

RESEARCH ARTICLE

흑타리버섯으로부터 항치매성 Acetylcholinesterase 저해물질의 생산 및 PC12 신경세포사 저해 효과

한상민, 김지윤, 이종수*
배재대학교 바이오·의생명공학과

Production of Anti-dementia Acetylcholinesterase Inhibitor from *Pleurotus ostreatus* (Heuktari) and Inhibitory Effect on PC12 Neuron Apoptosis

Sang-Min Han, Ji-Yoon Kim, Jong-Soo Lee*
Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea

*Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr

ABSTRACT

To develop a new antidementia acetylcholinesterase (AChE) inhibitor from edible mushrooms, the inhibitory effects on AChE of water and ethanol extracts from various edible mushrooms were measured. Among the tested compounds, 70% ethanol extracts from *Tremella fuciformis* showed the highest AChE inhibitory activity, at 25.3% (IC₅₀: 9.9 mg). Water extracts from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus* (Heuktari) showed AChE inhibitory activity of 20.2% (IC₅₀: 12.4 mg). However, the yield (40.8%) from *Pleurotus ostreatus* (Heuktari) was higher than that from *Tremella fuciformis* (5.0%). Therefore, we selected *Pleurotus ostreatus* (Heuktari) as the most promising candidate for a mushroom containing anti-dementia AChE inhibitors. The AChE inhibitor from *Pleurotus ostreatus* (Heuktari) was optimally extracted when its fruiting body was treated with water for 6 h at 30°C. The anti-dementia effects of the partially purified AChE inhibitor from *Pleurotus ostreatus* (Heuktari) were observed in PC12 nerve cells.

Keywords: Acetylcholinesterase inhibitor, Anti-dementia, Nerve cell, PC12, *Pleurotus ostreatus* (Heuktari), Water extracts



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2019 September, 47(4): 337-46
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190039>

Received: August 27, 2019
Revised: October 07, 2019
Accepted: October 07, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

최근 우리나라도 급속한 노인인구의 증가로 인해 고령사회로 진입함에 따라 만성 소모성 질환으로 단독 생존력이 없어 사회복귀가 불가능하고 경제적 부담이 큰 치매 질환이 크게 증가하는 추세이다. 치매 질환의 주 원인으로는 B-secretas에 의한 B-amyloid 단백질(노인반) 생성으

로 인지능력 등의 신호가 차단되어 발생하는 경우[1,2]와 주요 신경전달물질인 아세틸콜린과 부티릴콜린 등이 이들을 분해하는 acetylcholinesterase, EC.3.1.1.7 등에 의해 콜린과 아세테이트로 전환되어 이들의 결핍이 초래되어 발생하는 경우로 크게 대별된다[2,3]. 따라서 B-secretase 와 acetylcholinesterase 등은 치매 발병의 주요 효소들로 이들을 저해하는 물질을 이용한 치매의 치료 또는 예방을 위한 새로운 저해제 개발 연구가 현재 많이 진행되고 있다.

지금까지 acetylcholinesterase 저해물질은 석이버섯[4], 녹차나 과일 등의 식물체들[5-11]과 일부 미생물[12]로부터 추출 또는 생산되어 이들의 특성이 분석, 보고되었다. 또한, 이들 저해물질을 응용하여 개발한 Livastigmine Galantamine, Donepezil, Tacrine, Memantine들이 현재 치매의 약물 치료제로 FDA의 승인을 받았으나 이들은 메스꺼움, 식욕 부진, 구토 및 설사와 같은 부작용이 있다.[2]. 따라서 부작용이 적고 효능이 비교적 우수한 새로운 항치매 건강소재의 개발이 필요하다.

한편, 버섯은 진균류의 일종으로 담자포자를 형성하는 담자균류에 주로 분포하고 있고 탄수화물 외에도 단백질과 핵산 등이 풍부하며 특히 β -glucan과 provitamin D인 ergosterol을 함유하고 있어 생식 외에도 건강소재 자원으로 이미 오래 전부터 많이 사용되고 있다[13,14].

