

항산화 효소의 산화적 변형에 팽잎 발효물이 미치는 영향

강정훈[†]

청주대학교 바이오메디컬학과
(2019년 9월 10일 접수: 2019년 9월 28일 수정: 2019년 9월 28일 채택)

Effects of Fermented Mulberry Leaves (*Morus alba* L.) on Oxidative Modification of Antioxidant Enzymes

Jung Hoon Kang[†]

Department of Biomedical Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea
(Received September 10, 2019; Revised September 28, 2019; Accepted September 28, 2019)

요약 : 팽잎 (*Morus alba* L.)을 노루궁뎅이 버섯균사체(*Hericium erinaceum*)로 발효시켜 열수 추출한 발효물(MA-HE)이 항산화 효소인 Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD)와 ceruloplasmin (CP)의 산화적 변형에 미치는 영향을 관찰하였다. 세포질에서 중요한 항산화 활성을 나타내는 Cu,Zn-SOD와 CP는 모두 구리이온을 포함하는 단백질이다. MA-HE는 peroxy radical에 의해 변형되는 Cu,Zn-SOD와 CP를 모두 보호하였다. MA-HE는 peroxy radical에 의한 Cu,Zn-SOD의 단백질 fragmentation과 효소의 inactivation을 모두 효과적으로 억제하였다. 또한, MA-HE는 CP의 fragmentation과 inactivation도 효과적으로 억제하였다. MA-HE가 peroxy radical을 소거할 수 있는 기능을 가지고 있는지를 확인하기 위해 thiobarbituric acid를 이용한 활성 측정법으로 관찰한 결과, MA-HE는 농도가 증가함에 따라 비례적으로 peroxy radical 소거 활성이 높아지는 것으로 관찰되었다. MA-HE는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 44.03% 소거활성을 나타냈다. 따라서, MA-HE는 peroxy radical을 효과적으로 소거함으로써 세포 내의 항산화 효소를 산화적 손상으로부터 보호할 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 MA-HE가 세포 내에서 발생하는 활성산소종을 효과적으로 소거하여 산화적 스트레스에 의해 야기되는 세포 독성에 대한 보호 작용을 할 것으로 생각된다.

주제어 : 팽잎, 산화적 변형, 생체고분자, 항산화 활성, 활성산소종

Abstract : Mulberry (*Morus alba* L.) leaves fermented with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE) were assessed for the protection against oxidative modification of antioxidant enzymes, Cu,Zn-superoxide dismutase(SOD) and ceruloplasmin(CP). MA-HE were shown to significantly inhibited oxidative modifications and inactivations of Cu,Zn-SOD and CP induced by peroxy radical. Antioxidant activity of MA-HE evaluated using peroxy radical scavenging assays. MA-HE

[†]Corresponding author
(E-mail: jhkang@cju.ac.kr)

showed 44.03% of peroxy radical scavenging activity at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Thus, MA-HE protect the antioxidant enzymes from oxidative damage by the scavenging peroxy radicals. The results suggested that MA-HE was effectively removed reactive oxygen species in cells, thereby protecting cytotoxicity caused by oxidative stress.

Keywords : oxidative modification, biological macromolecules, antioxidant activity, reactive oxygen species

1. 서론

최근 성인병 예방 및 치료효과가 밝혀지면서 기능성식품의 재료로서 각광 받고 있는 뽕나무잎 (*Morus alba* L.)은 교목성 낙엽수로 열대지방 및 온대지역에 걸쳐 널리 분포하는 식물이다[1]. 우리나라에서 뽕나무는 5속 13종이 분포하고 유전 자원으로 등록된 계통수는 615계통이 있고, 대부분이 수집자원으로 알려져 있다[2]. 과거 뽕잎은 주로 양잠산업용 누에의 먹이로 이용해 왔으나, 현재는 식의약품 소재로 활용하기 위한 연구들이 활발하게 진행되고 있다[3]. 기존 보고에 의하면 뽕잎에는 술독을 제거하는 alanine, aspartic acid, glutamic acid의 함량이 높고, 특히 γ -aminobutyric acid와 rutin의 함량과 serine과 tyrosine의 함량도 높아 노인성 치매와 동맥경화를 예방한다고 알려져 있다[4]. 또한 항암, 항염, 항산화, 항고지혈증 및 혈압조절에 효과가 있는 것으로 알려져 있고[5] 각종 미네랄 중에서도 칼슘과 철분 및 칼륨의 함유량이 높은 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 오래전부터 뽕잎에 함유된 다양한 생리활성물질을 활용하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[7].

