

표고버섯 균사체로부터 항암 단백다당체의 추출 및 정제

박기문·이병우*

성균관대학교 식품생명자원학과, *백광 C&S

Extraction and Purification of Antitumor Protein-bound Polysaccharides from Mycelia of *Lentinus edodes*

Ki-Moon Park and Byung-Woo Lee*

Department of Food and Life Science, SungKyunKwan University, *Pack Kwang C&S

Abstract

Korean *Lentinus edodes* SR-1 was cultured to multiply the mycelia in the complete broth medium (C/N=13.1) for mushroom, and protein-bound polysaccharides were extracted from the cultured broth containing mycelia (The whole cultured broth was used to increase the yields: 80% of protein-bound polysaccharides were existed at the cell wall of mycelia and 20% of those were secreted extracellularly in this culture). Protein-bound polysaccharides in the cultured broth containing mycelia were extracted by using three different methods: 1) Extraction with hot water, 2) Disintegration of cell wall by glass bead mill treatment before extraction with hot water, and 3) Cellulase treatment before extraction with hot water. The highest yield was obtained (930 mg polysaccharides/100 mL culture broth) when protein-bound polysaccharides were extracted with 2) method. The extracted crude protein-bound polysaccharides were purified using protease, DEAE-cellulose and Sephadex G-100. The growth inhibition activity for P₃₈₈, mouse leukemic cell, increased (53.7, 62.2, 93.7% and 97.4%) as the purification level increased. Protein-bound polysaccharides contained 46.1% of polysaccharides, 7.3% of protein, and trace amounts of minerals. Polysaccharides contained glucose, galactose, xylose and mannose. The content of proline and glycine were high, however, methionine and leucine were not found. The major minerals were Na, K, Zn, and Ca.

Key words: *Lentinus edodes*, mycelia, protein-bound polysaccharides, extraction method, growth inhibition activity

서 론

최근 여러종류의 버섯에서 항암효과와 혈중콜레스테롤 저하 효과등이 있다는 것으로 알려진 이래 버섯류의 생리활성 물질에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 그 중 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 분리된 고분자 β -1, 3 glucan인 lentinan⁽¹⁾과 *Coriolus versicolor*의 배양균사체로부터 얻어진 단백다당체인 PS-K^(2,3)가 항암성을 가지고 있으며 이외에 *Ganoderma lucidum*⁽⁴⁾, *Lepiota procera*⁽⁵⁾ *Grifola frondosa*⁽⁶⁾, *Lyophyllum umulmarium*⁽⁷⁾, *Ganderma applanatum*⁽⁸⁾, *Pleurotus ostreatus*⁽⁹⁾ 등으로부터 분리한 단백다당체도 항종양 효과를 가진것으로 알려져 있다. 이중 표고버섯(*Lentinus edodes*)은 참나

무류, 밤나무,서어나무등의 활엽수에 기생하는 담자균류 주름버섯목 느타리과에 속하며 향미성분과 약리효과를 가지고 있어 국내에서도 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있다⁽¹⁰⁾. 표고버섯의 약리효과는 균사체(mycelium) 및 자실체(fruiting body)에 존재하는 성인병 예방과 인터페론 생성을 촉진하는 단백다당체가 종양에 대한 생체 고유의 방어력을 높여줌으로서 간접적으로 종양세포의 증식을 저해하거나⁽¹¹⁾, 암세포나 병원성균을 직접 사멸시키는 중요한 역할을 담당하는 대식세포의 수를 증가시키는 작용을 하는 것으로 보고되어 있다⁽¹²⁾. 이러한 단백다당체는 주로 균사체에 많이 존재하며 바이러스성 질병에 스스로 방어하고 인터페론과 같은 항체생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다^(13,14).