지금까지 보고된 버섯의 주요 생리(약리) 활성으로는 콜레스테롤 저해효과[15], 항산화 활성과 혈당 상승 억제 효과[16,17], 항비만효과[18], 항 통풍효과[19-21], 항암 효과[22], 혈소판 응집 저해 효과와 혈전 용해효과[23, 24] 등이 보고되어 있다.

또한 왕송이버섯[13], 검은 비늘버섯[25], 노랑느타리 버섯[14], 느티만가닥 버섯[26] 등의 항고혈압성 안지오텐신전환효소 저해물질의 추출 및 특성 등이 보고 되어있고, 골다공증 예방효과 등[27]이 보고 되어있다. 그러나 위와 같이 버섯의 다양한 생리활성들이 보고되었지만 항치매성 acetylcholinesterase 저해 물질에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 버섯으로부터 새로운 항치매성 건강소재를 개발하여 이들을 건강 식, 의약품산업에 응용하고자 먼저 시판 비늘버섯들로부터 항치매성 acetylcholinesterase 저해물질 생산 우수 버섯으로 검은 비늘버섯을 선별하여 이들의 acetylcholinesterase 저해물질 추출 최적 조건을 조사하여 보고하였다[9]. 본 연구에서는 경기도 버섯연구소에서 분양받은 몇 종의 주요 식용 및 약용 버섯들의 물과 에탄올 추출물들을 제조한 후, 이들의 수율과 acetylcholinesterase 저해활성을 측정하여 우수 버섯을 선별하였다. 또한 선별된 항치매성 우수버섯에 함유되어있는 acetylcholinesterase 저해물질의 추출 최적조건을 검토하였고 이 저해물질을 부분정제한 후 PC12 신경세포사 저해 활성을 측정하여 항치매 효능을 검증하였다.

재료 및 방법

시료버섯 및 재료

시료버섯은 느타리(흑타리)버섯 등 9종을 경기도 농업기술원 버섯연구소로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

Acetylcholinesterase 저해활성 측정에는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품의 acetylcholinesterase (*Electrophorus electricus*로부터 생산)와 acetylcholine chlorid, phosphate buffered saline, fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Invitrogen Co., USA), Streptomycin/ampicillin, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzonic

acid)와 VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)등을 사용하였다. 신경세포 PC12는 한국미생물자원센터(KCTC)에서 구입하였고 기타 모든 시약들과 용매는 분석용 특급을 사용하였다.

추출물 제조

건조 버섯 자실체 분말을 증류수와 1:30으로 혼합하여 30°C에서 6시간 동안 진탕하면서 추출하였다. 이 추출물을, Whatman 0.45 membrane filter(NO 7404-004)을 사용해서 여과한 후 동결건조하여 물 추출물을 제조하였다.

또한 70% 에탄올을 이용하여 위와 동일하게 추출한 후 건조하여 에탄올 추출물로 하였다[9].

Acetylcholinesterase 저해활성 측정

Acetylcholinesterase(AChE) 저해활성은 전보[9]의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각 well 마다 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3) 110 μ l와 AChE(0.8 unit)를 각각 30 μ l씩 넣고 기질 (2 mM acetylthiocholine chloride) 30 μ l와 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (2 mM DTNB)를 20 μ l씩 첨가한 후 assay buffer에 1 mg/ml로 용해시킨 버섯추출물 10 μ l를 96-well plate에 첨가하여 잘 섞은 후, 37°C에서 6분 동안 반응시키면서 VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 415 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다[9].

이들 흡광도 값을 이용하여 아래와 같이 AChE의 저해활성을 계산하였다.

$$\text{Acetylcholinesterase 저해활성 (\%)} = [1 - \{(S - S_0) / (C - C_0)\}] \times 100$$

(S, 반응 후 시료의 흡광도; S₀, 초기 시료의 흡광도; C, 반응 후 대조구의 흡광도; C₀, 초기 대조구의 흡광도)

Acetylcholinesterase 저해물질의 부분정제

AChE 저해물질 함유 우수버섯 자실체의 물 추출물을 먼저 30 kDa 이상과 이하로 한외여과를 실시하여 활성분획을 수집하였다. 이들을 다시 소량의 증류수에 현탁시킨 후 Sephadex G-100으로 분당 4 mL씩 100개를 분획한 다음 이들 분획들의 AChE 저해활성을 측정하여 활성분획을 얻은 후 이들을 모아서 농축시켜 부분 정제물로 하였다.

