

*Polyozellus multiplex*가 생산하는 지질과산화 저해물질

황지숙 · 송경식¹ · 김양섭² · 석순자² · 이태호³ · 유익동*

한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹경북대학교 농화학과,

²농촌진흥청 농업과학기술원, ³부산대학교 미생물학과

Lipid Peroxidation Inhibitors from *Polyozellus multiplex*. Ji-Sook Hwang, Kyung-Sik Song¹, Yang-Sup Kim², Soon-Ja Seok², Tae-Ho Lee³ and Ick-Dong Yoo*. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea, ¹Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea, ²Agricultural Science and Technology Institute, Royal Development of Agriculture (RDA), Suwon 440-707, Korea, ³Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea - In the course of screening lipid peroxidation inhibitor from basidiomycetes, a mushroom, which was collected at O-Dae mountain in Kangweon-Do, was found to have active compound. The mushroom was identified as *Polyozellus multiplex*, which belongs to Aphylloporalles Thelephoraceae, on the basis of macroscopic and microscopic characteristics of the fruiting body. The methanol extract of fruiting body was extracted with benzene and ethylacetate, sequentially. By using various kinds of chromatographies, PM1, and PM2 and PM3, were purified from the ethylacetate extract and the benzene extract, respectively. Color reaction and analyses of IR, UV, and NMR spectra indicated that PM1 was a derivative of thelephoric acid, and PM2 and PM3 were linoleic acid and oleic acid, respectively. IC₅₀ of PM1 for inhibition of lipid peroxidation was 1.96 ppm and LD₅₀ was 500 mg/kg.

지구상에는 수천 종의 버섯이 자생하고 있으며 이들이 지니는 약리효과로는 면역부활작용, 생체항상성 유지작용, 항균작용 및 암, 뇌졸중, 심장병 등의 성인병에 대한 예방 및 개선효과등이 알려져 있다. 또한 그 활성본체로는 다당류, steroid, terpenoid, nucleic acid 유도체 등이 보고되어 있다(1, 4). 이와 같이 버섯류는 각종 생리활성 2차대사산물을 생산하고 있으며, 이들에 대한 많은 연구가 이루어져 있으나 대개의 경우 시료의 다량 확보 및 배양 등에 한계가 있어 연구 대상이 된 버섯 종은 국한되어 있다. 따라서 아직 연구 대상이 되지 못한 버섯류로부터 새로운 생리활성, 또는 신규 화합물을 발견할 가능성이 있어 담자균류는 생리활성 물질의 자원으로써 기대되는 바 크다.

한편, 지질과산화물이란 대기 중의 산소나 효소등에 의해서 지질이 과산화되어 생성되는 물질로 세포막에 지질과산화물이 축적되면 세포의 기능이 저하되어 조직의 국소적인 장애가 생기게 되며 이로 인하여 간장 질환, 뇌졸중, 심근경색, 당뇨병성 혈관장애, 고지혈증 및 홍반, 피부암 등이 유발되고 세포내에 축적시 단백질 등과 결합하여 거대분자복합체를 형성하여 노화를 초래하게 된다(5, 6). 이러한 지질과산화물의 생성을 억제하는 항산화제로는 butylated hydroxy toluene(BHT), butylated hydroxy anisole(BHA) 등이 사용되고 있으나

이들은 유기합성 화합물이며 천연물 유래의 항산화 물질로 보고된 각종 flavonoid와 tannin류 등은 활성이 약하여 실용화 단계에까지 이르지 못하고 있다(7). 따라서 새롭고도 강력한 지질과산화 저해물질의 발견은 생체내 지질과산화 반응의 기초 연구 뿐만 아니라 류머티스, 관절염, 자가면역질환, 발암, 동맥경화 및 노화 등과 같은 질병의 치료제의 개발에도 유용할 것이다. 본 연구에서는 국내에서 자생하는 버섯을 대상으로 지질과산화 저해활성을 탐색하여 비교적 강한 활성을 나타내는 균주를 선발, 동정하였으며 이 균주가 생산하는 활성물질의 지질과산화저해활성 및 이화학적 성질을 검토하였으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 기기

강원도 오대산 일대의 가문비나무 소나무등의 부식토에 자생하는 흑청색의 버섯을 채집하여 공시하였다. TLC는 silica gel 60F₂₅₄ aluminium plate(Merck Co.)와 RP-18 F254S(Merck Co.)를 사용하였으며 column chromatography에는 silica gel(70~230 mesh, Merck Co. Art No.7734)와 Sephadex LH20(Pharmacia Co.)을 사용하였다. 기기는, HPLC는 Tosoh SC8010(Tosoh Co.)을, column으로는 Senshu pak ODS-H-2251 및 ODS-4301-N을 사용하였다. UV spectrum은 methanol 용매하에서 Shimazu UV-260 spectrophotometer로, IR 은 KBr disk법을 이용하여 Laser Precision Analect

*Corresponding author.

Key words: Basidiomycetes, *Polyozellus multiplex*, lipid peroxidation inhibitor, thelephoric acid derivative, linoleic acid, oleic acid

RFX-65s로, $^1\text{H-NMR}$ 은 DMSO- d_6 /chloroform- $d(1:4, \text{PM1})$ 또는 chloroform- $d(\text{PM2}$ 및 $\text{PM3})$ 을 용매로 하여 300 MHz(Varian UNITY 300, America)에서 측정하였으며 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 75 MHz에서 측정하였다. 이때 내부 표준물질은 TMS(tetramethylsilane)를 사용하였다.

