생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
33(3) : 224 ~ 229 (2002)

*Sarcodon aspratus*에서 분리한 수용성 단백다당체의 항암효과

문영희* · 우은란 · 박영준
조선대학교 약학대학

Antitumor Activity of a Water Soluble Proteoglycan Isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito

Young-Hee Moon*, Eun-Rhan Woo, and Young-Jun Park
College of Pharmacy, Chosun University, Gwang-ju 501-759, Republic of Korea

Abstract – *Sarcodon aspratus* (Thelephoraceae), a native mushroom distributed in Korea and Japan has been widely used as a traditional food and folk medicines. Two proteoglycan polysaccharides, named SAP-A and SAP-B were isolated from the fruitbody of *S. aspratus*. Their molecular weight were determined as 6184.9 D, and 25749.2 D, respectively, by maldi-tof ms. The composition of sugar and amino acid of these compounds was also determined. The SAP-A showed potent antitumor activity. The ID_{50} value of SAP-A was 8.2 mg/kg/day for ICR mice transplanted with solid sarcoma-180, and the elongation of life-span effect was 167.4% for ICR mice transplanted with ascitic sarcoma-180. Moreover, the elongation life-span effect of SAP-A increased dose-dependently.

Keywords – *Sarcodon aspratus*, proteoglycan, antitumor activity, sarcoma 180

최근에는 버섯의 식용보다는 항암효과, 면역기능 증강 및 회복제로서의 활용가치가 증가되고 있다.[1-3]

담자균류에 함유된 단백다당체 성분이 숙주에 대해 독작용을 일으키지 않으면서 항종양작용을 나타냄이 보고되었고[4-6] 이러한 항암 성분은 부작용이 거의 없을 뿐만 아니라 식용으로 할 수 있으므로 최근 계속 증가되고 있는 암환자에게 숙주의 면역활성증가에 의한 항암작용 등으로 실용가치가 더욱 높아지고 있다.[7]

한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 Kim[8]등이 구름버섯(*Coriolus versicolor*), 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 및 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 자실체로부터 생쥐의 sarcoma 180에 대해 강력한 항암작용을 나타내는 다당류와 단백질로 구성된 물질을 보고한 이래 Min[9]등은 젖버섯 아제비(*Lactarius hatsudake*), 메꽃버섯(*Polystictus affinis*), Lee[10]등은 노랑다발버섯(*Naematoloma fasciculare*), Kim[11,12] 등은 뽕나무버섯(*Armillariella mella*), 졸각버섯(*Laccaria laccata*), Chung[13]등은 노랑치마아제비버섯(*Pluteus cervinus*), Jin[14]등은 잣버섯(*Lentinus lepideus*), 현[15]은 버들송이(*Agrocybe cylinderacea*)등의 자실체 또는 배양균사체로부터 생쥐 sarcoma 180에 대한 항암작용을 나타내는 단백다당체를 분리 보고하였다.

능이는 굴뚝버섯과(Thelephoraceae)에 속하는 버섯으로 9월 하순부터 10월 초순사이에 활엽수림의 부식이 많은 산지에서 발생하며 균모의 직경은 지름 10~20 cm 크기의 깔때기형을 이루고 있는 대형버섯으로 식용은 물론 민간에서 육류를 먹고 체하였을 때 민간약으로 사용되어 왔고 또한 육류 요리시 사용되어왔던 점에 착안하여 실험한 결과 Lee 등[16]은 다량의 단백질 분해효소가 함유되어 있음을 밝혀냈다. Lee 등[17]과 Eun[18-21]은 자실체중에 함유된 protease 활성이 강함을 발견하고 이를 추출정제하여 그 특성을 연구 보고하였고, Chang[22]은 능이에서 추출한 단백질 분해효소가 폐계에 대한 연육 효과가 있다고 보고하였다.

Kim 등[3]은 능이의 조추출물이 *Helicobacter pylori*의 urease 억제작용이 있다고 보고하였으며, Park[23]은 다당류를 생쥐에 주사하였을 때 sarcoma 180 복수암에 대한 항암작용이 없다고 하였으나, Maruyama 등[24]은 sarcoma 180 고형암에 대하여 메탄올 추출물은 성장억제작용이 없으나 물 추출물은 억제작용이 있다고 보고하였다. 능이의 성분으로는 Park[25]은 glutamic acid 등 유리아미노산 21종, Ca 등 9종의 금속원소와 단백질-다당체가 함유되어 있다고 보고하였다.