신경세포를 이용한 항치매 효능검사

항치매 효능 조사를 위하여 신경세포 PC12를 엠포실린과 스트렙토마이신과 FBS를 첨가한 RPMI 배지에 접종하여 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 3일간 배양한 후 pCT105를 일정량 첨가하여 신경세포 치사율을 확인하였다.

신경세포 치사율이 20% 이상 되는 pCT105의 최적 처리농도를 설정한 후 부분 정제한 흑타리 버섯 자실체의 항치매성 AChE 저해제를 농도별로 PC12세포와 같이 처리하여 신경세포 치사율의 억제 정도를 측정하여 최종 항치매성 효능을 검증하였다[28].

결과 및 고찰

항치매성 acetylcholinesterase 저해물질 생산 우수버섯의 선발

Acetylcholinesterase (AChE) 저해물질을 많이 함유한 버섯을 선정하기 위해 9 종의 식용 버섯 물 추출물과 70% 에탄올 추출물을 각각 제조하여 이들의 수율과 AChE 저해 활성을 측정하였다 (Table 1).

Table 1. Yield and acetylcholinesterase inhibitory activity of water and 70% ethanol extracts from various mushrooms fruiting body

Scientific name	Yield (%)		Acetylcholinesterase inhibitory activity(%, IC ₅₀)	
	Water extracts	70% Ethanol extracts	Water extracts	70% Ethanol extracts
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Heuktari).*	40.8	28.9	20.2(±0.5) 12.4mg	3.2(±0.4) 78.1mg
<i>Pleurotus nebrodensis</i>	38.1	35.3	12.3(±0.6) 20.3mg	2.9(±0.5) 86.2mg
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	58.5	29.9	10.8(±0.4) 23.1mg	4.4(±0.0) 56.8mg
<i>Tremella fuciformis</i>	12.4	5.0	7.3(±0.2) 34.2mg	25.3(±0.3) 9.9mg
<i>Lyophyllum leucophaeatum</i> (White)	37.2	27.4	7.1(±0.2) 35.2mg	11.0(±0.5) 22.7mg
<i>Lyophyllum leucophaeatum</i> (Black)	40.1	48.9	14.3(±0.1) 17.5mg	5.6(±0.3) 44.6mg
<i>Hericium erinaceum</i>	51.7	27.8	8.2(±0.4) 30.5mg	5.2(±0.2) 48.1mg
<i>Lentinus edodes</i>	45.4	27.4	18.2(±0.3) 13.7mg	1.3(±0.8) 192.3mg
<i>Grifola frondosa</i>	42.9	23.9	15.2(±0.1) 16.4mg	17.6(±0.2) 14.2mg

*Extraction condition: 1:30, 30°C, 24h

수율은 노랑 느타리버섯의 물 추출물이 58.5%로 가장 높았고, 70% 에탄올 추출물에서는 만가닥버섯(흑색)이 48.9%로 높았으나 이들의 AChE 저해 활성은 각각 4.4%와 5.6%로 매우 낮았다. 백목이버섯의 경우도 70% 에탄올 추출물의 AChE저해활성이 25.3% (IC₅₀: 9.9 mg) 로 가장 높았으나 수율은 5.0%로 매우 낮았고 표고버섯 물 추출물의 수율이 42.9%로 비교적 높았으나 AChE저해활성은 18.2% (IC₅₀: 13.7 mg)로, 흑타리버섯의 물 추출물의 20.2% (IC₅₀: 12.4 mg) 보다 낮았다. 따라서 수율이 5.0%로 매우 낮았으므로 수율이 40%로 비교적 높고 AChE 활성도 우수한 흑타리버섯을 AChE 저해물질을 함유한 우수 버섯으로 최종 선발하였다.