일반적으로 미생물이 생성하는 다당류는 세가지 형태 즉, 세포내다당, 구조다당, 세포외다당으로 구분되

Corresponding author: Ki-Moon Park, Department of Food and Life Science, SungKyunKwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do 440-746, Korea

어 있으며 세포내다당은 에너지의 저장 역할을 하고, 세포외다당은 세포벽의 일부로서 세포벽 주위의 협막을 형성하거나 세포벽 외부의 접질물질로서 발효중 축적되는 다당류이고, 구조다당류는 세포벽의 주요 구성성분인 그람음성 세균의 리포다당, 효모의 β -glucan이나 곰팡이류의 α 및 β -glucan 등으로 세포의 형태를 유지하는 다당류이다⁽¹⁵⁾. 따라서 이러한 항암효과를 나타내는 단백다당체를 생산하기 위하여 1차적으로 균사체를 대량으로 배양하여야 하며 그 배양법 및 배양조건에 대해서는 전보⁽¹⁶⁾에 보고하였다. 표고버섯 균사체에 존재하는 단백다당체는 구조다당류의 형태로서 세포벽을 구성하는 물질로 이 유용물질을 세포벽으로부터 얻기 위하여 효과적인 추출 방법을 고려하여야 한다. 균사체로부터 단백다당체의 추출방법으로는 화학적 방법과 기계적 방법으로 나누어지며, 화학적 방법은 알카리처리, 열수처리, 효소처리, 세제처리, 삼투압 처리등이 있고, 기계적 방법은 liquid shear, 마멸교반등으로 이 방법 중 공업적 규모로 사용할 수 있는 것은 liquid shear를 이용한 homogenizer나 마멸교반을 이용한 bead mill 등이 있다⁽¹⁷⁾. 현재 사용되고 있는 대부분의 단백다당체 추출방법은 기계적 추출방법보다는 열수추출을 한후 과량의 극성용매(ethanol, methanol)를 가하여 침전시키는 방법을 사용하고 있다^(18,19). 따라서 본 연구에서는 한국산 표고버섯을 사용하여 액체배양법으로 생산된 균사체로부터 단백다당체를 가장 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 검토하였으며, 여기서 분리된 단백다당체를 순수 단일 물질로 정제한 후 그 구성성분을 분석하였고 또한 정제도에 따른 항암세포 증식억제 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 암세포

본 실험에 사용한 표고버섯 균주는 버섯 종균 배양소(금성농산)에서 구입한 산련 1호 균주(*Lentinus edodes* SR-1)를 사용하였으며, 단백다당체의 정제도에 따른 항암력을 실험하기 위해 mouse leukemic cells인 P₃₈₈을 사용하였다.

버섯균사체의 배양

버섯균주는 PDA (potato dextrose agar) 배지⁽²⁰⁾에 보존하였으며, 종균용 배지로 TGY 배지⁽²¹⁾를 사용하였고, 액체 배양용 배지는 버섯 완전배지(mushroom complete medium)⁽¹⁷⁾의 C/N 비를 13.1로 하여 배양온도 25°C, 초기 pH 4.0, 교반속도 300 rpm, starter 접종

량 10%, 공기 통기량 1 vvm으로 50 L 발효조를 사용하여 7일간 배양 후 생성된 L당 18.8 g (건물 기준)의 균사체를 사용하였다.

단백다당체의 추출

배양이 완료된 배양액을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 여액은 감압농축기로 10배 농축한 후 3배의 에탄올을 가하여 4°C에서 하루밤 동안 방치하여 추출하였으며, 원심분리 후 회수된 균사체는 2배가량의 물을 첨가한 다음 100°C에서 3시간 정도 가열한 후 상기와 같은 방법으로 추출하였다. 그리고, 배양액 전체에서 단백다당체의 추출은 Fig. 1과 같이 실시하였다. 배양액을 여러 추출방법에 따라 추출한 후 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 상징액을 감압농축하고, 농축물을 3배 정도의 ethanol을 가하여 4°C에서 하루밤 방치하였다. 방치후 생성된 침전물을 원심분리한 다음 증류수에 녹여 상기의 추출 조작을 2회 반복한 후 동결건조하여 단백다당체를 분리하였다.

추출 방법에 따른 단백다당체의 수율을 비교하기 위하여 Fig. 1과 같이, 열수추출은 배양액을 100°C에서 시간별(30분 간격)로 추출한 다음 단백다당체를 분리하였으며, glass bead mill (Type KDL-Special, Swiss) 추출은 배양액을 0.25~0.5 mm의 크기인 glass bead로 30분간 분쇄한 후 열수추출을 하였다. 또 배양액에 cellulase (Novo, cellucalact -1.5)를 농도별로 첨가하고 pH 5.0, 온도 50°C에서 1시간 효소반응 시킨 후 열수로 단백다당체를 추출하였다.

