노루궁뎅이 버섯 열수추출물의 항산화 활성과 항염증 효능 평가

김다혜 · 박사라 · 트리쉬나 · 하스낫 · 펄빈 · 임병우[†]

건국대학교 의료생명대학 응용생화학 전공

Evaluation of the Antioxidant Activity and Anti-Inflammatory Effect of *Hericium erinaceus* Water Extracts

Da Hye Kim, Sa Ra Park, Trishina Debnath, MD Abul Hasnat, Mehnaz Pervin and Beong Ou Lim

College of Biomedical & Health Science, Department of Applied Biochemistry, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea.

ABSTRACT : This study was conducted to determine the antioxidative activity of *Hericium erinaceus* (HE) and we investigated that HE extract contributes to cell proliferation and to anti-LPS-induced inflammation. HE extract showed high DPPH free radical scavenging activity. However, the reducing power activity slightly increased in compare with control. Nitrite scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, SOD-like activity of HE were elevated in dose-dependent. The level of total phenolic and flavonoid showed 30.06 mg/100 g and 33.86 mg/100 g, respectively. Linoleic acid oxidation inhibition had reached a maximum level on the fourth day and started to drop from the fifth day. HE extract contributes to cell proliferation on the RAW 264.7 cell. Our finding demonstrated that water extracts of HE possess significant antioxidant activities and may be suggested a new potential source of anti-inflammatory medicines.

Key Words : Antioxidant, LPS, RAW 264.7, Anti-Inflammatory, *Hericium erinaceus*

서 언

최근 생활수준과 소득수준이 향상됨에 따라 삶의 질 향상에 대한 많은 관심이 높아지고 있으며, 특히 노화와 암의 대처방안으로 천연 항산화 물질 등의 생리활성물질 개발에 관심이 집중되고 있다 (Cutler, 1984).

생체 내에서 필요한 에너지 공급을 위해 생화학적 산화 반응은 끊임없이 일어나며 이 과정에서 항상 발생하는 흔히 유해산소라 불리는 활성산소는 가장 안정한 형태의 산소인 삼중항산소 ($^3\text{O}_2$)가 산화, 환원과정에서 생성되는 일중항산소인 superoxide ($^1\text{O}_2$)와 hydroxyl radical (OH)과 같은 짝짓지 않은 상태의 free radical 및 과산화수소 (H_2O_2)를 통칭한다 (Papa and Skulachev, 1997).

활성산소는 불안정하고 산화력이 높아 생체물질과 쉽게 반응하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스

(oxidative stress)를 유발하게 되며, 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고, 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 뇌졸중, 암, 동맥경화, 알츠하이머병, 파킨슨 병 등 다양한 질병을 유발하게 된다 (Jeong *et al.*, 2008). 생물학적 반응으로 생성된 free radical을 제거시켜 생체를 보호하는 생리학적 항산화 효소로는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSHpx) 및 glutathione S-transferase (GST) 등이 있으며, 저분자의 항산화제 혹은 free radical scavenger 역할을 하는 것으로 α -tocopherol, β -carotene, ascorbic acid 및 glutathione 등이 알려져 있다 (Borrello *et al.*, 1984). 이와 같이 인체는 식이로 섭취하는 항산화 식품이나 인체 내의 항산화 효소로서 활성산소의 유리기를 제거하여 산화와 항산화의 균형을 유지하여 산화적 스트레스로부터 인체를 보호하고 있다 (Ji, 1993).

버섯은 향미성분이 풍부하고 단백질과 지질의 함량이 낮은

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-840-3570 (E-mail) beongou@kku.ac.kr

Received 2013 January 18 / 1st Revised 2013 January 26 / 2nd Revised 2013 February 8 / 3th Revised February 27 / 4th Revised March 5 / 5th Revised March 16 / Accepted 2013 March 18

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

반면 다당류, 비타민 및 무기질과 같은 특수 영양소를 다량 함유하고 있어서 예로부터 건강식품으로 인식되어 왔으며 최근에는 항암활성, 면역증강, 항산화 등의 약리효과가 밝혀지면서 의약품과 건강기능식품의 소재로 많이 이용되고 있다 (Franz *et al.*, 1996).