이러한 흑타리버섯 물추출물의 AChE 저해 활성은 야생효모, *S. cerevisiae* WJSL 0113과 WJSL 0090 무세포추출물들의 저해활성(95.2%, 84.2%)[29]과 호두(72.6%)[3], 울무(55.1 %)[11], 식용 검은 비늘버섯 에탄올 추출물의 저해활성(30.6%)[9]보다 약간 낮아 아래와 같은 최대활성을 가진 추출물 제조를 위한 다양한 추출조건의 최적화 연구를 진행하였다.

항치매성 acetylcholinesterase 저해물질 추출조건

흑타리버섯 자실체의 AChE 저해물질 대량추출을 위한 추출 온도의 영향을 조사하였다(Table 2).

Table 2. Effects of extraction temperature on the yield and acetylcholinesterase inhibitory activity of water extract from *Pleurotus ostreatus* (Heuktari)

Extraction temperature (°C)	Yield ¹⁾	AChE ²⁾ inhibitory activity
30 ³⁾	40.8	20.2(±0.5) 12.4mg
50	36.0	10.1(±0.2) 24.8mg
70	35.7	10.9(±0.3) 22.9mg
100	35.8	6.4(±0.1) 39.1mg

¹⁾ Ratio of sample and solvents; 1 : 30

²⁾ AChE; acetylcholinesterase

³⁾ Extraction time; 24h at 30°C and 50°C, 3h at 70°C and 100°C

30°C에서 추출한 물 추출물의 수율(40.8%)은 100°C에서 추출한 물 추출물의 수율(35.8%)보다 5% 높았고 추출 온도가 증가함에 따라 조금씩 감소하였다.

AChE 저해활성도 30°C에서 추출한 물 추출물이 20.2% (IC₅₀: 12.4 mg) 로 가장 높았다.

추출 시간이 AChE 저해제 추출에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 72시간동안 추출한 물 추출물의 수율이 49.4%로 3시간 동안 추출한 물 추출물의 수율(39.4%)보다 약 10% 높았

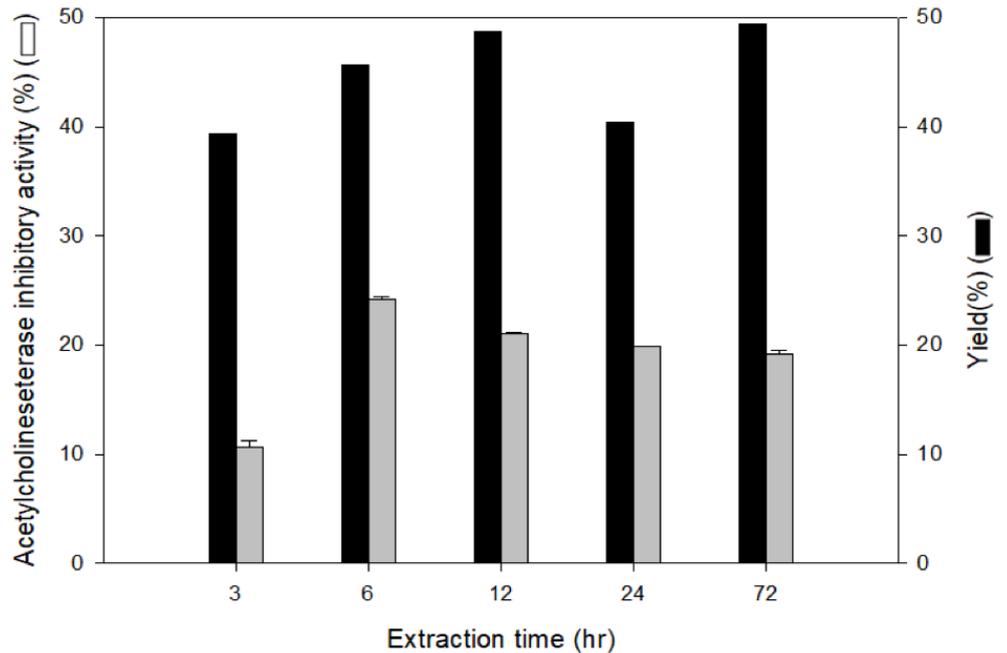


Fig.1. Effect of extraction time on the yield

고 추출 시간이 길어짐에 따라 증가하였다. 그러나 AChE 저해활성은 6시간에서 24.2% (IC₅₀: 10.3 mg)로 가장 높았고 추출시간이 길어짐에 따라 활성은 큰 변화 없이 일정하였다.