미생물학적 특성 조사

채집한 버섯의 자실체를 우선 육안으로 관찰한 후 광학현미경(Olympus OM-4Ti)으로 갓(pileus), 대(stipe) 및 자실층(hymenium)의 형태와 크기, 색상을 기록하였으며(9) 자실체의 조직특성과 맛 등을 조사하였다(8). 즉 자실체의 갓 가장자리에서 얻은 얇은 절편을 슬라이드 글래스 위에 올려놓고, 3% congo-red 및 1% phloxine을 한 방울 떨어뜨려 시료의 세포벽 및 세포질을 염색한 후 광학 현미경을 사용하여 세포벽, 균사색소, 담자의 크기 및 형태, 협구(clamp connection)의 존재 유무등의 미세구조를 관찰하였다.

전자현미경관찰은 Clinton등(10)의 방법을 이용하여 포자의 외형 및 표면구조를 관찰하였다. 즉, 자실체를 75% ethanol 용액에서 10분간 처리한 후 2.5% glutaraldehyde 용액과 2% osmium tetroxide로 각각 고정시켰다. 이것을 ethanol로 탈수시키고 amylacetate로 치환한 후 liquid carbon dioxide를 이용하여 건조시켰다. 여기에 gold-palladium을 coating시킨 다음 scanning electron microscope(Hitachi S-570)로 검경하였다.

열, pH, 안정성 조사 및 유기용매 추출

풍건한 공시버섯의 자실체를 methanol로 환류추출하고 농축시킨후 증류수로 현탁시켜 조시료액을 만들었다. 조시료액 3 ml씩을 pH 2, 7, 10으로 각각 조절하고, 100°C에서 10분간 열처리한 후 중화시킨 다음 지질과산화 저해활성을 측정하였다. 이때 대조군으로는 pH 및 열처리하지 않은 조시료를 사용하였다. 그 결과 pH 2와 pH 7에서는 97%의 잔존활성을 나타낸 활성물질이 pH 10에서 열처리한 경우는 2%에 불과하였다. 유기용매 추출성은 물에 현탁시킨 시료액 3 ml를 benzene 및 ethylacetate 각 3 ml로 추출하고 각 분획의 활성을 측정함으로써 확인하였다. 그 결과 ethylacetate층에서 가장 높은 활성이 나타났으며 benzene층에는 비교적 약한 활성이 나타났다.

지질과산화 저해활성(11)

지질과산화 저해활성은 비효소적 측정방법의 일종인 Fe^{2+} /ascorbate법에 의해 측정하였다. 즉, 생후 4주된 Sparague-Dawley계 rat의 간 microsome을 기질로 하여 Fe^{2+} /ascorbate에 의해 생성되는 malone dialdehyde의 양을 thiobarbituric acid와 반응 시킨 후 530 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 각 시료에 대한 지질과산화 저해활성을 측정하였으며 무처리구와 비교하여 상대적인

저해율을 백분율로 나타내었다. 양성대조구로는 유기합성제인 butylated hydroxy toluene(BHT, Sigma Co.)을 사용하였다.

활성물질의 안전성 조사

실험동물은 한국과학기술연구원 생명공학연구소에서 유지 관리되고 있는 specific pathogen free의 KIST: ICR계 mouse를 사용하였으며 체중이 20 g 전후의 것으로 암수 모두 5주령에서 약재 투여가 시작되었다. 실험동물은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 조명 12L/12D의 동물실 내에서 유지되었으며, 사료 및 음료수는 자유 섭취시켰다. 활성이 있는 PM1 50 mg을 corn oil 1.0 ml에 현탁시켜 500 mg/Kg 농도로 경구투여하였으며 대조군으로는 corn oil을 사용하였다. 투여당일에는 투여 후 1, 4, 8, 12시간 뒤에, 투여 익일부터 12일까지는 매일 오전 오후 1회 이상씩 일반증상의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰 하였다. 또한 투여 12일째에 동물을 치사시켜 해부한 후 대조군과 함께 육안적으로 모든 내부장기를 검사하였다.

결과 및 고찰

공시버섯의 형태적 특성

채집된 버섯의 자실체(Fig. 1)는 잎새모양 혹은 부채모양이었고 높이는 10~20 cm, 폭 7~20 cm 정도이었으며 색상은 청흑색 내지는 남흑색이었다. 대의 크기는 길이 3~5 cm, 두께 10~20 mm로 반복하여 소분지로 갈라지고 각 분지의 선단부에서 갓이 형성되었다. 갓은 가장자리가 안으로 굽어 있어 물결모양을 이루고 있었으며 성장한 갓은 주걱모양 내지는 부채모양을 하고 있었다. 갓의 표면은 매끈하였고 평활하였다. 자실층의 아랫면은 회백색 또는 회청색을 띄었고 백색의 분질로 덮혀있었으며 방사상의 주름이 대에까지 내려져 있어



Fig. 1. Fruiting body of wild mushroom, *Polyozellus multiplex*.