노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceus*)은 산호버섯과에 속하는 버섯으로 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 발생하며 중국에서는 원숭이 머리버섯, 곰머리 버섯으로 알려져 있으며 (Chang *et al.*, 1999), 일본에서는 Yamabushitake (Ahn, 1992), 우리나라에서는 노루궁뎅이 버섯으로 알려졌다. 노루궁뎅이 버섯에서는 탄수화물, 단백질, 아미노산, 효소, 무기염류 및 비타민 등이 풍부하고, 항암 및 면역 기능을 증대시키는 효능이 있다고 알려져 있다 (Yearul and Shuichi, 1989, Yanmagumci and Yearul, 1987). 최근에는 치매치료제로 가능한 물질이 분리되었으며, 항암효과를 가진 성분을 비롯하여 다양한 생리활성물질이 있는 것으로 보고되었다 (Kawagishi *et al.*, 1996).

본 연구는 노루궁뎅이 버섯 열수추출물의 항산화 효능과 RAW 264.7 cell에서의 LPS에 의한 염증반응의 조절 효과에 대해 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 소재인 노루궁뎅이 버섯은 음건하고 분쇄하여 사용하였다. 리터당 약 100 g을 넣고 85°C에서 3회 반복 열수 추출하고, 추출액은 여과지 (Adventec Toyo 2, Japan)를 사용하여 2회 감압 여과하고 rotary evaporator로 농축하였다. 이를 동결건조 후 -20°C에 보관하여 사용하였다.

2. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 항산화 활성

1) DPPH 라디칼 소거능 (DPPH radical scavenging activity) 측정

DPPH는 Blois의 (Blois, 1958) 실험방법을 변형하여 열수 추출을 통해 얻어진 노루궁뎅이 버섯 시료를 10 mg을 증류수 1 ml로 희석하여 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml 농도로 각각 1 ml씩 제조하고, standard로 사용되는 BHT 용액은 BHT 10 mg을 methanol 1 ml로 희석하여서 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml의 농도로 각각 1 ml씩 제조한다. 또한 DPPH 용액은 DPPH 0.002 g에 methanol 25 ml로 제조한다. 96 well plate에 BHT 용액과 methanol을 각각 80 μ l씩 혼합한 군, BHT와 DPPH 용액을 각각 80 μ l씩 혼합한 군, sample과 DPPH 용액을 각각 80 μ l씩 혼합한 군, methanol과 DPPH용액을 각각 80 μ l씩 혼합한 군, methanol만을 160 μ l씩 처리한 군, 증류수와 DPPH용액을 각각 80 μ l씩 혼합한 군, 증류수와 methanol을 각각 80 μ l씩 혼합한 군을 각각 구분하여 분주한 후 빛과 반응하지 못하게 foil로 감싸준 뒤 실온에서 30분간 방치한 후

ELISA reader를 이용해 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 환원력 (Reducing power assay) 측정

Oyaizu의 (Oyaizu, 1986) 방법에 따라 PBS와 1% potassium ferricyanide 2.5 ml를 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml의 농도로 제조한 sample과 standard인 BHT와 ascorbic acid 2.5 ml과 대조군 2.5 ml에 각각 혼합시킨 후 50°C에서 20분 동안 정지한 다음 반응이 끝난 혼합물을 각각 5 ml씩 새 tube로 옮긴 뒤 TCA (trichloroacetic acid) 용액 2.5 ml를 첨가하여 centrifuge에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리한 상층액 5 ml에 증류수 5 ml와 ferric chloride 1 ml를 첨가한 후 96well plate에 0.15 ml씩 분주 해준 뒤 ELISA reader를 이용해 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 아질산염 소거능 (Nitrite scavenging activity) 측정

