

주요 식용버섯 추출물의 생리활성 효과

최세진¹ · 이연실² · 김진경² · 김진규³ · 임순성^{1,2,3*}

¹한림대학교 식품영양학과

²한림대학교 식의약품 효능평가 및 기능성 소재개발 센터

³한림대학교 천연의약연구소

Physiological Activities of Extract from Edible Mushrooms

Se-Jin Choi¹, Yeon Sil Lee², Jin-Kyung Kim², Jin Kyu Kim³, and Soon Sung Lim^{1,2,3*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition,

²Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Food and Drugs, and

³Institute of Natural Medicine, Hallym University, Gangwon 200-702, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the physiological activity of extracts of fresh mushrooms. The components were extracted by hot water; subsequently, the hot-water extract was subjected to 60% ethanol precipitation to yield high-molecular-weight (HMW) and low-molecular-weight (LMW) fractions. Total polyphenol contents, β -glucan contents, electron-donating ability (EDA), superoxide dismutase (SOD)-like activity, nitrite-scavenging activity, fibrinolytic activity, nitric oxide (NO) production, and inhibition of NO production of the mushroom extracts were measured using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophages, RAW 264.7 cells. The extracts of *Lentinus edodes* (Berk.) Singer and *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer contained the highest levels of β -glucan (33.5% and 25.57%, respectively). Further, the LMW fractions of the *Phellinus linteus* contained the highest levels of polyphenols (233.23 mg/g). The EDA of LMW fractions (10 mg/mL) of the *Phellinus linteus* and *Agaricus bisporus* were 80.74% and 51.35%, respectively. Further, SOD-like activities of the LMW fractions were high as compared to those of the HMW fractions. Nitrite-scavenging activities of the LMW fractions (pH 1.2; concentration, 10 mg/mL) of the *Phellinus linteus* and *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer were 75.95% and 41.05%, respectively. The fibrinolytic activity of the LMW fractions of all mushrooms showed no enzyme activity by fibrin plate assay. The fibrinolytic activity of the extracts of *Tricholoma matsutake* was the greatest inhibitory activity at 60.4%. Further study revealed that the mushroom extracts exhibited anti-inflammatory effects on RAW 264.7 cells. The LMW fraction (500 μ g/mL) of the *Phellinus linteus* considerably inhibited NO production (100%).

Key words: edible mushroom, β -glucan content, polyphenol, anti-oxidant, fibrinolytic activity, anti-inflammation,

서 론

버섯은 분류학적으로 균류에 속하나 일반적인 균류와 다르게 포자를 형성하기 위한 대형의 자실체를 만드는 것이 특징으로 대부분 담자균류와 자낭균류에 속하는 고등균류이다. 버섯은 풍미가 뛰어나고 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질, 비타민 및 미네랄 등의 각종 영양소를 다양하게 함유하고 있을 뿐만 아니라 생리활성 물질들을 생산함으로써 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 온 식품이다(1).

최근 고령화 인구 증가 추세에 따른 현대인의 건강에 대한 관심 증대와 삶의 질에 대한 인식 변화와 더불어 생체 리듬 조절 및 질병의 치료와 노화억제 등의 생명활동에 영향을 미치는 기능성식품과 천연물에 대한 관심이 높아지고 있다.

이에 따라 천연물을 대상으로 한 연구가 활발히 수행되면서 항균, 항산화, 항암, 면역력 강화 등 천연물의 기능성과 천연물에 함유되어 있는 2차 대사산물의 생리활성 효과에 대한 연구가 주요 관심사가 되고 있다(2). 따라서 단순한 식품으로서가 아니라 생체에 영향을 미치는 효과와 기능으로서의 생체방어, 생체리듬조절 및 질병의 회복과 노화억제 등 생명활동에 대한 식품의 생리조절 능력을 가진 기능성식품에 관심이 집중되고 있으며, 식품의 안전성도 중요시되고 있다(3).

모든 생물체는 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지를 발생하는 과정에서 유해 산소로 불리는 활성산소들의 상해에 대한 근본적인 자기방어를 가지고 있다(4). 조직의 방어기구에서 해리되지 못한 활성산소는 노화, 암, 관절염 등에 직·간접적으로 생체 장애를 일으키는 원인으로 알려져

*Corresponding author. E-mail: limss@hallym.ac.kr
Phone: 82-33-248-3075, Fax: 82-33-244-1738

있다(5). 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제는 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등의 효소 계열의 예방적 항산화제(6)와 phenolic 화합물, tocopherol류, ascorbic acid, carotenoid, glutathione, 아미노산 등의 천연 항산화제가 있으며(7), 합성 항산화제인 butylated hydroxy anisole(BHA)와 butylated hydroxy toluene(BHT) 등은 안전성에 대하여 논란이 제기되어 현재에는 허용대상 식품이나 사용량이 법적으로 엄격히 규제되어 있다(8). 이처럼 천연으로부터 산화반응 및 radical의 반응성을 억제할 수 있는 항산화물질을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있으며 일부는 상품화되고 있다.

또한 버섯의 β -glucan은 면역활성체의 기능, 항산화능, 생체조직 재생과 치유기능, 항생제, 항균, 항바이러스 및 대식세포를 자극하여 돌연변이 세포를 인식하고 공격하는 항종양 효과가 있다고 보고되고 있다(9-11). 혈액 내의 homeostasis가 깨어져 혈전에 생성되면 혈관이 막히게 되고 혈액순환이 방해를 받게 되는데 버섯이 혈액 내에서 혈전 용해를 향상시켜 혈액순환에 도움을 주고 뇌졸중, 심장병 같은 혈관계 질환, 당뇨, 알츠하이머 같은 질병의 치료에 효과를 나타내고 있다(12,13). 버섯의 이 같은 생리활성 물질은 성인병 예방과 치료를 위한 기능성식품이나 음료를 개발하는 데 이용할 수 있게 되었다.

따라서 본 연구에서는 식용으로 많이 이용되고 있는 버섯(송이버섯, 새송이버섯, 양송이버섯, 느타리버섯, 애느타리버섯, 팽이버섯, 표고버섯)과 약용버섯으로 널리 알려진 상황버섯을 대상으로 유효성분 함량 비교를 위하여 β -glucan, 총 폴리페놀 함량을 측정하고, 저분자와 고분자로 분획하여 이들 각각의 생리활성을 비교 분석하였다. 생리활성에는 전자공여능, SOD 유사활성, 아질산염 소거능력 등의 항산화능력을 비교하였고, 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 이용하여 대식세포 활성능 및 항염증 효능을 확인하였으며, 혈전용해능력 측정을 위하여 fibrinolytic 활성을 비교하였다. 이와 같이 상황버섯을 포함한 일반적으로 식용하고 있는 버섯류들로부터 다양한 생리활성을 측정함으로써 기능성 소재로의 이용 가능성에 대해 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 송이버섯(*Tricholoma matsutake*)은 양구 솔레원(주)에서 제공받아 사용하였으며, 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*), 양송이버섯(*Agaricus bisporus*), 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Quel), 애느타리버섯(*Pleurotus osteratus* (Fr.) Kummer), 표고버섯(*Lentinus edodes* (Berk.) Singer), 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 춘천 소재의 대형마트에서 구입하여 사용하고, 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 삼성생약에서 제공 받아 사용하였다.

