韓 國 菌 學 會 誌 第 9 卷 第 2 號
Kor. J. Mycol. Vol. 9, No. 2, 49~66, 1981

韓國産 高等菌類의 成分및 培養에 관한 硏究*

沈 美 慈
서울大學校 藥學大學 微生物藥品化學敎室

Studies on Constituents and Culture of the Higher Fungi of Korea

Mi Ja Shim
Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract: The objectives of this investigation were to produce artificially an antitumor constituent by submerged culture of the mycelium of *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél., to characterize the influence of various modifications of the nutrient and culture conditions with respect to the production, to determine chemical composition of the antitumor constituent, and to examine effects of the constituent on the immune resonse of mice.

Submerged agitation of the mycelium in flasks containing a nutrient solution showed its adequate growth. Especially the mycelial growth in the medium containing glucose and yeast extract was abundant. The addition of cotton seed flour or ginseng waste to the medium increased the yield of mycelial growth and the production of the antitumor constituent. The replacement of glucose with starch also yielded the adequate growth.

The antitumor constituent extracted from the mycelium and isolated from the culture filtrate was a protein-bound polysaccharide. The analyses of this constituent by GLC and amino acid autoanalysis showed that it contained four monosaccharides and fifteen amino acids.

The protein-free polysaccharide of the constituent was also found to exert greater antitumor activity against sarcoma-180 in mice than the entire constituent.

The antitumor constituent was found to potentiate the immune response of mice against sheep red blood cell. The protein-bound polysaccharide exerted more favorable influence on the immunity than the protein-free moiety.

緖 論

담자균류는 고대로 부터 인류생활과 밀접한 관계를 가져 약용 및 식용으로 사용되어 왔으며 독성분에 대하여도 알려진 바 있다(Hatfield 등, 1975).

담자균류에 함유된 유효성분에 관한 연구는 Bose (1955)가 담자균류 수종의 항균 성분에 대하여 보고하였으며, Catalfomo등(1964)은 담자균류중 *Psilocybe* 속균을 인공 배양하였으며, Neal등(1968)은 그 2차대사산물 축적에 대하여 연구한 바 있다.

최근에 일본에서는 담자균류의 항암 성분의 연구가 활발히 진행되고 있으며 담자균류중 표고버섯 *Lentinus edodes* (Berk.) Singer에서 추출한 lentinan이 Sarcoma-180에 대해 강한 항암작용을 나타냈으며, 이의 항암기전은 세포 면역 반응의 촉진에 기인한 것으로 Chihara (1970), Maeda(1971, 1973)등이 보고한 바 있다. 식용버섯중의 하나인 팽나무버섯 *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Singer에도 항암성 다당류가 있음을 Yoshioka등 (1973)이 보고하였고, 화경버섯 *Lampteromyces japonicus*에 대해서는 Fukuda등(1975)이 발표한 바 있다. 구름버섯 *Coriolus versicolor*(*Fr.*) Quél.에 대

* 본 논문은 서울대학교 대학원에 제출된 박사학위 논문임.

하여도 항암 실험이 진행되어 이 버섯의 성분중 하나인 단백질—결합 다당류의 Sarcoma-180에 대한 작용에 관하여 Tsukagoshi등(1974)이 발표하였다.

한편 한국산 담자균류에 대한 연구는 부진한 상태였으나 근년에 와서 이 분야의 연구가 활발해 졌다.

1978년까지 600여종에 이르는 균류가 보고되었고(Lee *et al.*, 1959; Kim *et al.*, 1976c; Kim, 1978), 그들 고등균류의 성분에 대해서도(Kim *et al.*, 1973) 연구가 행하여 졌다.

그들 한국산 고등균류의 성분에 관한 연구 중에는 alkaloid확인(Kim *et al.*, 1971, 1975), 아미노산의 함량 분석(Kim *et al.*, 1977), 지방산 확인(Kim *et al.*, 1978a), 스테롤 확인(Kim *et al.*, 1976a, 1976b, 1978b; Shim *et al.*, 1978a, 1978b, 1979a, 1979b; Kwon *et al.*, 1980), 버섯 추출물에 대한 항균력 실험(Yoon, 1959), 항균 성분의 분리(Chung *et al.*, 1978), 버섯 성분이 HeLa배양 세포 증식에 미치는 영향(Chung, 1979)이 보고된 바 있다.

또한 한국산 담자 균류중 구름버섯, 느타리버섯, 표고버섯, 메꽃버섯, 만년버섯등의 자실체에서 항암 성분이 분리(Park *et al.*, 1977; Kim *et al.*, 1979a; Min *et al.*, 1980) 보고된 바 있으며, 그 중에서 표고 버섯의 인공 배양에 관한 실험 결과도 발표되었다(Park *et al.*, 1979).

저자는 한국산 담자균류의 성분중 가장 항암 효과가 높았던 것이 구름버섯이었다는 점에 착안하여, 그 항암성분의 발효 생산에 관한 기초적 원리를 수립하기 위해서 구름버섯 균사의 액내 배양조건등을 연구하였다.

위와 같은 목적하에서 액내 배양에서 생성되는 균사체의 량을 증가시키기 위한 각종 배양 조건이 검토되었다. 또한 그 배양 균사로부터 추출한 성분의 항암 효과는 마우스에 이식한 sarcoma-180에 대한 증식 저지효과로서 측정하였다.

이러한 성분의 화학적 조성을 UV, GLC, 아미노산 분석기를 이용하여 확인 정량하고 더 나아가서 이 항암 성분의 항암 작용기전을 구명할 목적으로 실험동물의 면역능에 미치는 영향을 실험하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

본 實驗에 사용한 材料는 구름버섯 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél. 균사체를 인공배지에서 液內振盪培養하여 얻은 균사체와 그 배양 여액을 사용하였다.

2. 培地組成

1) 種菌用 培地

Potato infusion 10*g*, glucose50*g*, Peptone 5*g*, Yeast ext. 5*g*, K_2HPO_4 1.5*g*, $MnSO_4$0.5*g*을 증류수(D.W.로 略)에 녹여 1*l*로 하고 pH5.5로 맞춘후, 한천 20*g*을 넣어서 멸균후 사면배지로 만들었다. 위의 Potato infusion은 감자 10*g*을 썰어서 물 500m*l*를 넣어 끓여 짜서 만든 것이다.

2) 液內振盪培養用 培地

각 배지 성분에 따라 조제하여 멸균후 液內振盪培養用培地로 사용하였다(Medium No. 1~24, 총 98종의 배지).

Table I. The composition of medium 1 and its variation.

Ingredient \ Medium No.	1-1	1-2	1-3	1-4
Glucose(g)	50	50	50	50
Peptone(g)	20	20	20	20
KH_2PO_4(g)	0.87	0.87	0.87	0.87
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(g)	0.5	0.5	0.5	0.5
KCl(g)	0.3	0.3	0.3	0.3
Basic Mineral Soln.*(m*l*)	20	20	20	20
Ca-Pantothenate(mg)	0	0	4	0
Pyridoxine·HCl(mg)	0	0	0	0.25
Distilled Water(m*l*)	1,000	1,000	1,000	1,000
pH	5.0	6.0	5.0	5.0

*Basic mineral solution (=B.M.S.):

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.5g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.36g
$ZnCl_2$	0.2g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.05g

Distilled water made up to 100m*l*.

3. 培養方法

1) 種菌培養

구름버섯 *Coriolus versicolor*(Fr.) Quél.의 균사체를 무균적으로 분리하여 種菌用 사면배지에 이식하여 24±1°C에서 1주일간 배양하였다.

2) 1次 液內振盪培養

사면배지의 菌絲體를 무균적으로 분리하여 液內振盪培養用 培地(주로 glucose, yeast ext. 배지) 소량을 가하여 blendor로 균질화하고 100m*l*의 液內培養用 培地를 가한 500m*l* 삼각 플라스크에 이식하여 24±1°C에

Table II. The composition of media 2, 3, 4, and 5.

Ingredient \ Medium No.	2	3	4	5-1	5-2	5-3	5-4
Glucose (g)	50	50	50	10	10	10	10
Potato infusion (g)	—	—	10	—	—	—	—
Peptone	—	—	5	—	—	—	—
Yeast extract (g)	—	7.5	5	0.5	1	1	1
KH_2PO_4 (g)	1	—	—	0.1	0.25	0.75	—
K_2HPO_4 (g)	—	—	1.5	—	—	—	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g)	5	—	—	—	—	—	—
$MnSO_4$ (g)	—	—	0.5	—	—	—	—
KNO_3 (g)	2	—	—	—	—	—	—
$Ca(NO_3)_2$ (g)	0.5	—	—	—	—	—	—
NaCl (g)	0.1	—	—	—	—	—	—
$FeSO_4$ (g)	trace	—	—	—	—	—	—
Ammonium succinate (g)	—	—	—	1	1	1	1
Thiamin·HCl (mg)	—	—	—	3	3	3	3
K_2SO_4 (g)	—	—	—	—	0.322	0.432	0.482
B.M.S. (m*l*)	—	—	—	20	20	20	20
D.W. (m*l*)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
pH	6.5	6.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5

Table III. The composition of media 6~11.

Ingredient \ Medium No.	6	7	8	9	10	11
Nutrient broth (g)	8	8	—	—	8	—
Glucose (g)	—	10	40	10	10	—
Sucrose (g)	—	—	—	—	—	40
Yeast extract (g)	—	—	1	1	1	1
Peptone (g)	—	—	—	—	—	10
KH_2PO_4 (g)	—	—	—	—	—	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g)	—	—	—	—	—	0.5
B.M.S. (m*l*)	—	—	20	20	20	—
D.W. (m*l*)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
pH	6.5	6.5	5.5	5.4	6.5	6.5

Table IV. The composition of medium 12 and its variation.