아질산염 소거능 측정은 Gray와 Dugan의 (Gray and Dugan, 1975) 실험방법을 이용하여 먼저, 노루궁뎅이 버섯 추출물과 standard인 ascorbic acid를 각각의 농도 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml로 sample을 제조하고, 1 ml의 증류수 대조군을 준비해 준 후 여기에 각각 1 ml에 1 mM의 nitrite sodium을 넣고 혼합해 준 뒤 8 ml의 0.2 M citrate buffer (pH 3.0)를 넣고 혼합한다. 그 후, 37°C에서 1시간 동안 incubation한 후에 혼합물 중 1 ml를 다른 시료에 옮긴 뒤 2% acetic acid 2 ml와 griess reagent를 0.4 ml 넣고 혼합한다. 그 후, 15분 동안 실온에서 반응 시킨 후, ELISA reader로 520 nm에서 측정하였다. Nitrite 계산법은 다음과 같다.

$$\text{Nitric oxide scavenging activity (\%)} = [1 - (A - C) / B] \times 100$$

4) ABTS 라디칼 소거능 (radical scavenging) 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Jeong 등의 방법 (Jeong *et al.*, 2009), 변형하여 측정하였다. 증류수에 용해한 7 mM의 ABTS와 2.45 mM의 potassium persulfate를 혼합한 후, 안정화를 위해 암실상태에서 12-16시간 방치한다. 734 nm에서 OD값이 0.70 ± 0.02 이 되도록 PBS (pH 7.4)로 희석하였다. 노루궁뎅이 버섯 추출물과 standard인 ascorbic acid를 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml로 용해한 용액 0.1 ml와 위의 ABTS 용액 0.9 ml를 가하여 혼합한 후, 5분간 실온에서 정지한 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 계산법은 아래와 같다.

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = \{(C - D) - (A - B) / (C - D)\} \times 100$$

위의 식에서 A는 ABTS 용액과 sample 또는 standard의 측정값을, B는 potassium persulfate 용액에 sample 또는 standard의 측정값을, C는 ABTS 용액과 증류수 또는 methanol의 측정값을, D는 potassium persulfate와 증류수 또는 methanol의 측정값을 의미한다.

5) 총 페놀성 화합물 함량 측정

총 페놀성 화합물 함량을 측정하기 위해 Folin-Ciocalteu's 방법을 이용하였다 (Wang *et al.*, 1994). standard인 gallic acid를 0.05, 0.10, 0.15, 0.25, 0.30 mg/ml의 농도로 실험하여 $y = 0.0642x + 0.0618$, $R^2 = 0.9903$ 의 표준곡선을 획득하였고 노루궁뎅이 버섯 추출물을 10 mg/ml로 용해한 용액 40 μ l와 Folin-Ciocalteu phenol reagent를 1 mg/ml로 용해한 용액 20 μ l, Na_2CO_3 (20%) 60 μ l을 혼합한다. 암실에서 30분간 반응을 시킨 후 ELISA reader를 이용해 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 후 얻어진 페놀 농도에 표준곡선과 수율 (61.04%)을 이용해 총 페놀 함량 값을 측정하였다.

6) 총 플라보노이드 화합물 함량 측정

노루궁뎅이 버섯 추출물의 총 플라보노이드 화합물 함량의 측정은 Nieva 등 (Nieva *et al.*, 2000)의 방법으로 측정되었다. 우선 catechin reagent를 1 mg/ml로 용해한 용액을 0.0025, 0.005, 0.01, 0.015, 0.020, 0.025 mg/ml의 농도로 각각 만든 후 25 μ l씩을 분주 한 후 125 μ l의 증류수로 희석한다. 다음은 5% sodium nitric (NaNO_2) 8 μ l를 첨가한 후, 5분간 상온에서 반응시켜준다. 그 후 10% aluminum chloride 15 μ l를 넣고, 6분간 반응 후 1 M sodium hydroxide (NaOH) 50 μ l와 27 μ l의 증류수를 첨가하여 혼합한 후 ELISA reader를 이용해 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. $y = 0.0168x + 0.0232$, $R^2 = 0.9972$ 의 표준곡선을 획득하였고, 노루궁뎅이 버섯 추출물 또한 위와 같은 방법으로 실험하여 얻어진 결과인 플라보노이드 농도에 표준곡선과 수율 (61.04%)을 통해 총 플라보노이드 함량 값을 측정하였다.

