

상황버섯(*Phellinus linteus*) 균사체 액체발효물의 항염증 활성

신현영 · 김 훈* · 정은진** · 김현경** · 손승우*** · 서민근**** · 김나리**** · 서형주***** · †유광원*****

고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템융합전공 대학원생, *중앙대학교 생명공학대학 연구교수,

한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, *고려대학교 대학원 의생명융합과학과 대학원생,

****(주)네오크레마 연구개발부 연구원, *****고려대학교 대학원 의생명융합과학과 교수, *****한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Anti-Inflammatory Activity of Liquid Fermentation by *Phellinus linteus* Mycelium

Hyun Young Shin, Hoon Kim*, Eun-Jin Jeong**, Hyun-Gyeong Kim**, Seung-U Son***,
Min Geun Suh****, Na Ri Kim****, Hyung Joo Suh***** and †Kwang-Won Yu*****

Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health System, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science,
Korea University, Seoul 02841, Korea

*Research Professor, College of Biotechnology and Natural Resources, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

**Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

***Graduate School Student, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Korea

****Researcher, Dept. of R & D, Neo-Cremar Corporation, Seoul 05702, Korea

*****Professor, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Korea

*****Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

To investigate the industrial availability of liquid fermentation (PL-ferment) by *Phellinus linteus* mycelium as a postbiotics for the inhibition of inflammation, PL-ferment was fractionated into culture supernatant (CS), hot-water extract (HW) from PL-ferment, EtOH-precipitate (CP) fractionated from HW, and the dialysate (DCP) of CP. Compared to the other fractions, DCP which is expected to contain exopolysaccharide (EPS) as the major component, significantly decreased the production of NO, IL-6, and MCP-1 in LPS-induced RAW 264.7 cells, and IL-6 and IL-8 in TNF- α and IFN- γ -induced HaCaT cells. The general component analysis results showed that no significant difference in components was observed between the fractions, whereas sugar composition analysis revealed that DCP had decreased glucose and increased mannose contents compared to the other fractions. This suggests that mannose played an important role in the anti-inflammatory activity of the active fraction, DCP. Molecular weight distribution analysis revealed that DCP was mainly composed of low-molecular-weight material-removed high-molecular-weight polysaccharides of 18 - 638 kDa, suggesting that EPS originated from *P. linteus* EPS. In conclusion, our results suggest that the DCP of *P. linteus* mycelium fermentation using the anti-inflammatory activity could be used industrially as postbiotic material.

Key words: *Phellinus linteus* mycelium, liquid fermentation, anti-inflammatory activity, EtOH-precipitate, postbiotics

서 론

버섯은 진균류에 속하는 담자균 중 자실체를 형성하는 고등균류로 알려져 있으며, 자실체(fruiting body)와 균사체(mycelium)로 구성되어 있다(Kim 등 2011). 버섯을 섭취함에 따라 항암

활성, 생체기능 조절, 당뇨병 및 항산화제 등의 약리학적 효능이 보고되고 있으며, 관련 소비가 증가하고 있는 추세이다(Rathore 등 2017). 소나무 비늘버섯과(*Hymenochetaceae*), 진흙버섯속(*Phellinus linteus*)에 속하는 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 백색부후균으로 알려져 있다(Lee 등 2006). 상황

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

버섯을 통해 여러 효과가 보고되고 있으며, 국내에서 연구된 바로는 면역활성(Song 등 1998), 항산화 활성(Park & Hong 2014) 및 항균(Kim 등 2008) 등이 있으며, 국외로는 항암 활성(Nakamura 등 2004; Mei 등 2015), 저혈당 개선에 의한 당뇨병 예방 효과(Kim 등 2001), 면역활성(Kim 등 1996) 및 염증 억제 활성(Lin 등 2014) 등의 연구도 보고되고 있다.

균사체는 자실체에 비해 저렴하고 대량생산이 가능하다는 장점이 있어 산업화에 효과적일 것으로 예상되며(Kim 등 2014), 상황버섯 균사체에는 hispidin 및 이성질체인 hypholomine B 등의 폴리페놀계 화합물들이 존재하고(Jung 등 2008), 특히 다당류와 관련된 exopolysaccharide(EPS)에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다. EPS란 미생물 세포벽의 일부 또는 이로부터 유리되는 미생물 유래 다당류를 의미하는데, 1차 또는 2차 대사산물이 포함된다(Kim & Chang 2006). EPS는 미생물에 직접적인 에너지원으로 이용되기 보다 간접적으로 건조, 항체, 독성 화합물, 스트레스 등으로부터 자신을 보호하는 역할을 지니고 있으며(Kang 등 2005), 상황버섯 배양을 통한 EPS 생성의 최적조건 및 특성 규명(Hwang 등 2003), 항고지혈증(Zou 등 2009) 및 대식세포에 의한 면역활성(Jiang 등 2016) 등의 연구가 보고되고 있다. EPS는 세포벽 구성 다당류(1차)와 함께 분비 다당류(2차)를 지칭하기 때문에, 균체 성분과 배양 상등액으로부터 얻을 수 있다.

한편, 상황버섯의 항염증 활성과 관련해서는 자실체를 활용한 연구가 보고되고 있지만(Kim 등 2004; Huang 등 2012), postbiotics의 소재로 균사체 발효물의 산업적 활용성을 검토하기 위해 액체발효물을 조제하여 분획한 후 이들 분획에 대한 염증 억제 활성은 거의 보고된 바가 없다. 따라서, 상황버섯 균사체의 액체발효물(PL-ferment)을 배양액(CS), PL-ferment의 열수추출물(HW) 및 HW의 주정 침전물(CP)과 저분자 물질을 제거한 고분자 주정침전물(DCP)로 분획하여 RAW 264.7 대식세포주와 HaCaT 피부각질세포주에 대한 항염증 활성을 검토하였다. 또한, 분획물의 구성분을 확인하기 위해 중성당, 산성당, 단백질 및 총 폴리페놀 함량을 평가하였으며 구성당 분포 및 분자량을 평가함으로써, 활성 물질을 추정하여 추후 장 염증 등을 억제하기 위한 postbiotics 개발의 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 상황버섯 균사체 액체발효물 배양 및 분획방법

본 연구에서 사용된 상황버섯 균사체는 corn starch, glucose, yeast extract, soy peptone, monosodium glutamate(MSG)가 첨