Ingredient \ Medium No.	12-1	12-2	12-3	12-4	12-5	12-6	12-7
Glucose (g)	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
Yeast extract (g)	1	1	1	1	1	1	1
Ingredient \ Medium No.	**12-8**	**12-9**	**12-10**	**12-11**	**12-12**	**12-13**	**12-14**
Glucose (g)	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
Yeast extract (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

Ingredient \ Medium No.	12-15	12-16	12-17	12-18	12-19	12-20	12-21
Glucose (g)	5	7.5	0	12.5	15	17.5	20
Peptone (g)	2	2	2	2	2	2	2
B.M.S. (m*l*)	2	2	2	2	2	2	2

Distilled water was added to 100m*l* and pH was adjusted to 6.5.

Table V. The composition of media 13, 14, 15, and 16.

Ingredient \ Medium No.	13-1	13-2	13-3	13-4	14	15	16
Glucose (g)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Yeast extract (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
B.M.S. (m*l*)	—	—	—	—	—	2	2
Tap water (m*l*)	—	—	—	—	100	100	—
D.W. (m*l*)	100	100	100	100	—	—	100
pH	5.4	5.7	6.1	6.5	6.5	6.5	6.5

Table VI. The composition of medium 17 and its variation.

Ingredient \ Medium No.	17-1	17-2	17-3	17-4	17-5
Glucose (g)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Yeast extract (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
B.M.S. (m*l*)	2	2	2	2	2
Cotton seed flour (g)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
D.W. (m*l*)	100	100	100	100	100
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

Table VII. The composition of medium 18 and its variation.

Ingredient \ Medium No.	18-1	18-2	18-3	18-4	18-5	18-6	18-7	18-8	18-9	18-10	18-11	18-12	18-13	18-14	18-15
A Solution* (m*l*)	98	96	94	92	90	80	70	60	50	40	30	20	10	—	—
B Solution** (m*l*)	2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	100
B.M.S. (m*l*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2

* A solution=Medium 12-11.

** B solution=the residue (300g) of the alcohol extract of ginseng root was re-extracted with 3,000m*l* of hot water for 24 hours (=G.R.A.W.).

Table VIII. The composition of medium 19 and its variation.

Ingredient \ Medium No.	19-1	19-2	19-3	19-4	19-5	19-6
Glucose (g)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Yeast extract (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
G.R.A.P.* (g)	0.01	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0
B.M.S. (m*l*)	2	2	2	2	2	2
D.W. (m*l*)	100	100	100	100	100	100
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

*G.R.A.P.: lyophilized powder of G.R.A.W.

Table IX. The composition of media 20-1~7, 21-1~2, 22, and 23-1~7.

Ingredient \ Medium No.	20-1	20-2	20-3	20-4	20-5	21-1	21-2	22
Glucose (g)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	—
Yeast extract (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	—	—	1.5
B.M.S. (m*l*)	2	2	2	2	2	2	2	2
G.R.A.P. (g)	—	—	—	—	—	0.01	0.1	7.0
Ginseng saponin (g)	0.005	0.01	0.1	0.3	0.5	—	—	—
D.W. (m*l*)	100	100	100	100	100	100	100	100
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

Ingredient \ Medium No.	23-1	23-2	23-3	23-4	23-5	23-6	23-7
Glucose (g)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Yeast extract (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
B.M.S. (m*l*)	2	2	2	2	2	2	2
G.R.A.P. (g)	0.01	0.1	0.5	1.0	0.01	0.1	0.5
Ginseng saponin (g)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.1	0.1	0.1
D.W. (m*l*)	100	100	100	100	100	100	100
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

Table X. The composition of medium 24 and its variation.

Ingredient \ Medium No.	24-1	24-2	24-3	24-4	24-5	24-6	24-7	24-8	24-9	24-10
Glucose (g)	—	1	2	2	5	7	10	12	15	12
Starch (g)	12	10	10	10	7	5	2	2	2	—
Yeast extract (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
B.M.S. (m*l*)	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—
D.W. (m*l*)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

서 180rpm의 속도로 orbital shaker incubator(Gallen Kamp)에서 7일간 배양하였다.

3) 2次 液內振盪培養

菌絲體를 포함한 1次 液內 培養液 全體를 blendor로 10초간 균질화하고 무균 pipet로 10m*l*씩 취하여 液內 培養用 培地 100m*l*를 가한 500m*l* 삼각 플라스크에 이식하여 24±1°C에서 180rpm의 속도로 incubator에서 14일간 배양하였다. 한가지 배지에 대해 3~20개씩 배양하여 평균치를 취하였다(Media No. 1~24에 총 98종의 배지 사용).

4) 靜置培養

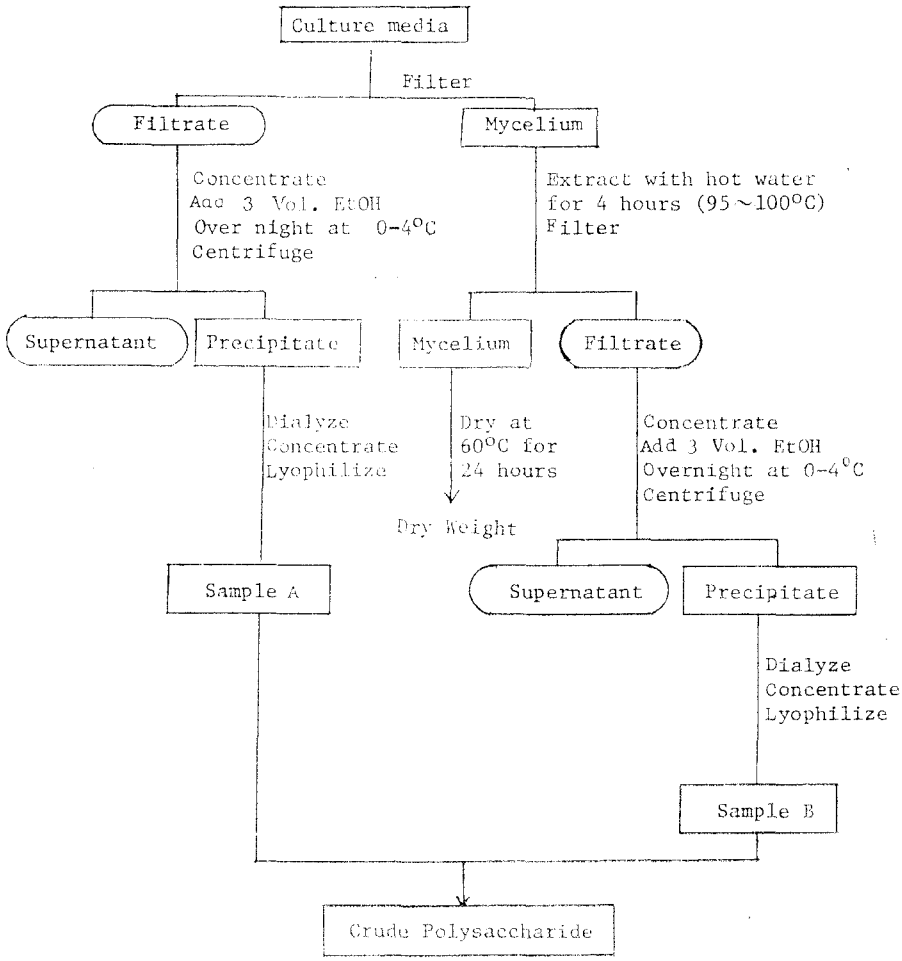
Table V의 培地中에서 Medium 14와 15는 정치배양을 각각 시행하여 비교하였다.

4. 抗癌成分의 抽出

배양액을 감압 여과하여 여액과 균사체를 분리하고 균사체는 60°C에서 24시간 동안 건조시켜 건조 중량을 측정하였다. 여액은 수욕상에서 농축한 후 에탄올을 가하여 생성된 섬유상의 갈색침전을 완결시키기 위해 0~4°C에서 1일간 방치하였다.

원심분리기(Beckman Co., Model J-21)를 사용하여 8,000rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 취한후 냉동 건조기(Edwards; Model EF03)를 사용하여 냉동 건조시켜 생긴 건조물을 증류수로 녹여 Visking tube (Visking Co.)로 0~4°C에서 3일간 투석시켰다. 이 액을 농축한 후 냉동 건조시켜서 얻은 분말을 Sample A라 했다.

한편 건조된 균사체는 증류수를 넣어 수욕상에서 4시간 동안 가열 환류시켜서 추출한 후 감압 여과하였



Scheme I. Extraction of the polysaccharide from the cultured mycelia of *Coriolus versicolor*.

다. 균사체의 추출여액을 감압 농축하여 상기 방법에 따라 에탄올로 침전, 원심분리, 투석, 농축, 냉동 건조시켜 얻은 것을 Sample B로 했다(Scheme I).

5. 抗癌成分의 精製

정제방법은 Fukuda등(1975)의 방법에 준하였으며, Scheme II에 표시하였다.

1) 단백질 제거

배양해서 얻은 항암성분 17g(Sample A+B)을 850ml의 증류수에 녹이고, 0.1N-NaOH로 pH7.5로 맞춘후 protease(동아약품 Aprose) 100mg을 가하고 37°C에서 1일간 반응시킨 다음 pH7.5로 다시 맞추고 protease 50mg을 가하여 37°C에서 1일간 더 반응시켰다.