*교신저자(E-mail) : yhmoon@chosun.ac.kr

최근 버섯으로부터 분리된 단백다당체의 항암활성이 밝혀짐에 따라 암의 보조치료제외에 생물학적 반응조절제(biological response modifier, BRM)로서 각종 면역 관련 질환의 치료 등에 이용하는 방향으로 연구가 진행되고 있다.

이에 저자는 옛날부터 민간에서 식용 및 약용으로 사용되어 온 능이의 수용성 당단백을 추출하여 항암작용이 있는 당단백을 분리하여 구성당과 아미노산을 분석하였으며, sarcoma 180 고형암 및 복수암에 미치는 효과를 관찰하였기에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험재료 – 능이 *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito는 1999년 10월 초순에 지리산에서 채취한 것을 구입하여 그 기원을 확인하고 음건, 세절한 자실체를 실험재료로 사용하였다.

시약 및 기기 – 표준 단당류는 Aldrich의 The Aldrich Library of Chemical Standards 중 carbohydrate I을 사용하였고, 분자량 측정용 pullulan kit는 Waters Co.에서 구입하였다. Open column chromatography용 resin은 DEAE Sepharose CL-2B, Sephacryl HR S-300 및 Sephadex G series로서 Pharmacia 제품을 사용하였다. HPLC는 recycling preparative HPLC(LC-908), UV detector는 JAIGEL UV detector 310, RI detector는 JAIGEL RI detector RI-5, column은 JAIGEL-GS-620을 사용하였다. Gas Chromatography는 HP-5890를 사용하였으며 column은 SP-2330 (Supelco), injector temp.는 260°C, detector temp.는 280°C의 조건에서 실시하였다. MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) MS는 perseptive analytical elite (U.S.A.)를 사용하였고 software는 grams program을 사용하였다. Photometer-5010은 녹십자사 제품을, Coagulator는 Behnk Electronic사 제품을 사용하였으며 그밖의 시약은 Sigma사 및 일급시약을 사용하였다.

단백다당체 추출 – 음건, 세절한 능이 300 g씩을 증류수(수욕상)와 ethanol로 2회 추출하고 감압농축하여 엑기스를 얻었으며, 또한 능이 800 g을 상온에서 ethanol로 추출한 잔사를 건조시킨 후 수욕상에서 증류수로 2회 추출하여 60°C로 감압상태에서 반 정도로 농축한 뒤 2 배량의 ethanol을 가하여 0°C에서 다당체를 침전시켜 단백다당체 조분획(이하 SAP)을 얻었다.

단백다당체 정제 – Sepharose CL-2B에 loading하고 0.5 M NaCl 용액으로 흘려서 세분획후 membrane으로 탈염시켜, 비슷한 크기의 분자량을 가지는 단백다당체 분획을 모으고, 다시 증류수에 녹인 후 Prep-HPLC에 loading하여 RI와 UV detector로서 peak 양상을 계속 관찰하면서 sharp한 peak가 나올때까지 recycling하여 SAP-A와 SAP-B를 얻었다.

분자량 측정 – HPLC를 이용하여 standard pullulan (5.9 KD~112 KD)으로 검량곡선을 작성하고 분리한 다당류의 개략적인 분자량을 측정한 후 MALDI-TOF MS를 이용하여 정제된 다당류의 분자량을 상법에 의하여 확인하였다.[26,27] 즉 SAP-A와 SAP-B를 30°C 진공하에서 24시간 방치하여 수분을 제거한 후 시료로 하였으며, matrix는 DHB (dihydrobenzoic acid)를 사용하였다. Matrix solution의 제조는 5 mM의 물과 에탄올(2:1, v/v)과 29 mM의 formic acid : water : 2-propanol (1:3:2, v/v/v)을 병용하여 사용하였으며, matrix solution을 만들 때 녹지 않은 DHB를 제거하기 위하여 700 g로 원심분리시킨 상등액을 사용하였다. 또한 당 sample의 solution에도 5 mM의 물과 에탄올(2:1, v/v)과 29 mM의 formic acid : water : 2-propanol (1:3:2, v/v/v)을 병용하여 사용하였으며, sample solution을 만들 때에도 미량의 녹지 않은 당을 제거하기 위하여 700 g로 원심분리시키고 상등액을 sample solution으로 하였다. Sample-matrix solution의 제조시에는 sample : matrix solution (1:5)의 비율로 혼합하였으며, 앞의 방법으로 혼합한 sample : matrix solution을 MALDI-TOF-MS의 sample plate에 dried drop 방법으로 결정화시킨 후 분자량을 확인하였다. 이때 가장 chromatogram이 우수한 조합은 matrix solution을 물과 에탄올 (2:1, v/v)로 하고, sample solution을 29 mM의 formic acid : water : 2-propanol (1:3:2, v/v/v)으로 하는 것을 조합한 것이었다.