그 밖에도 분말 현탁액을 초음파 처리나 비드 침가 후 vortexing했을 때 수율은 48.5%까지 약간 증가했으나 저해활성은 증진되지 않았고 건조 자실체를 분말화하여 추출했을 때 역시 활성 변화는 없었으나 플레이크 상태로 처리했을 때보다 수율이 약 15%정도 낮았다(data not shown). 따라서 이러한 전처리 효과는 저해활성 증진에 효과가 없는 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합하였을 때 흑타리버섯 자실체중의 항치매성 AChE 저해물질의 추출 최적 조건은 흑타리버섯 분말을 1:30으로 증류수에 현탁 시킨 후 30°C에서 6시간 추출하는 조건이었다.

본 연구의 흑타리버섯이 항치매활성 버섯 선별 시 저해활성이 다른 야생효모들이나 호두 등의 식물추출물들보다 다소 낮았지만, 흑타리버섯은 경기도 농업기술원 버섯 연구소에서 주년재배 체계를 확립하기 위해 중, 고온기에 안정적으로 재배 가능한 느타리버섯의 식용가능한 신품종으로 육성, 보급한 새로운 버섯이라는 점[30]과 식품용 가공제품에 유리한 물 추출물에서 활성과 수율이 높고 추출 최적 조건 연구를 통해 수율과 저해활성이 증가하여 대량 추출을 위한 대량생산이 가능한 점 등에서 산업적 가치가 매우 큰 것으로 사료된다.

항치매성 AChE저해 물질의 부분정제 및 신경세포사 저해 효과

흑타리버섯 자실체의 항치매성 AChE 저해물질을 부분정제한 결과, 먼저 흑타리버섯 자실체 물 추출물 (AChE 저해 활성; 24.2% (IC₅₀: 10.3 mg))를 30 kDa이상과 이하로 한외여과를 실시한 결과 30 kDa이하 여과물의 수율이 25.7%, AChE 저해활성이 14.3%로 30 kDa 이상의 물질들의 수율과 저해활성(7.1%, 11.2% (IC₅₀: 35.2 mg, 22.3 mg))보다 높았다. 따라서 활성과 수율이 좋았던 30 kDa 이하의 여과액을 농축시켜 Sephadex G-100으로 젤 여과 크로마토그래피를 실시하였다. 100개의 분획들의 AChE 저해활성을 측정된 결과 No.21-No.25 분획이 16.0%의 저해활성을 보여 가장 높았으므로 이들 활성분획들을 모아서 농축시켜 AChE 저해물질의 부분정제물로 하였다.

신경세포에 대한 항치매 효과, 신경세포 PC12의 세포치사 억제에 미치는 흑타리버섯에 함유된 AChE 저해 부분 정제물질의 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다.

신경세포의 최종적인 현상으로 β APP의 C말단 단백질 펩티드인 CT105발현에 의한 신경세포의 세포치사는 정상군 5.0(±0.2)%에 비해 CT105의 발현으로 인한 세포치사율은 87.1(±2.5)%이었다. 본 연구의 흑타리버섯 부분정제물을 50 µg/mL로 처리했을 때 17.0(±0.5)%로 치사율이 낮아져서 흑타리버섯 부분정제물이 치매 진행과정을 억제하거나 지연시키는 효과를 보이는 것으로 사료된다.

