

## 갈황색 미치광이버섯 균사체 추출물 및 배양액의 생리활성

손정아<sup>1</sup> · 석순자<sup>1</sup> · 이경진<sup>2</sup> · 이강효<sup>1</sup> · 박정식<sup>1</sup> · 박기문<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>농업과학기술원 응용미생물과, <sup>2</sup>성균관대학교 식품생명공학과

### Physiological Activities of *Gymnopilus spectabilis* Mycelium Extract and Supernatant of its Broth

Jung-A Son<sup>1</sup>, Soon-Ja Seok<sup>1</sup>, Kyoung-Jin Lee<sup>2</sup>, Kang-Hyo Lee<sup>1</sup>, Jeong-Sik Park<sup>1</sup> and Ki-Moon Park<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received September 4, 2007)

**ABSTRACT:** This study was carried out to investigate the physiological activities of the ethanol extract from *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and of the supernatant obtained from fermentation broth (SGB). The contents of polysaccharides, phenol compounds and total  $\beta$ -glucans of EGM were found to be 80.14%, 3.5 mg/ml and 5.91%, respectively and those for SGB were 78.68%, 3.32 mg/ml and 3.28%, respectively. Both EGM and SGB exhibited dose-dependent nitrate-scavenging abilities at pH 1.2. In addition, both EGM and SGB on the autoxidation rate of the linoleic acid demonstrated powerful antioxidant activities at 1 mg/ml level. With respect to fibrolytic activity, EGM showed 1,180 unit/g, which was the same activity as streptokinase, while SGB was 1,011 unit/g. The angiotensin converting enzyme inhibition activity of EMG determined by both the normal and pretreatment methods were estimated to be 8.2% and 10.2%, respectively. However, SGB showed no corresponding activity. The growth inhibitory effects of EGM on AGS, A549, HeLa and NCTC cells were over 58.88%, respectively. And the growth inhibitory effects of the SGB on HeLa and NCTC cells were 44.92 and 76.76%, respectively. Also, EGM and SGB activated the components of the alternative complement pathway from 51 and 62% at the concentration of 100 mg/ml. The xanthine oxidase inhibition activities of EGM and SGB (1 mg/ml) were 9.53 and 16.92%, respectively.

**KEYWORDS:** Fibrolytic activity, *Gymnopilus spectabilis*, Physiological activity, Xanthine oxidase

의학기술의 발전에 따라 인류 수명이 연장되면서 고령화 사회는 세계적 추세이며 암을 비롯한 고혈압, 당뇨 등 각종 생활 습관 병의 발생률도 증가하는 경향을 나타내고 있다. 이러한 질병의 증가는 환경오염과 잘못된 식습관 및 운동부족, 스트레스, 유전적 요인 등에 기인하는 경우가 대부분이다. 이와 같은 질병의 예방 및 치료를 위해 많은 의약품들이 개발되고 있으나 사용량이나 사용빈도에 따라 체내에서 부작용이나 독성이 밝혀지고 있어 예방차원에서 천연물질로부터 추출한 생리활성 물질을 함유한 기능성 식품 등에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Park *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 1997). 또한 향신료 및 다류를 이용한 천연항산화제의 개발 연구가 활발해지고 있으며, 이들 천연물질들은 다양한 생리활성 효과를 가지고 있어 심혈관계 질환 그리고 암, 당뇨병, 염증성 질환들에 대하여 질병의 완화, 예방할 수 있는 생리활성 물질이라는 점에서 관심이 높아지고 있다(Jung, 2002). 이러한 천연물질 소재로는 약용식물을 포함한 herb류가 가장 많이 활용되

고 있으며, 이 외에 버섯류가 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐만 아니라 항암활성 및 면역증강 효과, 항산화효과 등의 약리 작용 때문에 최근에는 건강식품 및 의약품 소재로 널리 이용되고 있다(Mizuno *et al.*, 1986). 최근에 버섯류를 포함한 담자균류에서 다양한 생리활성물질들이 분리 정제되고 있으며, 이러한 성분들은 세포에 대한 직접적인 독성은 없고, 숙주매개성 면역 활성화(host mediate immunity) 기능을 보유하고 있어 면역계와 관계 있는 보체(complement) 및 macrophage를 활성화하여 암 세포의 생물학적 반응을 변화시켜서 치료효과를 나타내므로 독성 및 부작용이 거의 없는 장점을 가지고 있다(Ooi and Liu, 1999). 현재 여러 종류의 버섯들에 항암효과가 있음이 과학적으로 검증되었는데 주요 성분은 버섯 속에 함유되어 있는  $\beta$ -glucan 계열의 다당체로 밝혀져 있으며 면역증강 및 항암치료를 사용하기 위해 상업화되어 있는 것으로는 *Schizophyllum commune*(치마버섯) 균사체 배양액에서 추출한 다당체 Shizopyllan이 항암성 면역증강 주사제로 판매되고 있고, 그밖에 각종 버섯류로부터 추출한 Lentinan, Grifolan, Krestin(polysaccharide-peptide

\*Corresponding author <E-mail: pkm1001@skku.edu>

complex), PSK(polysaccharide-protein complex)가 알려져 있다(Zhang *et al.*, 2007).