조성당 분석[28] – 정제된 당단백 다당류 각 5 mg에 TFA 100 μl를 가하고 밀봉하여 100°C에서 3시간동안 가열하였다. 반응물에 1 M NH_3 0.1 ml씩 넣어 녹인 후 $NaBH_4$ 0.2 g을 DMSO 10 ml에 녹인 액 1 ml을 넣고 40°C에서 90분간 방치한 후 0.1 ml HOAC를 넣어 과잉의 $NaBH_4$를 제거하고 2 ml acetic anhydride와 촉매로 0.2 ml 1-methylimidazole을 넣고 실온에서 10분간 방치하였다. 5 ml의 증류수를 넣어 과잉의 acetic anhydride를 분산시키고 냉각후 dichloromethane 1 ml을 넣고 혼합한 후 분리된 아래층의 용매만을 취하여 40°C에서 건조시킨 후 다시 dichloromethane에 녹여 GC로 조성당을 분석하였다.

조성 아미노산 분석 – 당단백 다당체를 구성하고 있는 아미노산을 분석하기 위해 시료 10 mg에 10 ml의 6 N-HCl을 가하고 110±5°C에서 24시간 가수분해시켰다. 얻은 가수분해물을 여과하여 감압농축 후 0.02 N HCl에 녹여 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

단백다당체의 항암실험[29]

1) 실험동물 : 4~5 주령의 ICR 웅성 마우스(20~25 g)를

대한실험동물에서 분양받아 최소 일주일간 실험사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명에 의하여 조명시간을 아침 7시부터 저녁 7시까지 12시간으로 조절하였으며 실내온도는 18~23°C로 유지하였다. 사료는 고형사료(삼양사)를 사용하였고 그 조성은 조단백질 21%, 조지방 3.5%, 조셀룰로우즈 5.0%, 무기질 8.0% 등이었다. 급수는 정수된 물을 사용하였으며, 사료와 급수는 제한하지 않았다.

2) 암세포이식 및 시료투여 : 마우스 sacroma 180 세포는 본 연구실에서 ICR 마우스의 복강내에서 7 일 간격으로 계대배양한 것을 복수와 함께 취해서 빙냉 phosphate buffered saline (pH 7.2)용액으로 세척한 후 약 5×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켜 0.1 ml (5×10^6 cells/mouse)씩을 건강한 정상 ICR 마우스의 왼쪽 서혜부에 피하 이식하여 고형암을 유발시켰다. 또한 마우스 sacroma 180 세포를 5×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켜 0.1 ml씩 (5×10^6 cells/mouse) 건강한 정상 ICR 마우스의 복강에 이식하여 복수암을 유발시켰다.

암세포를 이식한 다음날부터 생리식염수에 용해시킨 시료를 일정량씩 매일 1회 10일간 복강내에 0.1 ml씩 투여하였다. 대조군에는 생리식염수를 양성대조군에는 krestin 20 mg/kg/day을 0.1 ml씩 투여하였다.