7) 리놀레산 산화 저해 활성 측정

리놀레산 산화 저해 활성 측정은 Debnath 등의 방법 (Debnath *et al.*, 2012)을 사용하여 측정하였다. 최저 농도 0.1 mg/ml, 최고 농도 3 mg/ml로 용해한 노루궁뎅이 버섯 추출물과 standard인 ascorbic acid를 제조하고, 추가적으로 증류수로만 이루어진 대조군을 각각 2.5 ml을 새 tube에 분주한다. 그 후, 0.1 M PBS (pH 7.0) 1 ml, 증류수 0.5 ml, 50 mM linoleic acid 1 ml를 가해주고, 40°C에서 7일간 정치해준 후, 각각의 용액들을 7일간 같은 시각에 50 μ l를 따서 새 tube에 분주한 후 추가적으로 75% EtOH 2.35 ml, 30% ammonium thiocyanate 50 μ l, 20 mM FeCl_2 50 μ l을 순서대로 분주한 뒤 3분간 상온에서 반응시킨다. 그 후, 혼합액을 150 μ l씩 분주 후 ELISA reader를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 linoleic acid oxidation inhibition의 계산법은 아래와 같다.

$$\text{Inhibition of linoleic acid oxidation (\%)} = (1 - (A/B)) \times 100$$

이때 A는 sample 또는 standard의 흡광도 값을, B는 대조군의 흡광도 값을 의미한다.

8) Superoxide dismutase 유사 활성 (SOD-like activity) 측정

SOD 유사 활성 측정은 Marklund의 방법 (Marklund and Marklund, 1975)에 따라 측정하였다. 노루궁뎅이 버섯 추출물과 standard인 ascorbic acid를 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml로 용해한 용액과 증류수 각 0.2 ml에 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 가한 후, 3 ml의 tris-HCl buffer (50 mM tris[hydroxymethyl]aminomethane + 10 mM EDTA, pH 8.5)를 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨다. 그 후 1 N HCl 1 ml를 가한 혼합물과 농도처리만 된 sample과 standard를 0.15 ml을 가한 후 ELISA reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

이때 SOD-like activity 계산법은 아래와 같다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 100 - [(A-B)/C] \times 100$$

위의 식에서 A는 실험과정이 모두 이루어진 sample 또는 standard를, B는 농도 처리만 된 sample 또는 standard를, C는 실험과정이 모두 이루어진 대조군을 의미한다.

3. 세포 활성 실험

1) 세포배양

본 연구에 사용한 RAW 264.7 세포를 유지하기 위해 DEME 배지를 사용하였고, 이때 각각의 배지에 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco/BRL)와 1% penicillin이 포함된 용액을 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였고 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)로 각 세포의 단층을 깨끗이 씻어낸 후 계대배양을 실시하였고, 배지는 매일 교환하였다.

2) 세포생존율 측정 (MTT assay)

추출물의 세포독성은 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 이용한 방법에 의해 측정하였다. 배양된 RAW 264.7 세포를 5×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양하여 부착 및 안정화시킨 후, 농도별로 희석한 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 세포에 알맞은 배지로 5 mg/ml의 농도로 용해시켜 제조한 MTT용액을 각 well에 10 μ l씩 가하고, 37°C, 5% CO_2 조건에서 4시간 동안 반응시켜 MTT가 환원되도록 하였다. 배지를 제거한 후, 각 well에 100 μ l의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 산출하였다.

$$\text{Viability (\%)} = (\text{Test well}/\text{대조군 well}) \times 100$$

4. 통계처리

본 연구의 모든 실험값은 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, 통계는 SPSS package program을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 $p < 0.05$ 의 유의수준에서 Duncan's multiple range test로 유의적 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 페놀 및 플라보노이드 함량 비교

노루궁뎅이 버섯 추출물의 페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 페놀 함량은 30.06 mg/100 g, 플라보노이드 함량은 33.86 mg/100 g로 확인되었다.

2. DPPH 라디칼 소거 활성, 환원력, 아질산염 소거능, ABTS 라디칼 소거 활성 측정

노루궁뎅이 버섯에 대하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정

Table 1. Total phenolic compound and flavonoid contents of *Hericium erinaceus* extract.