단백다당체의 정제 및 확인 실험

단백다당체의 정제: Fukuda⁽²²⁾의 방법에 따라 조단백다당체 약 30 g을 증류수 1,500 mL에 녹이고 pH

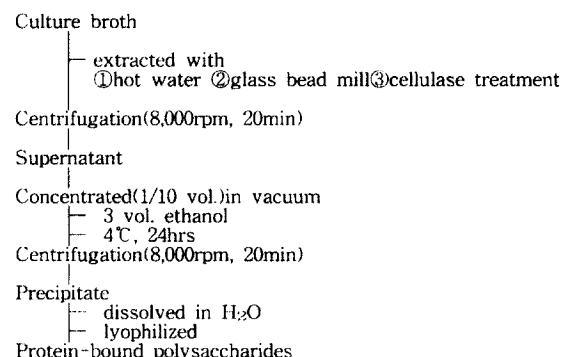


Fig. 1. Extraction procedures of the protein-bound polysaccharides from the culture broth of korean *Lentinus edodes* SR-1.

7.0으로 조정한 후, protease (Novo, Neutrase) 100 mg를 넣고 37°C에서 6시간 반응시킨 다음, 100°C에서 5분간 끓이고 농축하였다. 여기에 40% trichloroacetic acid를 가하여 최종농도를 10% 되게하고, 4°C에서 하룻밤 방치한 후 Fig. 1과 같이 원심분리, 농축 및 에탄올 처리한 후 침전물을 회수하였다. 1차 정제를 위하여 DEAE-cellulose (capacity: 0.85 meq/g)를 3차 중류수에 혼탁시킨 다음 수지의 약 10~15배의 0.5 M HCl로 세척하고 여과한 후, 같은 방법으로 3차 중류수, 0.5 M NaOH, 3차 중류수로 세척하고 0.05 M 인산완충액(pH 6.9)으로 column (2.5×40 cm)에 충진시켰다. 여기에 상기의 단백다당체(5,000 mg/20 mL)를 넣고 0.05 M 인산완충액, 0.5 M NaCl을 함유한 0.05 M 인산완충액 및 0.5 N NaOH로 흡착된 단백다당체를 용출하였다. 용출한 단백다당체는 2차 정제를 위하여 Sephadex G-100을 3차 중류수에 팽윤시킨 후 기포를 제거하고 column (2.0×40 cm)에 충진한 후 0.3 M NaCl을 함유한 0.3 M 초산으로 평형화 시키고 동일 용액으로 용출시켰다.

단백다당체의 확인: 단백다당체의 정제도를 확인하기 위하여 Chromarod S-3(silica gel powdercoated)에 1 μL (sample을 H₂O로 회석)의 시료를 점적하고 건조시켜 전개용매(CHCl₃, 100%)로 10 cm 전개 후 120°C에서 1분간 건조시켜 TLC/FID analyser (Iatroskan MK-5, Japan)로 scanning하였다.

단백다당체의 항암실험

정제과정 중 각 단계별 추출 단백다당체의 항암성을 확인하기 위하여 Mouse leuke mic cells인 P₃₈₈을 Fischer's medium^(23,24)을 사용하여 medium 1 mL 당 각 단백다당체를 1 mg첨가한 후 Fischer 와 Sartorelli법⁽²⁵⁾으로 24시간 배양하여 세포수를 coulter counter (ZBI, USA)로 측정하였다.

단백다당체의 화학적 분석

다당류의 함량은 폐놀-황산법⁽²⁶⁾을 이용하여 분석하였으며 구성단당류의 분석은 0.1 N HCl로 가수분해시켜 건조한 후 pyridine 50 μL, hexamethyldisilazane 45 μL, trifluoroacetic acid 5 μL를 넣고 35°C에서 1시간 반응시킨 다음 gas chromatography (Shimadzu, GA-14, Japan)로 분석하였다. 그리고 단백질의 함량은 Kjeldahl법으로 측정하였으며, 구성 아미노산은 6 N-HCl로 용해시켜 질소를 충진한 후 밀봉하여 110°C에서 가수분해시켰다. 분해물을 여과하여 침전물을 제거한 다음 감압농축한 후 건조시켜 HPLC (Water 510, USA)로

분석하였다. 그 외에 무기질 함량은 건조시료 0.1 g에 전한황산 5 mL를 가하고 분해시킨 다음 3차 중류수를 이용하여 100 mL로 조정한 후 Toyo No. 2로 여과하고 여액을 Inductively coupled plasma (Plasma-8840, Labtan, Australia)로 분석하였다.