각 버섯은 깨끗이 손질한 후 즉시 동결건조 하여 분쇄 후 분말로 하여 사용하였다. 분말시료 일부는 β -glucan 함량 측정시료로 사용하였고, 그 외 버섯 분말 시료의 저분자 분획 및 고분자 분획 추출방법은 Fig. 1에 나타내었다.

β -Glucan 함량 측정

β -Glucan의 함량은 beta-glucan assay kit(Megazyme International Ireland Limited, Bray, Ireland)를 사용하여 total glucan과 glucan 이외의 당 함량을 구한 후, α -glucan과 glucan 이외의 당 함량 간의 차이를 이용하여 구하였다.

$$\beta\text{-Glucan (\% w/w)} =$$

$$\text{Total glucan (\% w/w)} - \alpha\text{-glucan (\% w/w)}$$

실험방법을 간단히 요약하면, 각각의 시료에 진한 염산을 첨가하여 100°C에서 2시간 동안 가수분해 시킨 후 2 N KOH를 이용하여 pH를 조정하였다. 가수분해액을 200 mM의 sodium acetate buffer(pH 5.0)를 이용하여 희석한 후 원심분리 하여 상층액 100 μ L을 취하여 exo 1,3- β -glucanase와 β -glucosidase를 첨가한 후 glucose determination reagent(Megazyme International Ireland Limited)를 첨가하여 510 nm에서 흡광도를 측정하여 total glucan과 glucan 이외의 당 함량을 얻었다.

α -Glucan과 glucan 이외의 당 함량은 시료에 2 M KOH를 넣고 20분간 얼음이 채워진 수욕에서 반응 후 1.2 M sodium acetate buffer(pH 3.8)를 첨가하고 amyloglucosidase와 invertase를 넣어 40°C에서 30분간 반응시키고, 그 후 200 mM sodium acetate buffer를 가하고 glucose determination reagent를 첨가하여 510 nm(EL 800 Universal Microplate Reader, BIO-TEK Instrument, Inc., Winooski, VT, USA)에서 흡광도를 측정하였다.

총 폴리페놀 함량의 측정

총 폴리페놀의 함량은 Folin-Ciocalteu법(14,15)을 사용해

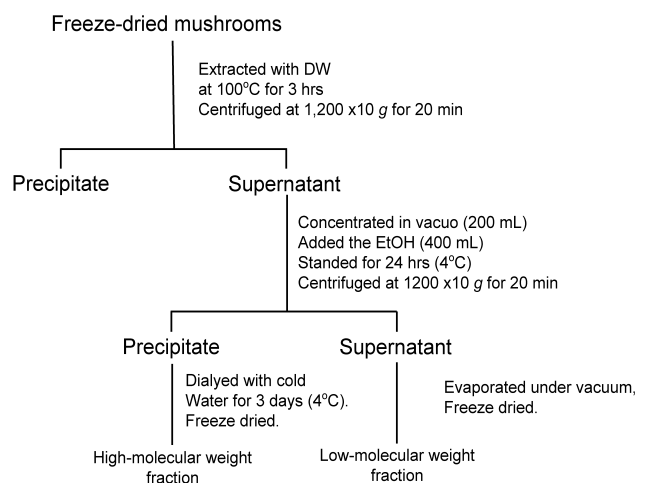


Fig. 1. Procedure for preparation of the fractionations from mushrooms.

측정하였다. 건조 시료 일정량을 증류수에 녹이고 일정농도로 희석하여 측정에 이용하였다. 시료 0.25 mL에 Folin-Ciocalteu reagent를 0.75 mL 가하여 5분간 실온에 방치시킨다. 그 후 7.5% Na₂CO₃을 2.0 mL 첨가하고 증류수 7 mL을 첨가해 최종 부피를 10 mL로 맞춘 후 암실에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 765 nm에서 흡광도를 측정했다. 표준시약은 gallic acid, tannic acid, catechin을 사용했으며, 각 표준시약의 농도를 달리하여 조제한 후 표준 곡선을 작성하였다. 실험 측정은 3회 반복 실험하여 평균±표준편차로 나타내었다.

전자공여능(electron donating abilities) 측정

전자공여 작용(electron donating abilities, EDA) 측정은 Blois의 방법(16)을 변형하여 각 추출물의 DPPH에 대한 수소공여 효과를 측정하여 전자공여능을 평가하였다. 즉, 일정농도의 시료 30 µL에 0.32 mM DPPH 용액(dissolved in 99% methanol)을 180 µL 넣고 혼합한 후, 암실에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 spectrophotometer를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타냈으며, 양성대조물로는 L-ascorbic acid를 사용하였다. 실험 측정은 3회 반복 실험하여 평균±표준편차로 나타내었다.

$$\text{EDA} (\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: 추출물 첨가구의 흡광도

B: 추출물 무 첨가구의 흡광도

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성의 측정은 Marklund의 방법을 변형한 Kim 등(17)의 방법을 이용하여 실시하였다. 즉, tris-HCl buffer (50 mM tris[hydroxymethyl] amino-methane + 10 mM EDTA, pH 8.5)를 이용하여 pH 8.5로 조절된 시료액을 만들었다. 각 추출물 0.2 mL에 tris-HCl buffer(pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치한 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정, 시료 첨가 및 무첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity} (\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: 추출물 첨가구의 흡광도

B: 추출물 무 첨가구의 흡광도

단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

아질산염 소거능(nitrite-scavenging ability) 측정

아질산염 소거효과는 Gray와 Dugan(18)의 방법으로 측정하였다. 즉, 1 mM NaNO₂ 0.1 mL에 각각의 추출물을 0.2 mL 가하고 pH에 따른 소거능 차이를 확인하기 위해 0.1 N HCl를 가하여 pH 1.2로 만들고, 0.2 N citrate buffer로 pH 3.0, 6.0 용액을 만든 후 pH가 다른 용액 0.7 mL을 달리하여 가한 후 반응용액의 부피를 1 mL로 하였다. 이를 37°C에서

1시간 동안 반응시킨 다음 여기에 2% acetic acid 5 mL, griess reagent(Promega, Madison, WI, USA) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 그리고 대조구는 griess reagent 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 추출액 첨가 전후의 아질산염 백분율로 표기하였다.

$$N (\%) = \left(1 - \frac{A-C}{B}\right) \times 100$$

N: 아질산염 소거율

A: 1 mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B: 1 mM NaNO₂ 용액에 시료 대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