가된 멸균배지에서 생물반응기(Fermentec, Cheongju, Korea)를 이용하여 액체발효하였으며, (주)네오크레마(Neo Cremar Co., Ltd, Seoul, Korea)에서 제공받았다. 상황버섯 균사체의 액체발효물(균사체+배양액)은 decoction 방법으로 처리(90~95℃)하여 용매의 양이 절반이 될 때까지 추출하고 동결건조(Ilshin Biobase, Yangju, Korea)하여 열수추출물(hot-water extract, HW)로 조제하였다. 조제된 열수추출물(HW)에 95% 주정을 5배(w/v) 첨가하여 상온에서 교반 한 후 원심분리로 회수한 침전물을 동결건조하여 조다당 획분(crude polysaccharide; CP)로 분획하였다. CP로부터 저분자 물질을 제거하기 위하여 CP를 소량의 증류수에 용해시켜 투석(MWCO 12,000~14,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)한 후 농축 및 동결건조하여 dialyzed crude polysaccharide(DCP)로 분획하였다. 한편, 액체발효물로부터 배양액만을 따로 분리하여 활성을 비교하기 위해 8,000 rpm에서 20분간 원심분리(Gyrogen Co., Ltd., Daejeon, Korea)한 후, 상등액만을 농축(Eyela, Tokyo, Japan) 및 동결건조하여 배양 상등액(culture supernatant, CS)으로 제조하였다.

2. 세포주 및 배양조건

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7과 인체 유래 각질형성 세포주인 HaCaT 세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 두 가지 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, Massachusetts, USA)과 1% penicillin-streptomycin(P/S; GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA) 배지에서 배양하였다. 두 가지 세포주는 37℃, 5% CO₂ 조건이 유지되는 배양기(Sanyo, Sakata, Japan)에서 2~3일에 한 번씩 계대배양하여 연구에 이용되었다.

3. RAW 264.7 세포를 통한 염증 억제 활성

액체발효물 분획물에 의한 염증 억제 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포주를 6×10⁴ cells/well로 96 well plate에 200 μL씩 분주하고 배양기에서 약 70~80% confluent될 때까지 배양하였다. 이후 배양액을 제거하고 serum free-DMEM(이하 SFM) 160 μL와 적당한 농도로 조제된 시료 20 μL를 첨가하여 30분간 배양하고 염증모델을 형성하기 위해 lipopolysaccharide from *Escherichia coli*(LPS; Sigma-Aldrich) 20 μL를 첨가하여 24시간 동안 재배양하였다. LPS에 의해 염증모델을 형성한 RAW 264.7 세포의 시료 독성평가는 0.1 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Invitrogen, Eugene, OR, USA) 용액을 100 μL를 처리하고 30분간 배양하였다. 이후 dimethyl sulfoxide

(DMSO) 100 μ L를 분주하여 보라색의 pigment를 용해시켜 550 nm의 흡광도에서 측정하였으며, LPS 유도균에 대한 세포 생존율(cell viability, %)로 나타냈다. 한편, 세포 배양을 통해 형성된 염증매개 물질인 산화질소(nitric oxide, NO)의 함량은 griess assay를 통해 측정되었으며 sodium nitrate를 이용하여 표준곡선을 작성하여 μ M로 함량을 평가하였다. 사이토카인 및 케모카인인 interleukin-6(IL-6) 및 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)은 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 구입한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit로 측정되었으며, 제조사에서 제공된 standard reference를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(ng/mL)로 평가되었다.

4. HaCaT 세포를 통한 피부염 억제 활성

액체발효물 분획물에 의한 피부염 억제활성을 평가하기 위해 HaCaT 세포를 2×10^4 cells/well로 96 well plate에 200 μ L씩 분주하고 배양기에서 약 70~80% confluent될 때까지 세포를 배양하였다. 이후 배양액을 제거하고 SFM 200 μ L를 분주하여 하루동안 starvation을 진행하였다. 이후 SFM 160 μ L와 적당한 농도로 조제된 시료 20 μ L를 첨가하고 배양하였으며, 1시간 후 염증유발 물질로 각각 10 ng/mL의 TNF- α 와 IFN- γ (T+I)가 혼합된 용액 20 μ L를 첨가한 다음 24시간 동안 재배양하였다. T+I로 염증 모델을 형성한 HaCaT 세포의 시료에 의한 독성평가는 0.5 mg/mL의 MTT 용액을 이용하여 측정하였으며, T+I 유도균에 대한 세포 생존율(%)로 나타냈다. 세포 배양을 통해 형성된 염증성 사이토카인인 IL-6 및 interleukin-8(IL-8)의 함량은 BD Biosciences에서 구입한 ELISA kit를 이용하여 측정되었으며 제조사에서 제공된 standard를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(pg/mL)으로 계산되었다.

5. 구성분 및 구성당 분석

중성당 및 산성당 함량은 phenol-sulfuric acid법(Dubois 등 1956) 및 *m*-hydroxybiphenyl법(Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973)을 통해 분석하였으며, 표준물질로 glucose(Glc) 및 glucuronic acid(Glc A)를 이용하여 μ g/mg으로 나타냈다. 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 Bradford(Bradford MM 1976) 방법으로 측정되었으며 μ g/mg으로 계산되었다. 총 폴리페놀 함량 분석은 Kim 등(2016)의 방법을 이용하여 측정하였으며, 표준물질로 gallic acid을 이용하여 μ g/mg로 계산되었다. 시료의 구성당 분석은 Honda 등(1989) 및 Shin 등(2021)의 방법을 참고하였으며 시료를 2 M trifluoroacetic acid로 처리하여 aldose 단위로 분해한 후, 0.3 M NaOH와 PMP(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline)을 첨가하여 단당류에 PMP 결합시켜 유도체로 전환시킨다. 다음으로 유도체를 중화시키기 위해 0.3 M HCl을 첨가하고 2상 용매계(water, chloroform)로 분리 및 추출하고 물층만을 회수하여 PVDF membrane filter (0.45 μ m, Jaema Trade Inc., Gwangwon-do, Korea)로 여과한 후 HPLC에 주입하였다. HPLC 분석조건은 Table 1에 나타냈으며, 분석 결과는 단당류의 peak area와 response factor를 이용하여 mole%로 나타냈다.

6. 분자량 추정

분자량을 평가하기 위해 gel permeation chromatography (GPC)를 이용하였으며 시료를 적당한 농도로 희석하고 PVDF membrane filter로 여과한 후 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. 표준물질은 galactose 및 pullulan(p-5-800)을 이용하여 표준곡선을 작성하였으며, 작성된 표준곡선과 시료의 retention time을 비교하여 kDa으로 계산되었다.