결과 및 고찰

배양액으로부터 단백다당체의 추출

발효가 끝난 배양액을 다음 3단계: (1) 원심분리후 여액에서 (2) 원심분리 후 균사체에서 (3) 배양액 전체로부터 단백다당체의 추출을 Fig. 1과 같이 하여 1시간 동안 열수추출을 한 후 수율을 비교한 결과 (1)의 경우 0.12±0.01%, (2)의 경우 0.55±0.04% 그리고 (3)의 경우 0.69±0.08%로 단백다당체가 존재하였으며 배양액 전체에서 추출한 것이 690 mg/100 mL로 가장 많았다. 또 이들 구성 단당류의 pattern을 비교한 결과, Fig. 2와 같이 동일한 pattern을 나타내었다. 따라서 배양 후 단백다당체 회수를 위한 각 단계별 수율비교에서 회수된 전체 단백다당체 중 균사의 세포벽에 약 80%의 단백다당체가 함유되어 있는 것으로 밝혀졌으며 Chihara⁽¹⁾, Takehara^(12,13) 등이 보고한 균사의 세포벽중에 80~90%에 해당하는 다당류가 함유되어 있다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타내었다. 그리고 표고버섯 균사체의 경우 발효과정 중 단백다당체 성분의 약 20% 정도가 균체밖으로 유출되는 것으로 나타나 단백다당체의 추출은 전체 배양액을 이용하는 것이 효과적이라 사료되었다.

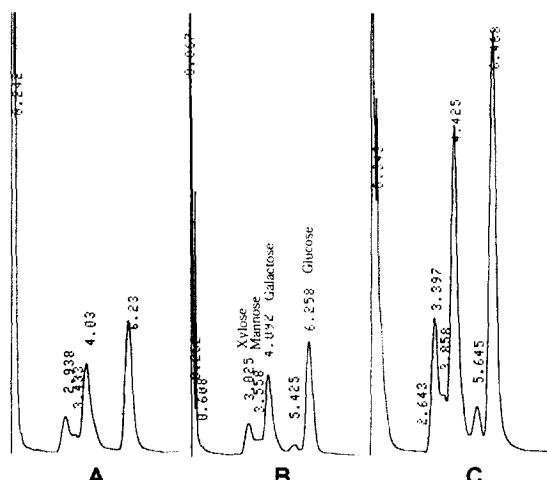


Fig. 2. Gas chromatogram of monosaccharide of the protein-bound polysaccharide extracted from mycelia (A), filtrate (B) and culture broth (C).

추출방법에 따른 단백다당체의 함량

추출방법에 따른 단백다당체의 추출함량은 Fig. 3과 같이 추출매체인 열수를 사용하여 30분 간격으로 단백다당체를 추출한 결과, 추출시간이 경과 할수록 단백다당체의 수율은 증가하지만 추출 2시간 이후부터는 수율 변화가 없었다. 그리고 추출매체로 glass bead 을 이용하여 균사체를 먼저 30분간 파쇄시킨 후 파쇄된 균사체를 30분 간격으로 열수추출하여 단백다당체 를 추출한 결과 추출시간 60분일때 단백다당체의 수율 이 930 mg/100 mL로 가장 높았으며 추출시간이 경과 하면서 수율은 감소하였지만 열수추출에 비하여 수율 이 평균 16.8% 증가함을 알 수 있었다. 또 Cellulase를 0.1, 0.5, 1.0% (v/v) 농도별로 처리한후 1시간 동안 열수추출하여 단백다당체의 수율을 비교한 결과는 Fig. 3과 같이 효소 0.5%를 사용하였을 때 770 mg/100 mL 의 단백다당체를 얻었지만 glass bead 추출보다 효과가 낮음을 알 수 있었다. 일반적으로 단백다당체는 다당류와 단백질의 결합으로 그 중심부인 polypeptide 사슬에 2~6 종류의 단당류가 결합되어 있으며 친수성이 많이 있는 다분산계로 생체성분과 강하게 결합되어 있어 단백다당체의 추출은 주로 열수, 유기용매, 산, 또는 일칼리용액등으로 추출하지만 열수를 이용한 방법을 많이 사용하고 있다^(18,27). 열수만을 사용하는 경우 추출