C: 시료 추출물 자체의 흡광도

혈전용해 활성(fibrinolytic activity)

혈전용해 활성은 Astrup과 Müllertz의 fibrin plate법(19)을 수정하여 사용하였다. 먼저 0.6% bovine fibrinogen 10 mL를 10 cm petri dish에 부은 후, bovine thrombin 0.5 mL를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 응고시켰다. 응고된 plate 위에 시료 50 µL를 조심스럽게 점적하였다. 대조구로는 시료대신 plasmin(2.5 unit/mL)을 사용하였다. 이때 시료는 50 mg/mL의 농도를 사용하였다. 이 plate를 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 투명환의 크기를 측정하였다. Fibrin plate법에서 fibrin이 가수분해 됨에 따라 생기는 투명환의 면적을 관찰할 수 있으며 이는 혈전용해능과 비례관계에 있다. 그러므로 혈전용해 활성은 투명환의 면적으로 나타낼 수 있으며, 버섯의 혈전용해 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Fibrinolytic activity} (\%) = \frac{\text{Dimension of zone of sample}}{\text{Dimension of zone of plasmin}} \times 100$$

RAW 264.7 세포를 이용한 대식세포 활성능 측정

활성화된 대식세포가 분비하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 mouse 단핵구 기원의 Raw 264.7 cell을 이용하여 NO 생성량의 변화를 측정(20)하였다. RAW 264.7 세포를 24-well에 1×10⁵ cell로 분주하여 18시간 동안 배양한 다음 각 well에 각 버섯 시료 50~500 µg/mL를 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 5% CO₂의 공기조건으로 배양하였다. 시료에 대한 대조구로는 500 ng/mL의 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 비교군으로 사용하였다. 배양 후, 상정액 100 µL를 회수하고 여기에 동량의 griess reagent를 첨가한 뒤 15분 동안 실온에서 반응시켰으며 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RAW 264.7 세포를 이용한 NO 생성 저해 능력 측정

LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cell로부터 NO 생성 저해활성에 미치는 작용을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포를

24-well에 1×10^5 cell로 분주하여 18시간 동안 배양한 다음 각 well에 LPS를 500 ng/mL을 넣고 20시간 배양한 후에 상등액을 제거하고 PBS로 세척한 후에 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)으로 교환하고 시료를 50~500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 가하여 20시간 배양 후, 상정액 100 μL 를 회수하고 여기에 동량의 griess reagent를 첨가한 뒤 15분 동안 실온에서 반응시켰으며 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

통계처리는 SAS(statistical analysis system) program을 사용하여 각각의 시료에 대한 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 각 군의 평균치의 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 ANOVA test와 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

결과 및 고찰

추출수율

시료버섯 8종을 물로 추출한 후 저분자 분획(LMW)와 고분자 분획(HMW)으로 나누어 동결건조한 후 추출수율을 조사하였다(Table 1). 각 버섯의 LMW 분획물은 양송이버섯(III)이 32.82%로 가장 높았고, 그 다음은 송이버섯(I) 32.63%, 팽이버섯(VI) 27.16%, 느타리버섯(IV) 26.24%의 순이었다. HMW 분획물은 새송이버섯(II)이 2.31%로 가장 높

은 수율을 보였으며, 그 다음 느타리버섯(IV) 1.46%, 애너타리버섯(V) 1.45% 순으로 나타났다. LMW와 HMW의 추출수율을 비교한 결과 새송이버섯(II)과 상황버섯(VIII)은 약 7배, 그 외의 버섯들은 평균 10배 이상 LMW 분획의 추출수율이 높게 나타났다.

β -Glucan 함량

β -Glucan은 버섯류의 세포벽을 구성하면서 단백질 혹은 기타 세포벽성분과 결합한 형태로 존재한다. 이는 면역활성체의 기능, 항산화능, 생체조직 재생과 치유기능, 항생, 항균, 항바이러스 및 대식세포를 자극하여 돌연변이 세포를 인식하고 공격하는 항종양 효과가 있다고 보고되었다(9-11). 각 버섯의 β -glucan의 함량은 표고버섯(VII) 33.50%로 β -glucan 함량이 가장 높았으며, 그 다음으로 애너타리버섯(V) 25.57%, 상황버섯(VIII) 23.92% 순으로 나타났다(Table 2). 버섯에서 모든 β -glucan을 추출하기는 매우 어렵고, 추출, 정제된 β -glucan 내에 기타 성분들이 일부 혼입된다고 알려져 있다(21). 또한 Jung 등(22)은 해송이버섯 물 추출물의 β -glucan 함량이 9.32%라고 보고하였으며, Hong 등(23)은 아가리쿠스버섯의 열수 추출물의 β -glucan 함량은 24.32%라고 보고하였다. 본 실험에서 양송이버섯(IV)이 해송이버섯과 유사한 β -glucan 함량을 나타내었으며, 아가리쿠스버섯보다 표고버섯은 10% 정도 더 높은 33.5% β -glucan 함량을 나타내었다.

Table 1. Yields of low-molecular weight (LMW) and high-molecular weight (HMW) fraction extracted from mushrooms

Mushrooms	LMW	HMW
	%	%
<i>Tricholoma matsutake</i> (I)	32.63 \pm 0.47 ^{1)a2)}	1.06 \pm 0.12 ^c
<i>Pleurotus eryngii</i> (II)	17.80 \pm 0.04 ^e	2.31 \pm 0.14 ^a
<i>Agaricus bisporus</i> (III)	32.82 \pm 0.20 ^a	0.89 \pm 0.02 ^c
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) Quel. (IV)	26.24 \pm 0.06 ^c	1.46 \pm 0.15 ^b
<i>Pleurotus osteratus</i> (Fr.) Kummer (V)	22.46 \pm 0.10 ^d	1.45 \pm 0.17 ^b
<i>Flammulina velutipes</i> (VI)	27.16 \pm 0.03 ^b	1.25 \pm 0.10 ^c
<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer (VII)	11.15 \pm 0.26 ^f	0.46 \pm 0.15 ^d
<i>Phellinus linteus</i> (VIII)	3.69 \pm 0.13 ^g	0.86 \pm 0.07 ^c

¹⁾All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

²⁾Values in the column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table 2. β -Glucan contents of mushrooms

	Total glucan	α -Glucan	β -Glucan ¹⁾
<i>Tricholoma matsutake</i> (I)	22.99 \pm 0.62 ²⁾	0.93 \pm 0.31	22.06 \pm 0.93 ^{c3)}
<i>Pleurotus eryngii</i> (II)	30.52 \pm 0.82	6.29 \pm 0.21	24.23 \pm 1.03 ^b
<i>Agaricus bisporus</i> (III)	8.97 \pm 0.21	1.13 \pm 0.52	7.83 \pm 0.74 ^e
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) Quel. (IV)	23.30 \pm 1.24	1.34 \pm 0.41	21.96 \pm 5.26 ^c
<i>Pleurotus osteratus</i> (Fr.) Kummer (V)	28.45 \pm 0.41	2.89 \pm 0.21	25.57 \pm 0.63 ^b
<i>Flammulina velutipes</i> (VI)	17.94 \pm 0.82	1.13 \pm 0.21	16.8 \pm 1.04 ^d
<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer (VII)	35.05 \pm 1.55	1.55 \pm 0.00	33.5 \pm 1.55 ^a
<i>Phellinus linteus</i> (VIII)	25.57 \pm 1.03	1.65 \pm 0.52	23.92 \pm 1.55 ^b

¹⁾ β -Glucan (% w/w) = Total glucan (% w/w) - α -glucan (% w/w).