3) 결과 판정 : 고형암의 경우에 50% 종양 성장저지량 결정은 각 시료에 대하여 3가지의 용량으로 실시한 고형암 실험결과로부터 ID_{50}을 결정하였다. 종양성장저지백분율 결정은 암세포를 이식한지 30일째 되는 날 실험동물을 치사시키고 유발된 고형암을 적출한 후 그 중량을 측정하여 평균 종양 중량을 얻고 다음 식에 따라 종양저지백분율(I.R. %)을 계산하였다.

$$(\text{I.R. }\%) = \frac{CW-TW}{CW}\times100$$

CW : 대조군의 평균 종양 중량
TW : 시료투여군의 평균 종양 중량

종양부피 측정은 시료 투여후 시간에 따른 고형암 성장저지정도를 알아보기 위하여 암 이식 후 7, 14, 21, 28일째에 종양의 크기를 측정하여 다음식에 따라 종양의 부피를 계산하였다.

$$\text{Tumor volume} = \frac{ab^2}{2}$$

a : 종양의 장반경
b : 종양의 단반경

복수암의 경우는 암세포 이식 후 대조군과 시료투여군의 생존여부를 60일까지 관찰하여 평균생존일(MST : mean survival time)과 평균생존백분율(T/C(%))을 다음식에 따라 계산하였다.

$$T/C(\%) = \frac{Tmst}{Cmst}\times100$$

Cmst : 대조군의 평균생존일
Tmst : 시료투여군의 평균생존일

실험결과 및 고찰

단백다당체의 분자량 및 조성당 – 단백다당체 분획(SAP)을 sepharose CL-2B를사용하여 0.5 M NaCl 용액으로 유출시켜 세분획한 후 menbrane으로 탈염시킨 후에 비슷한 크기의 분자량을 모아서 Recycling HPLC로 재정제하여 SAP-A와 SAP-B를 얻었다. 이를 MALDI-TOF MS 측정법을 이용하여 분자량을 분석한 결과 SAP-A는 6184.9D, SAP-B는 25749.2D으로 나타났다.

GC에 의한 당조성 분석결과 SAP-A는 arabinose 10.03%, xylose 1.56%, mannose 5.45%, galactose 39.84%, glucose 15.20%로 밝혀졌고 SAP-B는 rhamnose 17.40%, arabinose 24.40%, xylose 24.50%, galactose 33.80%로 확인되었다 (Table I).

당단백의 아미노산 조성 – 능이에서 분리한 당단백 SAP-A와 SAP-B의 구성 아미노산을 자동분석기로 분석한 결과는 Table II와 같다. 이 결과에 의하면 SAP-A는 aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, amino acetic acid, alanine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine-acetate, histidine, arginine, proline, tyrosine 등 16종의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이중 glutamic acid가 22.78 μg/mg으로서 함량이 가장 많았으며, 그 다음이

Table I. Physico-chemical properties of proteoglycans isolated from *Sarcodon aspratus*

	SAP-A	SAP-B
Molecular weight[1)]	6184.9	25749.2
Sugar Component	(Mol %)	
Arabinose	10.03	24.40
Xylose	1.56	24.50
Mannose	5.45	–
Galactose	39.84	33.80
Glucose	15.20	–
Rhamnose	–	17.40

[1)]Molecular weight was measured by MALDI-TOF MS (Voyager™-DE System)

Table II. Amino acid content of proteoglycans isolated from *Sarcodon aspratus*

Amino acid	Content (μg/mg)	
	SAP-A	SAP-B
L-Aspartic acid	18.23	5.15
L-Threonine	9.22	2.69
L-Serine	11.67	3.64
L-Glutamic acid	22.78	5.79
L-Amino acetic acid	9.15	2.66
L-Alanine	7.73	2.22
L-Valine	5.13	1.69
L-Methionine	2.12	0.69
L-Isoleucine	2.76	0.78
L-Leucine	4.56	1.23
L-Phenylalanine	3.39	0.92
L-Lycine-acetate	15.02	4.16
L-Histidine	4.66	1.66
L-Arginine	14.6	3.88
L-Proline	8.23	2.30
Tyrosine	3.05	0.69

aspartic acid 18.23 μg/mg, lysine-acetate 15.02 μg/mg, arginine 14.6 μg/mg의 순서로 함유되어 있었다. 함유된 16종의 아미노산중 methionine이 2.12 μg/mg으로 함량이 가장 적은 것으로 나타났다. SAP-B의 조성 아미노산은 SAP-A와 같이 glutamic acid 등 16 종의 아미노산으로 구성되어 있었으며 함량에서는 glutamic acid 5.79 μg/mg, aspartic acid 5.15 μg/mg, lysine-acetate 4.16 μg/mg, arginine 3.88 μg/mg으로 조성 아미노산의 함량비의 순서는 SAP-A와 같으나 mg당 전체 아미노산의 함량이 SAP-A에 비하여 약 1/3 정도로 나타났고 특히 SAP-A에 함유된 아미노산 중 함량비가 가장 적은 것은 methionine (2.12 μg/mg)이었으나 SAP-B에 있어서는 tyrosine (0.69 μg/mg)으로 나타났다.