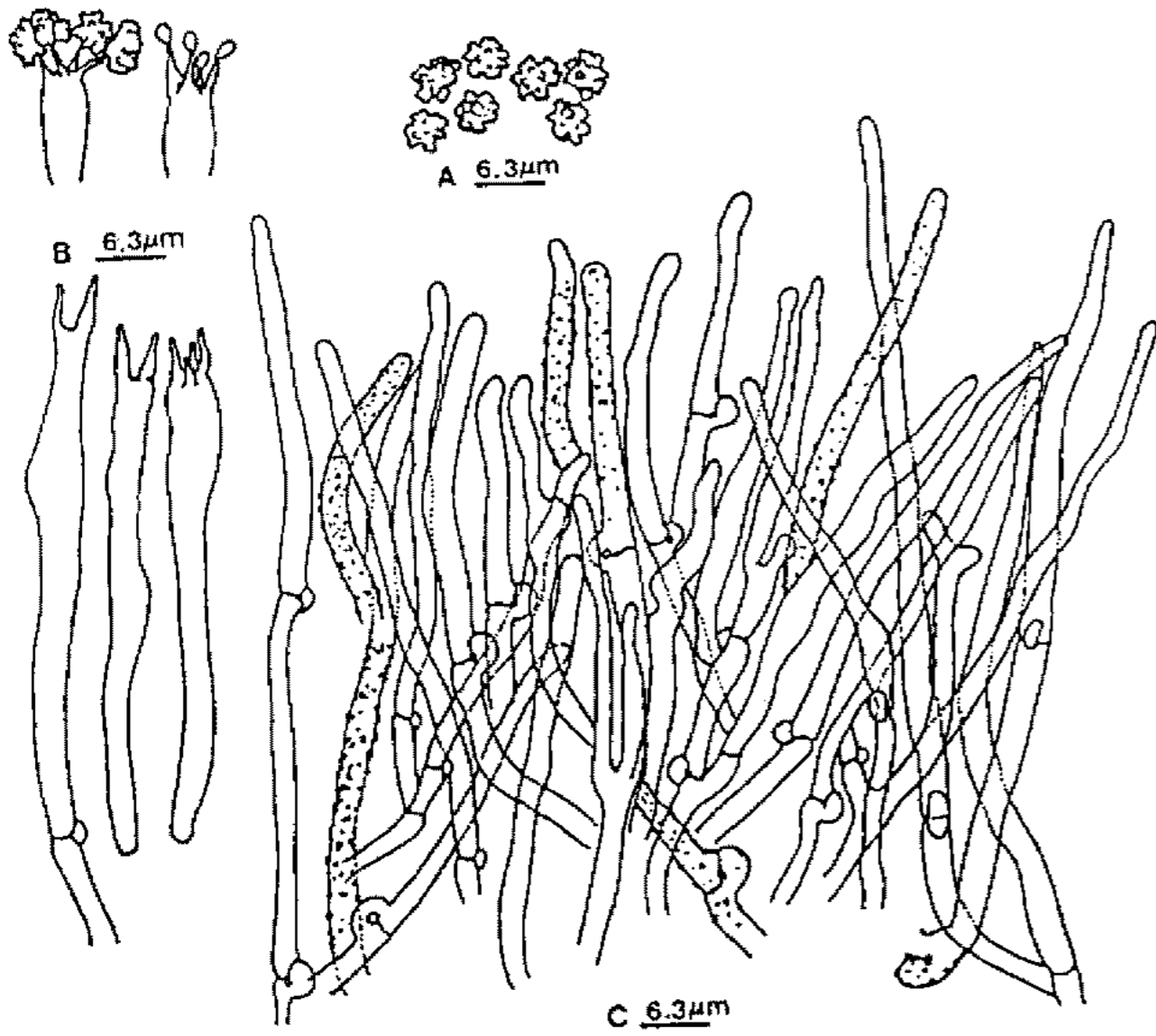


Fig. 2. Microscopic description of *Polyozellus multiplex*.
a: spores, b: basidia, c: pileipellis

갓과 대의 경계가 불명확하였다. 조직은 얇고 부드러우며 잘 부서지고 약간 쓴맛을 나타내었다. 자실체 및 포자를 광학현미경으로 관찰한 결과(Fig. 2) 포자의 표면은 각진 돌기형으로 그 크기는 $5.6\sim 6.9\times 4.6\sim 5.6\ \mu\text{m}$ 이었다. 담자기는 약 $50.2\sim 76.3\times 6.0\sim 7.7\ \mu\text{m}$ 로 4극성이었고 기부에는 협구(clamp connection)가 있었으며 iodine 처리시 투명하거나 옅은 노란색을 띠고 KOH 처리시 옅은 황록색을 띠었다. 갓표면의 표피상층부에 있는 말단세포(pileipellis)는 길고 유연한 원통형이었으며 격막에 협구가 있고 크기는 $42.9\sim 119.3\times 2.9\sim 3.7\ \mu\text{m}$ 이었다. 또한 포자의 형태를 전자현미경으로 조사한 결과 포자의 표면이 각진 돌기형임을 재확인할 수 있었다(Fig. 3).

이상으로 육안 및 현미경으로 관찰한 공시버섯의 자실체의 형태적 특징들을 종합한 결과, 본 실험에 사용한 공시버섯은 Alexander 등(12)과 Bigelow 등(13) 그리고 김 등(14)에 의해 보고된 민주름버섯목(*Aphyllporalles*)의 굴뚝버섯과(*Thelephoraceae*)에 속하는 까치버섯(*Polyozellus multiplex*)으로 동정되었다. 한편 본 실험에 공시한 까치버섯의 포자표면은 상기에서 기술한 바와 같이 각진 돌기형이었으나, Hongo와 Imazeki(15)는 까치버섯의 포자 표면에 미세한 침상돌기가 있다고 보고하였으며 Corner 등(16)은 포자의 표면이 평활하다고 보고하였다. 이와같이 까치버섯의 포자형태가 연구자에 따라 약간씩 상이한 점이 있어 추후의 면밀한 비교 검토가 필요하리라 생각된다.

한편, 까치버섯은 8월말부터 10월말에 걸쳐 소나무 등의 침엽수림 또는 가문비나무 등의 활엽수림의 부식토에서 자생하는 버섯으로 우리나라를 비롯하여 일본, 중국, 미국 등지에 분포하고 있으나 일부 지역에서만 발견되는 희귀종으로 기록되고 있다(13, 16). 또한 본