한편, 독성 물질을 가지고 치료제를 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있는데 현재 살모사 독으로부터 개발된 혈액응고 방지제 Aggrastat(성분명: tirofiban)가 급성 심장질환자에게 처방되어지고 있으며, 뱀독을 이용해 심장마비와 뇌졸중을 예방하는 연구도 진행되고 있다(Stephen *et al.*, 2004). 뱀독 이외에도 눈가의 주름살을 펴는 특효약인 “Botox”는 부패균인 *Clostridium botulinum*에서 추출한 맹독이지만 1970년대 후반 안과의사 Alan Scott가 치사량의 1천분의 1로 사시를 고친 뒤, 지금은 주름살과 안면근육 경련 제거 등에 널리 쓰이고 있다(Carruthers and Carruthers, 2004). 또한, 생활주변에서 흔히 발견되는 식중독 균인 *Pseudomonas*와 고열을 일으키는 *Diphtheria* 세균독을 이용한 항암제 개발연구와 동물의 장에 서식하는 *Shigella*에서 분비되는 독성분 또한 림프종이나 뇌종양 등 항암제를 만드는 데 응용되고 있다. 우리나라에서 특히 많이 일어나는 복어 식중독 사망사고를 일으키는 tetrodotoxin도 통증치료 및 마취제로 개발하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 심지어 마리화나 연기 속 tetrahydrocannabinol 성분이 항암제의 부작용인 구토를 가라앉힌다는 보고도 나오고 있다(Wayne *et al.*, 2005).

식용의 *Amanita rubescens*(붉은점박이 광대버섯)에 함유되어 있는 Amatoxin은 진핵세포의 RNA polymerase B에 대해 특이적 저해 작용을 주 기능으로 하고 이에 따라 단백질의 합성을 저해, 결과적으로 세포 괴사를 일으키기 때문에 이러한 성질을 이용하여 다양한 생화학적 연구에 이용되고 있다(Odenthal *et al.*, 1982).

또한 *Amanita phalloides*(유럽광대버섯) 및 *Amanita verna*(흰알광대버섯)에 존재하는 phalloxin은 간 기능 및 actin의 연구 재료로 사용되고 있다(Zhijian *et al.*, 1992).

그 외에 *Naematoloma fasciculare*(노란다발버섯)에서는 항종양활성이 있는 수용성 단백질체를 분획하였으며, *Clitocybe acromelalga*(갈대기버섯류)에서 분리된 clitidine와 acromelic acid A, B는 신경독으로 알려진 kainic acid, domoic acid와 동일한 골격을 함유하고 있으며 이 성분들은 신경약리연구에 사용되고 있다(Mizuno, 1999).

국내에 발생하고 있는 버섯의 종류는 1,500여 종이며 그 중 독버섯은 50여종이고 맹독성인 버섯은 20여 종으로 치명적인 독성분을 가진 버섯은 Agaricales(주름버섯목)의 Amanitaceae(광대버섯과), Tricholomataceae(송이과), Strophariaceae(독청버섯과), Cortinariaceae(끈적버섯과), Rhodophyllaceae(외대버섯과), Russulaceae(무당버섯과) 등에 널리 분포되어 있다.

*Gymnopilus spectabilis*(갈황색미치광이버섯)은 주로 여름과 가을에 활엽수 고사목의 그루터기 주위 또는 살아있는 나무뿌리 주위에 군생한다. 갓의 크기는 38~137 mm

로 초기에는 원추형-종형이나 성장하면 반반구형-편평형으로 되며, 중앙부위가 약간 들출되어 있거나 편평하다. 주름살은 대에 홈주름살이거나 다소 짧은 내린 주름살이며 뺨뺨하고, 초기에는 황색을 띠나 성장하면 황갈색-밝은 적갈색을 띠며, 주름살 끝은 평활하거나 미세하게 갈라져 있다. 갈황색미치광이버섯은 목장말뚱버섯과 같이 신경계통에 자극을 주어 환각 증상을 일으키나 맹독성은 아니며 시간이 지나면 자연치유된다. 따라서, 본 연구에서는 독버섯이지만 그 활용여부에 따라 암 등 생활습관병의 예방 및 치료제로 이용가능성 있는 독버섯인 갈황색 미치광이버섯의 균사체 및 배양여액 추출물의 항산화활성, angiotensin converting enzyme저해에 의한 항고혈압성, 항암, 면역증강효과 등에 대한 다양한 생리활성기능을 탐색하여 기능성 소재로서 사용가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균사체 배양

*Gymnopilus spectabilis*는 농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과에서 분양받아 사용하였으며 potato dextrose agar(PDA, Difco Co.) 평판배지에서 생육된 균사체를 직경 7 mm의 cork border로 일정하게 절취하여, glass homogenizer로 균질화한 다음, 100 ml potato dextrose broth가 들어 있는 500 ml baffle flask에 옮겨 25°C에서 180 rpm의 속도로 7일간 1차 종균배양을 하였다. 1차 종균배양이 끝난 배양액을 다시 PDB(pH 5.0) IL가 들어 있는 flask에 균질화한 종균을 10% 접종하고, 25°C, 180 rpm에서 7일간 2차 종균 배양하였다(Chung *et al.*, 1991).