항암효과 – 능이의 자실체로부터 분리, 정제한 당단백 SAP-A를 마우스에 sarcoma 180 암세포를 이식한 다음날부터 10일간 투여하고 암세포를 이식한지 30일째 고형암을 적출하여 중량 및 종양억제율을 측정한 결과 대조군은 5.48±0.82 g이었으며, 5 mg/kg/day 투여군에서는 3.29±0.45 g으로 대조군에 비하여 40.0%의 종양억제율이 나타났으며, 15 및 30 mg/kg/day 투여군에서는 각각 1.94±0.62 g, 1.58±0.41 g로 대조군에 비하여 64.6% 및 71.5%의 종양억제율이 나타났다. SAP-B는 5, 15 및 30 mg/kg/day 투여군에서 각각 5.02±0.74 g, 4.45±1.44 g 및 4.67±0.38 g으로 대조군에 비하여 8.4%, 18.8% 및 14.8%의 종양억제율이 나타났으며,

Table III. Antitumor activity of the SAP-A and SAP-B in ICR mice transplanted with solid sacroma-180

Compound	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight (g, mean±S.E.)	Inhibition ratio (%)	ID_{50}[1] (mg/kg/day)
Control		5.48±0.82		
Krestin	20	2.27±0.45	58.6	
SAP-A	5	3.29±0.45	40.0	
	15	1.94±0.62	64.6	8.2
	30	1.56±0.41	71.5	
SAP-B	5	5.02±0.74	8.4	
	15	4.45±1.44	18.8	>100
	30	4.67±0.38	14.8	

[1]ID_{50} indicates dose level which inhibits tumor growth to 50% of the control. Krestin : Positive control. SAP-A, SAP-B : The proteoglycans isolated from *Sarcodon aspratus*.

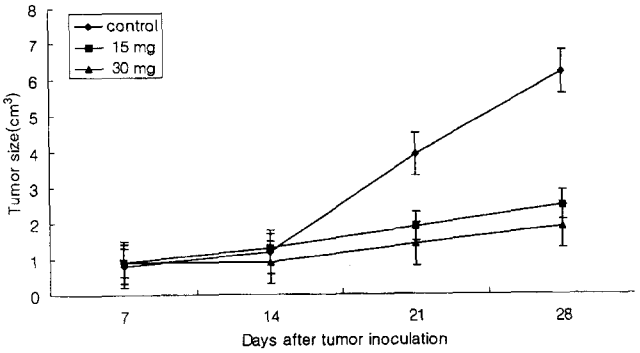

Fig. 1. Antitumor activity of the SAP-A in ICR mice transplanted with solid sacroma-180. The results are shown as a mean ±S.E. of three separate experiments. 15 mg/kg and 30 mg/kg of SAP-A were administrated to mice by i.p. as described in experimental procedure.

양성대조약물인 krestin 20 mg/kg/day 투여군에서는 2.27±0.45 g으로 58.6%의 종양억제율로 나타났다(Table III). 이 결과로 보아 SAP-A는 우수한 종양억제작용을 나타내는 것으로 판단되며 ID_{50}는 8.2 mg/kg/day 이었다. 시간 경과에 따른 고형암의 성장억제 정도를 알아보기 위하여 암 이식 후 7, 14, 21, 및 28 일째에 SAP-A 15 및 30 mg/kg/day에 대하여 고형암의 크기를 측정하였을때, 암 이식후 2주까지는 비교적 비슷하게 성장하였으나 이후부터는 특히 SAP-A 투여군의 경우 성장이 둔화됨을 알 수 있었다(Fig. 1). Sarcoma 180 복수암세포 이식 후 대조군과 SAP-A 투여군의 생존여부를 60일간 관찰한 결과 대조군은 22.4±2.4 일이었으나 SAP-A 5 mg/kg/day 투여군은 37.5±5.5 일로 대조군에 비하여 167.4%의 수명연장 효과를 나타내었으며, 15