Table 1. Analytical condition of HPLC applied for determining the component sugar and molecular weight of fractions from PL-ferment

Analysis	Component sugar	Molecular weight
Instrument	HPLC YL-9100 series (Young Lin Co., Ltd, Gyeonggi-do, Korea)	HPLC Agilent 1260 series (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA)
Detector	UV at 254 nm	Refractive index
Column	YMC-Triart C18 (250 \times 4.6 mm, 5 μ m, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)	Superdex TM 75 GL column (10 \times 300 mm, GE Healthcare, Anaheim, CA, USA)
Column temperature	30 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C
Flow rate	1 mL/min	0.5 mL/min
Eluent	0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.7): acetonitrile (82:18)	50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)
Injection volume	20 μ L	20 μ L

7. 통계처리

모든 시험은 3번 반복하여 실시하였으며 결과를 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. 염증 억제 활성은 Statistical Package for the Social Science(SPSS V26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하였으며 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 수준에서 유도균과의 유의성을 검증하였다. 한편, 중성당, 산성당, 단백질 및 총 폴리페놀 등의 구성분의 분석결과는 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시한 후, 동질성을 갖는 경우 분산 분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 상황버섯 균사체 액체발효물 분획물의 세포독성 평가

포스트바이오틱스(postbiotics)는 특정 미생물이 만들어내어 인간의 몸에 유익한 작용을 하는 대사물질로 구성되는데 특히, 본 실험에서는 장 건강 개선뿐만 아니라, 다양한 염증의 기능성식품 포스트바이오틱스 소재로의 개발을 목적으로 상황버섯 균사체의 액체발효물의 가능성을 검토하고자 하였다. 본 연구에서는, 상황버섯 균사체 배양물로부터 항염증 소재로서의 가능성을 확인하고자, 균사체 배양물로부터 각각 배양 상등액(CS), 균체와 상등액의 열수추출물(HW), 열수추출물로부터 분리된 조다당획분(CP) 및 저분자가 제

거된 조다당획분(DCP)을 각각 분획하였다. CS에는 배지 성분과 함께 균사체로부터 분비된 exopolysaccharide 등의 다양한 대사산물이 포함되어 있을 것으로 사료되었으며, HW에는 배양 상등액 성분과 함께 균체로부터 유리된 다양한 세포내 구성물질이 포함되어 있을 것으로 사료되었다. HW의 주정 침전에 의해 분리된 CP에는 HW에 존재하는 다양한 저분자 및 고분자 물질 중에서 단백다당 및 다당류 등의 고분자 물질이 주로 포함되어 있을 것으로 추측되었는데 (Kim 등 2009), 상등액으로부터 유리된 EPS가 주로 존재할 것으로 추측해 볼 수 있었다. DCP에는 CP 중에서도 저분자가 완전히 제거된 EPS를 포함한 고분자 물질만이 포함되어 있을 것으로 사료되었다. 염증 억제 활성은 세포주를 이용하여 염증 매개 인자를 측정함으로써, 시료에 의해 생산 억제를 측정하는 시험법으로 시료 처리에 의해 세포독성이 나타나면 관련 인자들의 생산이 감소한다. 결과적으로, 시료에 의한 세포 독성이 염증 억제 활성으로 판단할 수 있기 때문에 먼저 시료의 세포주에 대한 독성을 세포의 생존율로 확인하였다. 시료 처리에 의한 RAW 264.7 세포의 독성평가는 Fig. 1A에 나타났다. 시료 4종은 500~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 LPS 유도군 대비 90% 이상의 세포생존율을 확인하였는데, 비색법을 통한 세포독성 평가에서 처리군에 대한 세포 생존율이 대조군 대비 80% 이상이면 세포독성이 없다고 간주되기 때문에 시료 4종은 상기된 농도범위에서 세포독성이 없는 것으로 확인되었다. 동일 농도범위에서 HaCaT 세포의 세포독성 평가를 진행하였는데(Fig. 1B), T+I 유도군

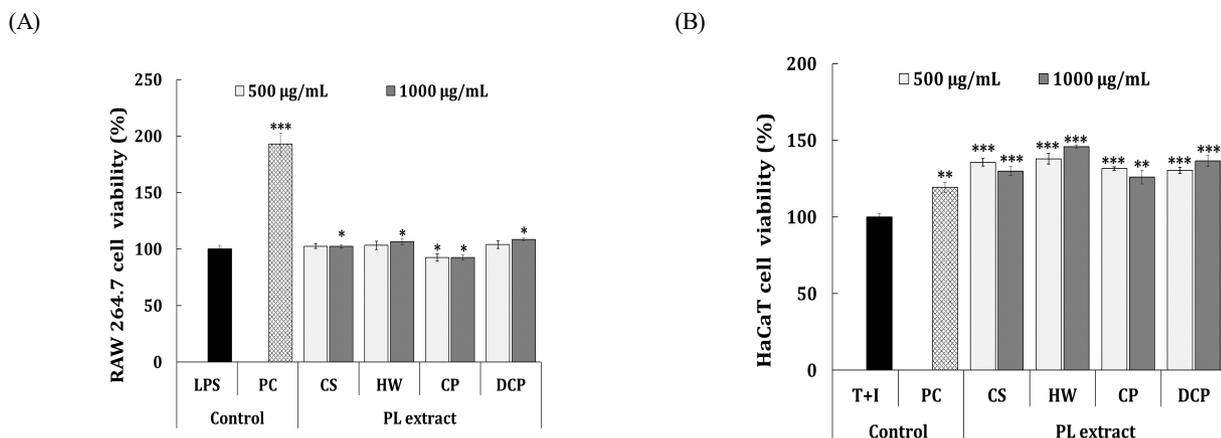


Fig. 1. Cytotoxic effect of fractions from PL-ferment using (A) RAW 264.7 macrophage and (B) HaCaT keratinocyte. Each sample were treated to RAW 264.7 or HaCaT cells, and inflammation inducer, such as lipopolysaccharide (LPS) or TNF- α and IFN- γ (T+I) were subsequently stimulated for 24 hr. A dexamethasone (50 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for RAW 264.7 and HaCaT, respectively) was used as positive controls. Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between inflammation group (LPS or T+I) and each group by Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

대비 130% 이상의 세포생존율이 나타나 30.0~45.9%의 통계적으로 유의한 세포증식능이 확인되었다. Qi 등(2013)의 연구에서 동일 세포주인 HaCaT 세포주를 이용한 독성평가에서 상황버섯 자실체 추출물의 0.5~1 mg/mL의 농도범위에서 유의적인 세포독성이 관찰되었으며, 본 연구와 상이한 결과가 나타났는데 이는 자실체 및 배양액에 따른 차이로 추정된다. 상황버섯 균사체 액체발효물의 4종 희분에 대한 세포독성 평가결과, 500~1,000 µg/mL의 농도범위에서 RAW 264.7 및 HaCaT의 두 가지 세포주에 유의적인 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되어 동일 농도범위에서 염증 억제 활성을 분석하였다.