²⁾All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

³⁾Values in the column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table 3. Total polyphenol contents of mushrooms according to different phenolic standards unit: mg/g (dry weight)

	Gallate		Tannic acid		Catechin	
	LMW ¹⁾	HMW ²⁾	LMW	HMW	LMW	HMW
<i>Tricholoma matsutake</i> (I)	11.72±0.89 ^{3)bd)}	5.72±0.06 ^c	14.35±1.12 ^b	6.85±0.08 ^c	18.59±1.42 ^b	9.07±0.10 ^c
<i>Pleurotus eryngii</i> (II)	4.74±0.24 ^d	0.37±0.06 ^f	5.62±0.31 ^d	0.15±0.07 ^f	7.51±0.39 ^d	0.59±0.10 ^f
<i>Agaricus bisporus</i> (III)	9.51±0.52 ^b	9.45±0.22 ^b	11.58±0.65 ^{cd}	11.50±0.27 ^b	15.07±0.83 ^{cb}	14.98±0.34 ^b
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) Quel. (IV)	10.28±0.62 ^b	3.54±0.03 ^d	12.54±0.77 ^{bc}	4.12±0.04 ^d	16.29±0.98 ^b	5.61±0.05 ^d
<i>Pleurotus osteratus</i> (Fr.) Kummer (V)	12.18±0.92 ^b	3.17±0.22 ^d	14.92±1.15 ^b	3.65±0.27 ^d	19.32±1.46 ^b	5.02±0.34 ^d
<i>Flammulina velutipes</i> (VI)	6.09±0.12 ^d	1.66±0.00 ^e	7.31±0.15 ^d	1.77±0.00 ^e	9.66±0.20 ^d	2.63±0.00 ^e
<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer (VII)	7.23±0.28 ^b	5.78±0.74 ^c	8.73±0.35 ^{cd}	6.92±0.92 ^c	11.46±0.44 ^{cd}	9.17±1.17 ^c
<i>Phellinus linteus</i> (VIII)	233.23±4.31 ^a	17.23±1.23 ^a	288.46±5.39 ^a	18.46±1.54 ^a	369.76±6.83 ^a	27.32±0.98 ^a

¹⁾LMW: Low-molecular weight.

²⁾HMW: High-molecular weight.

³⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

⁴⁾Values in the column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

총 폴리페놀 함량

식품 속에 함유되어있는 많은 생리활성 phytochemical 중에는 플라보노이드, 프로시아니딘, 탄닌, 안토시아닌 및 페놀산과 같은 페놀성분이 있다. 이들 폴리페놀은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl을 가진 방향족 화합물이며 항암, 항염증 및 항혈전 작용을 지니고 있는 항산화성 생리활성 물질이다(24,25). 본 실험에서 버섯 추출물의 총 폴리페놀 함량을 구하기 위하여 gallate, tannic acid, catechin의 3가지 표준물질로 함량을 계산하였다. 각각의 표준물질에 따라 버섯의 총 폴리페놀 함량이 차이가 나타났으며, 표준물질을 catechin으로 했을 때 가장 높은 페놀 함량을 가졌고, tannic acid, gallate 순으로 나타났다. 이것은 각 표준물질의 흡광도를 통해 얻어진 결과를 이용하였기에, 서로 다른 표준물질 간 흡광도 차이에 의한 결과라고 생각되어진다.

Gallate를 기준으로 LMW 분획에서의 총 페놀 함량은 상황버섯(VIII)(233.23 mg/g)이 가장 높은 함량을 가졌으며, 그 다음은 애스타리버섯(V) 12.18 mg/g, 송이버섯(I) 11.72 mg/g 순으로 나타났다. 그 외의 버섯은 4~10 mg/g의 다양한 페놀함량을 나타내었다. HMW 분획은 LMW 분획보다 낮은 페놀 함량을 나타냈으며, 상황버섯(VIII)(17.23 mg/g)이 가장 높은 페놀 함량을 가졌으며, 그 다음으로 양송이버섯(III)(9.45 mg/g), 표고버섯(VII)(5.78 mg/g), 송이버섯(I)(5.72 mg/g)으로 나타났다(Table 3). Kim 등(26)의 연구에서 상황버섯 열수추출물의 페놀 함량이 149.92 mg/g, 에탄올 추출물이 432.42 mg/g의 함량을 보였으며, 이는 물 추출물의 경우 저분자와 고분자가 동시에 추출이 되고, 에탄올 추출물의 경우는 주로 저분자성 물질이 추출되는 것으로 추출용매의 차이가 구성성분의 차이를 나타내는 사실을 확인할 수 있었다.

전자공여 작용

각종 버섯 추출물과 항산화제인 ascorbic acid를 DPPH를 이용하여 전자공여능을 측정하였다. DPPH는 분자 내 radical을 함유하여 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만들고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 만나면

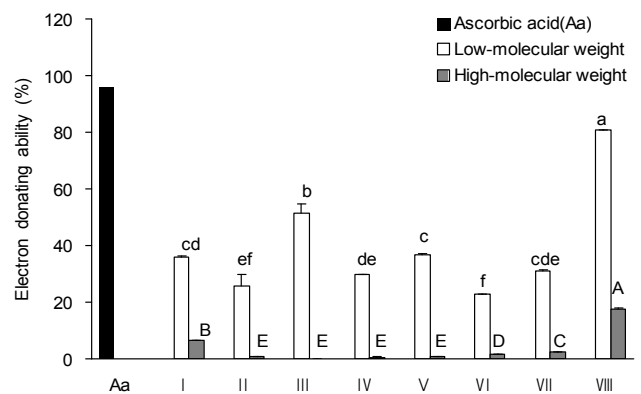


Fig. 2. Electron donating ability (EDA) of mushroom extracts from LMW (low-molecular weight, 10 mg/mL) and ascorbic acid (0.5 mg/mL). Symbols are as follows; Aa, ascorbic acid 0.5 mg/mL; I, *Tricholoma matsutake*; II, *P. eryngii*; III, *Agaricus bisporus*; IV, *P. ostreatus* (Jacq.) Quel.; V, *P. osteratus* (Fr.) Kummer; VI, *Flammulina velutipes*; VII, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer; VIII, *P. linteus*. Values expressed are mean±SD of triplicate measurements. Means with different letters were significantly different at p<0.05 (ANOVA, Duncan multiple range test). Large and small characters are expressed in LMW and HMW, respectively.