Extract	Total phenolic (mg GAE/100 g of dry mass)**	Total flavonoid (mg CE/100 g of dry mass)*
Water extract	30.06 $\pm$ 0.17	33.86 $\pm$ 0.01***

*GAE: gallic acid equivalent.

**CE: catechin equivalent.

***Values are mean $\pm$ SD(n = 3).

Fig. 1. Antioxidant activities of extract from different concentration of *Hericium erinaceus*. (A); DPPH radical scavenging ability, (B); Reducing power, (C); Nitrite Scavenging Activity, (D); ABTS radical scavenging activity. The values are the mean $\pm$ S.D. from three independent experiments * $p < 0.05$ vs. control group.

한 결과 Fig. 1의 A와 같다. DPPH 라디칼 소거능은 DPPH가 짙은 자색의 안정한 자유 라디칼로 항산화 물질에 의해 환원되면서 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 측정하며 그 측정 방법이 비교적 간단하여 여러 시료로부터 항산화 활성을 탐색할 때 유용하다 (Lee *et al.*, 2011). 열수 추출한 노루궁뎅이 버섯은 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml 에서 각각 62.81%, 77.38%, 81.36%, 77.19%, 71.62%의 소거 활성을 보였다. 이와 비교적으로 합성 항산화제인 BHT는 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml 에서 각각 74.74%, 95.69%, 96.08%, 96.71%, 95.94%를 보임으로서 노루궁뎅이 버섯은 BHT 보다는 낮은 소거 활성을 보이나 전체적 농도로 보았을 때 60% 이상의 DPPH 라디칼 소거활성을 보이기 때문에 DPPH 라디칼에 대한 높은 전자공여능을 가지고 있는 것으로 사료된다.

노루궁뎅이 버섯의 농도를 달리하여 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정한 결과는 Fig. 1의 B와 같으며, 여러 가지 항산화 작용 중 활성산소종 및 유리기에 전자를 공여하는 능력을 환원력이라고 한다. 이는 항산화 활성을 검정하는 방법으로 많이 쓰인다. 환원력이 클수록 색은 녹색으로 변하며 큰 흡광도 값을 나타낼수록 항산화도가 높다고 평가된다 (Song *et al.*, 2012). 노루궁뎅이 버섯의 농도가 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 보이나 standard로 사용된 물질인 ascorbic acid나 BHT보다는 낮은 결과를 보여 노루궁뎅이 버섯이 환원력에는 크게 영향을 미치는 않는 것으로 판단된다.

아질산염을 일정 농도 이상 섭취하게 되면 메트헤모글로빈을 메트헤모글로빈으로 전환시키는데, 이 메트헤모글로빈은 각종 중독현상을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Jung *et al.*, 2000). 노루궁뎅이 버섯의 아질산염 소거능은 Fig. 1의 C와 같으며, 결과를 보면 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml 에서 각각 19.33%, 23.65%, 39.67%, 67.47%, 101.34%의 저해율을 보였으며, standard로 쓰인 ascorbic acid는 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml 에서 각각 15.11%, 25.13%, 37.57%, 55.15%, 99.47%의 저해율을 나타냈는데, 노루궁뎅이 버섯이 Ascorbic acid 이상의 소거능을 보였다. 이때 노루궁뎅이 버섯은 standard 물질과 같이 농도 의존적으로 높은 저해율을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

ABTS 라디칼 소거활성은 산화 유도제인 potassium persulfate와 반응에 의해 형성된 ABTS 양이온이 시료 중의 항산화 물질에 의해 제거될 때 일어나는 탈색반응을 이용하여 물질의 항산화 능력을 측정하는 방법이다 (Myung and Hwang, 2008). 노루궁뎅이 버섯의 ABTS 라디칼 소거능의 결과는 Fig. 1의 D와 같으며, 노루궁뎅이 버섯의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거능 또한 증가하였다. 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml 에서 각각 29.13%, 47.63%, 69.82%, 99.48%, 101.49%의 소거활성을 보였으며 이때 standard 물질로 쓰인 ascorbic acid는 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml 에서 각각

Fig. 2. Inhibition of linoleic acid oxidation by the water extract of *Hericium erinaceus*. The values are the mean $\pm$ S.D. from three independent experiments * $p < 0.05$ vs. control group.

Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD)-like activities of water extract from *Hericium erinaceus*. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. The values are the mean $\pm$ S.D. from three independent experiments * $p < 0.05$ vs. control group.

100.44%, 99.97%, 99.29%, 99.16%, 100.95%의 소거활성을 보임으로써 높은 소거 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

3. 리놀레산 산화 저해 활성

불포화유리지방산의 일종인 Linoleic acid에 대한 노루궁뎅이 버섯의 산화 억제 활성 (oxidation inhibition)을 측정하였으며, 항산화제로 널리 쓰이는 ascorbic acid의 산화 억제 활성을 함께 비교하였다. linoleic acid 산화 억제능의 결과는 Fig. 2와 같으며, 노루궁뎅이 버섯은 시간이 증가함에 따라 linoleic acid 산화 억제능 또한 증가하였다. 특히 4일째에 노루궁뎅이 버섯은 85% 억제능을, standard인 ascorbic acid는 96%의 억제능으로 제일 높은 값을 나타내었고 5일째부터 감소하는 경향을 나타냈다.

4. Superoxide dismutase 유사 활성 (SOD-like activity)

생체 내 항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutase는 세포내 활성산소를 과산화산소로 전환시키는 반응을 촉매 하

Fig. 4. RAW 264.7 cells were incubated under various concentration of *Hericium erinaceus* extract. Viability of cells harvest at 24 hr after LPS addition was determined using the MTT assay. The values are the mean $\pm$ S.D. from three independent experiments * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. LPS-treated group.

는 효소이며, SOD에 의해 생성된 과산화수소는 catalase 또는 peroxidase에 의해 물 분자와 산소 분자로 전환되는 중요한 효소 중 하나이다 (Ha *et al.*, 2010). 노루궁뎅이 버섯의 SOD 유사활성능의 결과는 Fig. 3에 나타났다. 즉, superoxide의 반응성을 억제하며, 노화와의 관계가 있는 SOD유사활성능을 pyrogallol에 대한 자동산화 반응을 이용하여 노루궁뎅이 버섯을 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml의 농도에서 측정된 결과, 각각 44.38%, 54.71%, 77.01%, 114.42%, 175.46%로 나타났으며 standard인 ascorbic acid는 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml에서 각각 43.11%, 52.42%, 70.60%, 97.91%, 100.28%를 나타내는 것으로 보아 노루궁뎅이 버섯이 높은 SOD 유사활성능을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

5. 세포생존율 측정 (MTT assay)

MTT를 이용하여 노루궁뎅이 버섯 추출물이 LPS (10 µg/ml)로 유도된 RAW 264.7 Cell에서 얼마나 세포 독성을 나타내는지 확인한 결과는 Fig. 4와 같다. 노루궁뎅이 버섯 추출물을 농도별로 처리시 세포 생존율은 증가하였다. LPS군에서는 세포수가 감소하였으며, 추출물의 경우에는 높은 세포 생존율을 나타냄으로서 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물에서 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물은 환원력에는 크게 영향을 미치는 않는 것으로 판단되며, 페놀과 플라보노이드 함량은 낮았지만 DPPH 라디칼 소거능, 아질산염 소거능, ABTS 라디칼 소거능, superoxide dismutase 유사 활성에서는 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 리놀레산 산화 저해 활성에 있어서 standard 물질인 ascorbic acid