반응액을 5분동안 끓이고 300ml로 농축시킨후 40% trichloroacetic acid 100ml를 가해서 최종농도를 10%로 되게하고, 4°C에서 1일간 방치해다.

그후 8,000rpm으로 30분동안 원심분리해서 얻은 상등액을 Visking tube를 사용하여 2일간 증류수를 흘려주면서 투석시킨후 농축하고 에탄올을 가해침전 시켰다. 원심분리하여 침전물을 취해 건조하였다(수득량 7.16g). 단백질 제거농도는 Lowry-Folin법(Lowry *et al.*, 1951)으로 확인하였다.

2) 핵산 제거

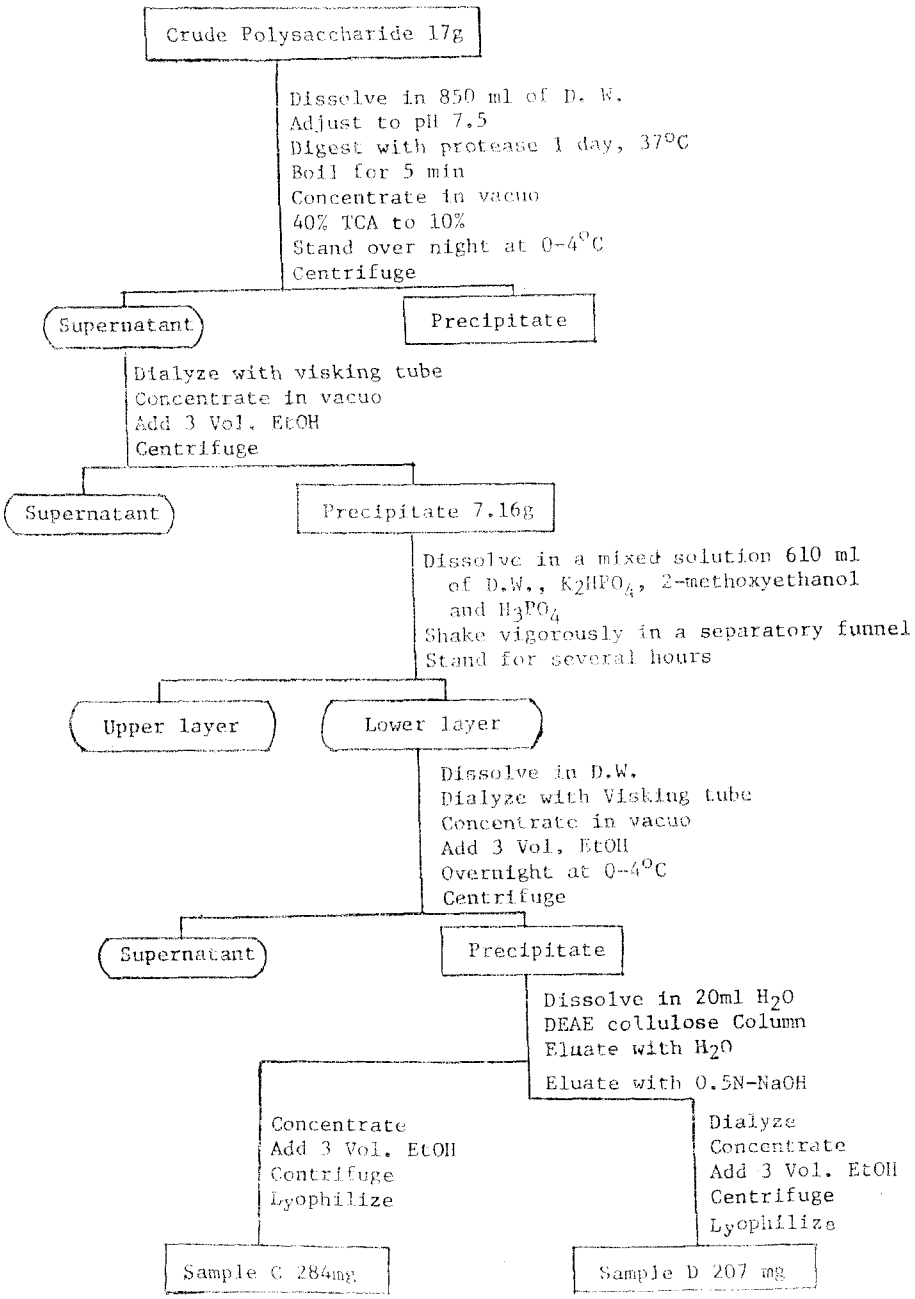
단백질 제거한 것을 증류수 200ml에 녹이고 2.5M-K_2HPO_4 200ml, 33.3% H_3PO_4, 10ml, 2-methoxyethanol 200ml를 함께 분액 여두에 넣고 세게 진탕했다.

1일간 방치후 불용성 물질을 포함한 하층을 취해 여기에 다시 증류수 200ml, 2.5M-K_2HPO_4 200ml, 2-methoxyethanol 200ml, 33.3% H_3PO_4 10ml를 가해 1일간 방치해서 얻은 불용성 물질을 포함한 하층을 취했다. 그것을 3일간 투석시키고, 농축한후 3배량의 에

탄올을 가해 4°C에서 1일간 방치한 후 8000rpm으로 30분 동안 원심분리해서 침전물을 취해 냉동 건조하였다(수득량 0.62g).

3) DEAE Cellulose Column Chromatography

DEAE cellulose(Capacity 0.7mcg/g)는 chloride form을 사용했다. 핵산제거 한것을 20ml의 증류수에 녹여 DEAE cellulose에 적용시키고 용출속도 30ml/hour, column크기 3×30cm와 같은 조건에서 증류수로 용출시켰다. 용출액을 시험관에 10ml씩 받아서 소량씩 취하여 anthrone법(Harper *et al.*, 1979)에 의해 양성이 나타나는 부분을 취해 농축하고 ethanol로 침전시켜서 백색의 건조분말 284mg을 얻었으며 이것을 Sam-



Scheme II. Purification of the antitumor polysaccharide.

ple C로 사용하였다.

다시 용출되지 않고 남아있는 물질을 0.5N-NaOH로 용출시켜 농축하고 ethanol로 침전시켜서 담황색의 건조 분말 207mg을 얻었으며 이것을 Sample D로 사용하였다.

6. 抗癌成分의 分析

1) 다당류 함량 및 구성 단당류 분석

시료에 대해 각각 anthrone 반응을 실시한 후 U.V. Spectrophotometer(Hitachi Co.)를 사용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다(Kim *et al.*, 1979b).

포도당을 표준으로 해서 작성한 검량곡선을 사용하여 시료 중의 다당류 함량을 계산하였다.

시료중 구성 당류의 종류와 함량은 시료를 methanolysis시킨후 G.L.C.를 행해 확인 계산하였다.

시료 5mg을 2ml의 3% HCl-MeOH에 용해시키고 ampule에 넣은후 질소를 충진시키고 밀봉한 뒤 100±5°C에서 20시간 동안 methanolysis 시켰다.

여과하여 감압 농축 시킨뒤 1ml의 pyridine에 용해시키고 0.2mg의 hexamethyl disilazane과 0.1ml의 trimethyl chlorosilane을 가하고 30초동안 맹렬히 진탕시켜 trimethylsilylation을 시킨후 다음과 같은 조건에서 G.L.C.(Shimadzu G.C.-4BM)를 행하였다.

Column	3% OV-17(80-100 mesh Shimalite)
	3mmϕ×1m boronsilicate glass column
Temperature	Column 130°C, Detector 190°C
Flow rate	N_2: 50ml/min.
	H_2: 60ml/min. (0.6kg/cm^2)
	Air: 88ml/min. (1.2kg/cm^2)
Attenuation	8×10^2 a.f.s.(ampere full scale)

각 표준 당에 대해서도 같은 방법으로 trimethylsilylation을 시킨후 G.L.C.를 행하였다.

시료의 G.L.C. chromatogram상의 retention time을 표준품의 retention time과 비교하여 시료중의 단당류를 확인하였으며 peak면적을 반치폭법과 planimetry로 계산해 구성 당류의 조성을 중량비로 산출해 내었다.

2) 단백질 함량 및 구성 아미노산 분석

단백질 함량은 Lowry-Folin법에 의해 albumin을 대조로 하여 계산하였다. albumin과 시료에 대해 각각 Lowry-Folin시험을 실시한 후 U.V. Spectrophotometer를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다.

albumin을 표준으로 해서 작성한 검량 곡선을 사용하여 시료중의 단백질 함량을 계산해 내었다.

구성 아미노산은 시료를 가수분해 시켜후 아미노산 자동분석기로 분석하였다. 시료 20mg을 5ml의 6N-HCl에 용해시켜 ampule에 넣고 질소를 충진하고 밀봉시켰다. 이것을 110±5°C에서 24시간동안 가수분해 시킨후 여과하여 침전을 제거하고 감압 농축 건조시켰다. 이것을 0.02N-HCl 2ml에 용해 시킨후 40μl를 아미노산 자동 분석기에 주입하여 분석하였다.

Amino Acid Autoanalyzer는 Hitachi Model 835를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같다.