Table VI. Antitumor activity of the SAP-A in ICR mice transplanted with ascitic sacroma-180

Compound	Dose (mg/kg/day)	Mean survival time (day, mean±S.E.)	T/C[1)] (%)
Control		22.40±2.4	
SAP-A	5	37.50±5.5	167.4
	15	40.90±3.3	182.6
	30	41.10±4.0	183.5

SAP-A : The proteoglycan isolated form *Sarcodon aspratus*.

$$^{1)}T/C(\%) = \frac{\text{Mean survival time of treated group}}{\text{Mean survival time of control group}} \times 100$$

및 30 mg/kg/day 투여군은 40.9±3.3 및 41.1±4.0일로 182.6%, 183.5%의 수명연장 효과를 나타내었다(Table IV). 이상의 사실은 Maruyama[24] 등이 능이의 물 엑기스를 복강 투여시 sarcoma 180의 고형암에 대하여 억제 효과가 있다는 보고와 일치하고 있으며 실험결과 항암작용이 강한 당단백은 분자량이 6184.9 D인 SAP-A인 것으로 나타났다. 일반적으로 항종양 다당류는 복수형 암에는 효과가 없으나 고형암에는 탁월한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나[14] 능이로부터 분리, 정제한 단백다당체 SAP-A는 sarcoma 180의 고형 및 복수암에 대하여 모두 억제작용을 하는 것으로 사료된다.

결 론

능이(*Sarcodon aspratus*)의 자실체로 부터 당단백 다당체 SAP-A와 SAP-B를 분리하여 ICR계 생쥐에 이식한 sarcoma 180 고형암에 대하여 실험한 결과 SAP-A만이 우수한 종양 억제 작용을 나타냈으며, ID_{50}는 8.2 mg/kg/day으로 나타났다. 또한 sarcoma 180 복수암에 대하여 SAP-A 5 mg/kg 투여군이 대조군에 비교하여 167.40%의 수명연장효과를 나타냈으며, 증량에 따른 수명연장 효과도 관찰되었다.

항암작용이 있는 당단백 SAP-A의 분자량은 6184.9 D이었으며 조성당은 arabinose 10.03%, xylose 1.56%, mannose 5.45%, galactose 39.84%, glucose 15.20%로 밝혀졌으며 조성 amino acids는 *L*-aspartic acid 등 16종의 amino acid로 구성되어 있었다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 조선대학교 학술연구비에 의하여 일부 충당되었으며 이에 감사합니다.

참고문헌

1. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y., and Fukuoka, F.(1970) Antitumor polysaccharide derived chemically from naural glucan (Pachyman). *Nature*. **225**: 943-949.
2. Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F., and Ishida, N.(1980) Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide. KS-2. extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics*. **31**: 376-381.
3. Kim, D.H., Bae, E.A., Jang, I.S., and Han, M.J.(1996) Anti-*Helicobacter pylori* activity of Mushrooms, *Arch. Pharm. Res.* **19**: 447-449.
4. Kim, H.R., Shim, M.J., Kim, J.W., Kim, H.W., Lee, C.O., Chung, K.S., Shim, M.J., and Kim, B.K.(1983) Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XXXVII), antitumor components of *Armillariella mella*. *Kor. J. Mycol.* **11**: 151-157.
5. Suzuki, I., Itanti, T., Ohno, N., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T., and Yadomae, T. (1984) Antitumor activity of a polysaccharide fraction extracted from cultured fruiting bodies of *Grifola frondosa*. *J. Pharm. Dyn.* **7**: 492-500.
6. Ohno, N., Shinohara, H., and Yadomae, T. (1986) Physicochemical properties and immunomodulating activities of hot water extract from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 5071-5078.
7. Judith, G.G., Paul, W.K., and Steven, B.M.(1984) Interleukin-1 mediated induction of k-light chain synthesis and surface immunoglobulin expression on pre B cells. *J. Immunol.* **132**: 223-230.
8. Kim, B.K., Park, E.K., and Shim, M.J. (1979) Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor, Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Arch. Pharm. Res.* **2**: 145-151.
9. Min, H.K., Choi, E.C., and Kim, B.K.(1980) Studies on the constituents of the higher fungi of Korea, components of *Microporus affinis*. *Kor. J. Mycol.* **8**: 13-19.
10. Lee, C.O., Choi, E.C., and Kim, B.K. (1981) Studies on the antitumor components of Korean basidiomycetes (IV), antitumor components of *Naematoloma fasciculare (Fr.)* Karst. *Arch. Pharm. Res.* **4**: 117-122.
11. Kim, J.S., Choi, E.C., Kim, H.R., Lee, C.O., Chung, K.S., Shim, M.J., and Kim, B. K.(1983) Studies on constituents of the higher fungi of Korea(XXXVII), antitumor components of *Armillariella*. *Kor. J. Mycol.* **11**: 151-157.
12. Kim, S.H., Woo, M.S., and Kim, B.K.(1982) Antitumor components extracted from the carpophores and cultured mycelia of *Laccaria laccata*. *Kor. J. Mycol.* **10**: 155-163.
13. Chung, K.S., and Kim, B.K. (1985) Studies on antitumor constituents of *Pluteus cervinus*. *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **10**: 1-18.
14. Jim, M.R., Jung, K.S., and Kim, B.K. (1998) Differentical antitumor activities of the proteoglycans from the mycelium