한편, 흑타리버섯 AChE 저해 부분정제물을 100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL로 처리하여 세포 생존율을 조사한 결과 각각 95.4(±1.5)%, 91.7(±2.5)%, 86.4(±3.5)%, 80.2(±2.7)%, 71.6(±4.1)%를 보여 흑타리버섯 부분정제물이 농도 비 의존형태로 세포 생존율이 감소하였다(Fig. 3). 이와 같이 본 연구의 흑타리버섯 AChE 저해 부분정제물이 100 µg/mL에서 27% 세포사를 보인 것은 전보[9]의 야생효모 *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0113가 100 µg/mL에서 40%의 세포사를 보인 결과에 비해 훨씬 더 높은 세포사 저해능을 보여 항치매 효과가 더 우수한 것으로 사료된다.

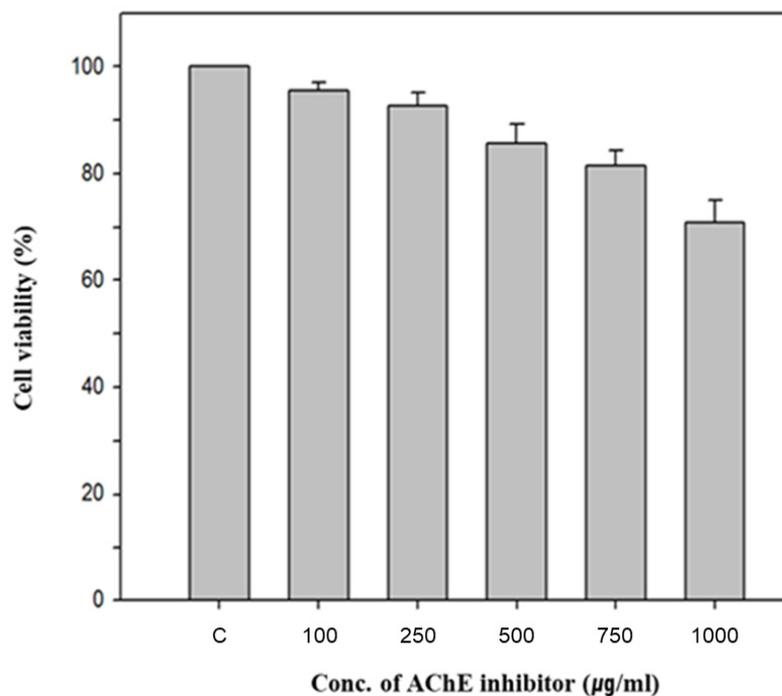


Fig. 2. Cell viability on PC12 nerve cell of the partial purified acetylcholinesterase(AChE) inhibitor. C, AChE inhibitor not treated

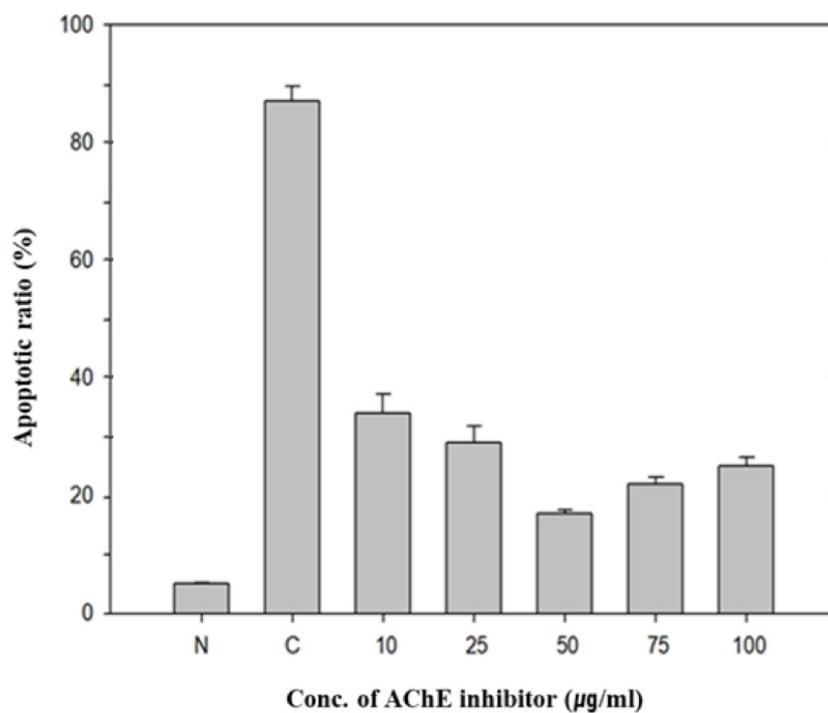


Fig.3. Apoptotic ratio on PC12 nerve cell of the partial purified acetylcholinesterase(AChE) inhibitor. N, CT105 not treated; C, CT105 treated