라디칼이 소거되며, 이때 고유의 청남색이 없어지는 특성을 가지고 있어 이 색차를 비색정량하여 전자공여능력을 측정한다(16). Fig. 2는 각각 버섯시료 LMW 분획물 10 mg/mL을 사용하여 전자공여능을 나타낸 것이다. 상황버섯(VIII)이 80.74%로 가장 높은 억제활성을 보였으며, 그 다음으로 양송이버섯(III) 51.35%, 애스타리버섯(V) 36.61%, 송이버섯(I) 36.04%의 억제활성을 나타내었다. 앞의 총 페놀 함량에서 높은 페놀 함량을 가진 상황버섯(VIII)이 가장 높은 억제활성을 가졌으며, 양송이버섯(III)은 송이버섯(I)보다 페놀 함량이 낮았지만 송이버섯보다 높은 억제활성을 나타내었다. 버섯 추출물의 항산화 활성과 페놀 함량과의 상관관계는 Cheung 등(27)의 연구와 같이 높은 폴리페놀 함량을 가진 버섯 추출물에서 안정적인 DPPH radical 억제활성을 가진다는 결과와 유사하였다. 또한 HMW 분획은 LMW 분획보다 페놀 함량이 낮았으며 전자공여능 억제활성도 LMW 분획보다 현저히 낮은 전자공여 작용을 나타내었다.

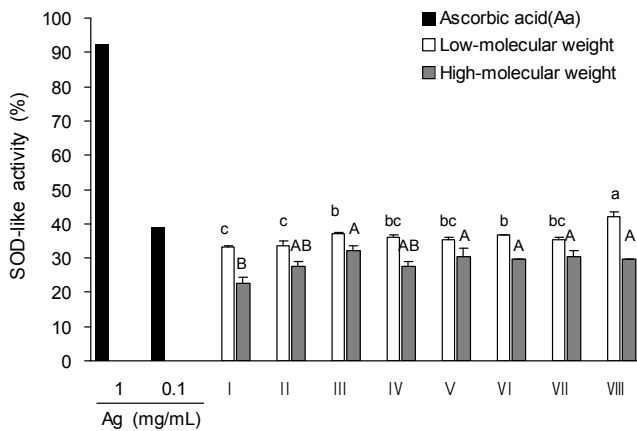


Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD)-like activity of mushroom extracts from LMW (low-molecular weight) and HMW (high-molecular weight). Values expressed are mean \pm SD of triplicate measurements. Means with different letters were significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA, Duncan multiple range test). Large and small characters are expressed in LMW and HMW, respectively.

SOD 유사활성

SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 주로 phytochemical에 속하는 저분자 물질이 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide의 반응성을 억제함으로써 superoxide로부터 생체를 보호한다. 따라서 SOD 유사활성을 갖는 물질은 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 노화 억제와 더불어 산화적 장애의 방어 효과를 가진다(28). 각종 버섯의 LMW 분획물과 HMW 분획물의 SOD 유사활성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. LMW 분획물의 SOD 유사활성은 상황버섯(VIII)이 41.98%로 가장 높게 나타났으며, 그 다음은 양송이버섯(III) 37.02%, 팽이버섯(VI) 36.64%, 느타리버섯(IV) 35.88% 순으로 버섯류의 LMW 분획물 모두 30% 이상의 SOD 유사활성을 갖는 것으로 나타났다. HMW 분획은 LMW 분획에 비해 다소 낮은 SOD 유사활성을 (III) 32.06%로서 가장 높은 SOD 유사활성을 보였고, 표고버섯(VII), 애느타리버섯(VI)이 30.53%의 SOD 유사활성을 나타내었다. 비교물질로 사용된 1 mg/mL 및 0.1 mg/mL의 L-ascorbic acid의 경우 각각 92.37%, 38.93%의 활성을 보였으며 가장 높은 활성을 나타낸 상황버섯(I)은 L-ascorbic acid 0.1 mg/mL보다 더 높은 SOD 유사활성을 가졌다. Lim 등(29)의 보고에서 흰색 양송이버섯(III)의 열수 추출물에서 22.3%의 SOD 유사활성을 보였으며, 이는 본 실험에서 확인된 양송이버섯(III) LMW 분획물과 HMW 분획물보다 다소 낮은 결과임을 확인할 수 있었다.

아질산염 소거능

버섯 추출물의 LMW 분획물과 HMW 분획물을 각각 pH 1.2, 3.0, 6.0에서 반응시킨 후 아질산염 소거능을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. LMW 분획물과 HMW 분획물의 아질산염 소거능은 크게 차이가 없었고, pH가 감소함에 따라 소

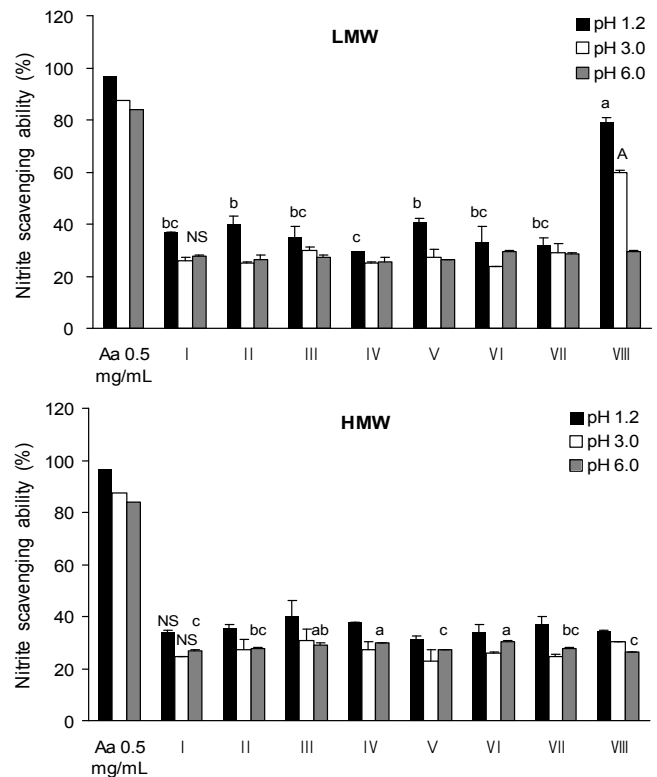


Fig. 4. Nitrite scavenging ability of LMW (low-molecular weight) and HMW (high-molecular weight) fraction extracted from mushrooms at various pHs. Values expressed are mean \pm SD of triplicate measurements. Means with different letters were significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA, Duncan multiple range test). NS: not significant.