와 유사한 값을 나타내어 매우 우수한 항산화 활성을 가진 물질로 사료된다. 한편, MTT assay 결과에서 LPS로 유도된 RAW 264.7세포는 높은 세포 생존율을 나타냄으로써 노루궁뎅이 버섯 열수 추출물은 낮은 독성을 갖는 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되며 이와 같은 실험을 감안하여 노루궁뎅이 버섯 추출물의 경우 마이크로웨이브 추출공정 최적화 (Lee *et al.*, 2007)와 같은 다각도의 실험이 추가적으로 요구되며 열수 추출물뿐만 아니라, 추출물의 분획물 등에서의 추가적인 활성 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 정부 (교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단 (F 00082), 지식경제부지원 지역혁신센터사업 (건국대학교 바이오 식·외약 연구센터), 건국대학교 의료생명대학일반대학원 응용생명과학과 두뇌한국사업팀의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Ahn DK. (1992). Medicinal fungi in Korea. Korean Journal of Mycology. 20:154-159.
- Blois MA. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181:1199-1200.
- Borrello S, Seccia A, Galeotti T, Bartoli GM, Farallo E and Serri F. (1984). Protective enzymes in human epidermal carcinomas and psoriasis. Archives of Dermatol Research. 276:338-340.
- Chang HY and Roh MG. (1999). Physiological characteristics of *Hericium erinaceus* in sawdust media. Korean Journal of Mycology. 27:252-255.
- Cutler RG. (1984). Antioxidants aging, and longevity. In Pryor WA. (ed.). Free Radicals in Biology. Academic Press. New York. New York, USA. p.371-428.
- Debnath T, Bak JP, Samad NB, Jin HL, Lee BR and Lim BO. (2012). Antioxidant activity of mume fructus extract. Journal of Food Biochemistry. 36:224-232.
- Franz H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Kozu T and Sakai Y. (1996). Japanese green tea as a cancer preventive in humans. Nutrition Reviews. 54:56-70.
- Gray JI and Dugan JRL. (1975). Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. Journal of Food Science. 40:981-985.
- Ha JH, Jeong MH, Seo YC, Yong CW, Kim JS, Kim HH, Ahn JH and Lee HY. (2010). Enhancement of antioxidant activities of bark of *Berberis koreana* Palibin by lactic acid fermentation. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:421-428.
- Jeong CH, Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Heo HJ, Shim KH, Cho BR, Bae YH and Choi JS. (2009). *In vitro* antioxidant activities and phenolic composition of hot water extract from different parts of *Cudrania tricuspidata*. Journal of food science nutrition. 14:283-289.
- Jeong EJ, Sung SH, Kim J, Kim SH and Kim YC. (2008). *Rhus verniciflua* stokes attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. Natural Product Sciences. 14:156-160.
- Ji LL. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. Medicine and Science in Sports and Exercise. 25:225-231.
- Jung GT, Ju IO, Choi JS and Hong JS. (2000). The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis*(Omiija) seed. Korean Journal of Food Science and Technology. 32:28-945.
- Kawagishi H, Shimada A, Hosokawa S, Mori H, Sakamoto H, Ishiguro Y, Sakemi S, Bordner J, Kojima N and Furukawa S. (1996). Erinacines E, F and G stimulators of nerve growth factor(NGF)-synthesis from the mycelia of *Hericium erinaceum*. Tetrahedron Letters. 37:7399-7402.
- Lee JS and Lee JS. (2007). Physiological function and development of beverage from *Grifola frondosa*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 36:1241-1247.
- Lee KA, Jung JE and Choi . (2007). Optimization of microwave-assisted extraction process of *Hericium erinaceus*. Korean Society for Food Engineering. 11:195-202.
- Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH and Park DS. (2011). Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 40:29-36.
- Marklund S and Marklund G. (1975). Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Herbology. 23:1-8.
- Myung JE and Hwang IK. (2008). Functional components and antioxidative activities of soybean extracts. Korea Soybean Digest. 25:23-29.
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA. (2000). Comparison of the free radical -scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology. 71:109-114.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition. 44:307-315.
- Papa S and Skulachev VP. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Molecular and Cellular Biochemistry. 174:305-319.
- Song CH, Seo YC, Choi WY, Lee CG, Kim DU, Chung JY, Chung HC, Park DS, Ma CJ and Lee HY. (2012). Enhancement of antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 20:238-244.
- Wang XJ, Sun H and Liu ZS. (1994). Quantitative analysis of 6,7-dimethylesculetin and capillarsine in *Artemisia capillaries* Thumb. and prescriptions containing the crude drug. China Journal of Chinese Materia Medica. 19:667-670.
- Yanmaguchi M and Yearul KA. (1987). Effect of shitake and maitake mushroom on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 33:341-345.
- Yearul KA and Shuichi K. (1989). Dietary mushroom reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rat(SHR). Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 35:91-94.