적요

본 연구에서는 버섯으로부터 항치매성 건강소재를 개발하고자 주요 식용 및 약용 버섯들의 물과 에탄올 추출물들을 제조한 후 이들의 수율과 acetylcholinesterase 저해활성을 측정하여 우수 버섯을 선발하였다. 또한 선발된 우수버섯에 함유되어있는 항치매성 acetylcholinesterase 저해물질의 추출 최적조건을 검토하였고, 이 저해물질을 부분정제한 후 PC12 신경세포사 저해 활성을 측정하여 항치매 효능을 검증하였다. 시료 버섯들의 물 추출물과 70% 에탄올 추출물을 각각 제조하여 이들의 acetylcholinesterase 저해 활성을 측정한 결과 물 추출물의 수율이 40%로 높고 acetylcholinesterase 저해 활성도 20.2% (IC_{50} : 12.4 mg)로 우수한 흑타리버섯을 acetylcholinesterase 저해물질을 함유한 우수 버섯으로 최종 선발하였다. 흑타리버섯 자실체중의 항치매성 acetylcholinesterase 저해물질의 추출 최적 조건은 흑타리버섯 분말을 1:30으로 증류수에 현탁시킨 후 30°C에서 6시간 추출하는 조건이었다. 흑타리버섯 자실체의 항치매성 acetylcholinesterase 저해물질을 한외여과와 gel 여과 등으로 부분정제한 후 신경세포 PC12의 세포치사 억제에 미치는 영향을 조사한 결과 부분정제 물질을 50 μ g/mL 처리했을 때 세포치사율이 17.0%로 낮아져서 흑타리버섯 부분정제물이 치매 진행과정을 억제하거나 지연시키는 효과를 보이는 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the research grant of PaiChai University in 2019.

REFERENCES

1. De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem* 2012;65:329-52.
2. Dugu M, Neugroschl J, Sewell M, Marin D. Review of dementia. *Mt Sinai J Med* 2003;70:45-53.
3. Lee EN, Song JH, Lee JS. Screening of a potent antidementia acetylcholinesterase inhibitor-containing fruits and optimal extraction conditions. *Korean J Food & Nutr* 2010;23:318-23.
4. Lee JS, Min GH, Lee JS. Nutritional and physicochemical characteristics of the antidementia Acetylcholinesterase-inhibiting methanol extracts from *Umbilicaria esculenta*. *Mycobiology* 2009;37:203-6.
5. Kwak JH, Jeong CH, Kim JH, Choi GN, Shin YH, Lee SC, Cho SH, Choi SG, Heo HJ. Acetylcholinesterase inhibitory effect of green tea extracts according to storage condition. *Korean J Food Sci Technol* 2009;41:435-40.
6. Jang CH, Eun JS, Park HW, Seo SM, Yang JH, Leem KH, Oh SH, Oh CH, Baek NI, Kim DK. An acetylcholinesterase inhibitor from the leaves of *Securinega suffruticosa*. *Korean J Pharmacogn* 2003;34:14-7.
7. Ahmad I, Anis I, Malik A, Nawaz SA, Choudhary MI. Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosma hispida*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2003;51:412-4.
8. Tang XC, Han YF. Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chinese herb. *CNS Drug Rev* 1999;5:281-300.
9. Kim DY, Bae SM, Han SM, Lee JS. Screening of potent anti-dementia acetylcholinesterase