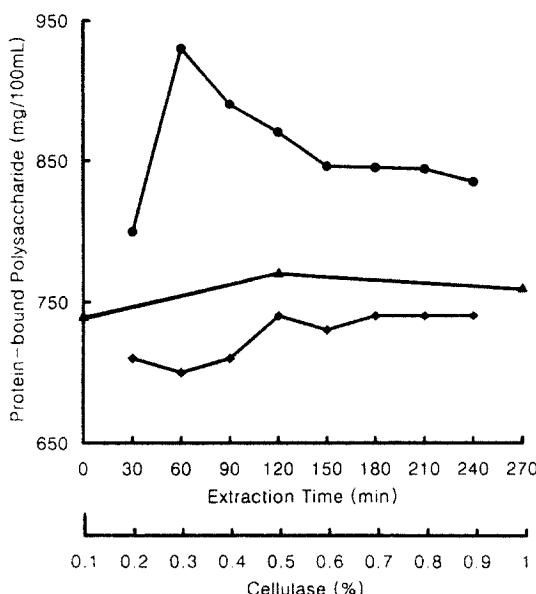


Fig. 3. Effect of different extraction methods on protein-bound polysaccharide yield. ◆◆: Extraction with hot water, ●●: Extraction with hot water after glass bead mill treatment, ▲▲: Extraction with hot water after cellulase treatment.

능력은 약하고 추출시간이 길다는 단점이 있으나 대량 추출이 용이하다는 장점을 가지고 있기 때문에 버섯류의 단백다당체 추출은 Fig. 3에서와 같이 우선 glass bead mill 등의 물리적인 방법으로 균사체의 세포막을 파쇄한 후 열수로 60분 정도 가열 추출하는 것이 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다.

단백다당체의 정제 및 확인

단백다당체의 정제: 배양액에서 회수한 단백다당체를 protease 처리하여 사용 원료량에 비해 약 21.2% 감소한 27.2g의 단백다당체를 회수하였다. 그중 5 g을 DEAE-cellulose column chromatography한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 3가지 다당류 peak가 나타났으며, 이중 가장 높은 peak의 분획(No.15-22)에서 500 mg을 회수하여 Sephadex G-100으로 겔 여과하였다. 그 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 하나의 활성 peak 가 나타났으며 이 분획(No. 18~23)을 모아서 농축한 후 3배의 ethanol을 가하여 침전시킨 다음 침전물을 동결건조시켰다. 그리고 정제과정중 각 단계별 추출 단백다당체에 대한 항암성의 조사는 mouse leukemic cell인 P₃₈₈을 사용하여 24시간 배양한 후 세포수를 계수한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 대조구 8.2 × 10⁴ cells/ml에 대하여 조단백다당체, protease처리 단백다당체, DEAE-cellulose peak, Sephadex G-100 분획

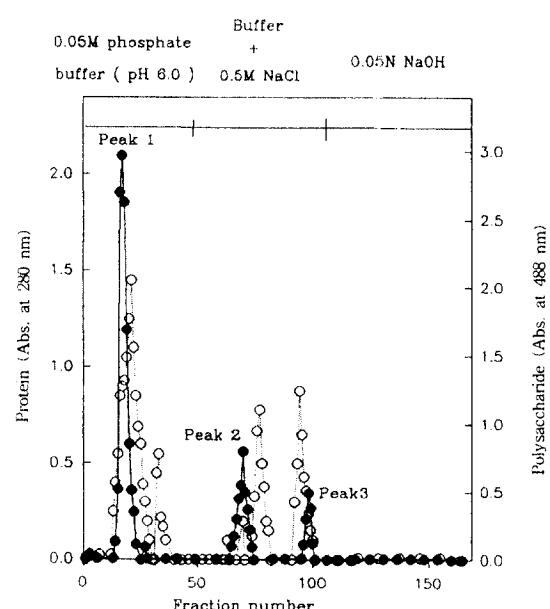


Fig. 4. DEAE-cellulose column chromatography of crude protein-bound polysaccharide. ●●: polysaccharide, ○○: protein