노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum*)은 담자균류 민잠류버섯목(*Aphlllophorales*), 턱수염버섯과(*Hydnaeae*), 산호침버섯속(*Hericium*)으로 분류되는 버섯으로 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등 북반구 온대지역에 분포하는 식용버섯으로 이용되어 왔다[8]. 노루궁뎅이 버섯은 암세포의 증식 억제, 신경성장인자 합성 유도 촉진, 면역기능 조절, 등의 생리활성이 보고되었다[9-13]. 선행연구에 따르면 담자균류의 균사체를 곡류 및 약용 식물에 배양하여 다양한 기능성 소재를 개발하였다. 예를 들어, 수삼을 이용한 여러 가지 균사체 배양물의 면역활성이 보고된 바 있고[14,15] 인진속에 배양한 노루궁뎅이버섯 균사체 발효물은

숙취와 알코올성 지방간 등에 효과가 있다는 결과도 보고된 바 있다[16-18]. 또한, 신진초와 신진초박에 배양한 노루궁뎅이 버섯 균사체 추출물의 생리활성이 보고되었고[19] 비타민나무 발효물의 항산화 활성 및 세포 보호작용도 보고된 바 있다[20].

Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD)는 세포내의 중요한 항산화 효소로 알려져 있다. 그러나 이 효소가 과대 발현되면 세포사멸[21], 지질과산화 증가[22], biogenic amines 수송 저하[23], 뉴우런의 파괴[24]이 일어난다고 알려져 있다. 이와 같은 현상은 Cu,Zn-SOD의 또 다른 활성인 자유라디칼 생성 기능에 기인한다고 알려져 있다. 이 효소의 자유라디칼 생성 활성 기작 과정에서 단백질의 구조 변형이 일어나며 효소가 가지고 있는 구리이온이 방출됨으로서 자유라디칼 생성을 증폭시킨다고 보고되었다[25,26]. Ceruloplasmin (CP)은 혈장에 존재하는 구리이온 운반 단백질로서 세포내의 대부분의 구리이온이 이 단백질에 의해 운반되고 있다[27]. CP는 이 밖에 antioxidant defense, tissue angiogenesis, coagulation의 기능을 가지고 있다고 알려져 있다[28-31]. 특히, CP는 Fe(II)를 Fe(III)로 산화시키는 효소 활성을 가지고 있어 항산화 기능을 나타내는 혈장 내의 중요한 효소이다[32,33]. 이와 같은 세포내의 중요한 단백질이 산화적 변형이 일어나면 다양한 질병을 유발하는 원인이 될 수 있다[34-36].

본 논문에서는 뽕잎을 천연물배지로 하여 노루궁뎅이 버섯균사체를 배양시켜 제조한 발효물이 항산화 기능이 있는 지를 확인하고자 하였다. 이와 같은 연구는 노루궁뎅이 버섯균사체 발효물을 이용한 기능성 식품 소재 개발 및 산업화에 도움을 줄 것으로 생각된다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

본 실험에 사용한 콩잎 (*Morus alba* L.; MA)은 2016년 4월에 강원도 정선군에서 채취한 것을 사용하였으며, 균주로 사용한 노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum*) 균사체는 충북농업 기술원 (Chungbuk, Korea)으로부터 분양받아 potato dextrose agar (PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C에서 10일간 배양한 후 4°C에 보존한 노루궁뎅이 버섯균사체를 사용하였다. Thiobarbituric acid (TBA), Cu,Zn-SOD, *p*-phenylenediamine은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, human CP는 Calbiochem(Darmstadt, Germany)으로부터 구입하였다. 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Wako (Chuo-Ku, Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 콩잎의 발효

콩잎의 발효는 콩잎을 수세한 후 실온에서 3-4일간 건조시켜 수분함량을 조절한 다음 건조물 100 g에 1.5배수의 물을 첨가하여 3시간 침지 시켜준 후 121°C에서 2시간 동안 고압에서 멸균하였다. 멸균시킨 콩잎을 냉각시킨 후 10% 노루궁뎅이 버섯균사체를 접종하여 25°C에서 60일간 배양 (multi room incubator, Vision Scientific, Gyeonggi-do, Korea)하고 60°C에서 2일간 건조시켜 콩잎 발효물을 제조 하였다. 이와 같은 발효물의 열수 추출물 제조를 위해 콩잎 발효물에 20배의 증류수를 첨가하고 homogenizer (Ultraturrax T-50, Janke & Kunkel GmbH & CO., KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 열수 추출하였으며, 여과지 (No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 잔사와 추출액을 분리하고 잔사는 다시 반복 추출 하였다. 2회 반복 추출 후 열수 추출액을 4°C에서 30분 동안 7,600 Xg로 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하고 상층액을 농축 및 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

2.2. 단백질의 산화적 변형

단백질의 농도는 BCA 방법[37]을 사용하여 측정하였다. Cu,Zn-SOD와 CP를 50 mM AAPH와 반응시킨 후 반응액을 Vivaspin ultrafiltration

column에 넣고 13,000 rpm으로 1시간 원심분리하여 반응하지 않은 AAPH를 제거해준다. 반응액을 Chelex 100으로 처리한 물로 filtration column에서 13,000 rpm으로 1시간 원심분리하여 남은 AAPH를 제거해준다. 이와 같은 방법으로 3번 반복실험 한다. Column에 남아 있는 단백질을 수거하여 후 동결 건조기에서 건조시킨 후 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 용해시킨 후 실험에 사용하였다.