2. RAW 264.7 세포를 통한 염증 억제 활성

RAW 264.7은 마우스 대식세포주로 조직 및 세포 손상뿐만 아니라 염증반응에서 핵심적인 역할을 하는 세포로 알려

져 있으며(Oishi & Manabe 2018), 본 연구에서는 대식세포에서 분비하는 염증 매개 인자인 NO, IL-6 및 MCP-1의 생성에 상황버섯 균사체 액체발효물의 4종 희분이 미치는 영향을 평가하고자 하였다. NO 억제활성 평가는 Fig. 2A에 나타냈으며, 양성대조군(positive control, PC)으로 N-nitroarginine methyl ester(50 µg/mL)를 이용하였는데, LPS 유도군(31.3 µM) 대비 18.4 µM(41.3%)의 통계적으로 유의한 NO 억제활성을 보였다. 상황버섯 균사체 액체발효물의 4종 희분 중 CS 처리군은 500~1,000 µg/mL의 농도범위에서 LPS 유도군 대비 24.0~27.5 µM(12.3~23.2%)의 유의한 NO 억제활성을 보였으나, HW 처리군의 경우, 통계적으로 유의한 NO 억제활성이 확인되지 않았다. 한편, CP 처리군에서는 LPS 유도군 대비 24.2~24.6 µM(21.4~22.6%)의 통계적으로 유의적으로 낮은 NO 억제활성을 나타냈으나, DCP 처리군은 LPS 유도군 대비 12.7~15.4 µM(50.7~59.6%)의 우수한 억제활성을 보여

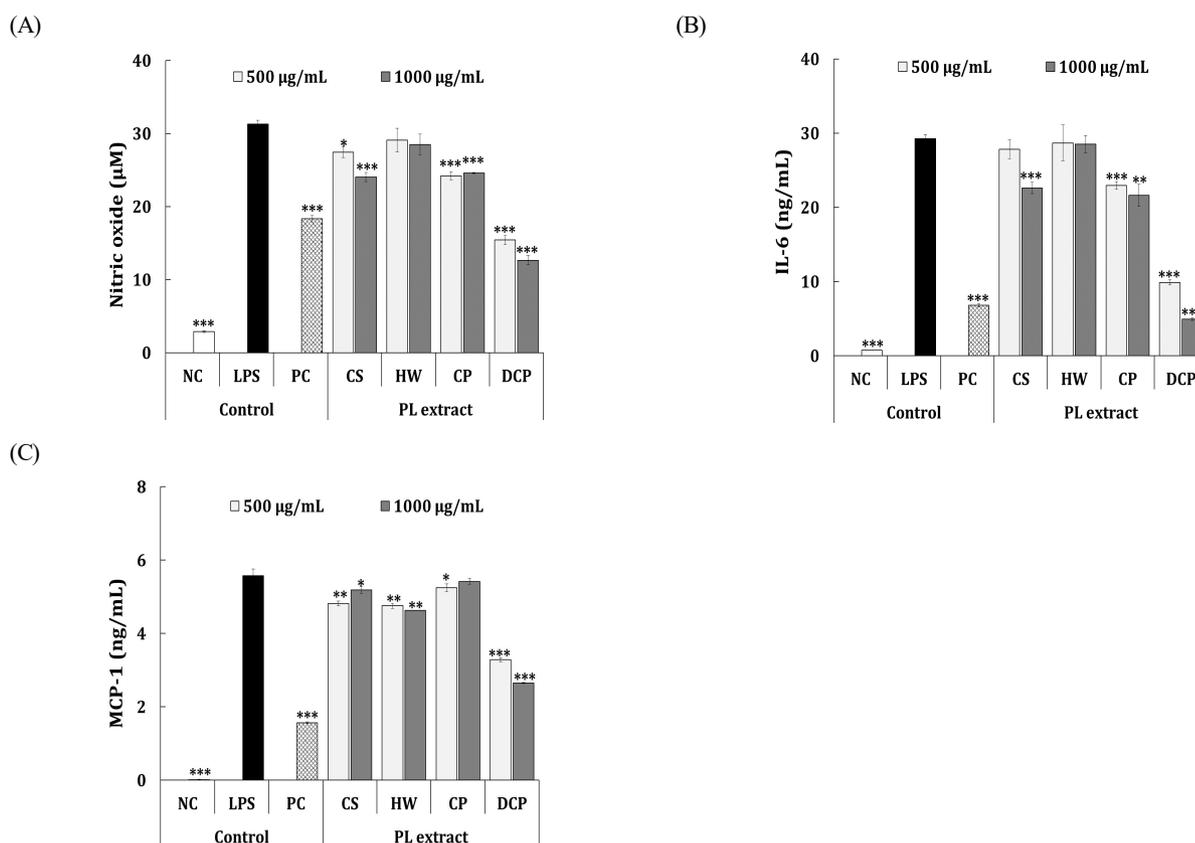


Fig. 2. Anti-inflammatory activities of fractions from PL-ferment on LPS-stimulated RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were treated with sample followed by LPS treatment for 24 hr, and production of (A) nitric oxide (NO), (B) IL-6 and (C) MCP-1 were estimated. A dexamethasone (50 µg/mL) or N-nitroarginine methyl ester (L-NAME; 50 µg/mL) were used as positive control (PC) for TNF-α and IL-6, or NO experiments, respectively. Results are expressed as mean±S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between LPS group and each group by Student's *t*-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