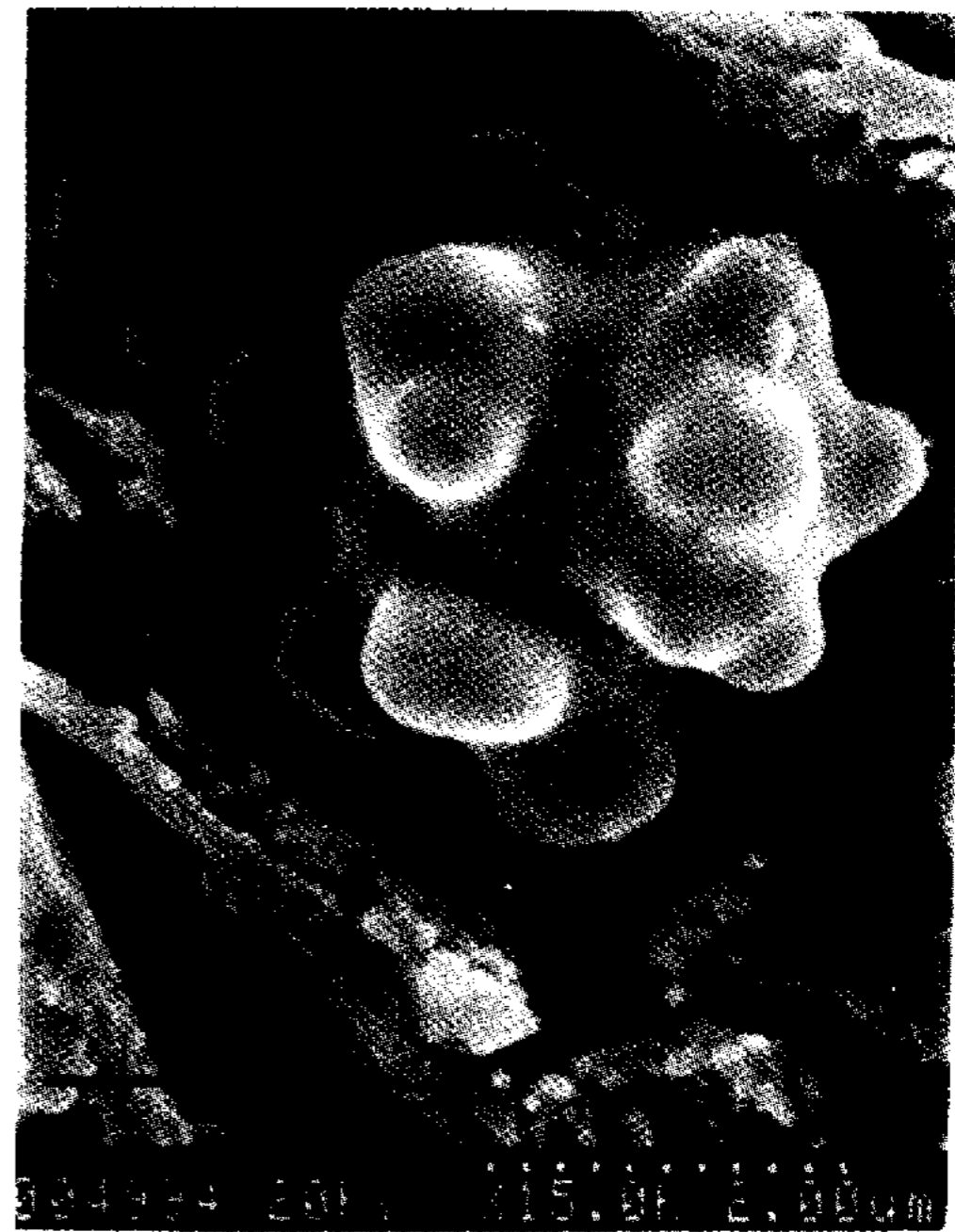


Fig. 3. Scanning Electron Microphotography of *Polyozellus multiplex* basidiospore.
($\times 5000$, bar represents $2\ \mu\text{m}$, SEM)

버섯의 균사는 소나무, 가문비나무 등과 같은 고등식물 뿌리의 주위를 둘러싸서 균외투막(mantle) 혹은 균피(external)라고 불리는 구조를 형성하는 외생균근균(ectomycorrhizal fungi)으로, 순수분리하기가 어려울 뿐만 아니라 기주식물체에 활물기생하여 복잡한 영양공생 관계를 이루고 있어 분류동정을 위한 기준이 미흡한 실정이다.

지질과산화 저해활성물질의 정제

까치버섯으로부터의 지질과산화 저해물질의 분리 정제 과정을 Fig. 4에 요약하였다. 까치버섯의 자실체 700g을 3l의 methanol로 70°C의 수욕상에서 3회 환류추출한 후 여액을 농축시켜 약 134g의 추출물을 얻었다. 이 추출물을 1.5l의 증류수로 현탁시킨 후 상법에 의해 benzene 가용성분획 및 ethylacetate 가용성분획으로 나누었다.

Etylacetate 가용성분획(1.14g)은 불순물을 제거하기 위해 0.5N NH_4OH 수용액 100ml로 현탁시킨 후 신속히 동량의 ethylacetate로 3회 반복추출을 실시한 후 유기용매층을 탈수, 감압농축하였다(592mg). 여기에 300ml의 methanol을 가하여 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 불용물을 제거한 후 상등액을 감압농축하여 387mg의 연회색 분말상태의 활성물질을 얻었다. 이 시료를 전개용매를 달리한 조건에서 TLC를 행한 결과 단일 spot로 나타났으며 HPLC 분석결과, Rt 9.5분에서 단일 peak로 나타났다. 따라서 활성물질이 순수하게 정제된 것으로 판단하고 이 화합물을 PM1이라고 명명하였다. 한편 benzene 가용성분획(8.15g)은 silica gel