2.3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

단백질 용액에 4X 시료처리 완충용액 (0.25 Tris, 8% SDS, 40% glycerol, 20% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenolblue)을 넣고 100°C에서 10분간 가열시킨 후 SDS-PAGE를 한다. 각각의 시료를 4-20% precast gel (KOMA biothec)에 점적한 후 120 volt로 1시간 전기영동한 후 gel을 수거하여 0.15% Coomassie brilliant blue R-250 용액에 넣고 염색시켰다. 염색된 gel을 탈색용액에 옮겨 탈색시킨 후 건조기에서 건조시킨 후 보관하였다.

2.4. SOD의 활성 측정

Cu,Zn-SOD의 활성은 xanthine/xanthine oxidase에 의한 ferricytochrome *c*의 감소를 억제하는 정도를 측정하는 McCord와 Fridovich 방법 [38]을 이용하여 측정하였다.

2.5. CP의 활성 측정

CP의 효소활성은 Sunderman과 Nomoto 방법 [39]을 사용하여 측정하였다. CP(0.2 mg/mL)을 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.7)에서 500 ug/mL *p*-phenylenediamine을 넣고 37°C에서 1 시간 반응시킨 후 반응액을 540 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer로 흡광도를 측정한다.

2.6. Peroxyl radical 소거활성

Peroxyl radical 소거활성을[40]의 방법을 변형하여 측정하였다. 50 mM AAPH와 10 mM 2-deoxy-D-ribose를 함께 첨가하여 thiobarbituric acid와 반응할 수 있는 물질인 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 유도하기 위해 37°C에서 2시간 동안 반응시키고, 1X PBS 용액, 2.8% TCA 용액, 1% TBA 용액을 각각 200 μ L씩 첨가하고 100°C에서 10분간 가열한다. 반응액을 13,000 rpm에서 10분

간 원심분리한 후 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. Peroxyl radical 소거활성은 다음 식(1)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{Peroxyl radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (1)$$

2.7. 통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험값은 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균 \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 각 군 간의 측정치 비교는 ANOVA 분석 후 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 에서 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Cu,Zn-SOD의 산화적 손상에 대한 보호 작용

세포질에 존재하는 중요한 항산화 효소인

Cu,Zn-SOD의 산화적 손상에 발효물이 미치는 영향을 관찰하였다. AAPH는 지질과산화의 initiator로 용액 상에서 산소 radical 중에 하나인 peroxy radical을 생성하는 화학물질로 잘 알려져 있다[41]. AAPH를 처리하여 Cu,Zn-SOD의 손상을 유도하고 뽕잎 발효물을 처리한 결과 발효물을 처리하지 않았을 때에는 단백질의 절단으로 인해 Cu,Zn-SOD 단백질 띠가 거의 보이지 않았으나(Fig. 1A, lane 2), 발효물을 처리하였을 때에는 농도가 증가함에 따라 단백질 띠의 밀도가 증가함을 나타냈다(Fig. 1A).

SOD 단백질 띠를 밀도 측정기를 이용하였을 때 뽕잎 발효물 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 Cu,Zn-SOD 단백질 띠가 정상 단백질로 100% 회복되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1B). AAPH 처리 시 Cu,Zn-SOD는 단백질의 변형은 효소의 활성도에 영향을 미칠 것으로 생각되었다. 따라서 peroxy radical이 Cu,Zn-SOD의 활성 미치는 영향을 알아보았다. 그림 2에서 보는 바와 같이 Cu,Zn-SOD의 활성은 AAPH에 의해 59% 정도 감소되었으나 발효물 처리 시 발효물 농도에 비례하여 활성감소폭이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 뽕잎 발효물 2000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는