PC보다도 유력한 활성을 가지는 것으로 확인되었다. IL-6 생성 억제활성 평가 결과는 Fig. 2B에 나타났다. PC 처리군으로 이용된 dexamethasone(50 µg/mL)은 6.8 ng/mL의 IL-6 생성량을 나타냈으며, LPS 유도군(29.3 ng/mL) 대비 통계적으로 유의한 78.8%의 억제활성이 확인되었다. 액체발효물의 분획물인 CS 처리군은 1,000 µg/mL의 농도에서 LPS 유도군 대비 22.6 ng/mL(23.2%)의 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성을 나타내었으나 동일 농도범위에서, HW 처리군은 NO와 마찬가지로 LPS 유도군 대비 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성은 확인되지 않았다. 그러나 HW의 주정 침전물인 CP 처리군은 21.6~22.9 ng/mL(22.1~26.7%) IL-6 억제활성을 나타내었고 DCP 처리군의 경우, 5.0~9.9 ng/mL(68.0~85.3%)의 우수한 IL-6 억제활성으로 PC 처리군과 유사한 활성을 나타냈다. 마지막으로 MCP-1 억제활성 평가는 Fig. 2C에 나타냈으며, PC 처리군은 1.6 ng/mL의 MCP-1 생성량을 나타내어 LPS 유도군(5.6 ng/mL) 대비 72.0%의 통계적으로 유의한 억제활성이 확인되었다. 상황버섯 균사체 액체발효물 CS 처리군에서는 500~1,000 µg/mL의 농도에서 LPS 유도군 대비 4.8~5.2 ng/mL(7.0~13.5%) 및 동일 농도 범위에서 HW 처리군도 LPS 유도군 대비 4.6~4.8 ng/mL(14.7~17.0%)의 유의적으로 낮은 억제활성을 나타냈다. 한편, CP 처리군은 1,000 µg/mL의 농도에서도 통계적으로 유의한 억제활성은 확인되지 않았으나, DCP 처리군의 경우에는 500~1,000 µg/mL의 농도범위에서 가장 우수한 2.7~3.3 ng/mL(41.2~52.5%)의 MCP-1 억제활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 버섯 균사체를 이용한 항염증 활성 연구로, Du 등(2017)은 치마버섯 균사체를 이용해 crude EPS를 조제하

여 RAW 264.7 세포에서 염증억제 활성을 확인한 결과, nitrate 및 *inducible nitric oxide synthase(iNOS)*의 통계적으로 유의한 억제 활성이 나타나는 것으로 보고한 바 있다. 결과적으로, RAW 264.7을 통한 염증 억제 활성 평가결과, 상황버섯 균사체 액체발효물(PL-ferment)의 열수추출물로부터 분리된 DCP 처리군이 PC로 사용된 dexamethasone의 활성과 유사하거나 보다 우수한 NO, IL-6 및 MCP-1 억제활성으로 나타났다. 따라서, DCP에 존재할 것으로 추정되는 EPS 등의 고분자 물질이 항염증 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정할 수 있었다.

3. HaCaT 세포의 피부염 억제 활성

염증의 또 다른 형태로서 발현되는 피부 염증 관련 항염증 활성을 측정하기 위해서는 인간유래 각질형성 세포인 HaCaT 세포에 염증성 사이토카인(TNF-α와 IFN-γ, T+I)을 처리하여 염증모델을 형성하고 피부염 억제활성을 확인하고자 하였다. Lee 등(2020)의 연구에서 T+I 유도에 의해 염증이 유발된 HaCaT 세포는 *cyclooxygenase 2(COX-2)* 및 IL-6 등을 생성하여 아토피 및 피부염을 유발하는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 연구에서는 이를 활용하여 상황버섯 균사체 액체발효물 희분 처리에 의해 IL-6 및 IL-8의 생성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 먼저, IL-6 억제활성 결과는 Fig. 3A에 나타났다. PC로 사용된 dexamethasone(20 µg/mL)의 경우 T+I 유도군(1,039.0 pg/mL)과 비교하여 340.9 pg/mL(68.8%)의 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성을 확인했다. 한편, 액체발효물 분획물인 CS 처리군의 경우, 500~1,000 µg/mL 농도범위에서 T+I 유도군 대비 775.8~

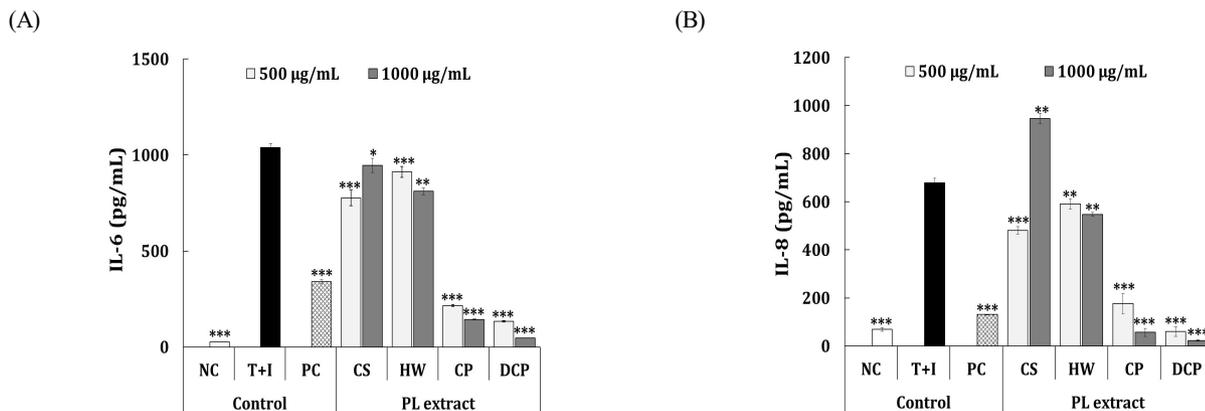


Fig. 3. Anti-inflammatory activities of fractions from PL-ferment on TNF-α+IFN-γ (T+I)-stimulated HaCaT keratinocyte. HaCaT keratinocyte were treated with each sample followed by TNF-α+IFN-γ (T+I) treatment for 24 hr, and the production of (A) IL-6 and (B) IL-8 were estimated. A dexamethasone (20 µg/mL) were used as positive control (PC). Results are expressed as mean±S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between T+I group and each group by Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