거능력이 증가하는 것을 알 수 있었다. 다만 pH 3.0과 pH 6.0 조건에서 몇몇의 버섯 분획물들이 pH의 증가에 따라 소거능력이 다소 증가하는 분획물도 있었다. Gray와 Dugan(18)이 보고한 것과 같이 nitrite는 아민류와 반응하여 발암 물질인 nitrosoamine을 형성하는 과정에서 pH가 낮을수록 반응속도가 빨라지므로 pH 1.2에서 nitrite 제거활성이 다른 pH 조건보다 높았던 것은 본 실험결과와 일치하였다. LMW 분획물에서 상황버섯(VIII) 78.95%로 가장 높은 활성을 보였고, 애느타리버섯(V)이 pH 1.2에서 41.05%, 새송이버섯(II)이 40%의 활성을 보였다. 또한 HMW 분획에서 양송이버섯(III)이 pH 1.2에서 40%로 가장 높은 활성을 가졌으며, 느타리버섯(IV) 37.89%, 표고버섯(VII) 36.84%의 활성을 나타내었다. 이처럼 상황버섯(VIII) LMW 분획물을 제외하고 각 버섯의 HMW와 LMW분획물의 활성에는 큰 차이를 보이지 않았다.

혈전용해 활성

버섯 추출물의 LMW 분획물과 HMW 분획물이 혈액응고 기전에 미치는 영향을 알아보기 위하여 fibrin plate method를 이용하여 대표물질인 plasmin의 용해한 지름과 비교하였다. Table 4에는 각 버섯의 혈전용해도를 plasmin과 비교하여 수치화하였다. 각 버섯의 분획물들을 대조군인 plasmin

Table 4. Fibrinolytic activity of low-molecular weight (LMW) and high-molecular weight (HMW) fraction extracted from mushrooms by fibrin plate method

	LMW	HMW	%
	Plasmin unit	Plasmin unit	
<i>Tricholoma matsutake</i> (I)	NA ¹⁾	1.51±0.04 ^{2)a3)}	60.4
<i>Pleurotus eryngii</i> (II)	NA	NA	—
<i>Agaricus bisporus</i> (III)	NA	1.16±0.11 ^{b)}	46.6
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) Quel. (IV)	NA	0.86±0.06 ^{c)}	34.4
<i>Pleurotus osteratus</i> (Fr.) Kummer (V)	NA	1.46±0.04 ^{d)}	58.8
<i>Flammulina velutipes</i> (VI)	NA	0.45±0.01 ^{d)}	18.0
<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer (VII)	NA	NA	—
<i>Phellinus linteus</i> (VIII)	NA	NA	—

¹⁾NA: Non-active at 50 mg/mL.

²⁾Concentration of mushroom extracts was 50 mg/mL. Plasmin (2.5, 1.25, 0.25 U/mL) was used as positive control.

³⁾Values in the column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

(2.5, 1.25, 0.25 U/mL)과 같이 점적하여 용해면적을 상대 비교하였다. 전체적으로 LMW 분획에서는 혈전용해 활성이 없는 것으로 보였으며, HMW 분획물 50 mg/mL에서 송이버섯(I)은 1.51 plasmin unit의 비교적 강한 활성을 나타냈으며, 애스타리버섯(V) 1.47 plasmin unit, 양송이버섯(III) 1.16 plasmin unit 순으로 활성이 나타났다. 새송이버섯(II), 표고버섯(VII), 상항버섯(VIII)의 HMW 분획물에서는 혈전용해 활성이 나타나지 않았다.

혈관 내에 출혈로 인해 생기는 지혈과정 중 과응고로 생성된 혈전은 조직의 재생 후에도 완전한 용해가 일어나지 않고 작은 조각으로 혈관을 따라 흐르게 되면 혈관이 막히게 되고 혈액 순환이 방해되어 영양분과 산소공급에 영향을 끼쳐 심부전이나 심장질환 등의 혈전증(thrombosis)으로 사망에까지 이르게 된다. 이와 같은 혈전형성을 방지하기 위해 항혈소판제제, 즉 혈소판활성화 억제제 등 항혈전제가 요구된다(30). Kim 등의 연구(31)에서 자생하는 55종의 버섯을 메탄올로 추출한 후 100 mg/mL의 농도로 희석하여 혈전용해 활성을 측정하였다. 그 결과 14종의 버섯에서 혈전용해 활성을 확인하였으며, 그중 흰가시광대버섯이 3.9 plasmin unit 정도의 범위를 보였다. 이는 본 연구에서 사용한 버섯 분획물의 농도보다 2배 높음을 감안한다면, 송이버섯(I) HMW 분획물이 우수한 항혈전 능력을 가진다는 것을 알 수 있다.

대식세포 활성능 측정

대식세포는 생체 내에서 감염, 염증 등의 자극에 의하여 L-arginine을 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 대사하여 NO를 생성하여 종양세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여 생체를 지키는 중요한 역할을 하고 있다(32,33). NO는 혈관확장, 신경전달, 혈소판응집억제, 염증반응의 매개 등 매우 다양한 기능을 갖고 있으며, 또한 체내로 침입한 미생물 및 암세포에 대한 직접적인 살상기능을 갖고 있는 것으로도 알려져 있다(34,35).

각 버섯 추출물의 LMW 및 HMW 분획물이 RAW 264.7 cell에서 NO 생성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험한 결과 LMW 분획에서는 NO 생성능이 거의 없는 것으로 조

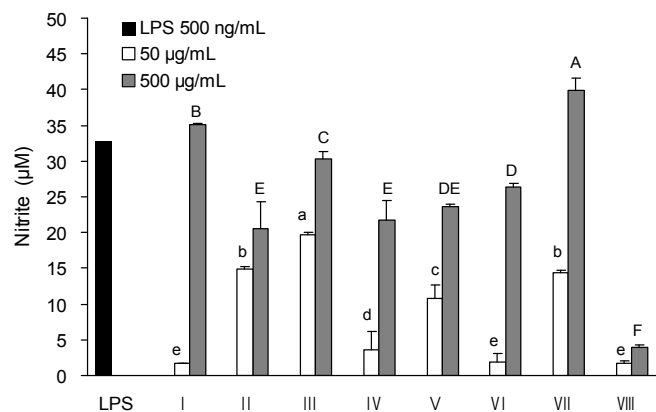


Fig. 5. Nitric oxide (NO) production of HMW (high-molecular weight) fraction extracted from mushrooms. Values expressed are mean±SD of triplicate measurements. Means with different letters were significantly different at p<0.05 (ANOVA, Duncan multiple range test).