Column	2.6×150mm
Ion exchange resin	#2619 (Hitachi)
Flow rate	Buffer soln. 0.225ml/min.
	ninhydrin 0.3ml/min.
Analysis cycle time	70min.
Column pressure	80~130kg/cm^2
Ninhydrin pressure	15~35kg/cm^2
Column temperature	53°C
N_2 gas pressure	0.28kg/cm^2
Reaction bath temp.	98°C
Wave length	570nm, 440nm

같은 조건하에서 실시한 표준 아미노산의 peak와 비교하여 시료중의 구성 아미노산을 확인하였다.

peak height법에 의해 각 아미노산의 구성 중량비를 산출하였다.

7. 抗癌實驗

본 실험에서는 서울대학교 동물사육장에서 구입한 A-strain웅성 마우스를 사용하였다.

마우스 복강내에 sarcoma-180 세포현탁액 0.1ml(1×10^7 cell/ml)를 이식하여 일주일간 배양 계대하였다. 이 마우스를 해부하여 복수액중의 sarcoma-180 세포를 분리해 낸후 그 세포액 0.1ml(1×10^7 cell/ml)씩을 50마리의 마우스의 오른쪽 겨드랑이에 주사하여 고형암을 유발시켰다.

위의 50마리의 마우스를 10마리씩 5군(대조군, Sample A 20mg/kg/day *i.p.*, Sample B 20mg/kg/day *i.p.*, Sample C 20mg/kg/day *i.p.*, Sample D 20mg/kg/day *i.p.*)으로 나누어 대조군에는 생리 식염수를, 처치군에는 생리식염수에 녹인 각 시료를 복강내에 각각 주사하였다.

암을 이식한 후 3일째부터 시료를 매일 1회씩 10일간 주사하고 암 이식후 30일 째에 마우스를 모두 치사시키고 고형종양을 적출해 내어 종양의 무게를 측정하여 평균치를 취하였다. 항암작용의 지표로서 종양의 저지 백분율(inhibition ratio=I.R.)을 다음과 같은 식에 의해 구하였다.

저지백분율 $I.R.=\frac{C_w-T_w}{C_w}\times 100$

C_w=대조군의 평균 종양무게

T_w=처치군의 평균 종양무게

8. 抗癌成分이 免疫에 미치는 影響에 관한 實驗

본 실험에서는 서울대학교 동물사육장에서 구입한 20~25g의 웅성 ICR-strain 마우스를 사용하였다.

배양 여액과 균사로부터 추출한 Sample A와 B를 합하여 단백결합 다당류 시료로 하고, 단백질을 제거한 Sample C를 다당류 시료로 사용하였다.

비장 세포를 현탁시키는데 사용한 Balanced salt solution (=B.S.S.)은 다음과 같이 조제하였다.

용액 Ⅰ은 dextrose 10g, KH_2PO_4 0.6g, Na_2HPO_4, 1.85g, 0.5% Phenol red soln. 2ml를 탈이온수 1*l*에 녹였다. 용액 Ⅱ는 $CaCl_2$ 1.86g, KCl 4.0g, NaCl 80g, $MgCl_2$ 2.0g, $MgSO_4$ 2.0g을 탈이온수 1*l*에 녹였다. 사용시 증류수 800ml, 용액 Ⅰ 100ml, 용액 Ⅱ 100ml를 섞어서 pH7.2로 사용하였다.

항원을 현탁시키는데 사용한 완충액(Conjugation buffer)은 다음과 같이 만들었다. 즉 NaCl 4.38g, KH_2PO_4 2.44g, Na_2HPO_4 10.00g을 탈이온수 1*l*에 녹였다.

면양 적혈구 Sheep red blood cell(=S.R.B.C.)는 Alsever's solution에 저장된 것을 사용전에 4회 완충액으로 씻어서 사용하였다.

보체로써는 Guinea pig complement(M.A. Bioproducts 회사 제)를 사용하였다.

실험 방법은 Cunningham(1973) 및 Jerne *et al.* (1974)의 방법에 준하였으며 Scheme Ⅲ에 표시하였다.

36마리의 마우스를 6마리씩 6군으로 나누고 시료 투여군으로서 3군(a, b, c군)에는 단백결합 다당류(20mg/kg/day, *i.p.*)를 주사하고, 대조군으로서 나머지 3군(d, e, f군)에는 생리식염수를 5일간 i.p.로 투여하였다.

시료 최종투여일에서 10일 경과한 후 시료 투여군 중의 a군과 대조군 중의 d군에는 면양 적혈구 4×10^8 세포를 복강내에 주사하고, b군과 e군에는 면양 적혈구 1×10^7 세포를 투여하였다. 나머지 c군과 f군에는 생리식염수를 투여하였다.

단백제거다당류를 사용한 실험에서는 24마리의 마우스를 6마리씩 4군(m, n, o, p군)으로 하고 시료 및 생리식염수를 각각 투여후 시료투여군 m군과 대조군 o군에는 면양 적혈구 1×10^7 세포를 투여하고 나머지 n군과 p군에는 생리식염수를 투여하였다.

5일 경과후 마우스를 치사, 해부하여 비장을 적출하였다. 적출된 비장에 B.S.S. 10ml를 넣어 균질화하고 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 비장 세포를 취하였다. 4°C에서 0.83% NH_4Cl 5ml를 가하여 적혈구를 용혈시켰다.

B.S.S. 10ml씩으로 3회 세척하고 다시 일정량의 B.S.S.를 가하여 재현탁시켜 총 세포수를 계산하였으며 그 현탁액의 일부를 취하여 10^6 cell/ml의 비장세포 현탁액을 만들었다. 소시험관에 B.S.S. 30μl, 보체 20μl, 20% S.R.B.C. 10μl, 비장세포 현탁액 100μl를 넣고 잘 혼합하였다.

그것을 slide chamber에 옮겨 vaseline-paraffin으로 봉하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 다음, 형성된 용혈반의 수를 세었다.

Mouse
- Administer samples (20mg/kg/day *i.p.* for 5 days)
- After 10 days

Mouse
- S.R.B.C. 4×10^8, 1×10^7 cell, *i.p.*
- After 5 days

Spleen
- Homogenize(4°C) with 10ml B.S.S.
- Centrifuge
- Add 0.83% NH_4Cl 5ml
- Centrifuge
- Wash with 10ml B.S.S., 3 times
- Resuspend in 10ml B.S.S.
- Cell count

Single Cell Suspension
- Mix with B.S.S., complement, and 20% S.R.B.C.
- Incubate for 2 hours in a chamber

Plaque Forming Cell

Scheme III. Procedure of plaque assay.

實 驗 結 果

1. 菌絲培養結果

1) 振盪培養에 따른 균사 생장량 및 항암성분 생성

배지 1에서 11까지(17종)의 실험결과에서 배지 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 3, 4, 8 및 11에서 균사 성장이 비교적 양호하였다(Fig. 1). 이들 배지를 비교해 볼때 배지 1-2, 1-3 및 1-4에서 균사 생장이 양호하였으며 항암성분의 생성량도 많았다.

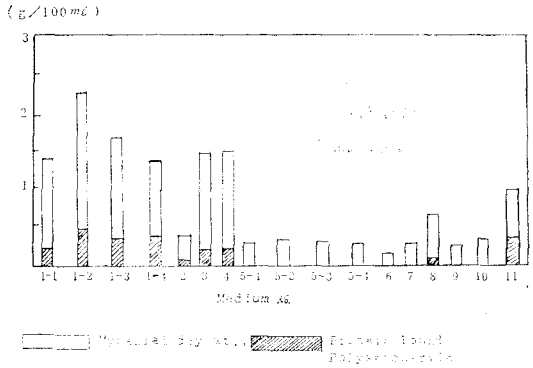


Fig. 1. A comparison of mycelial growth and protein-bound polysaccharide(=PBP) production by variation of culture media.

2) Glucose, Yeast extract 및 Peptone의 함량에 따른 균사생장량

배지 12(총 21종)에서 yeast extract, peptone 및 B.M.S.양을 고정시키고 glucose함량을 변화시켜 균사 생장량을 본 바(Fig. 2), 12.5% glucose: 1.5% yeast extract (배지 12-11)일때 생장량이 증가하였다.

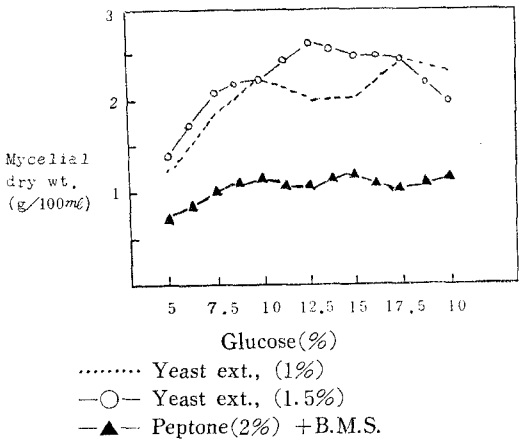


Fig. 2. A comparison of mycelial growth due to glucose amount in the media with different nitrogen sources.

3) pH에 따른 균사 생장량

균사 생장이 양호했던 12.5% glucose: 1.5% yeast extract 배지의 pH를 변화시켜 균사 생장량을 비교한 바(Fig. 3), pH6.5에서 가장 양호하였다.