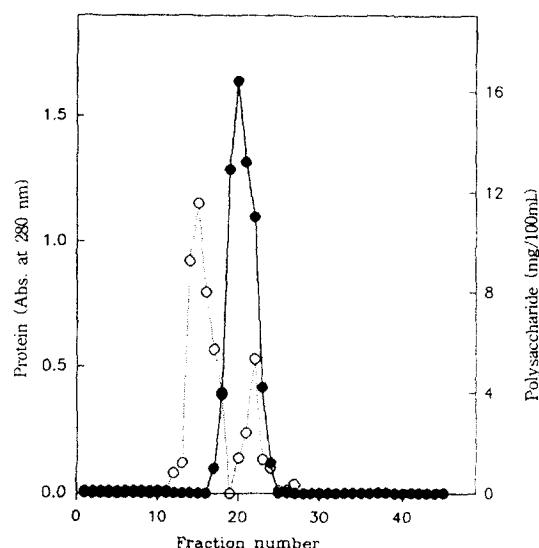


Fig. 5. Gel filtration on Sephadex G-100 column chromatography. ●—●: polysaccharide, ○—○: protein.

Table 1. Comparison of growth inhibition of $P_{388}^{(1)}$ and yield of protein-bound polysaccharides by purification levels of korean *Lentinus edodes* SR-1

Preparations	Cell growth ²⁾ cells/ml	Growth inhibition		Yield mg
		%		
Crude protein-bound polysaccharides	3.8×10^4	53.7		34,570
Protease treatment	3.1×10^4	62.2		27,230
DEAE-cellulose column chromatography				
Peak-1	5.2×10^3	93.7	2,180	
Peak-2	-	-	230	
Peak-3	-	-	149	
Sephadex G-100 column chromatography				
Peak-1	2.1×10^3	97.4	273	

¹⁾Control cell number: 8.2×10^4 cells/ml

²⁾Incubation time: 24 hours

에서 각각 3.8×10^4 과 3.1×10^4 , 5.2×10^3 , 2.1×10^3 cell/ml로 나타나 정제 정도에 따라 암세포의 감소율은 53.7, 62.2, 93.7, 97.4%로 나타나 항암효과가 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 단백다당체의 glucan 함량이 높을수록 항암력이 높아진다는 보고⁽²⁸⁾에 따른 protease 처리에 의하여 조단백다당체 보다 glucan 함량이 높아진 것과 정제도에 따른 결과로 사료된다.

단백다당체의 확인

단백다당체의 정제 정도를 확인하기 위하여 TLC/FID chromatography한 결과 Fig. 6과 같이 조단백다당

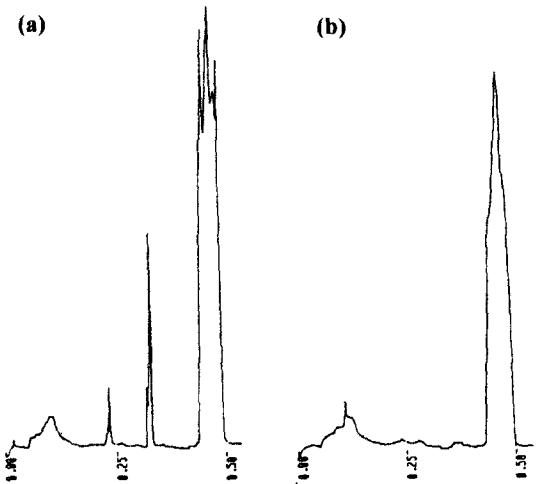


Fig. 6. TLC/FID analyser chromatogram of protein-bound polysaccharide. a: Crude protein-bound polysaccharide, b: Purified protein-bound polysaccharide

체에서 3개의 peak가 나타났으나, 정제된 단백다당체에서는 하나의 peak만을 확인할 수 있어 정제된 단백다당체가 순수한 물질임을 확인할 수 있었다.

단백다당체의 성분 분석

다당류의 함량 및 구성 단당류: 단백다당체의 다당함량을 조사한 결과 46.1%로, 그들의 구성 단당류의 조성은 Table 2와 같이 glucose, galactose, xylose, mannose 등의 순으로 주로 5, 6탄당으로 이루어짐을 알 수 있었다.

단백질의 함량 및 구성 아미노산: 단백다당체의 단백질함량은 7.28%로, 그들의 구성 아미노산 조성은 Table 3과 같이 proline이 가장 많았으며 glycine, arginine, serine, threonine, lysine 등의 순으로 많이 함유하고 있는 것으로 나타났고 methionine, leucine는 거의 없었다.