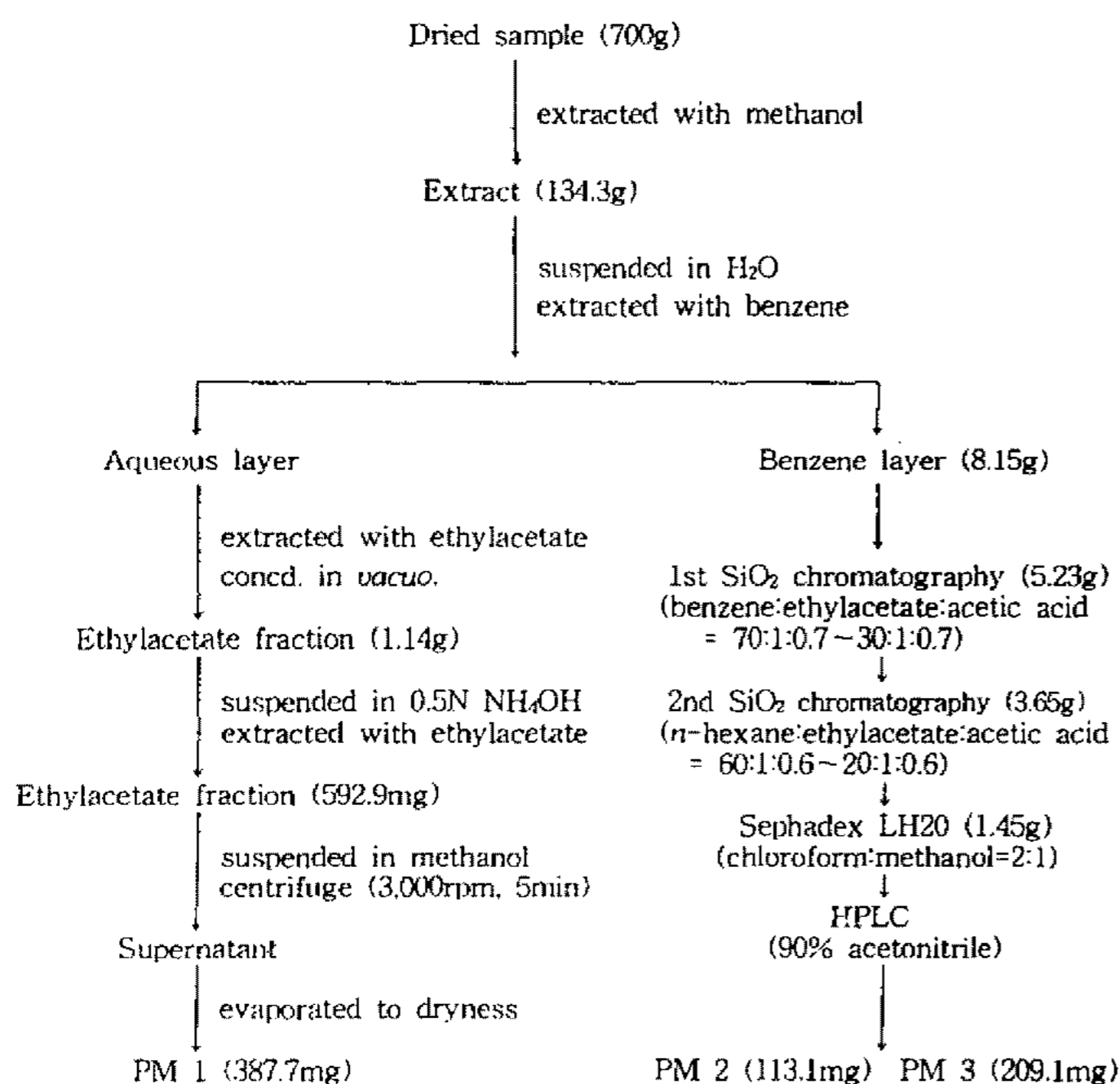


Fig. 4. Purification procedure of PM1, PM2 and PM3.

column chromatography를 행하여 분획1~60으로 나누고 이들 중 활성을 나타내는 분획22~32에 대하여 재차 silica gel column chromatography, Sephadex LH 20 chromatography 및 HPLC를 실시하여 Rt 18.0분 (113.1 mg)과 Rt 23.4분(209.1 mg)의 두 활성물질을 얻었으며 이를 각각 PM2 및 PM3이라 명명하였다.

이화학적 성질 및 구조분석

PM1 화합물의 발색시약에 대한 정색반응 결과, phenol-sulfuric acid, ninhydrin, bromocresol green 및 Dragendorff's reagent에 대하여 음성이었으므로 당, carboxyl기, amine 및 amino acid moiety가 없는 것으로 추정되었다. 한편 phosphomolybdic acid 및 sulfuric acid에 대해서는 양성이었다고, 특히 ferric chloride reagent에 대하여 청녹색으로 발색하였으므로 PM1에는 phenolic OH group이 존재할 것으로 추측되었다. PM1의 유기용매에 대한 용해성, TLC pattern, 융점등은 Table 1에 정리하였다.

한편 PM1의 UV λ_{\max} (log ϵ)는 359(4.69), 346(4.99), 331(4.81), 278(4.55), 268(4.42), 245(4.78), 224(4.87)에서 각각 흡수극대 peak를 나타내어 이 화합물이 terphenyl 계통의 화합물임을 추정할 수 있었다(17). IR spectrum (Fig. 5)에서는 798 cm^{-1} (aromatic C-H), 1475 cm^{-1} (aromatic C=C), 1409 cm^{-1} (CH₃), 1753 및 1780 cm^{-1} (ester carbonyl), 3276 cm^{-1} (aromatic C-H stretching), 3440 cm^{-1} (OH)의 peak들이 관측되어 이 화합물이 methyl group 및 carbonyl ester group을 함유하는 phenolic 화합물일 것으로 추정되었다. 또한 ¹H-NMR에서 aromatic region에서의 두 개의 singlet peak(δ 7.14, 7.21

Table 1. Physico-chemical properties of PM1.