945.5 pg/mL(9.2~26.0%)의 통계적으로는 유의하였으나 우수한 억제활성을 보이지는 않았고 HW 처리군에서도 500~1,000 µg/mL의 농도범위에서 T+I 유도군 대비 811.7~911.3 pg/mL(12.6~22.4%)의 유의적으로 낮은 억제활성을 확인되었다. 그러나 HW의 주정 침전물인 CP 처리군에서는 500~1,000 µg/mL의 농도범위에서 T+I 유도군 대비 143.4~215.9 pg/mL(81.2~88.3%)으로, DCP 처리군은 500~100 µg/mL의 농도에서는 T+I 유도군 대비 46.6~132.9 pg/mL(89.4~97.9%)로서 PC보다도 우수한 IL-6 억제활성이 확인되었다. IL-8 억제활성 평가 결과는 Fig. 3B에 나타냈으며, PC 처리군은 T+I 유도군(678.5 pg/mL) 대비 131.1 pg/mL(89.8%)의 통계적으로 유의한 억제활성이 나타냈다. 그러나 액체발효물의 배양 상등액인 CS 처리군의 경우에는 500 µg/mL 농도에서는 481.0 pg/mL(32.4%)의 통계적으로 유의한 억제활성이 확인되었으나, 1,000 µg/mL의 농도에서는 T+I 유도군 대비 억제활성이 나타나지 않았다. HW 처리군의 경우에는 500~1,000 µg/mL의 농도범위에서 T+I 유도군 대비 547.8~591.4 pg/mL(14.3~21.4%)의 낮은 억제활성을 나타냈다. 한편, CP의 처리군은 T+I 유도군 대비 56.7~176.3 pg/mL(82.4~102.0%)의 통계적으로 유의한 억제활성을 나타내었고, DCP 처리군의 경우에는 T+I 유도군 대비 22.8~59.7 pg/mL(101.5~107.5%)의 통계적으로 유의한 가장 우수한 억제활성이 나타나는 것으로 확인되었다. 결과적으로, HaCaT 피부세포를 이용한 피부염 억제 활성 평가결과, 상황버섯 균사체 액체발효물(PL-ferment)의 열수추출물로부터 분리된 DCP 처리군이 가장 우수한 IL-6 및 IL-8 억제활성을 가지는 것으로 나타났으며, 이는 DCP에 존재할 것으로 추정되는 EPS 등의 고분자 물질이 피부염 억제 활성에 중요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있었다. Kim 등(2021)의 연구에서 동일 세포주인 HaCaT로부터 상황버섯 가수분해물이 보습관련 *hyaluronan synthase 2* 및 3(HAS 2 및 3)의 발현량을 mRNA 수준에서 증가시키는 것으로 확인되었는데, 이는 본 연구결과에서 확인된 바와 같이 상황버섯 균사체 액체발효물은 피부 관련 생리활성이 우수한 것으로 추정되었다. 본 연구진이 조사한 바에 따르면, 상황버섯 균사체는 1,000 mg/kg의 용량으로 14일 동안 경구투여 시 어떠한 독성징후를 나타내지 않는 것으로 보고되고 있으며(Park HJ 2014), 또한 Hu 등(2018)의 연구에서 상황버섯 유래 다당류는 500 mg/kg으로 투여 시 dextran sulfate sodium salt (DSS)로 염증이 유발된 마우스에서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 및 iNOS를 현저하게 감소시킬 수 있는 항염증 활성이 있는 것으로 확인되었으며 본 연구에서도 추후 상기 농도범위에서 *in vivo* 실험에 적용 가능할 것으로 사료된다. 지금까지의 연구결과를 종합했을 때, 상황버섯 균사체 액체발효물 유래의

DCP는 우수한 항염증 활성을 나타냈으며, 본 연구결과를 바탕으로 추후 장 염증 완화 등의 검토를 통해 postbiotics로서 개발 가능성도 높을 것으로 사료된다.

4. 구성분 및 구성당 분석

상황버섯 균사체 액체발효물 유래 4종 희분의 구성분을 확인하기 위해 중성당, 산성당, 단백질 및 총 폴리페놀 함량을 분석하였다(Table 2). 중성당이 CS(887.8 µg/mg), HW(766.3 µg/mg), CP(716.7 µg/mg) 및 DCP(830.1 µg/mg)에서 모두 가장 높은 구성분 함량을 보였고, 산성당의 경우, CS가 39.5 µg/mg, HW가 35.2 µg/mg, CP가 31.7 µg/mg 및 DCP가 44.1 µg/mg의 함량을 나타냈다. 한편, 단백질은 CS(0.8 µg/mg), HW(0.9 µg/mg), CP(3.9 µg/mg) 및 DCP(8.9 µg/mg) 모두 가장 적은 함량을 보였고, 총 폴리페놀 함량의 경우에는 CS(7.9 µg/mg), HW(8.8 µg/mg), CP(17.5 µg/mg)에서는 소량이 함유되었으나 DCP는 42.6 µg/mg으로 산성당의 수준을 나타내었다. 구성분 분석에서 4종 희분 모두 중성당이 높은 함량을 보였으므로 HPLC-UV를 이용하여 이들의 구성당 분포를 분석하였다(Table 2). 배양 상등액인 CS와 액체발효물 열수추출물인 HW의 주요 구성당은 glucose(99.2와 99.1%)로 확인되었으며, mannose(0.7%) 및 arabinose(0.1%)가 극히 소량 함유되어 있었고 나머지 단당류는 확인되지 않았다. 한편, CP의 구성당은 CS 및 HW에 비해 mannose(2.8%)가 소량 증가하였으며 미량의 galactose, xylose 및 fucose가 함유되어 있는 것으로 확인되었고, CP에서 투석으로 저분자 물질이 제거된 DCP 경우에는 glucose(86.5%) 감소와 mannose(9.2%)와 galactose(1.4%) 증가뿐만 아니라 소량의 glucuronic acid, galacturonic acid, fucose, xylose 및 arabinose도 검출되어 CP 및 다른 희분과도 현저한 차이를 나타내었다. 따라서, EPS가 주로 함유되어 있을 것으로 추정되는 DCP는 glucose와 mannose를 주요 구성당으로 함유하는 고분자 희분인 것으로 나타났다. 한편, 가장 우수한 항염증 활성을 나타낸 DCP에는 CS, HW 및 CP와 비교하여 유의미하게 감소된 glucose와 증가된 mannose 함량을 확인할 수 있었는데, 이는 증가된 mannose 함량이 항염증 활성에 중요한 역할을 할 수 있는 성분으로 추정될 수 있었다. 일반적으로 미생물 균체로부터 분리된 EPS의 경우 glucan, mannan 또는 glucomannan으로 이루어진 다당류가 주성분으로 보고되고 있기 때문에(Kim 등 2006; Baker 등 2008), 본 연구에서 확인된 높은 glucose와 mannose 함량을 통해 항염증 활성을 나타내는 DCP에서 활성성분으로 glucan, mannan 또는 glucomannan의 존재 가능성을 추정할 수 있었다. 또한, Buchala & Leisola(1987)는 구성당 분석 및 methylation analysis 등을 이용하여 유색고약버섯 유래의