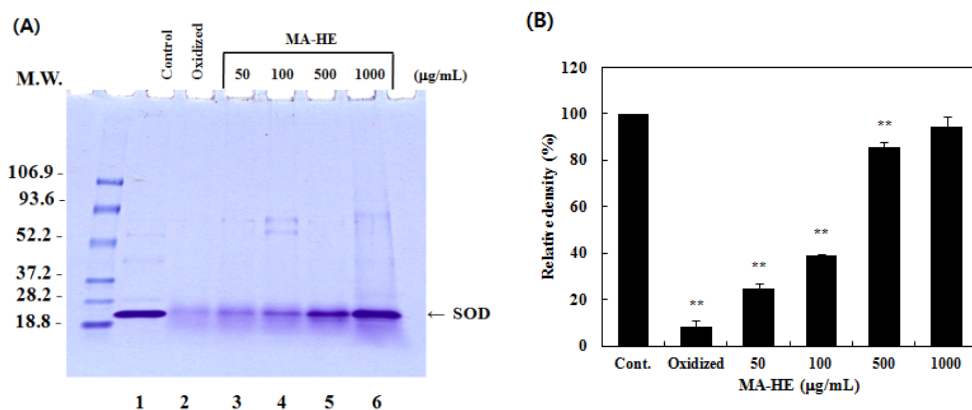


Fig. 1. Protective effects of fermented *Morus alba* L. with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE) on oxidative modification of Cu,Zn-SOD induced by peroxy radical. Cu,Zn-SOD was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 24 h. Lane 1, control Cu,Zn-SOD; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 50 $\mu\text{g/mL}$ MA-HE; lane 4, lane 2 + 100 $\mu\text{g/mL}$ MA-HE; lane 5, lane 2 + 500 $\mu\text{g/mL}$ MA-HE; lane 6, lane 2 + 1000 $\mu\text{g/mL}$ MA-HE. The values represent the mean \pm S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

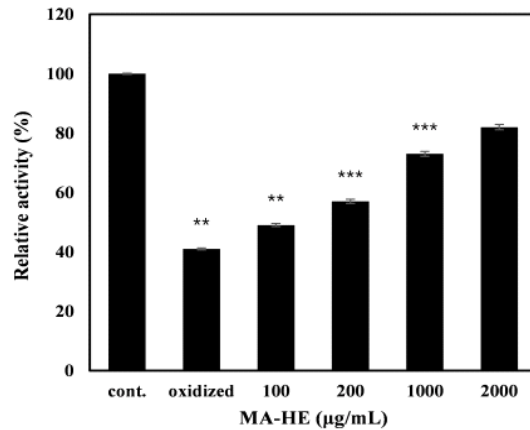


Fig. 2. Protective effects of fermented *Morus alba* L. with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE) on inactivation of Cu,Zn-SOD induced by peroxy radical. Cu,Zn-SOD was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 12 h. The values represent the mean \pm S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Cu,Zn-SOD 활성이 18%정도 감소되는 것으로 나타나, 효소가 산화적 손상을 받을 때에 비해 약 30% 효소 활성을 보호해 주는 것으로 관찰되었다.

Cu,Zn-SOD는 정상적으로 발현이 될 때에는 효과적인 항산화 효소로 작용하지만 산화적 손상이 일어날 경우 세포의 파괴, 산화적 스트레스, 생체물질 수송기능 저하 등을 유발하여 여러 질병과 같은 해로운 현상을 야기한다[21-24]. 따라서, 팽잎 발효물에 의한 Cu,Zn-SOD의 손상 억제제는 세포내의 해로운 현상을 막아주어 궁극적으로 산화적 스트레스로부터 야기되는 여러 퇴행성 질환 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

3.2. CP의 산화적 손상에 대한 보호 작용

주로 혈장에 존재하는 구리이온 운반 단백질이자 항산화 효소로 작용하는 CP의 산화적 손상에 발효물이 미치는 영향을 관찰하였다. AAPH를 처리하여 단백질의 손상을 유도하고 팽잎 발효물을 처리한 결과 발효물을 처리하지 않았을 때에는 단백질의 절단으로 인해 단백질 띠가 거의 보이지 않았으나(Fig. 3A, lane 2), 발효물을 처리하였을 때에는 농도가 증가함에 따라 단백질 띠의 밀도가 증가함을 나타냈다(Fig. 3A). CP 단백질 띠를 밀도 측정기를 이용하였을 때 팽잎 발효물 1000 µg/mL 농도에서 CP 단백질 띠가 정상 단

백질로 100% 회복되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3B).

CP도 AAPH 처리 시 단백질의 변형 뿐아니라 효소의 활성도 감소시킨다. 따라서 팽잎 발효물이 peroxy radical에 의한 CP의 활성감소에 어떤 영향을 미치는 지 알아보았다. 그림 4에서 보는 바와 같이 CP의 활성은 AAPH에 의해 70% 이상 감소되었으나 발효물 처리 시 발효물 농도에 비례하여 활성감소폭이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 팽잎 발효물 2000 µg/mL 농도에서는 CP 활성이 20%정도 감소되는 것으로 나타나 효소가 산화적 손상을 받을 때에 비해 약 50% 효소 활성을 보호해 주는 것으로 관찰되었다.