4) 정치 배양과 진탕 배양시의 비교

배지 14 및 15를 사용하여 진탕 배양과 정치 배양을 시행하였을 때 균사 생장량과 항암성분량이 진탕 배양 쪽에서 양호하였다(Fig. 4). 배지 15와 16을 비교하였

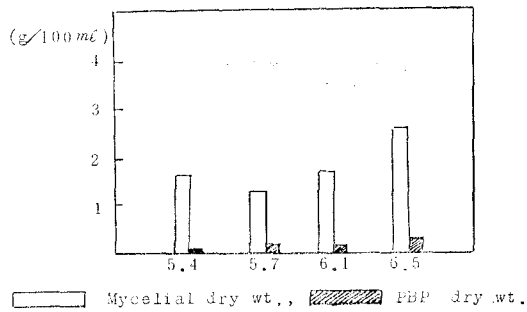


Fig. 3. Mycelial growth and PBP production in various pH values.

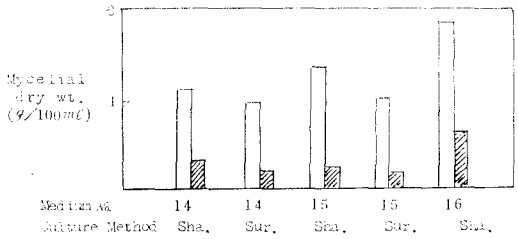


Fig. 4. Mycelial growth and PBP production by surface culture (=Sur.) and shake culture (=Sha.).

을 때 tap water 보다는 증류수가 양호하였다.

5) 棉實粕의 첨가에 따른 균사 생장량

glucose 12.5%, yeast ext. 1.5%, B.M.S. 함유배지에 棉實粕 cotton seed flour를 첨가하여 배양하였던 바 cotton seed flour 1g을 첨가한 배지(배지 17-5)에서 균사 및 항암성분 생성이 양호하였다(Fig. 5).

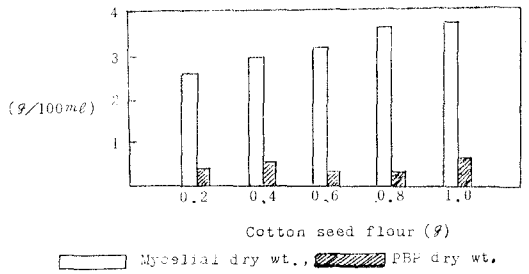


Fig. 5. Effects of cotton seed flour on mycelial growth and PBP production.

6) G.R.A.W.액 첨가에 따른 균사 생장량

배지 18-1~15 중에서 A soln.:B soln,의 비율이 70 : 30부터 50 : 50인 배지(배지 18-7~9)까지에서 균사 생장량이 양호하였다(Fig. 6).

7) G.R.A.P.의 첨가에 따른 균사 생장량

G.R.A.P.를 첨가한 배지 19를 사용하여 배양하였을

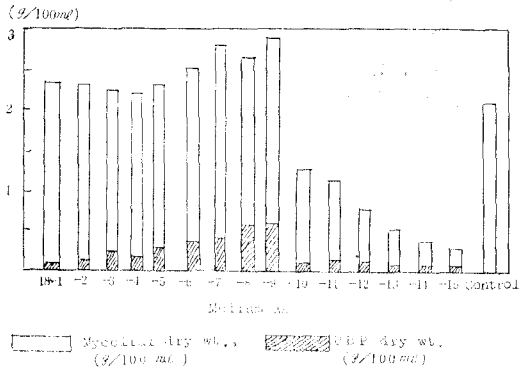


Fig. 6. Effects of G.R.A.W. on mycelial growth and PBP production.

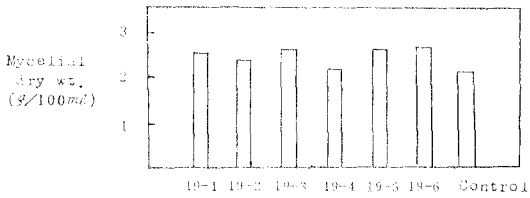


Fig. 7. Effects of G.R.A.P. on mycelial growth.

때 G.R.A.P.첨가가 균사 생장을 다소 증가시켰다(Fig. 7).

8) 인삼 사포닌의 첨가에 따른 균사 생장량

인삼 사포닌을 첨가한 배지 20을 사용하여 배양했을 때 인삼사포닌 0.1g을 첨가한 배지(배지 20-3)에서 균사 생장이 증가하였다(Fig. 8).

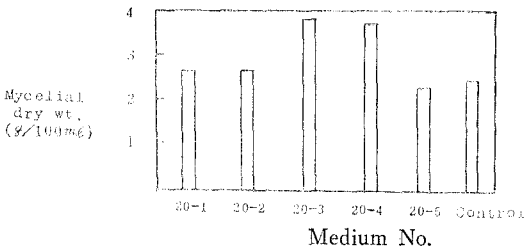


Fig. 8. Effects of ginseng saponins on mycelial growth.

9) Yeast extract에 대한 G.R.A.P.의 대체에 따른 균사 생장량의 비교

배지 21-1 및 21-2에서 질소원인 Yeast extract를 빼고 그 대신 G.R.A.P를 첨가하였을 때는 균사 생장이 감소되었다(Fig. 9).

10) Glucose에 대한 G.R.A.P의 대체에 따른 균사 생장량의 비교

배지 22에서는 탄소원인 glucose를 빼고 그 대신 G.

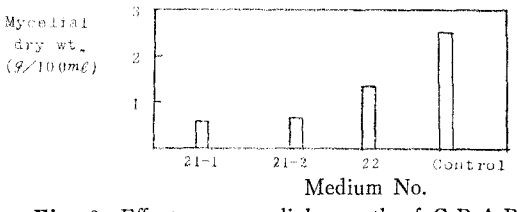


Fig. 9. Effects on mycelial growth of G.R.A.P.

R.A.P.를 첨가하였을 때도 균사 생장이 감소되었다(Fig. 9).

11) G.R.A.P. 및 인삼 사포닌 혼합첨가에 따른 균사 생장량의 비교

배지 23-1~7에 표시된 것과 같이 G.R.A.P.와 인삼 사포닌을 혼합하여 첨가했을 때 균사 생장량은 Control의 그것과 유사하였다(Fig. 10).

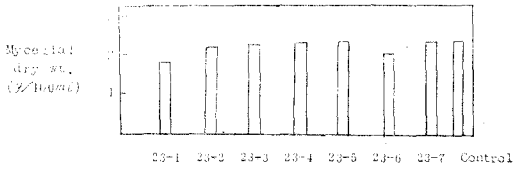


Fig. 10. Effects of G.R.A.P. and ginseng saponins on mycelial growth.

12) Glucose 및 Starch 함량비의 변화에 따른 균사 생장량의 비교

배지 24-1~10을 사용하여 배양하였을 때 균사생장량은 glucose yeast extract(24-10) 배지에서 좋았으며, glucose양을 감소시키고 starch량을 점차 증가시켜도 거이 유사한 량의 균사를 생성하였다(Fig. 11).

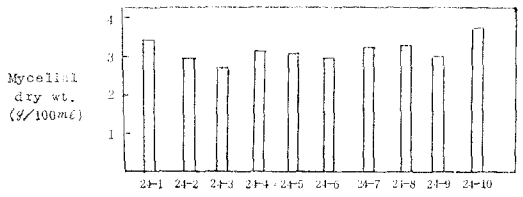
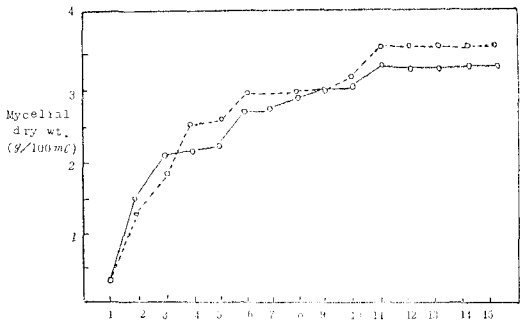


Fig. 11. Effects of the replacement of glucose with starch on mycelial growth.

13) 배양시간에 따른 균사 생장량의 비교

배지 24-1~10 중에서 배지 24-4와 균사 생장이 많았던 24-10 배지를 사용하여 각각 배양하고 시간경과에 따른 균사 생장량을 본 결과, 2차 진탕 배양 접종 후 11일에 균사 생성이 최고에 달하여 15일까지 계속되었다(Fig. 12).



——Medium 24-4 ·····Medium 24-10

Fig. 12. The curve of mycelial growth in submerged culture media with glucose or starch.

2. 抗癌成分의 分析結果

1) 다당류 함량 및 구성 단당류의 분석 결과

anthrone법에 따라 실험한 후 spectrophotometer에 의한 당류 함량 및 GLC에 의한 구성 당류의 분석결과는 Table XI, XII 및 Fig. 13에서 나타난 바와 같다.

다당류 함량은 4가지 시료중 시료 C의 다당류 함량이 92.4%로서 가장 높았다. 시료 B의 구성 단당류는 4종류였으며 그중 mannose함량이 65.7%로서 가장 많았다.

2) 단백질 함량 및 구성 아미노산의 분석 결과

Lowry-Folin방법에 따라 실험한 후 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 계산된 단백질 함량과 amino acid autoanalyzer에 의해 분석된 각 아미노산의 조성은 Table XIII, XIV와 같으며, 각각의 chromatogram은 Fig. 14, 15, 16 및 17과 같다.

단백질 함량은 5.7~8.1%였으며 시료 C에서는 단백질이 확인되지 않았다. 시료 A의 경우 구성 아미노산은 15종이었다.

Table XI. Polysaccharide contents of the antitumor fraction of the samples.

Sample	A	B	C	D
Polysaccharide content (%) (after anthrone test at 620nm)	45.5	41	92.4	34.4

Table XII. Retention time of TMS monosaccharides and monosaccharide contents of the antitumor fraction.