Table 2. Chemical properties of fractions from PL-ferment

Composition ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Fraction			
	CS	HW	CP	DCP
Neutral sugar	887.8 \pm 32.5 ^a	766.3 \pm 20.2 ^a	716.7 \pm 26.1 ^a	830.1 \pm 30.1 ^a
Uronic acid	39.5 \pm 4.5 ^b	35.2 \pm 1.6 ^b	31.7 \pm 3.5 ^b	44.1 \pm 1.8 ^b
Protein	0.8 \pm 0.0 ^c	0.9 \pm 0.1 ^c	3.9 \pm 0.5 ^c	8.9 \pm 1.5 ^c
Polyphenol	7.9 \pm 0.1 ^{bc}	8.8 \pm 0.7 ^c	17.5 \pm 0.9 ^{bc}	42.6 \pm 1.2 ^b
Component sugar (mol %)				
Mannose	0.7	0.7	2.8	9.2
Rhamnose	-	-	-	-
Glucuronic acid	-	-	-	0.8
Galacturonic acid	-	-	-	0.7
Glucose	99.2	99.1	96.5	86.5
Galactose	-	-	0.3	1.4
Xylose	-	-	0.2	0.6
Arabinose	0.1	0.1	0.1	0.1
Fucose	-	-	0.1	0.8

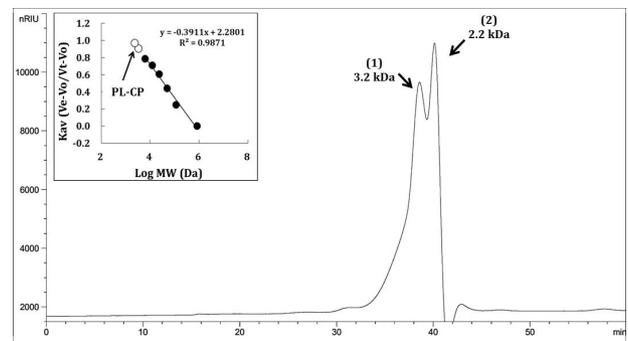
All results of composition content are expressed as mean \pm SD for three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. CS, culture supernatant; HW, hot-water from PL-ferment; CP, crude polysaccharide from HW, DCP, dialysis-CP.

polysaccharide가 주로 β -glucan의 형태로 존재한다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구의 활성시료인 DCP의 정확한 구조적인 규명을 위해 추후 methylation analysis 등을 통한 결합양식 확인이 필요할 것으로 사료된다.

5. 분자량 분석

상황버섯 균사체 액체발효물로 분획한 4종 획분이 활성에서 차이를 보이는 이유를 확인하기 위하여 분획과정이 유사하나 활성에 차이를 보인 HW의 주성 침전물인 CP와 DCP를 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하여 포함되어 있는 물질의 분자량 분포를 분석하였다. 표준물질로는 galactose 및 pullulan을 이용하여 표준곡선을 작성하였으며, 이를 통해 시료의 retention time과 비교하여 분자량을 측정하였다. 먼저, CP의 chromatogram은 Fig. 4A에 나타냈고, 표준물질과 비교해 보았을 때, CP는 2.2~3.2 kDa의 비교적 낮은 분자량 분포를 보여주면서 분자량이 높은 물질은 극소량 함유되어져 있음을 확인할 수 있었다. 한편, DCP의 분자량 분포는 Fig. 4B에 나타냈었는데 CP와 가장 뚜렷한 차이로 낮은 분자량(2.2 kDa)의 물질이 거의 제거되면서 18 kDa와 638 kDa의 고분자량에 속하는 물질이 증가되고 있는 경향을 보여주었다. Hwang 등(2021)의 연구에서도 감추출물로부터 분리된 345 kDa 이상의 조다당 획분이 감추출물에 비해 동일 세포주(RAW 264.7 및 HaCaT keratinocyte)에서

(A)



(B)

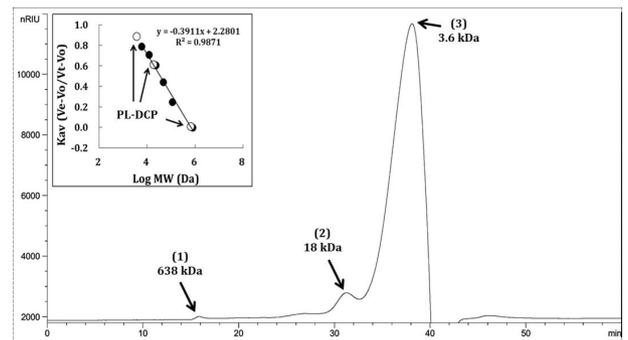


Fig. 4. Molecular weight chromatogram of (A) CP and (B) DCP from PL-ferment.

염증억제 활성이 우수하게 증가된 것을 보고하였는데, 이는 본 연구결과인 고분자 물질이 함유된 DCP가 우수한 염증억제 활성을 나타내는 것과 유사한 결과로 사료되었다. 상황버섯 균사체 액체발효물(PL-ferment)의 항염증 활성에는 주로 고분자 다당류가 관련되어 있는 것으로 추정되었으며, 이는 투석 등의 저분자 물질 제거를 통해 활성이 더욱 증가될 수 있을 것으로 사료되었다. 결론적으로 활성획분인 DCP는 glucose 및 mannose를 주요 구성당으로 함유하는 18 kDa 및 638 kDa의 고분자 다당류가 포함된 것으로 나타났으며, 이는 상황버섯 균사체로부터 유리된 EPS로 추정할 수 있었다. 향후 DCP에 존재하는 다당이 어떤 기전을 통해 염증억제 활성을 나타내는 지에 대한 추가연구가 필요할 것으로 생각되었으며, DCP는 항염증 활성을 나타내는 postbiotics 소재로 산업적인 개발이 가능할 것으로 사료되었다.

요약 및 결론

상황버섯 균사체(*Phellinus linteus* mycelium)의 액체발효물(PL-ferment)로부터 염증억제 활성을 평가하고 postbiotics로서의 산업적 이용 가능성을 조사하기 위해 PL-ferment를 배양 상등액(culture supernatant; CS), PL-ferment의 열수 추출물(hot-water extract; HW), HW로부터 분획된 주정 침전물(crude polysaccharide; CP) 저분자가 제거된 침전물(dialysis-CP; DCP)로 분획하였다. 타 획분들에 비해서, exopolysaccharide (EPS)가 주요 구성물질일 것으로 추정되는 DCP는 LPS로 염증이 유발된 RAW 264.7 세포에서 산화질소, IL-6와 MCP-1 생산을 유의적으로 감소시켰으며, TNF- α 와 IFN- γ 로 염증이 유발된 HaCaT 세포주에서 IL-6와 IL-8 생산을 유의적으로 억제시켰다. 구성분 함량 평가 결과, 모든 획분들간에는 유의한 성분차이를 보이지는 않았으나, 구성당 분석 결과에서 DCP는 다른 획분들에 비하여 유의미하게 감소된 glucose 함량과 증가된 mannose 함량을 나타냈다. 이를 통해 활성획분인 DCP에는 mannose가 항염증 활성에 주요한 역할을 할 것으로 추정되었다. 분자량 확인 결과, DCP는 저분자 물질이 제거된 18 및 638 kDa의 고분자 다당류가 주로 포함된 것으로 나타났으며, 이는 상황버섯의 EPS로부터 유래되었을 것으로 추정되었다. 결론적으로 DCP의 항염증 활성을 이용하여 상황버섯 균사체 발효물은 postbiotics 소재로서 산업적 활용이 가능할 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 논문은 2020년 전라북도 선도기업 육성사업(선도기업 기술개발 역량강화 지원사업; 과제번호 2020-나-6)으로 수행

한 연구로 전북테크노파크와 (주)네오크레마에 감사드립니다.