CP는 혈장에 높은 농도로 존재하는 단백질로서 한 분자당 6-7개의 구리 이온을 포함하고 있으며 구리이온을 운반하는 수송단백질로, 세포내의 90%이상의 구리이온이 이 단백질에 의해 운반된다[42]. CP는 구리이온 수송능력 뿐 아니라 Fe(II)를 Fe(III)로 산화시키는 ferroxidase 활성을 가지고 있어 Fe(II)에 의한 free radical 생성을 억제함으로써 항산화 효소로도 작용한다고 알려져 있다[32]. 그러나, 이 효소도 조건에 따라 생체에 해로운 현상을 유발할 수 있다는 사실이 관찰되었다. 산화적 스트레스를 받은 세포에서 CP는 지질과산화물을 촉진시킨다는 보고가 이를 뒷받

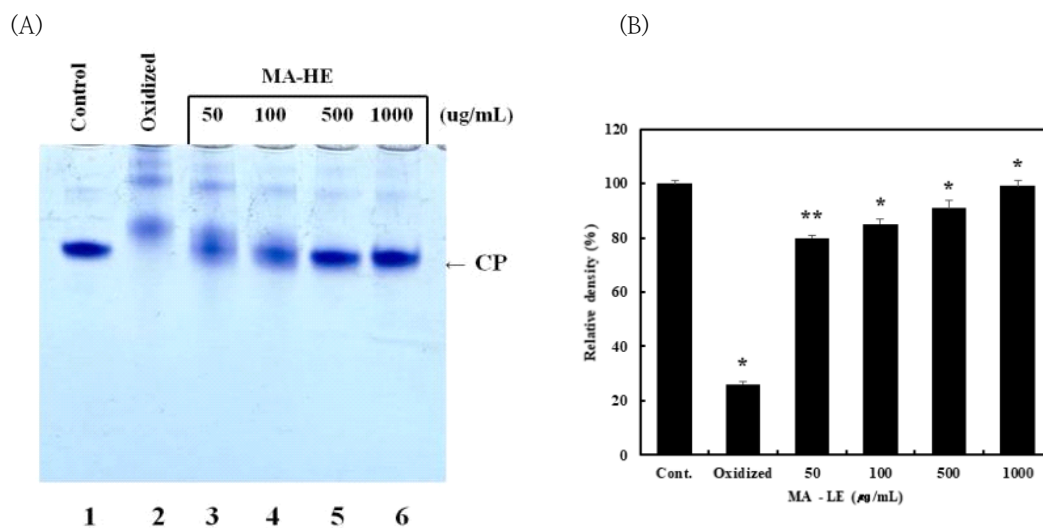


Fig. 3. Protective effects of fermented *Morus alba* L. with *Hericum erinaceum* mycelium (MA-HE) on oxidative modification of CP induced by peroxy radical. CP was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 24 h. Lane 1, control CP; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 50 µg/mL MA-HE; lane 4, lane 2 + 100 µg/mL MA-HE; lane 5, lane 2 + 500 µg/mL MA-HE; lane 6, lane 2 + 1000 µg/mL MA-HE. The values represent the mean±S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. *p<0.05, **p<0.01

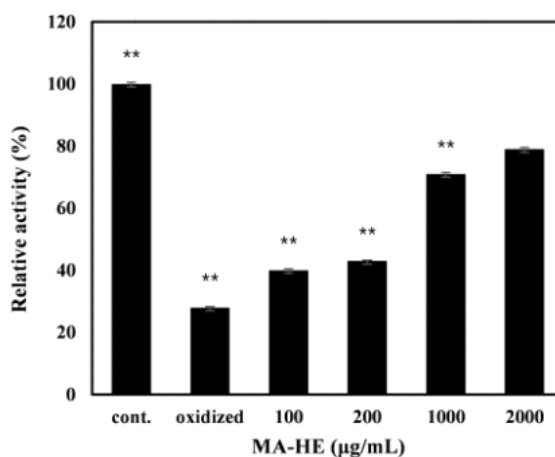


Fig. 4. Protective effects of fermented *Morus alba* L. with *Hericum erinaceum* mycelium (MA-HE) on inactivation of ceruloplasmin (CP) induced by peroxy radical. CP was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 12 h. The values represent the mean±S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. *p<0.05, **p<0.01

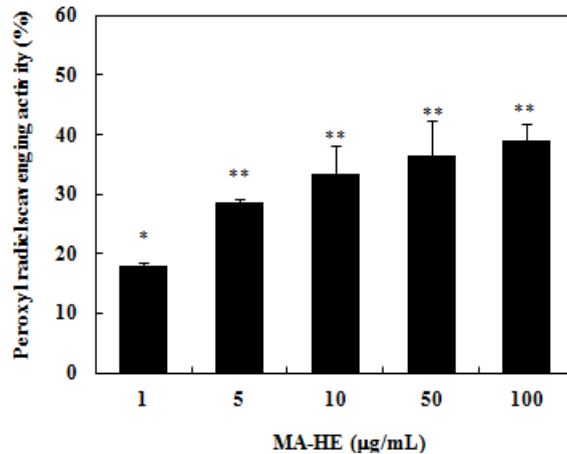


Fig. 5. Peroxyl radical scavenging activity of fermented *Morus alba* L. with *Hericium erinaceum* mycelium (MA-HE). The reaction mixture contained 10 mM deoxyribose and 50 mM AAPH in the presence or absence of various concentrations of MA-HE at 37°C for 2 h. The values represent the mean±S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. *p<0.05, **p<0.01