TMS-monosaccharide	Retention time(min.)	Average contents(%)
Xylose	7.2	1.20
Mannose	11.2	65.67
Galactose	15.2	7.50
Glucose	18.5	25.63

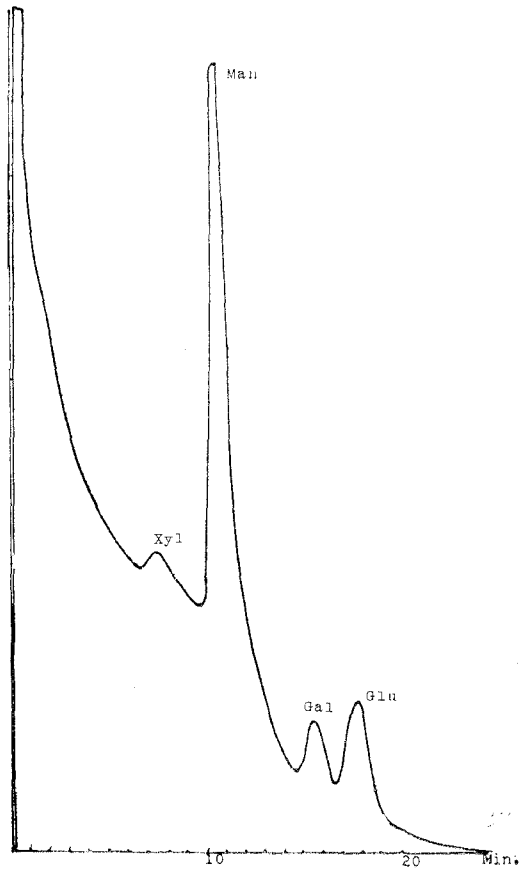


Fig. 13. G.L.C. pattern of monosaccharides of the antitumor polysaccharide.

Table XIII. Protein contents in the antitumor fraction of the samples A,B,C, and D.

Sample	A	B	C	D
Protein contents(%) (after Lowry-Folin test at 750nm)	8.1	6.0	0	5.7

Table XIV. Contents of amino acids in the protein fraction of the samples A,B, and D.

Amino acid(%) \ Sample	A	B	D
Aspartic acid	11.94	11.88	12.92
Threonine	11.05	10.23	4.50

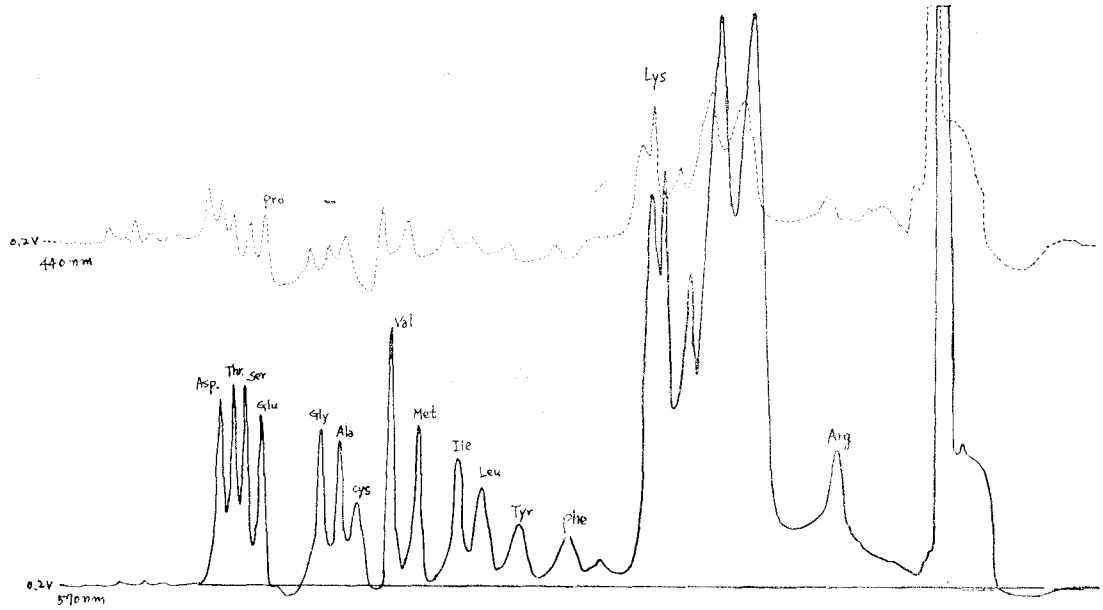


Fig. 14. Chromatogram of standard amino acids (A A A).

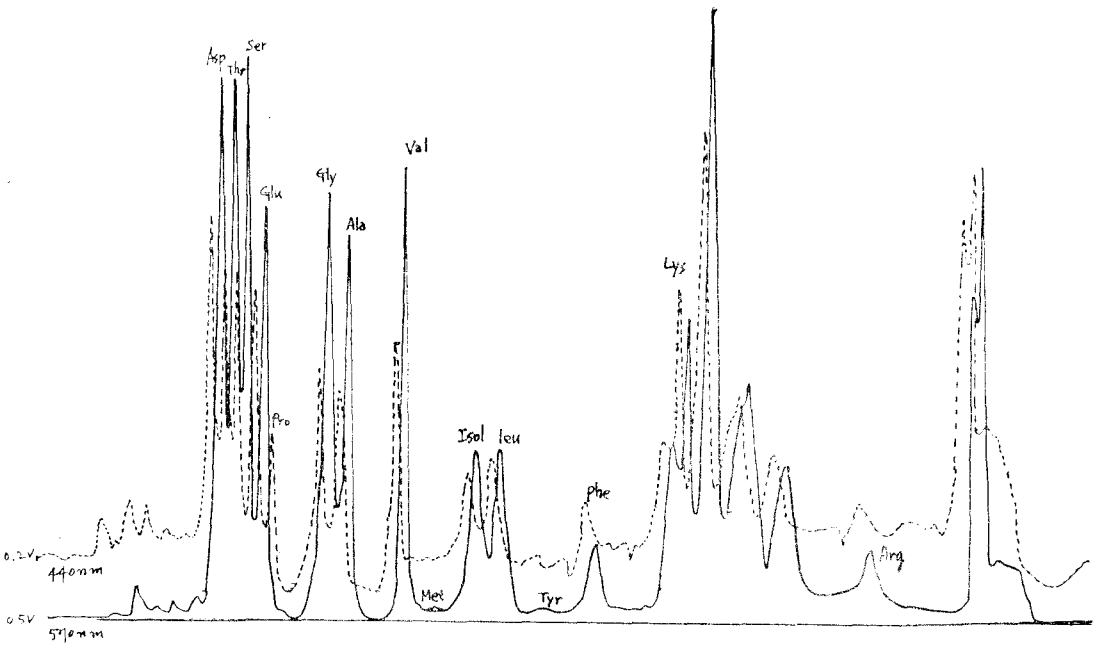


Fig. 15. Chromatogram of amino acids of Sample A.

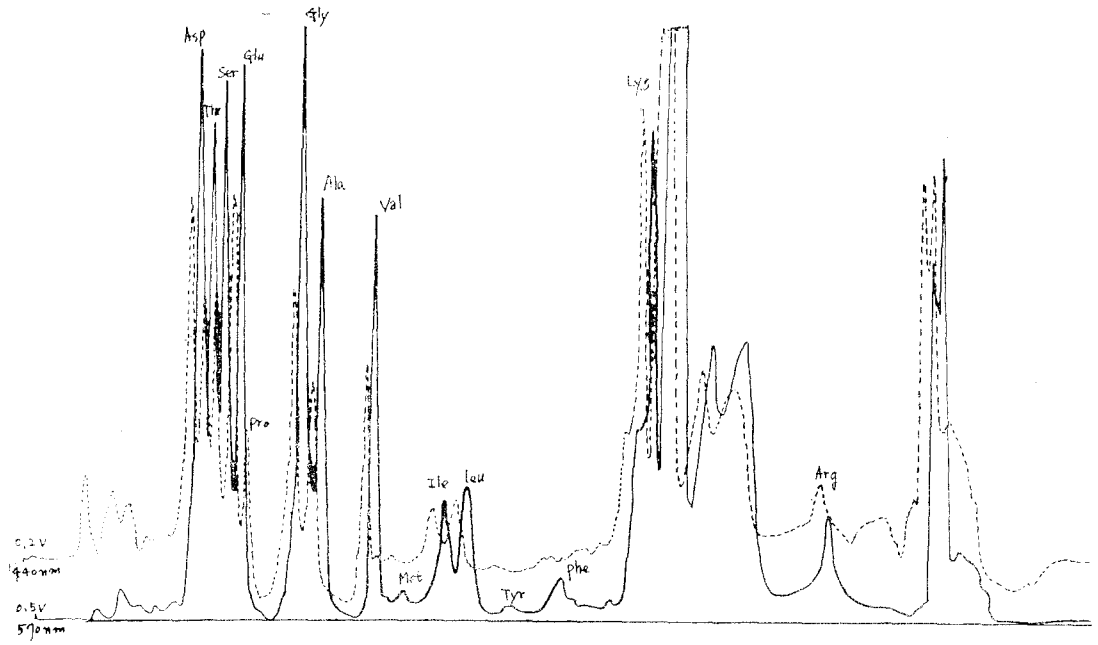


Fig. 16. Chromatogram of amino acids of Sample B.