무기물의 조성: ICP로 단백다당체의 무기물을 분석한 결과는 Table 4와 같이 Na, K, Zn, Ca, Mg 등의 순

Table 2. Compositions in the protein-bound polysaccharides extracted from the culture broth of korean *Lentinus edodes* SR-1

Monosaccharide	Contents (%) ¹⁾
Glucose	44.1 ± 0.8
Galactose	35.4 ± 0.7
Mannose	3.2 ± 0.1
Xylose	17.3 ± 0.4

¹⁾Mean \pm SD of 3 experiments.

Table 3. Amino acid compositions in the protein-bound polysaccharides extracted from the culture broth of korean *Lentinus edodes* SR-1

Amino acids	% ^{1,2)}	Amino acids	%
Asparatate	3.53±0.11	Serine	7.99±0.17
Histidine	1.55±0.06	Proline	27.67±0.97
Threonine	7.28±0.29	Valine	4.23±0.04
Cysteine	0.85±0.03	Isoleucine	4.21±0.09
Glycine	15.21±0.30	Arginine	8.37±0.24
Alanine	4.89±0.09	Tyrosine	1.48±0.03
Methionine	-	Leucine	-
Phenylalanine	3.01±0.06		

¹⁾percentages based on the total peak area.

²⁾Mean±SD of 3 experiments.

Table 4. Mineral compositions in the protein-bound polysaccharide extracted from the culture broth of korean *Lentinus edodes* SR-1

Minerals	mg/100 g ¹⁾	Minerals	mg/100 g
Ca	18.1±0.5	Mg	15.7±0.4
Cu	0.5±0.1	Mn	0.2±0.0
Fe	5.3±0.3	Na	464.0±17.6
K	280.0±10.7	Zn	29.0±0.9

¹⁾Mean±SD of 3 experiments

으로 함유하고 있었다.

요 약

한국산 표고버섯 산련 1호를 C/N비가 13.1인 버섯 완전액 체배지에서 배양하여 균사체를 증식시킨 후 생리활성을 보이는 단백다당체를 추출하였다. 표고버섯 균사체 액체배양시 생성되는 단백다당체는 균사체 세포벽에 약 80%가 존재하고, 약 20%정도는 세포밖으로 분비하는 것으로 나타나 단백다당체의 추출은 균사체가 함유된 배양액 전체를 이용하여 추출하는 것이 높은 수율을 얻을 수 있었다. 그리고 균사체로부터 단백다당체의 추출방법으로 열수추출 및 glass bead mill로 세포벽을 파쇄한 후 열수추출, cellulase 처리 후 열수추출을 비교한 결과 물리적으로 세포벽을 파쇄한 후 60분간 열수추출하는 것이 배양액 100 mL 당 약 930 mg의 조단백다당체가 추출되어 수율이 가장 높았다. 추출한 조단백다당체를 사용하여 protease 처리, 그리고 DEAE-cellulose 및 Sephadex G-100 column chromatography를 통하여 단백다당체를 정제한 후 단계별 시료에 대한 mouse leukemic cell인 P₃₈₈의 증식억제는 53.7, 62.2, 93.7, 97.4%로 정제도가 높아짐에 따라 증가하는 것으로 나타났다. Sephadex G-100 column으로 처리한 정제 단백다당체를 TLC/FID로 분석한 결과

단일 peak로 나타나 순수물질임을 확인하였다. 그리고 단백다당체의 성분을 분석한 결과 다당함량은 46.1%로 구성단당류는 glucose 및 galactose, xylose, mannose로 구성되어 있었고, 단백질은 약 7.3%로 주로 proline 및 glycine의 함량이 높았으며 methionine 및 leucine은 거의 없는 것으로 밝혀졌다. 그외에 무기질로서 Na, K, Zn, Ca 등이 존재하는 것으로 나타났다.

