. Bramlage (1992), Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts, *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1566-1570.

22. Blois, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* **181**, 1199-1202.
23. Tsakiris, S. and K. H. Schulpis (2002), Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine on acetylcholinesterase activity, *Z. Naturforsch* **57c**, 506-511.
24. Kasuga, A., Y. Aoyagi, and K. Sugahara (1993), Antioxidative activities of several mushroom extracts, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **40**(1), 56-63.