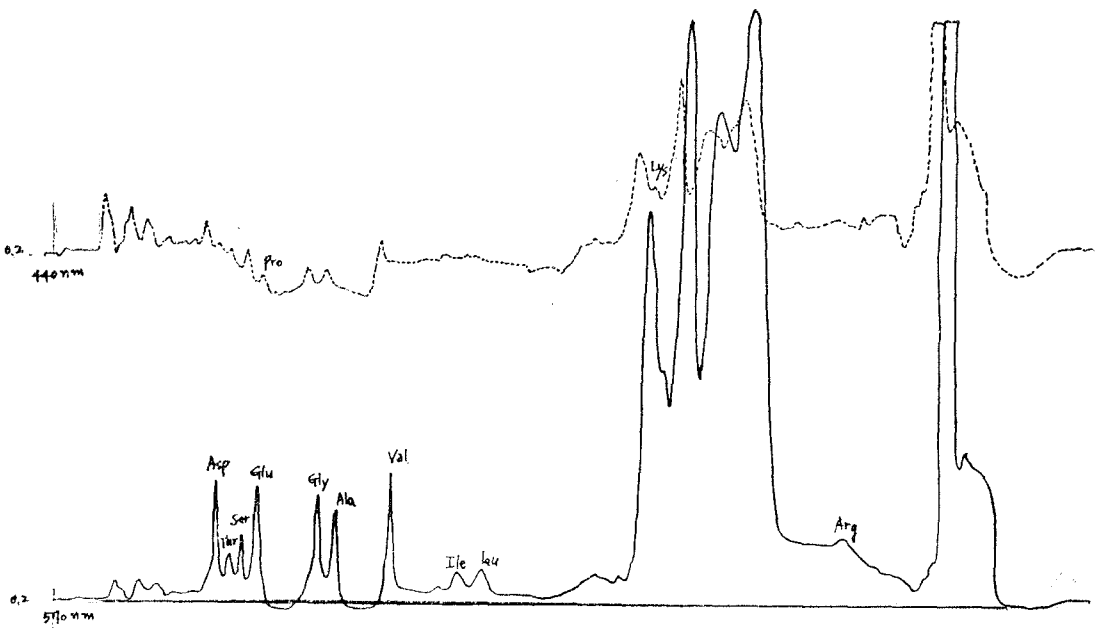


Fig. 17. Chromatogram of amino acids of Sample D.

Serine	11.21	10.23	6.46
Glutamic acid	9.38	12.00	12.92
Proline	3.53	3.56	5.48
Glycine	10.40	13.77	16.83
Alanine	10.25	10.65	12.33
Cysteine	—	—	—
Valine	7.09	5.95	9.59
Methionine	trace	0.68	—
Isoleucine	5.27	3.58	4.70
Leucine	7.27	5.34	6.65
Tyrosine	0.93	0.85	—
Phenylalanine	6.25	3.20	—
Lysine	3.20	4.91	2.94
Arginine	2.22	3.15	4.70

3. 抗癌實驗結果

마우스에 이식한 sarcoma-180을 이용한 항암실험결과에서 대조군에 비하여 처치군에서 종양의 무게가 훨씬 작아 시료가 항암성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 가장 높은 암저지율과 가장 높은 regression을 보인 것은 시료 C였다(Table XV).

시료를 투여한 군의 life span이 연장된 것이므로 항암효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 18).

4. 抗癌成分의 免疫 促進 効果

Cunningham법(1973)에 의하여 실험한 결과는 Table XVI 및 XVII과 같다.

단백질과 결합된 다당류와 단백질과 결합되지 않은 다당류를 각각 주사한 것이 대조군보다 비장세포수도 증가했을 뿐만아니라 용혈반의 형성수도 증가시켰다.

마우스를 면역시키는데 있어서 항원으로 사용한 면양 적혈구의 농도가 높을 때(4×10^8 cell)보다 낮을 경우(1×10^7 cell)에 그 면역 촉진효과가 크게 발현되었다.

또한 단백질이 결합되어 있는 다당류가 단백질이 제

Table XV. Effects of the Samples on mice bearing sarcoma-180.

Sample(*i.p.*) 20mg/kg/day	Average tumor weight(g)	Inhibition ratio(%)	Complete regression
A	1.372±0.31**	66.8	4/10
B	1.112±0.33**	73.1	3/10
C	0.157±0.04**	96.2	5/10
D	1.045±0.28**	74.7	4/10
Control	4.132±1.48*		0/10

* Mean±standard deviation

** Statistically highly significant($p<0.01$)

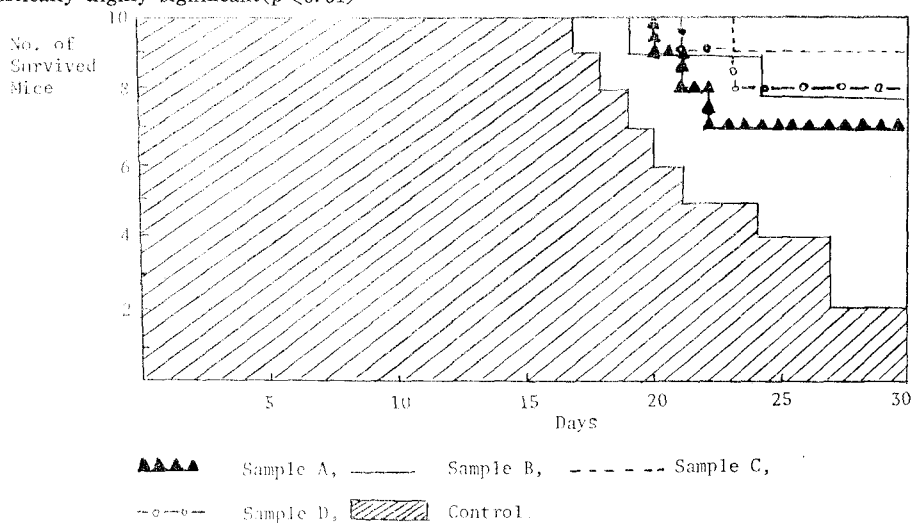


Fig. 18. Effects of the samples A, B, C, and D (20mg/kg/day *i.p.*) on the life span of mice inoculated with sarcoma-180

Table XVI. Hemolytic plaque-forming cells (PFC) in spleen of ICR mice immunized with sheep red blood cells (mouse: 20g) I.

Treatment	S.R.B.C.	No. of mice	Spleen cell counts($\times 10^7$)	PFC/10^6 spleen cells	PFC/ spleen($\times 10^8$)
Protein-bound polysaccharide	4×10^8	6	35.8±10.6*	2346±471**	796±148**
Control	4×10^8	6	22.4±4.0	2413±790	516±37
Protein-bound polysaccharide.	1×10^7	6	29.6±9.8**	435±202**	117±8**
Control	1×10^7	6	12.4±2.5	36±16	4±2
Protein-bound polysaccharide	—	6	19.61±7.0**	15±9	2±1
Control	—	6	10.60±3.8	10±3	0.7±0.5

* mean±standard deviation.
** statistically highly significant ($p<0.01$)

Table XVII. Hemolytic plaque-forming cells (PEC) in spleen of ICR mice immunized with sheep red blood cells (mouse: 25g) II.

Treatment	S.R.B.C.	No. of mice	Spleen cell counts ($\times 10^7$)	PFC/10^6 spleen cells	PEC/ spleen ($\times 10^8$)
Polysaccharide	1×10^7	6	44.6±10.5**	612±169	284±110
Control	1×10^7	6	28.0±5.9	227±121	59±23
Polysaccharide	—	6	30.7±8.5*	153±53	45±13
Control	—	6	16.6±6.0	100±18	16±7

* mean±standard deviation
** Statistically highly significant ($p<0.01$)

거된 다당류보다 면역반응 촉진 효과가 더욱 컸다.

考 察

구름버섯의 菌絲를 진탕 배양하였을 때 배지의 성분 중 탄소원으로써 glucose를 4%이상 넣고, 질소원으로서는 yeast extract를 0.5%이상 또는 peptone을 1% 첨가한 배지에서 그 생장이 잘 되었다.

표고버섯의 배양(Park *et al.*, 1979)에서 calcium pantothenate 첨가와 pyridoxine·HCl 첨가에 의해 균사의 생장이 개량되었는데 반하여, 구름버섯의 균사배양에서는 이들 vitamin 첨가에 의해 별영향을 받지 않았다. yeast extract에는 각종 vitamin이 함유되어 있으므로 별도로 첨가한 이들 2종의 비타민이 균사 생장에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

glucose와 yeast extract배지 중에서는 glucose 12.5%와 yeast extract 1.5%를 첨가한 pH 6.5 배지를 사용하여 진탕배양하였을 때 균사 생장이 잘 되었으므로 구름버섯의 균사 배양에서는 탄소원으로 glucose, 질소원으로서 yeast extract가 적합하다고 사료된다.

균사 생장량을 더욱 증가시키기 위한 시도로서 glucose-yeast extract 배지에 棉實粕을 첨가시켜 배양한 결과 균사 생장이 양호하였다. 이것은 棉實粕 중의 여러가지 영양소가 균사생장에 촉진적으로 작용하는 것으로 사료된다.

인삼에서 사포닌을 추출하고 난 인삼박을 물로 추출하여 glucose-yeast extract 배지에 혼합하여 배양한 결과 glucose-yeast extract 배지와 인삼박 추출물의 비율을 70 : 30부터 50 : 50으로 한것, 또는 인삼박을 추출, 동결 건조시킨 분말 500mg을 첨가한 배지에서 균사 생장이 양호하였다. 인삼 사포닌을 첨가했을 때도 역시 양호한 균사 생장을 보였다.