Appearance	Bright gray powder
FAB-MS(m/z) [M+1]	439
Molecular formula	C ₂₂ H ₁₄ O ₁₀
Melting point	>245°C (decomposed)
UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm(ϵ);	359(4.69), 346(4.99), 331(4.81), 278(4.55), 268(4.42), 245(4.78), 224(4.87)
Solubility	
Soluble	Dimethylsulfoxide, pyridine,
Slightly soluble	Ethyleneglycole, MeOH ¹⁾ , EtOH ²⁾
Insoluble	CHCl ₃ , Benzene, n-Hexane, H ₂ O
TLC(SiO ₂) ³⁾ , R _f value	
CHCl ₃ -MeOH-HOAc ⁴⁾ (13:1:0.5),	0.18
EtOAc-MeOH-HOAc(25:1:0.2),	0.66
Benzene-MeOH-HOAc(1:2:0.2),	0.54
HPLC(ODS) ⁵⁾ , R _t (min.)	9.48
(65% MeOH-HOAc, 99:1 v/v)	

¹⁾ methanol, ²⁾ ethanol, ³⁾ Silica gel plate 60F₂₅₄ (Merck), ⁴⁾ acetic acid, ⁵⁾ For HPLC conditions, see Results and Discussion

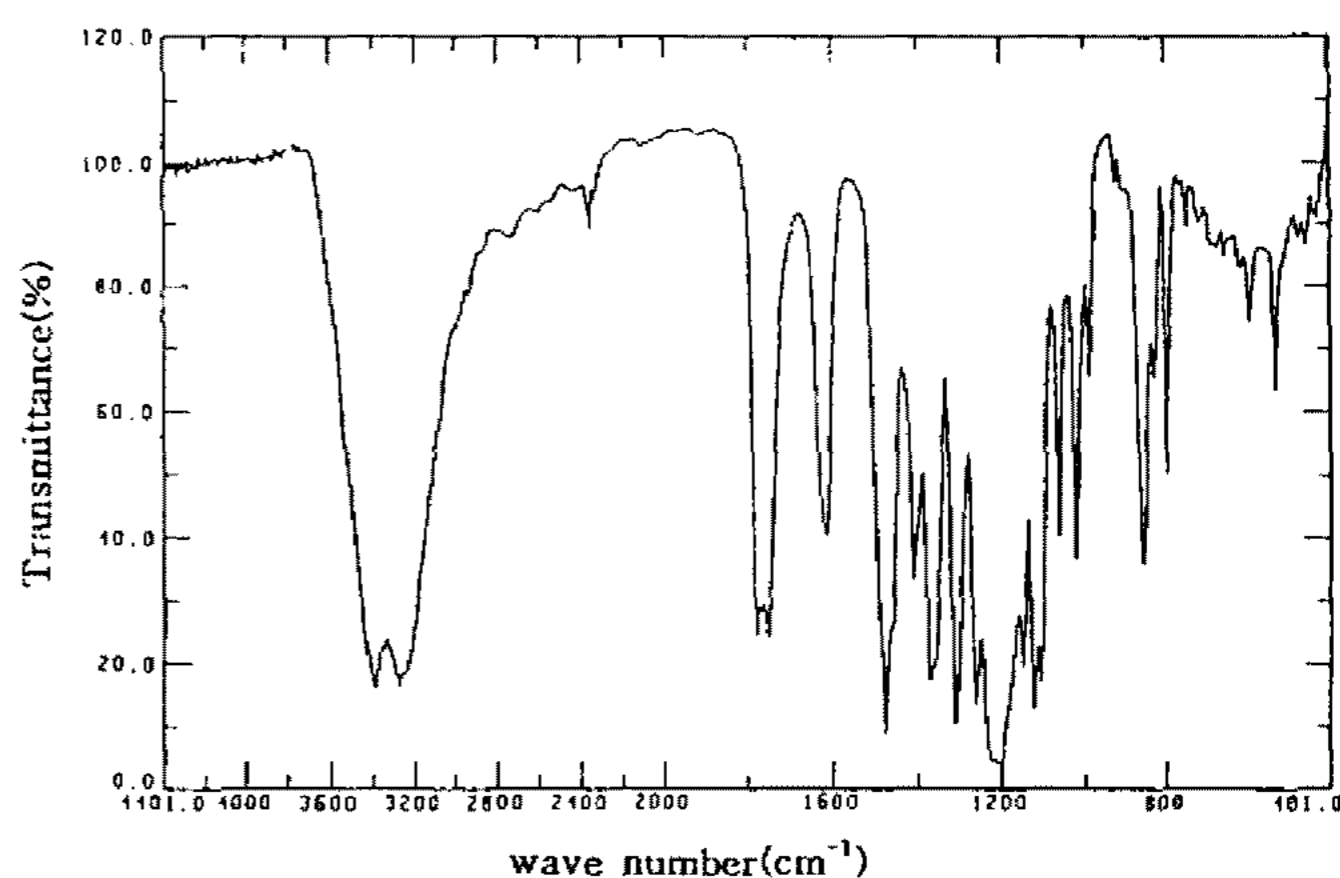


Fig. 5. IR-Spectrum of PM1 in KBr.

ppm)와 acetyl 유래의 CH₃로 보이는 δ 2.54 ppm에서의 singlet peak 및 phenolic OH 유래로 추정되는 두개의 broad한 singlet signal이 각각 δ 8.78과 9.23 ppm에서 관측되었다. 이상의 결과를 토대로 할 때 PM1은 theophoric acid 유도체의 일종인 것으로 판단되었으며 자세한 구조동정을 위하여 현재 ¹H-NMR, ¹³C-NMR을 포함한 2차원 NMR등의 기기분석을 행하고 있는 중이다.