침해하고 있다[43]. 따라서 팽잎 발효물에 의한 CP의 산화적 손상 억제는 산화적 스트레스를 막아주어 궁극적으로 여러 질환 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

3.3. Peroxyl radical 소거활성

팽잎 발효물이 Cu,Zn-SOD와 CP의 산화적 변형을 억제하는 것이 peroxyl radical의 소거로 인한 것이 지를 확인하기 위해 팽잎 발효물의 peroxyl radical 소거활성을 측정하였다. Peroxyl radical은 2-deoxy-D-ribose와 반응하여 TBA와 반응할 수 있는 물질(TBARS)로 전환되며 이는 분홍색을 띠게 된다. 따라서 TBARS 생성 억제 정도를 측정하여 peroxyl radical 소거활성을 관찰하였다. 팽잎 발효물은 농도가 증가함에 따라 TBARS 생성을 억제하였다. Peroxyl radical 소거활성은 1 µg/mL에서 18.14%였고 100 µg/mL에서는 44.03%를 나타냈다(Fig. 5).

본 연구결과를 종합해볼 때 팽잎 발효물은 peroxyl radical에 의한 Cu,Zn-SOD 및 CP의 산화적 변형을 억제하며 이는 peroxyl radical을 효과적으로 소거하기 때문일 것으로 생각된다. Peroxyl radical은 다양한 생리적 및 병리적 과정에서 나타나며[40,41], 지질과산화과정 중에 나타나는 탄소 radical과 산소가 반응하여 생성되므로

지질과산화물의 생성과 밀접한 관련이 있다. 따라서 팽잎 발효물에 의한 peroxyl radical 소거활성은 세포내의 지질과산화 생성 억제 및 항산화 효소들을 보호함으로써 활성산소로 인해 야기되는 여러 질병을 예방하는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

4. 결론

본 연구는 팽잎 (*Morus alba* L.)을 노루궁뎅이 버섯균사체(*Hericium erinaceum*)로 발효시켜 열수 추출한 발효물(MA-HE)이 항산화 효소인 Cu,Zn-superoxide dismutase(SOD)와 ceruloplasmin (CP)의 산화적 변형에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MA-HE는 농도가 증가함에 따라 peroxyl radical에 의한 Cu,Zn-SOD의 단백질 fragmentation과 효소의 inactivation을 모두 비례적으로 억제하였다.
2. MA-HE는 농도가 증가함에 따라 peroxyl radical에 의한 CP의 fragmentation과 inactivation도 비례적으로 억제하였다.

3. MA-HE는 농도가 증가함에 따라 비례적으로 peroxy radical을 소거할 수 있었다.

이상과 같은 연구결과를 통해, MA-HE는 peroxy radical을 효과적으로 소거함으로써 세포 내의 항산화 효소를 산화적 손상으로부터 보호할 것으로 예상된다. 따라서 MA-HE가 세포 내에서 발생하는 활성산소종을 효과적으로 소거하여 산화적 스트레스에 의해 야기되는 세포 독성에 대한 보호 작용을 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2018학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었습니다.