사되어 HMW 분획물의 NO 생성능만을 Fig. 5에 나타내었다. HMW 분획에서는 농도 의존적으로 대식세포를 활성화시켜 NO 양이 증가됨을 알 수 있었다. 양성대조군인 LPS를 첨가한 상태에서는 배양 24시간에 32.9 µM의 NO를 생성하였으며, HMW 분획물 500 µg/mL 처리군에서 표고버섯(VII), 송이버섯(I), 양송이버섯(III)이 각각 39.86 µM, 35.17 µM, 30.34 µM의 NO를 생성하였고, 특히 표고버섯(VII), 송이버섯(I)은 LPS보다 더 높은 NO 생성능을 가진 것으로 나타났다. 또한 50 µg/mL의 저농도에서 양송이버섯(III) 19.67 µM, 새송이버섯(II) 14.89 µM, 표고버섯(VII) 14.46 µM의 NO를 생성하여 대식세포를 활성화시키는 것을 확인하였다. Jo 등(36)은 신령버섯의 세포 내외 다당체가 대식세포를 활성화시켜 NO를 생성하는 지에 대한 연구에서 500 µg/mL의 농도에서 세포내외 다당체에서 각각 53.9 µM, 53.19 µM의 nitrite를 생성하였다. 본 연구에서 표고버섯(VII) 500 µg/mL 농도에서 39.86 µM의 생성능에 비해 다소 높은 결과를 나타내었다. 또한 본 연구에서 β-glucan 함량과 비교했을 때 β-glucan 함량이 높은 표고버섯(VII)의 NO 생성능이 가장 높았지만, 그 외의 버섯들은 β-glucan 함량과 NO 생성능이 낮은

상관관계를 보여주었다. 이와 같이 다당체에 의한 대식세포 활성화에는 다당체의 양에 의한 것보다는 구조적 특징에 기인하는 것으로 생각된다.

NO 생성 저해 능력 측정

NO는 NOS의 효소 촉매작용을 통해 생성되는 자유라디칼로 혈압조절과 신경전달 매개체로 면역반응에 중추적 역할을 하지만, 지속적 과발현은 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 유도한다. 이처럼 염증과 암 사이의 연관성은 150년 전부터 알려져 왔으며, 1863년 Virchow는 만성염증이 발생한 부위에서 암이 발생하는 경향성이 높다고 보고되었다(37).

활성산소 중 하나이며, 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 각 버섯 추출물이 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cell로부터 NO 생성 억제작용을 실험한 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

500 ng/mL의 LPS를 처리한 대조구에서는 22.17 μM의 NO가 생성되었으며, 이와 비교하여 LMW 분획물에서는 상황버섯(VIII) 500 μg/mL의 농도에서 100%¹⁾의 NO 생성 저해

활성을 보였으며 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해하는 것을 알 수 있었다. 새송이버섯(II)은 50 μg/mL 58.14% (9.28 μM), 500 μg/mL에서 67.79%(7.14 μM)의 저해활성을 가졌으며, 양송이버섯(III)이 저농도에서는 저해활성이 나타나지 않았지만 500 μg/mL에서 61.86%(8.46 μM)의 NO 저해활성을 나타내었다. 이처럼 상황버섯(VIII), 새송이버섯(II), 양송이버섯(III)을 제외한 다른 버섯에서는 활성이 대부분 없는 것으로 나타났다. HMW 분획물은 상황버섯(VIII) 500 μg/mL의 농도에서 38.51%(16.62 μM)의 저해활성을 보였지만 다른 버섯 추출물들은 저해활성이 낮았다. 유사 실험 내용으로 Yang 등(38)의 연구에 의하면 낙엽송추출물의 MeOH 추출물이 30 μg/mL의 농도에서 75%의 저해활성을 나타내었다.

$$^1) \text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{NO production of sample}}{\text{NO production of LPS}}\right) \times 100$$

요 약

본 연구는 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어지는 버섯의 기능성 소재로서의 타당성을 검증하기 위하여 버섯 추출물의 유효성분 함량(polyphenol, β-glucan)과 저분자 및 고분자 분획물의 항산화 활성, 혈전용해 활성, 면역증강 및 항염증 활성 등을 측정하였다. 그 결과 전체 수율은 식용버섯이 약용버섯보다 높게 나타났으며, β-glucan의 함량은 표고버섯(33.5%)이 가장 높게 나타났다. Polyphenol 함량은 약용버섯인 상황버섯(LMW)이 233.23 mg/g로 가장 높게 나타났으며, 애스타리버섯(LMW) 12.18 mg/g, 송이버섯(LMW) 11.72 mg/g 순으로 확인되었다. 버섯 추출물의 항산화 능력을 측정하기 위한 전자공여능 측정 결과는 ascorbic acid 0.5 mg/mL에서 95.91%의 저해율을 나타낸 것에 비하여 상황버섯(LMW, 10 mg/mL)이 80.74%의 억제활성을 나타내었다. SOD 유사활성 측정에서는 대부분의 버섯 추출물에서 큰 차이를 나타내지 않았으며, 아질산염 소거능 측정에서는 pH의 감소에 따라 소거능이 증가하였고, 상황버섯(LMW)이 가장 높은 소거능을 나타내었다. 이처럼 버섯 추출물의 항산화 능력 측정에서 phenolic 물질을 많이 함유하고 약용버섯으로 사용되는 상황버섯이 식용버섯(송이버섯, 새송이버섯, 양송이버섯, 느타리버섯, 애스타리버섯, 표고버섯, 팽이버섯)보다 LMW 분획에서 우수한 항산화 능력을 갖는 것을 알 수 있었다. 그러나 혈전용해 활성을 측정한 결과에서 대부분의 LMW 분획물들은 혈전용해 활성을 갖지 않았으며, 송이버섯(HMW, 50 mg/mL)이 60.4%의 가장 높은 혈전용해 활성을 나타내었다. 또한 RAW 264.7 cell을 이용한 대식세포 활성능(NO 생성)을 측정된 결과 LMW 분획에서는 대식세포 활성능력이 거의 없는 것으로 조사되었으며, 대조군인 LPS 500 ng/mL를 첨가한 상태에서 32.9 μM의 NO를 생성하는 것과 비교하여, 표고버섯(HMW, 500 μg/mL) 39.86