문 헌

- Chihara, G., Hamuro, J., Meada, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.: Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (berk) sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776-2781 (1970)
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F.: Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma ah-13 by oral use. *Gann*, **65**(12), 577-585 (1974)
- Lee, B.W., Lee, M.S., Park, K.M., Kim, C.H., Ahn, P.U. and Choi, C.U. : Anticancer activity of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor* (in Korean). *Korean J. Appl. Microbiol. Biootechnol.*, **20**(3), 311-315 (1992)
- Yoshiaki, S., Noriko, W. and Akira, M. : Structural and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agri. Biol. Chem.*, **49**(9), 2641-2653 (1985)
- Kim, B.K., Shim, M.J., Kim, O.N., Kim, H.W. and Choi, E.C.: Antitumor components of the cultured mycelia of *Lepiota procera* (in Korean). *Korean J. Food Hygiene*, **4**(2), 109-118 (1989)
- Tizuno, T., Ohawa, W. and Kuboyama, R.: Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from mitake Grifola frondosa. *Agri. Biol. Chem.*, **50**(7), 1679-1688 (1986)
- Chieko, K., Motohiro, N., Hiroshi, M. and Ikuzo, K.: Structural examination of water-soluble glucans from fruit-body of *Lyophyllum ulmarium* No.2. (studies on constituents of edible fungi) (in Japanese). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, **37**(10), 773-778 (1990)
- Taichih, U., Yoshio, I. and Takashi, M.: Isolation and characterization of antitumor activity β-D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydrate Research*, **115**, 273-280 (1983)
- Yuko, Y., Ryoko, T., Hazime, S., Nobukaki, U. and Funoko, F.: Antitumor polysaccharide from *P. ostreatus* (fr), qual, isolation and structure of a β-glucan. *Carbohydrate Research*, **140**, 93-100 (1985)
- 차동열, 유장현, 김광포: 최신 버섯 재배 기술. 상록사, p. 3-45 (1989)
- Chihara, G.: Immune modulation agents and their mechanisms(Lentinan, a T-cell oriented immunoprotentiator). *NY and Basel*, **19**, 409-436 (1985)
- Takehara, M.: Antiviral activity of virus-like particles

- from *Lentinus edodes* (Shiitake). *Arch Virol.*, **59**, 269-280 (1979)
13. Takehara M.: Antiviral effect of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake) on Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Arch Virol.*, **68**, 297-303 (1981)
 14. Tsunoda, A.: A mushroom extract as an interferon inducer. *Ann NY Acad. Sci.*, **173**, 719-725 (1969)
 15. Lee, S.Y.: Recently research trend and methods of microbial polysaccharide (I) (in Korean). *Microorganism and Fermentation*, **15**(2), 8-16 (1991)
 16. Lee, B.W., Im, G.H., Kim, D.W., Park, K.M., Son, S. H. and Shon, T.H.: Cultural characteristics and pilot scale fermentation for the submerged mycelial culture *Lentinus edodes* (in Korean). *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**(6), 609-614 (1993)
 17. Park, Y.D.: Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelial cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor* (in Korean). *Korean J. Micol.*, **17**(4), 223-228 (1989)
 18. 심미자 : 항암성 다당류의 제조방법. 대한민국 특허공고 84-505 (1984)
 19. 이병우, 임재호, 임근형, 박기문 : 항암성 다당류의 추출 방법. 대한민국 특허출원 92-21873 (1992)
 20. Lee, J.W., Chung, C.H., Jeong, H. and Lee, K.H.: Anticomplementary and antitumor activities of the alkali extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY 105 (in Korean). *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 571-577 (1990)
 21. Lee, J.S., Lee, S.R. and Yu, T.J.: Production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in shaking culture (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **7**(1), 22-29 (1975)
 22. Fukuda, K.: The polysaccharide from *Lampteromyces japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**(9), 1955-1959 (1975)
 23. Hwang, W.I., Lee, S.D., Son, H.S., Baik, N.G. and Ji, R.H.: Effect of fresh garlic extract on the tumor cell growth and immunopotentiating activity (in Korean). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **19**(5), 494-508 (1990)
 24. Bladley, T.R. and Metcalf, D.: The growth mouse bone marrow cell *in vitro*. *Aust. Exp. Biol. Med. Sci.*, **44**, 287-294 (1966)
 25. Fisher, G.A. and Sartorelli, A.G.: Development maintenance assay of drug resistance. *Meth. Med. Res.*, **10**, 247-253 (1964)
 26. 日本食品工業學會 : 食品分析法 (in Japanese). 光林, p. 189-191 (1982)
 27. 暇組治下 : 擬子菌類의 培養方法. 대한민국 특허공고 81-1708 (1981)
 28. Takash, M., Namoni, K., Atsushi, T. and Msako, S.: Fractionation, structural features and antitumor activity of water soluble polysaccharide from reishi the fruit body of *Ganoderma lucidum* (in Japanese). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, **58**(9), 871-880 (1984)

(1998년 10월 14일 접수)