References

1. C. H. Jeong, O. S. Joo, K. H. Shim, "Chemical components and physiological activities of young mulberry stem", *J. Korean Food Preserv.*, Vol.9, No.2 pp. 228-233, (2002).
2. H. B. Kim, C. K. Kang, G. B. Sung, S. W. Kang, J. R. Lee, "Antioxidative capacity of mulberry leaf and its tea", *J. Seri. Ento. Sci.*, Vol.49, No.1 pp. 18-22, (2007).
3. D. C. Kim, M. J. In, H. J. Chae, "Preparation of mulberry leaves tea and its quality characteristics", *J. Appl. Biol. Chem.*, Vol.53, No.1 pp. 56-59, (2010).
4. J. Y. Chae, J. Y., Lee, I. S. Hoang, D. Whangbo, P. W. Choi, W. C. Lee, J. W. Kim, S. Y. Kim, S. W. Choi, S. J. Rhee, "Analysis of functional components of leaves of different mulberry cultivars", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.32, No.1 pp. 15-21, (2003).
5. M. Y. Park, K. S. Lee, M. K. Sung, "Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostatis in relation to PPAR- α , PPAR- γ , and LPL mRNA expressions", *Life Sci.*, Vol.77, No.26 pp. 3344-3354, (2005).
6. J. R. Lee, Y. J. Hah, J. W. Lee, Y. M. Song, S. K. Jin, I. S. Kim, K. H. Hah, S. J. Kwak, "Physico-chemical and sensory properties of emulsified sausages containing mulberry and persimmon leaf powder", *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, Vol.22, No.4 pp. 330-336, (2002).
7. C. Hansawasdi, J. Kawabata, " α -Glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2", *Fitoterapia*, Vol.77, No.7-8 pp. 568-573, (2006).
8. M. G. Kang, W. S. Jo, W. H. Kim, S. Y. Choi, S. D. Park, "The difference of occurring pattern of *Hericium erinaceus* by pinheading induction methods", *J. Mushrooms*, Vol.13, No.1 pp. 11-15, (2015).
9. T. Mizuno, T. Wasa, H. Ito, C. Suzuki, N. Ukai, "Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushrooms called yamabushiotake or houtou", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.56, No.2 pp. 347-348, (1992).
10. T. Mizuno, "Yamabushitake, *Hericium erinaceum*: Bioactive substances and medicinal utilization", *Food Reviews International*, Vol.11 pp. 173-178, (1995).
11. H. Kawagishi, M. Ando, K., H. Shinb, H. Sakamoto, S. Yoshida, F. Ojima, Y. Ishiguro, N. Ukai, S. Furukawa, "Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Hericium erinaceum*", *Phytochemistry*, Vol.32, No. pp. 175-178, (1992).
12. K. Mori, S. Inatomi, K. Ouchi, Y. Azumi, T. Tsuchida, "Improving effects of the mushroom Yamabushiotake (*Hericium erinaceus*) on mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled clinical trial", *Phytother. Res.*, Vol.23, No.3 pp.

- 367-372, (2009).
13. H. Kawagishi, A. Shimada, S. Hosokawa, H. Mori, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, S. Sakemi, J. Bordner, N. Kojima, S. Furukawa, Erinacines E, F and G, "Stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*", *Tetrahedron Letters*, Vol.37, No.41 pp. 7399-7402, (1996).
 14. J. H. Ha, H. S. Jeong, S. H. Oh, S. S. Jeong, M. H. Jeong, H. S. Jeong, J. H. Jeong, K. W. Yu, H. Y. Lee, "Comparision of Immuno activities of fresh Ginseng cultured *Phelinus linteus* and *Hericium erinaceum* mycelium associated whit ultrasonification extraction", *Korean J. Medicinal Crop. Sci.*, Vol.17, No.5 pp. 311-320, (2009).
 15. C. K. Park, H. Kim, Qi. Tu, K. W. Yu, H. S. Jeong, H. Y. Lee, J. H. Jeong, "Chemical composition and immunostimulating activity of the fermented Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) with mushroom mycelium by solid culture", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.38, No.9 pp. 1145-1152, (2009).
 16. Y. Jang, S. H. Shin, B. I. Choi, D. S. Park, J. H. Jeon, Y. M. Cho, J. H. Cho, D. H. Jung, S. Y. Hwang, B. W. Ahn, M. S. Jeong, J. H. Jeong, Y. B. Kim, "Effects of Erinacol®, Extract of *Hericium erinaceum* Cultivated with *Artemisia iwayomogi*, on Alcoholic Hangover and Immune Function", *Lab. Anim. Res.*, Vol.22, No.2 pp. 157-163, (2006).
 17. S. H. Shin, J. Y. Jang, B. I. Choi, JH. H. Jeon, H. J. Ji, S. H. Moon, D. H. Jung, Y. G. Yeo, S. J. Baek, S. J. Hwang, J. H. Chung, Y. B. Kim, "Effects of Erinacol®, Extract of *Hericium erinaceum* Cultivated with *Artemisia iwayomogi*, on Alcoholic Fatty Liver", *Lab. Anim. Res.*, Vol.22, No.2 pp. 165-170, (2006).
 18. B. I. Choi, S. H. Shin, J. Y. Jang, D. S. Park, D. H. Kang, S. S. Nahm, Y. G. Yeo, J. H. Cho, S. Y. Hwang, M. S. Jeong, M. S. Jeong, J. H. Jeong, Y. B. Kim, "Single-and repeated-dose toxicities of Erinacol®, extract of *Hericium erinaceum* cultivated with *Artemisia iwayomogi*, in rats", *Lab. Anim. Res.*, Vol.22, No.2 pp. 171-179, (2006).
 19. S. C. Kwon, "Biological activities of ethanol extract from *Hericium erinaceum* mycelium on *Angelica keiskei* and *Angelica keiskei* pomace", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.40, No.12 pp. 1648-1653, (2011).
 20. S. S. Kim, I. G. Kyeong, M. L. Lee, D. G. Kim, J. Y. Shin, J. Y. Yang, G. H. Lee, W. S. Eum, J. H. Kang, "Protective effects of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves fermented with *Hericium erinaceum* mycelium against oxidative modification of biological macromolecules and cell death", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.44, No.1 pp. 35-43, (2015).
 21. P. Amstad, R. Moret, P. Cerutti, "Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress", *J. Biol. Chem.* Vol.269, No.3 pp. 1606-1609, (1994).
 22. O. Elroy-Stein, Y. Groner, "Impaired neurotransmitter uptake in PC12 cells overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase--implication for gene dosage effects in Down syndrome", *Cell*, Vol.52, No.2 pp. 259-267, (1988).
 23. O. Elroy-Stein, Y. Bemstein, Y. Groner, "Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation", *EMBO J.*, Vol.5, No.3 pp. 615-622, (1986).
 24. I. Ceballos-Picot, A. Nichole, P. Briand, G. Grimber, A. Delacourte, A. Defossez, F. Javoy-Aqid, M. Lafon, J. L. Blouin, P. M. Sinet, "Neuronal-specific expression of human copper-zinc superoxide dismutase