of *Lentinus lepideus. Yakhak Hoeji.* **42**: 480-486.
15. 현진원(1993) 버들송이의 항암성분에 관한 연구, 서울대학교 약학과 박사학위 논문.
16. Lee, T.K. (1986) Purification and some chracteristics of the proteolytic enzyme in fruitbody of neungee (*Sarcodon aspratus* (Berk). S. Ito.). *J. Korean Soc. Food nutr.* **17**: 276-282.
17. Lee, T.K., Eun, J.S., Yang, J.H., Jo, D.Y., and Yang, H.C. (1989) Studies on higher fungi in Korea(III), purification and stability of proteolytic enzyme *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *J. Kor. Pharm. Sci.* **19**: 81-86.
18. Eun, J.S., Yang, J.H., Cho, D.Y., and Lee, T.(1988) Studies on higher fungi in Korea(I), Activity of proteolytic ezyme from *Sarcodon asoratus*(Berk.) S. Ito. *J. Kor. Pharm. Sci.* **19**: 125-131.
19. Uhm, T.B., Ryu, K.S., Kim, M.K., and You, J.S. (1991) Characterization of a serine protease from neungee [*Sarcodon aspratus*(Berk.)S. Ito]. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **120**: 35-39.
20. Swada, J.(1964) Studies on the acid-protease of *Paecilomyces varioti* Bainer TPR-220. Part II, some enzymatic properties of the crystalline acid-protease. *Agr. Biol. Chem.* **28**: 348-354.
21. Park, W.H. (1986) Studies on enzymes of the higher fungi of Korea(I), identification of protease in *Sarcodon aspratus. Kor. J. Mycol.* **14**: 25-30.
22. 장재철(1989) 능이(能栮)가 생산하는 Proteolytic enzyme이 폐계(廢鷄)에 미치는 軟肉效果, 群山大學 自然科學研究. **6**: 159-168.
23. Park, W.H. (1983) Studies on components of *Sarcodon aspratus*(II), *Kor. J. Mycol.* **11**: 159-162.
24. Maruyama, H., Yamazaki, K., Murofushi, S., Konda, C., and Ikekawa, T. (1989) Antitumor activity of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito and *Ganoderma lucidum*(Fr.) Karst. *J. pharmacobio-pym.* **12**: 118-123.
25. Park, W.H. (1983) Studies on components of *Sarcodon aspratus*(I). *Kor. J. Mycol.* **11**: 85-89.
26. Redier, D.D., Brown, R.S., Weingerger, S., Kenny, J., and Bailey, J. (1998) Unknown peptide sequencing using matrix-assisted laser desorption/ionization and in source decay. *Anal. Chem.* **70**: 1214-1222.
27. Karas, M., and Hillenkamp, F.(1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.* **60**: 2299-2301.
28. Chaplin, M.F.(1994) In carbohydrate analysis, Oxford University press, London, pp.6-7, 32-45.
29. Maeda, Y.Y., and Chihara, G. (1973) Periodical considerationon the establishment of antitumor action in host and activation of peritoneal exudate cells by lentinan. *Gann.* **64**: 351-357.

(2002년 5월 29일 접수)