한편, PM2 화합물은 ¹H-NMR spectrum에서 δ 0.89 ppm에 methyl triplet peak가 관측되었고, δ 9.07 ppm 부근에서 carboxylic OH peak로 추정되는 broad한 singlet signal이 관측되었으며 δ 5.35 ppm에서는 vinyl proton의 signal을 발견할 수 있었다. 또한 ¹³C-NMR에서는 δ 14.08 ppm에서 methyl carbon이, δ 127.92,

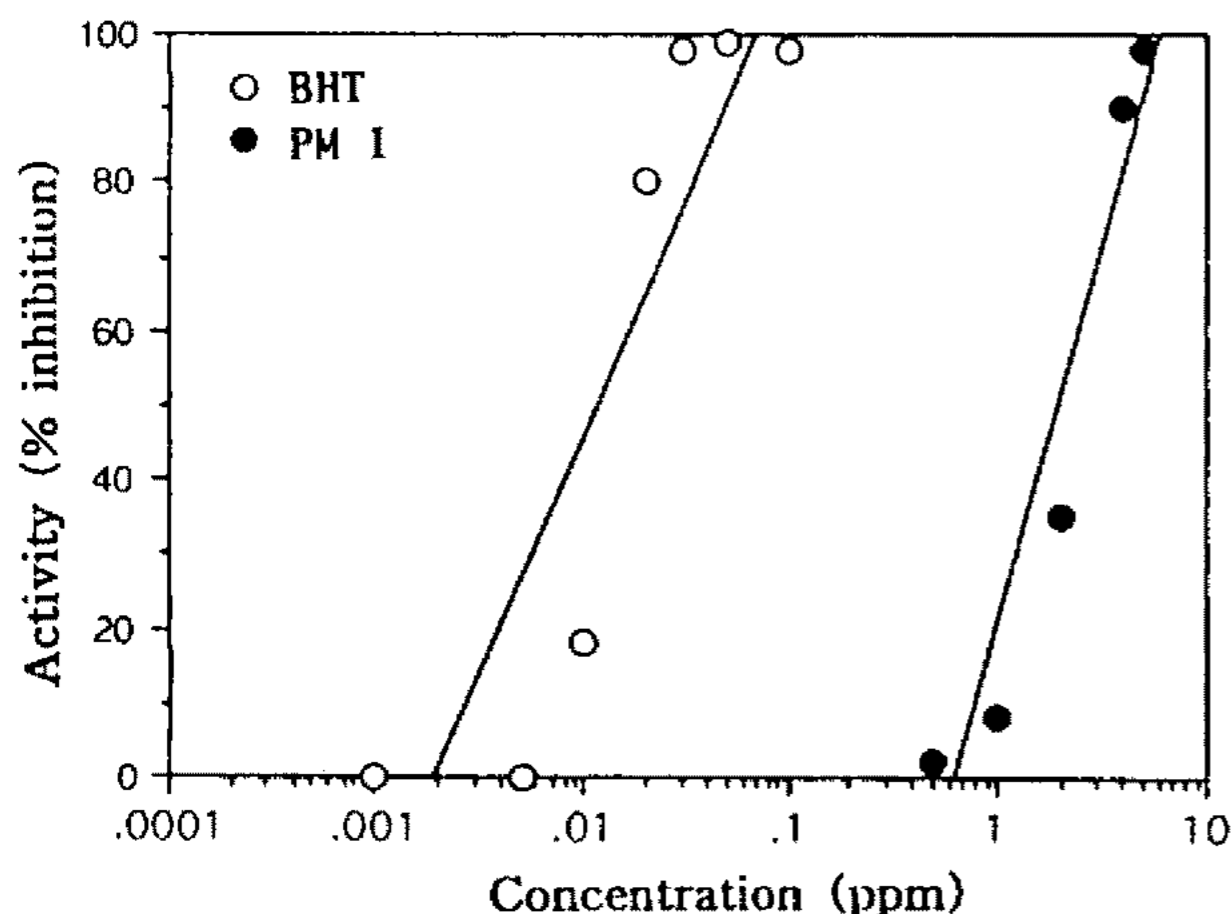


Fig. 6. The inhibitory activity of PM1 on lipid peroxidation. -○- BHT, IC₅₀=0.012 ppm, -●- PM1, IC₅₀=1.96 ppm

128.08, 130.03 및 130.24 ppm에서 methine carbon peak가 관측되었으며, δ180.2 ppm의 4급 carbon은 carboxyl group에서 유래되는 것으로 추정되었다. 또한 δ 20.0에서 40.0 ppm 사이의 중첩된 methylene peak가 관측되어 이 화합물은 불포화지방산의 일종인 것으로 판단되었다. EI-MS spectrum의 분석결과 분자 ion peak가 m/z 280에서 관측되었으며 MS library와 ¹H- 및 ¹³C-NMR spectra library(18)를 검토한 결과 PM2는 linoleic acid로 동정되었다.

PM3 화합물은 ¹H- 및 ¹³C-NMR 분석 결과 PM2와 매우 유사한 양상을 나타내었다. 즉, ¹H-NMR에서 methyl triplet(δ0.88 ppm) 및 vinylic proton(δ5.34 ppm, 2H)이 관측되었으며 ¹³C-NMR spectrum에서는 δ14.13 ppm의 methyl carbon peak, δ20.0에서 40 ppm 사이의 중첩된 methylene carbon, δ129.73과 130.03 ppm의 methine carbon peak 및 δ180.36 ppm의 carbonyl carbon이 관측되었다. 또한 ¹H- 및 ¹³C-NMR에서의 vinylic H와 C의 수로 보아 1개의 double bond를 가질 것으로 생각되었다. 이상의 결과로 미루어 PM3 역시 불포화 지방산의 일종인 것으로 생각되었으며, EI-MS 결과 ([M]⁺=m/z 282)와 MS library, 그리고 ¹H- 및 ¹³C-NMR spectra library(18)와 비교해 본 결과 oleic acid로 동정되었다.