- gene in transgenic mice: animal model of gene dosage effects in Down's syndrome", *Brain Res.* Vol.552, No.2 pp. 198-214, (1991).
25. M. B. Yim, P. B. Chock, E. R. Stadman, "Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator", *J. Biol. Chem.*, Vol.268, No6 pp. 4099-4105, (1993).
 26. S. M. Kim, J. H. Kang, "Peroxidative activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase", *Mol. Cells*, Vol.7, No1 pp. 120-124, (1997).
 27. N. Takahashi, F. W. Putnam, "Chemical structure and molecular heterogeneity of ceruloplasmin", *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, Vol.29, No.10 pp. 795-814, (1984)
 28. I. M. Goldstein, H. B. Kaplan, H. S. Edelson, G. Weissmann, "Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals", *J. Biol. Chem.*, Vol.254, No.10 pp. 4040-4045, (1979).
 29. D. R. Winge, "Normal physiology of copper metabolim", *Semin. Liver Dis.*, Vol.4, No.3 pp. 239-251, (1984).
 30. J. Folkman, M. Klagsburn, "Angiogenic factors", *Science* Vol.235, No.4787 pp. 442-447, (1987).
 31. F. J. Walker, J. Fay, "Characterization of an interaction between protein c and ceruloplasmin", *J. Biol. Chem.*, Vol.265, No.4 pp. 1834-1836, (1990).
 32. Ryden L. in *Copper Proteins and Copper Enzymes* Vol III p. 37-100, CRC Press Inc, (1984).
 33. J. M. C. Gutteridge, "Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferrodidase and redical scavenging activities", *Chem. Biol. Interact.*, Vol.56, No.1 pp. 113-120, (1985).
 34. B. N. Ames, M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol.90, No.17 pp. 7915-7922, (1993).
 35. B. Halliwell, J. M. Gutteridge, "The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases", *Aspects. Med.* Vo.8, No.2 pp. 89-193, (1985).
 36. B. S. Berlett, E. R. Stadtman, "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress", *J. Biol. Chem.*, Vol.272, No.33 pp. 20313-20316, (1997).
 37. P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, "Measurement of protein using bicinchoninic acid", *Anal. Biochem.*, Vol.150, No.1 pp. 76-85, (1985).
 38. J. M. MacCord, I. Fridovich, "Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein)" *J. Biol. Chem.*, Vol.244, No.22 pp. 6049-6055, (1969).
 39. F. W. Jr. Sunderman, S. Nomoto, "Measurement of human serum ceruloplasmin by its ρ -phenylenediamine oxidase activity" *Clin. Chem.*, Vol.16, No.11 pp. 903-910, (1970).
 40. H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Anal. Biochem.*, Vol.95, No.2 pp. 351-358, (1979).
 41. E. Niki, A. Kawakami, M. Saito, Y. Yamamoto, J. Tsuchiya, Y. Kamiya, "Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity", *J. Biol. Chem.*, Vol.260, No.4 pp. 2191-2196, (1985)
 42. P. L. Fox, C. Mukhopadhyay, E. E.nwald, "Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanism of human ceruloplasmin", *Life Sci.*, Vol.56, No.21 pp. 749-1758, (1995).
 43. C. Mukhopadhyay, E. Ehrenwald, P. L. Fox, "Ceruloplasmin enhances smooth muscle cell- and endothelial cell-mediated low density lipoprotein oxidation by a superoxide-dependent mechanism", *J. Biol. Chem.*, Vol.271, No.25 pp. 14773-14778, (1996).