- inhibitor-containing edible mushroom *Pholiota adiposa* and the optimal extraction conditions for the acetylcholinesterase inhibitor. *Kor J Mycol* 2016;44:314-7.
10. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.
 11. Seo DS, Jang JH, Kim NM, Lee JS. Optimal extraction condition and characterization of antidementia acetylcholinesterase inhibitor from job's tears (*Coix lachrymajobi* L.). *Korean J Med Crop Sci* 2009;17:434-8.
 12. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* 2008;36:102-5.
 13. Lee DH, Kim JH, Park JS, Choi YJ, Lee JS. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 2004;25:621-7.
 14. Jang JH, Jeong SC, Kim JH, Lee YH, Ju YC, Lee JS. Characterization of a new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. *Food Chem* 2011;127:412-8.
 15. Yu HE, Lee DH, Seo GS, Cho SM, Lee JS. Characterization of a novel β -hydroxy- β -methyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor from the mushroom, *Pholiota adiposa*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2007;12:618-24.
 16. Choi HY, Ha KS, Jo SH, Ka EH, Chang HB, Kwon YI. Antioxidant and anti-hyperglycemic effects of a *Sanghwang* mushroom (*Phellinus linteus*) water extract. *Kor J Food & Nutr* 2012;25:239-45.
 17. Bae SM, Han SM, Lee YH, Jung YK, Ji JH, Lee JS. Extraction and characterization of an anti-hyperglycemic α -glucosidase inhibitor from edible mushroom, *Pleurotus cornucopiae*. *Microbiol Biotechnol Lett* 2016;44:124-9.
 18. Lee JK, Jang JH, Seo GS, Lee JS. Manufacture and characteristics of food additives, *Phellinus linteus* powder-containing anti-obesity lipase inhibitor. *Kor J Mycol* 2010;38:54-6.
 19. Kang MG, Bolormaa Z, Lee JS, Seo GS, Lee JS. Antihypertensive activity and anti-gout activity of mushroom *Sarcodon aspratus*. *Kor J Mycol* 2011;39:53-6.
 20. Bolormaa Z, Song JH, Seo GS, Noh HJ, Yoo YB, Lee JS. Screening of anti-gout xanthine oxidase inhibitor from mushrooms. *Kor J Mycol* 2010;38:85-7.
 21. Jang IT, Hyun SH, Shin JW, Lee YH, Ji JH, Lee JS. Characterization of an anti-gout xanthine oxidase inhibitor from *Pleurotus ostreatus*. *Mycobiology* 2014;42:296-300.
 22. Mizuno T, Kinoshit T, Zhung C, Ito H, Mayuzumi Y. Antitumor-active heteroglycans from niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995;59:568-71.
 23. Park JS, Hyun KW, Seo SB, Cho SM, Yoo CH, Lee JS. Detection of platelet aggregation inhibitors and fibrinolytic substances from mushrooms. *Kor J Mycol* 2003;31:114-6.
 24. Hyun KW, Jeong SC, Lee DH, Park JS, Lee JS. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides* 2006;27:1173-8.
 25. Koo KC, Lee DH, Kim JH, Yu HE, Park JS, Lee JS. Production and characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Pholiota adiposa*. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:757-63.
 26. Kang MG, Kim YH, Bolormaa Z, Kim MK, Seo GS, Lee JS. Characterization of an antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biomed Res Int* 2013;2013:2839-64.

27. Jang JH, Lee JW, Kim JH, Lee YH, Ju YC, Lee JS. Isolation and identification of RANKL-induced osteoclast differentiation inhibitor from *Pleurotus citrinopileatus*. *Mycoscience* 2013;54:265-70.
28. Kim SH, Suh YH. Neurotoxicity of a carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Neurochem* 1996;67:1172-82.
29. Kim JY, Lee SY, Han SM, Lee JS. Production of anti-dementia Acetylcholinesterase inhibitors from the wild yeasts *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0113 and *Wickerhamomyces anomalus* JSF0128. *Kor J Mycol* 2018;46:447-57.
30. Choi JI, Lee YH, Ha TM, Jeon DH, Chi JH, Shin PG. Characteristics of new mid-high temperature adaptable oyster mushroom variety 『Heuktari』 for bottle culture. *J Mushrooms* 2015;13:74-8.