References

- Baker JR, Kim JS, Park SY. 2008. Composition and proposed structure of a water-soluble glycan from the Keumsa Sangwhang mushroom (*Phellinus linteus*). *Fitoterapia* 79: 345-350
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Buchala AJ, Leisola M. 1987. Structure of the β -d-glucan secreted by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous culture. *Carbohydr Res* 165:146-149
- Du B, Yang Y, Bian Z, Xu B. 2017. Characterization and anti-inflammatory potential of an exopolysaccharide from submerged mycelial culture of *Schizophyllum commune*. *Front Pharmacol* 8:252
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Hu T, Lin Q, Guo T, Yang T, Zhou W, Deng X, Yan JK, Luo Y, Ju M, Luo F. 2018. Polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* mycelia exerts anti-inflammatory effects via MAPK and PPAR signaling pathways. *Carbohydr Polym* 200:487-497
- Huang GJ, Huang SS, Deng JS. 2012. Anti-inflammatory activities of inotilone from *Phellinus linteus* through the inhibition of MMP-9, NF- κ B, and MAPK activation *in vitro* and *in vivo*. *PLOS ONE* 7:e35922
- Hwang HJ, Kim SW, Choi JW, Yun JW. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme Microb Technol* 33:309-319
- Hwang KC, Shin HY, Kim WJ, Seo MS, Kim H. 2021.

- Effects of a high-molecular-weight polysaccharides isolated from Korean persimmon on the antioxidant, anti-inflammatory, and antiwrinkle activity. *Molecules* 26:1600
- Jiang P, Yuan L, Huang G, Wang X, Li X, Jiao L, Zhang L. 2016. Structural properties and immunoenhancement of an exopolysaccharide produced by *Phellinus pini*. *Int J Biol Macromol* 93:566-571
- Jung JY, Lee IK, Seok SJ, Lee HJ, Kim YH, Yun BS. 2008. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. *J Appl Microbiol* 104:1824-1832
- Kang HJ, Baick SC, Yu JH. 2005. Studies on the properties of the stirred yogurt manufactured by exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. *Korean J Food Sci Anim Resour* 25:84-91
- Kim AR, Kim JE, Park SN. 2011. Antioxidative activity and component analysis of *Phellinus linteus* extracts. *J Soc Cosmet Sci Korea* 37:309-318
- Kim DH, Yang BK, Jeong SC, Park JB, Cho SP, Das S, Yun JW, Song CH. 2001. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnol Lett* 23: 513-517
- Kim GY, Lee JY, Lee JO, Ryu CH, Choi BT, Jeong YK, Lee KW, Jeong SC, Choi YH. 2006. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:1218-1226
- Kim H, Park CK, Jeong JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW. 2009. Immune stimulation and anti-metastasis of crude polysaccharide from submerged culture of *Hericium erinaceum* in the medium supplemented with Korean Ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:1535-1542
- Kim H, Suh HJ, Shin JY, Hwang JH, Yu KW. 2016. Physiological activity of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber* mycelium. *Korean J Food Nutr* 29:1-11
- Kim HJ, Chang HC. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Kimchi. *Korean J Microbiol Biotechnol* 34:196-203
- Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18:295-303
- Kim MC, Kim JS, Heo MS. 2008. Antibacterial, antioxidant and antitumor activities of mushroom mycelium mixed culture extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23:158-163
- Kim SH, Song YS, Kim SK, Kim BC, Lim CJ, Park EH. 2004. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the *n*-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J Ethnopharmacol* 93:141-146
- Kim TJ, Kwak B, Kim HT. 2021. Studies on skin anti-aging efficacy of hydrolysate from *Phellinus igniarius*. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 34:1-20
- Kim YD, Kwak SH, Kim KJ, Seo KS, Park TY, Yu KY, Jin SW. 2014. The analysis of useful components in *Flammulina velutipes* fruit body, *Flammulina velutipes* mycelium and *Cordyceps militaris* mycelium. *J Mushrooms* 12:193-200
- Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Kim JH, Cho YJ, Cha WS. 2006. Biological activities of extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49:298-303
- Lee Y, Choi HK, N'deh KPU, Choi YJ, Fan M, Kim E, Chung KH, An JH. 2020. Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. *Nutrients* 12:411
- Lin CJ, Lien HM, Chang HY, Huang CL, Liu JJ, Chang YC, Chen CC, Lai CH. 2014. Biological evaluation of *Phellinus linteus*-fermented broths as anti-inflammatory agents. *J Biosci Bioeng* 118:88-93
- Mei Y, Zhu H, Hu Q, Liu Y, Zhao S, Peng N, Liang Y. 2015. A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. *Carbohydr Polym* 124:90-97
- Nakamura T, Matsugo S, Uzuka Y, Matsuo S, Kawagishi H. 2004. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:868-872
- Oishi Y, Manabe I. 2018. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol* 30:511-528
- Park HJ. 2014. CARI III inhibits tumor growth in a melanoma-bearing mouse model through induction of G0/G1 cell cycle arrest. *Molecules* 19:14383-14395
- Park HM, Hong JH. 2014. Antioxidant activity of extracts with extraction methods from *Phellinus linteus* mycelium on *Mori ramulus*. *Korean J Food Preserv* 21:565-572

- Qi Y, Zhao X, Lim YI, Park KY. 2013. Antioxidant and anticancer effects of edible and medicinal mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:655-662
- Rathore H, Prasad S, Sharma S. 2017. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* 5:35-46
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Nutr* 34:36-46
- Song CH, Ra KS, Yang BK, Jeon YJ. 1998. Immunostimulating activity of *Phellinus linteus*. *Korean J Mycol* 26:86-90
- Zou X, Guo X, Sun M. 2009. pH control strategy in a shaken minibioreactor for polysaccharide production by medicinal mushroom *Phellinus linteus* and its anti-hyperlipemia activity. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:277-281

Received 02 September, 2021

Revised 14 September, 2021

Accepted 26 September, 2021