지질과산화 저해활성

양성대조구로 사용된 BHT와 분리한 PM1, PM2 및 PM3중 활성이 제일 강한 PM1 화합물의 지질과산화 저해활성을 Fig. 6에 나타내었다. BHT의 IC₅₀ 값은 0.01 ppm이었으며 PM1, PM2, PM3의 IC₅₀ 값은 각각 1.96 ppm, 37.5 ppm, 10.1 ppm으로 유기합성 항산화제인 BHT와 비교해 볼 때 활성이 비교적 약한 편이었다. 그러나, Shinya(19)등이 보고한 tocopherol의 IC₅₀ 값이 10.8 ppm이라는 사실과 비교해 볼 때 PM1은 tocophe-

rol보다 5배 정도 활성이 강한 것으로 나타났다.

독성 및 안전성

PM1을 암수 ICR mouse에 500 mg/Kg의 용량으로 경구투여한 결과, 투여 후 12일까지 일반적인 증상에 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. 또한 시료 투여 후 12 일째에 용매대조군과 함께 부검한 결과 심장, 위장, 비장, 간, 소장, 대장, 신장, 폐, 흉선등 모든 내부장기가 정상이었으며 아무런 이상도 발견할 수 없었다. 따라서 PM1의 경구투여에 의한 mouse에 대한 LD₅₀ 값은 500 mg/Kg 이상으로 판단되었다.

요 약

담자균류로부터 지질과산화 저해물질을 탐색하던 중 강원도 오대산 지역에 자생하는 버섯의 한 종류로부터, Sparague-Dawley계 rat의 간 mirosome 분획의 지질과산화를 강하게 억제하는 물질이 있음을 발견하였다. 이 버섯의 미생물학적 특성을 관찰한 결과 민주름버섯목, 굴뚝버섯과에 속하는 까치버섯(*Polyozellus multiplex*)으로 동정하였으며 본 버섯의 자실체 methanol 추출물을 benzene, ethylacetate로 순차적으로 추출하고 각종 chromatography를 이용하여 활성물질을 정제한 결과, ethylacetate층으로 부터 항산화활성을 나타내는 PM1을 benzene층으로 부터 지방산 계열의 PM2와 PM3 화합물을 순수하게 분리 정제하였다. PM1은 정색반응 및 각종 기기분석 결과 telephoric acid계의 화합물로 동정되었으며 PM2 및 PM3는 각각 linoleic acid와 oleic acid로 동정되었다. 지질과산화 활성물질로 분리정제한 PM1 화합물의 IC₅₀ 값은 1.96 ppm이었으며 LD₅₀ 값은 500 mg/Kg 이상이었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처에서 지원한 선도기술개발사업 (G7) 연구비지원에 의해서 수행되었음을 밝히며 이 자리를 빌어 감사드린다.

참고문헌

1. Kawagishi, H., R. Inagaki, T. Kanao, T. Mizuno, K. Shimura, H. Ito, T. Hagiwara and T. Nakamura. 1989. Fractionation and antitumor activity of the water insoluble residues of *Agricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* **186**: 267-273.
2. Kohda, H., W. Tokumoto, K. Sakamoto, M. Fujii, Y. Hirai, K. Yamasaki, Y. Komoda, H. Nakamura, S. Ishihara and M. Uchida. 1985. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm.*

- Bull.* **33**: 1367-1374.
3. Hikino, H. and T. Mizuno. 1989. Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* **55**: 385.
 4. Suzuki, H., K. Iiyama, O. Yoshida, S. Yamazaki, N. Yamamoto and S. Toda. 1990. Structural Characterization of the immunoactive and Antiviral Water-solubilized Lignin in an Extract of the Culture Medium of *Lentius edodes* Mycelia (LEM). *Agric. Biol. Chem.* **54**: 479-487.
 5. Harland, W.A., J.D. Gilbert and C.J.W. Brooks. 1973. Lipids of human atheroma VIII, Oxidised derivatives of cholesteryl linoleate. *Biochim. Biophys. Acta.* **316**: 378-385.
 6. Rowley, D., J.M.C. Gutteridge, D. Blake, M. Farr and B. Halliwell. 1984. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin. Sci.* **66**: 691-695.
 7. Branen, A.L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxy toluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**: 59-63.
 8. Largent, D.L. 1981. How to identify mushrooms to genus I. Macroscopic features, Pp. 1-50. Mad River press, California.
 9. Largent, D.L. 1981. How to identify mushrooms to genus III. Microscopic features, 2) Laboratory techniques. Pp. 3-27. Mad River press, California.
 10. Clinton J.D. 1984. Biological techniques for Transmission and Scanning Electron Microscopy, Ladd Research Industries, Pp. 301-303. Inc. Burlington, U.S.A.
 11. Ohkawa, H., N. Ohish and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351-358.
 12. Alexander, H.S. and E.M. Elizabeth. 1947. The *Cantharellus* in the Western United States. *Mycologia* **39**: 494-534.
 13. Bigelow, H.E. 1978. The *Cantharelloid* fungi of new England and adjacent areas. *Mycology* **70**: 707-712.
 14. 농촌진흥청, 1987. 굴뚝버섯과, 한국산 버섯류 원색도감(I), Pp. 223. 농업기술연구소, 농촌진흥청.
 15. Imazeki R. and T. Hongo. 1989. Thelephoraceae, Pp. 122-128. In Colored illustrations of mushrooms of Japan vol. II, Hoikusha publishing Co., Ltd, Japan.
 16. Corner, E.J.H., F.R.S. Corner, and F.L.S. Corner. 1966. *Cantharellus*, Pp. 28-82. in A monograph of *Cantharelloid* fungi, Oxford university press, England.
 17. Gripenberg, J. 1960. Fungus pigments-XII, The structure and synthesis of thelephoric acid. *Tetrahedron* **10**: 135-143.
 18. Charles, J. Pouchert, Behnke, J. 1993. Pp. 782-785: The Aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra vol. I, Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A.
 19. Shin-ya K., Y. Hayakawa, H. Seto. 1993. Structure of Benthophoenin, a new free radical scavenger produced by *Streptomyces prunicolor*. *J. Natural Products.* **56**: 1255-1258.

(Received 9 May 1996)