다른 질소원 및 탄소원을 빼고 인삼박 추출물을 질소원 및 탄소원으로 첨가한 배지에서는 균사 생장이 감소되었다. 이로 미루어 보아 인삼박 추출물은 영양원 이라기 보다는 발육 촉진 물질로서 작용한다고 추정된다.

또 탄소원으로서 glucose 대신 값이 싼 starch를 대치시켜도 유사한 성장을 보였다.

균사 배양시간에 따르는 균사 생장량은 접종후 11일

에 최고를 이루고 그 이후는 현저한 증가가 없었다. 따라서 배양기간을 11일로 잡으면 충분하다고 사료된다.

진탕 배양에 의해 생성된 항암성분을 구성하고 있는 단당은 xylose, mannose, glucose 및 galactose 였으며 그 단백질부분을 구성하는 아미노산으로서는 15종이 확인되었다.

한국산 구름버섯 자실체로부터 분리해낸 항암성분(Kim *et al.*, 1979a)과 저자가 균사체를 진탕배양하여 얻은 항암성 물질을 분석 비교하였을 때 함량의 차이는 다소 있으나 거의 유사한 조성으로 이루어져 있음으로 본질적으로 동일한 물질이라 사료된다.

전술한 동물 실험에서 본 바와 같이, 저자가 구름버섯의 균사체를 진탕배양하여 분리해 낸 단백 다당류가 높은 항암작용을 나타냈으며 그 중에서도 단백질을 제거한 다당류가 더 현저한 항암효과가 있었다.

한국산 구름버섯 자실체로부터 분리해 낸 다당류가 높은 항암효과를 나타냈던 결과에 비하면 약간 적었으나 균주를 개량하고 배양조건을 더욱 개선한다면 액내배양으로도 항암성분의 공업적 생산이 가능하리라 생각된다.

구름버섯의 항암성분의 항암 작용기전을 해명하려는 시도로써 마우스의 면역능에 미치는 영향을 실험한 바 그 성분이 마우스의 면역능을 촉진시킴을 알 수 있었다.

따라서 시료중의 항암성분이 B-cell의 활성화를 촉진시켜 항암성을 높일 것이라고 사료된다. 한편 단백질 결합 다당류의 면역촉진 효과가 단백질을 제거한 다당류 보다 크다는 것을 관찰하였다.

이것은 단백질을 제거한 다당류가 단백질 결합 다당류에 비해 높은 항암성을 보인 결과와 일치하지 않는다. 따라서 이 항암성분이 체내 면역반응에 관하여는 각종 세포중 비장의 B-cell만을 증가시켜 항암작용을 나타내는 것이 아니라 그밖의 여러 항암작용기전을 갖고 있을 것으로 사료된다. 그러므로 앞으로 암세포에 작용하는 각종 면역세포, 즉 macrophage, 각종 T-cell 및 B-cell에 대한 실험을 시행하여 전체적인 면역반응과 이 성분의 항암작용과의 관계를 더 추구할 필요가 있다고 사료된다.

結　論

1. 구름버섯의 균사를 진탕배양법으로 배양하여 그 항암성분을 생성할 수 있었으며, 특히 glucose 및 yeast extract 함유 배지에서 균사의 생장이 양호하였다.

이 배지에 棉實粕이나 인삼박을 첨가할 경우 균사생장이 증가하였고 glucose를 전분으로 대치한 배지에서도 균사가 생장하였다.

2. 구름버섯의 배양균사와 배양액으로부터 각각 분리한 항암성분은 다당류와 단백질이 결합된 것이었으며, 그 다당류 부분에서 4종의 단당을 확인 및 정량하였고, 그 단백질 부분에서는 15종의 아미노산을 확인 및 정량하였다.

뿐만 아니라 본 연구에서 진탕배양에 의해 생성된 항암성분은 야생 구름버섯의 자실체에 함유된 항암성분과 거의 동일하였다.

3. 구름버섯의 항암성분을 구성하고 있는 단백질과 다당류 중에서 단백질을 제거한 분획이 더 강한 항암작용을 나타내었다.

4. 구름버섯의 항암성분은 마우스의 면역능을 증가시켰으며 단백질이 결합되어 있는 다당류가 단백질을 제거한 다당류 보다 그 효과가 더 강했다.

감사의 말씀

이 연구를 지도해 주신 서울대학교 약학대학 김병각 교수님과 항상 격려하여 주신 이상섭 학장님, 최응철 교수님께 깊은 감사의 뜻을 표하며 실험에 협조하여 준 미생물 약품화학 교실의 강창율 석사와 교실원 여러분에게 감사하는 바이다.

이 연구에 소요되는 경비의 일부는 1981년도 문교부 학술연구 조성비로 충당되었기에 이에 깊이 감사하는 바이다.

References

Bose, S.R. (1955): *Nature* **175**, 468.

Catalfomo, P. and Tyler, V.E. Jr. (1964): *Lloydia* **27**, 53.

Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., and Fukuoka, F. (1970): *Cancer Res.* **30**, 2776.

Chung, K.S. (1979): *Arch. Pharm. Res.* **2**, 25.

Chung, K.S., Shim, M.J., and Kim, B.K. (1978): *Arch. Pharm. Res.* **1**, 33.

Cunningham, A. (1973): *Prog. Allergy* **17**, 5.

Fukuda, K., Uematsu, T., Hamada, A., Akiya, S., Komatsu, N., and Okubo, S. (1975): *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 1955.

Harper, H.A,, Rodwell, V.W., and Mayes, P.A. (1979): *Review of Physiological Chemistry*, Lange, California, 110.

Hatfield, G.M. and Brady, L.R. (1975): *Lloydia* **38**, 36.

Jerne, N.K., Henry, C., Nordin, A. A., Fuji, H., Kores, A.M.C., and Lefkovitz, I. (1974): *Transplant. Rev.* **18**, 130.

Kim, B.K. (1978): *Yakhak Hoeji* **22**, 91.

Kim, B.K., Choi, E.C., and Chi, H.J. (1973): *Korean J. Pharmacogn.* **4**, 39.

Kim, B.K., Choi, H.K., and Choi E.C. (1976a): *J. Natl. Acad. Sci. Republ. Korea* **15**, 211.

Kim, B.K., Jang, S.Y., and Shim, M.J. (1978b): *Korean J. Mycol.* **6**, 1.

Kim, B.K., Kang, C.Y., Choi, E.C., and Kim, K.H. (1976b): *Korean J. Mycol.* **4**, 27.

Kim, B.K., Kim, D.H., Choi, E.C., and Shim, M.J. (1976c): *Korean J. Mycol.* **4**, 17.

Kim, B. K,, Lee, Y.S., Choi, E.C., Shim, M.J., and Lee, Y.N. (1977): *Korean Biochem. J.* **10**, 47.

Kim, B.K., Lee, M.H., and Shim, M.J. (1978a): *Korean J. Mycol.* **6**, 5.

Kim, B.K., Lim, J.H., Yoon, I.H., Park, O.J., and Kim, H.S. (1971): *Korean J. Pharmacogn.* **2**, 31.

Kim, B.K., Park, E.K., and Shim, M.J. (1979a): *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145.

Kim, B.K., Shim, M.J., Choi, E.C., and Park, Y.I. (1975): *Korean J. Pharmacogn.* **6**, 9.

Kim, T.B., Lee, K.B., Joo, C.N., Kim, D.H., Lee, S.S., Kim, Y.S., Park, I.W., and Lee, S.Y. (1979 b): *Experimental Biochemistry*, Tamgoodang, Seoul, Korea, 226.

Kwon, T.J., Park, D.W., Lee, C.O., Kang, C.Y., and Kim, B.K. (1980): *Korean J. Mycol.* **8**, 25.

Lee, J.Y., Lee, Y.W., and Lim, J.H. (1959): *Illustration of Fungi of Korea*, Baemungak, Seoul, Korea, 101.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951): *J. Biol. Chem.* **193**, 265.

Maeda, Y. and Chihara, G. (1971): *Nature* **229**, 634.

Maeda, Y. and Chihara, G. (1973): *Int. J. Cancer* **11**, 153.

Min, H.K., Choi, E.C., and Kim, B.K. (1980): *Korean J. Mycol.* **8**, 13.

Neal, J.M., Benedict, R.G., and Brady, L.R. (1968): *J. Pharm. Sci.* **57**, 1661.

Park, E.K. and Kim, B.K. (1977): *Korean J. Mycol.* **5**, 25.

Park, D.W., Shim, M.J., and Kim, B.K. (1979): *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **4**, 19.

Shim, M.J., Lee, S.I., and Kim, B.K. (1978a): *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **3**, 65.

Shim, S.H. and Shim, M.J. (1979a): *Duksung Women's College J.* **8**, 163.

Shim, M.J. and Shim, S.H. (1979b): *Duksung Women's College J.* **8**, 171.

Shim, M.J., Shon, J.S., and Kim, B.K. (1978b): *Korean J. Mycol.* **6**, 53.

Tsukagoshi, S., and Ohashi, F. (1974): *Gann* **65**, 557.

Yoon, D.S. (1959): *Rep. Inst. Sci. Tech. Dept. Natl. Defense*, Seoul, **4**, 73.

Yoshioka, Y., Sano, T., and Ikekawa, T. (1973): *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 1772.

〈Received July 30, 1981〉