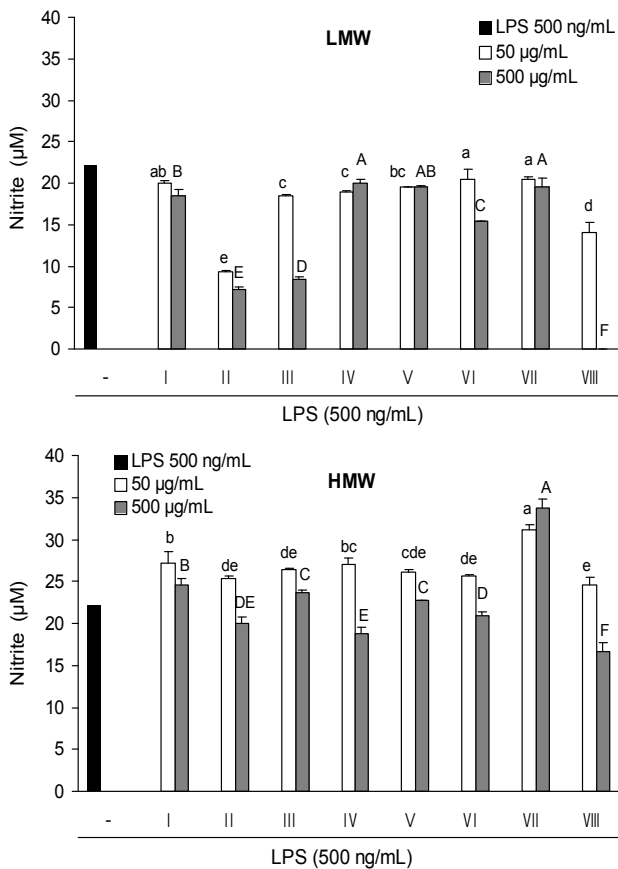


Fig. 6. Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by LMW (low-molecular weight) and HMW (high-molecular weight) fraction extracted from mushrooms. Values expressed are mean±SD of triplicate measurements. Means with different letters were significantly different at p<0.05 (ANOVA, Duncan multiple range test).

μM, 송이버섯 35.17 μM의 NO 생성능을 나타내었다. 또한 약용버섯인 상황버섯(HMW)은 NO 생성능력이 거의 나타나지 않았다. 반면에 RAW 264.7 cell로부터 LPS에 의해 유도된 NO 생성 저해활성을 측정할 결과 상황버섯(LMW) 500 μg/mL의 농도에서 NO의 생성을 100% 저해하였고, 새송이버섯(LMW)은 50 μg/mL에서 58.14%, 500 μg/mL에서 67.79%의 저해활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 phenol 성분을 다량 함유하고 있는 상황버섯(LMW)은 일반적인 식용버섯에 비해 항산화능이 우수함을 알 수 있었으며, 혈전용해능력(송이버섯, I)과 면역증강(표고버섯, VII) 그리고 항염증(새송이버섯, II)에서는 식용버섯의 HMW 분획물이 우수한 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원 사업으로 수행된 연구임(2009-0094074).

문헌

- Bano Z, Rajarathnam S. 1988. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 27: 87-158.
- Park SY, Kim JW. 1992. Screening and isolation of the anti-tumor agents from medicinal plants (I). *Korean J Pharmacogn* 23: 264-267.
- Yoon KY, Lee SH, Shin SR. 2005. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Sarcodon aspratus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 942-947.
- Block G, Langseth L. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol* 48: 80-84.
- Fukuzawa K, Takaishi Y. 1990. Antioxidants. *J Act Oxy Free Rad* 1: 55-70.
- Duh PD, Tu YY, Yen GC. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm Wiss Technol* 32: 269-277.
- Osborn-Barnes HT, Akoh CC. 2003. Effect of α-tocopherol, β-carotene, and isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions. *J Agric Food Chem* 51: 6856-6860.
- Yen GC, Hsieh CL. 1998. Antioxidant activity of extracts from *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *J Agric Food Chem* 46: 3431-3436.
- Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi M. 2002. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol* 2: 1205-1211.
- Hui LC, Guei RC, Chin CC, Jeng LM. 2001. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chem* 74: 203-207.
- Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. 1998. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 434-437.
- Kubo M, Tatsuda H, Nogami M, Arichi S, Takahashi T. 1983. Studies on the *Ganoderma lucidum* (IV), effects on the disseminated intravascular coagulation. *Yakugaku Zasshi* 103: 871-877.
- Kabir Y, Kimura S. 1989. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J Nutr Sci Vitamino* 35: 91-94.
- Folin O, Ciocalteu V. 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J Biol Chem* 27: 627-650.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.
- Gray JI, Dugan Jr LR. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci* 40: 981-984.
- Astrup A, Müllertz S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40: 346-351.
- Fallarero A, Peltoketo A, Loikkanen J, Tammela P, Vidal A, Vuorela P. 2006. Effects of the aqueous extracts of *Bryothamnion triquetrum* on chemical hypoxia and aglycemia-induced damage in GT1-7 mouse hypothalamia immortalized cells. *Phytodiocine* 13: 240-245.
- Ballance GM, Manners DJ. 1978. Structural analysis and enzymic solubilization of barley endosperm cell walls. *Carbohydr Res* 61: 107-113.
- Jung EB, Jo JH, Cho SM. 2008. Nutritional component and anticancer properties of various extracts from Haesongi mushroom (*Hypsizygus marmoreus*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1395-1400.
- Hong JH, Youn KS, Choi YH. 2004. Characteristics of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by extraction and precipitation conditions and its antitumor effect. *Korean J Food Sci Technol* 36: 586-593.
- An Bj, Bae MJ, Choi HJ, Zhang YB, Sung TS, Choi C. 2002. Natural products, organic chemistry: isolation of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon (*Diospyros kaki* L. Folium). *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 45: 212-217.
- Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. 2000. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κB in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys* 376: 338-346.
- Kim JO, Jung MJ, Choi HJ, Lee JT, Lim AK, Hong JH, Kim DI. 2008. Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 684-690.
- Cheung LM, Cheung CK, Vincent ECO. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 81: 249-255.
- Kitani K, Minami C, Amamoto T, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. 2002. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: potentials of propargylamines for human use. *Ann NY Acad Sci* 959: 295-307.
- Lim TS, Do JR, Kwon OJ, Kim HK. 2007. Physiological activities of *Agaricus bisporus* extracts as affected by solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 383-388.
- Yun YP, Kang WS, Lee MY. 1996. The antithrombotic effects of green tea catechins. *J Food Hyg Safè* 11: 77-82.
- Kim JH, Yoo KH, Seok SJ. 2007. Screening test of wild mushroom methanol extracts for fibrinolytic and α-glucosidase inhibitory activity. *J Exp Biomed Sci* 13: 245-249.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. 1992. Biochemistry of

- nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
33. Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, novel biological messenger. *Cell* 70: 705-707.
34. Kim MS, Cho HB. 2007. Immune enhancing effects of intracellular and extracellular polysaccharides extracted from mycelial cultivate of *Agaricus blazei* Murill. *The Korean J Microbiol* 43: 292-297.
35. Galla HJ. 1993. Nitric oxide, NO, an intracellular messenger. *Angew Chem Int Ed Engl* 32: 378-380.
36. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russel SW. 1993. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophage activated for tumor cell killing. *J Biol Chem* 268: 1908-1913.
37. Balkwill F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 537-545.
38. Yang KS, Jang HJ, Kim AK, Pyo MY. 2007. Inhibitors of nitric oxide synthesis from *Phellinus pini* in murine macrophages. *Yakhak Hoeji* 51: 430-434.

(2010년 1월 29일 접수; 2010년 7월 22일 채택)