### 시료 제조

7일간 통기배양 후 균사체를 여과하여 homogenizer로 균질화한 다음, 10배의 40% ethanol을 첨가하여 40°C에서 48시간 환류 추출하였다(Park and Lee, 1998). Ethanol 추출한 추출액은 규조토로 여과하고 50°C에서 감압 농축하여 실험에 사용하였고, 배양여액은 그 자체로 50°C에서 감압 농축하여 시료로 제조하였으며, 각 농축 시료의 고형물 함량이 10%가 되게 하여 사용하였다.

즉, 본 실험에 사용한 시료는 갈황색미치광이버섯 균사체 40% ethanol추출물(Ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium: EGM)과 배양여액 농축물(Supernatant of *Gymnopilus spectabilis* broth : SGB)을 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

### 성분 분석

총 다량류 함량은 Herbert 등(1971)의 방법에 준하여 anthrone test로 측정하였다. 즉, 100 µg/ml 농도의 시료 1 ml 및 차가운 anthrone reagent 5 ml를 시험관에 넣은

후 즉시 진탕하여 얼음 수조에 5분 동안 방치한 후 각각의 시험관을 100°C 항온 수조에서 10분 동안 방치하고 다시 얼음 수조에 보관하면서 anthrone 시약과 반응하여 나타나는 발색도를 625 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각 100 µg/ml의 농도로 혼합하여 조제한 fucose, galactose, glucose, mannose, ribose, xylose 혼합용액을 표준용액으로 하여 검량선을 작성하였으며, 이 검량선에 준하여 총 다당류 함량을 정량하였다. 그리고 총 단백질 함량은 Lowry method에 준하여 측정하였다. 페놀성 화합물 분석은 Folin-denis 방법에 따라 1 mg/ml의 농도의 시료 500 µl와 증류수 6.5 ml를 첨가하고 여기에 500 µl Folin diocalteu's phenol reagent를 넣어 혼합하고 실온에서 10분간 반응시킨 후 1 ml의 sodium carbonate를 첨가하고 여기에 증류수 1.5 ml를 가하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다(Slinkard and Singleton, 1974). Galic acid를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 이 검량선에 준하여 페놀 함량을 정량하였다. 그리고, 총 β-glucan함량은 알칼리 비용해성 및 알칼리 용해성 분석에서 얻어진 β-glucan을 합하여 산출하였다. 알칼리 비용해성 β-glucan 성분은 100 mg/ml의 농도의 시료 400 µl에 0.25 M NaOH 20 ml를 첨가하여 100°C에서 1시간 동안 진탕시킨 후 6,500×g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 0.25 M NaOH 35 ml를 첨가하여 80°C에서 3시간 동안 진탕하면서 반응시켰다. 반응 완료 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100% ethanol로 세척 후 110 µl oven에서 건조 후 중량을 계산하였다. 알칼리 용해성 β-glucan 분석의 경우 100 mg/ml의 농도의 시료 800 µl에 0.25 M NaOH 20 ml를 첨가하여 100°C에서 1시간 동안 진탕시킨 후 6,500×g에서 15분 동안 원심분리를 한 후에 상등액 2 ml를 취한 다음, 500 µl의 Fehling 시약을 첨가한 뒤 3~4분간 교반하고 2시간 30분 동안 실온에 반응시켰다. 반응 완료 후 6,500×g에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액 1 ml에 5% phenol 1 ml과 sulfuric acid 5 ml를 가하여 혼합하고 ice bath에 30분 동안 방치한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 glucose 표준곡선에 대입하여 당 농도를 환산 알칼리 용해성 glucan의 함량으로 측정하였다.

#### 항산화 효과

Nitrite scavenging activity는 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 1 ml에 0.45 µm의 filter(Advance MFS, INC)로 여과한 시료 0.6 ml를 첨가하고, 0.1 N HCl(pH 1.0)를 사용하여, pH를 조정 한 후, 최종 10 ml로 하였다. 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 반응액을 각각 1 ml씩 취하고 2% acetic acid 5 ml, 30% acetic acid로 제조한 Griess시약(1.0% sulfanilic acid 와 1.0% naphthylamine = 1 : 1 혼합액) 0.4 ml를 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합액을 상온에서 15분간 반응시

킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 아질산염 소거율을 계산하였다(Kang *et al.*, 1996).

환원력 측정은 microtube에 농도별 시료 200 µl와 0.05 M phosphate buffer(pH 6.6) 500 µl를 차례로 주입하고, 1% potassium ferricyanide를 500 µl씩 분주한 후 50°C에서 20분간 반응시킨 다음 3분간 냉각시키고 10% trichloroacetic acid를 500 µl 넣었다. 상등액 500 µl를 취하여 microtube에 옮긴 후 증류수 500 µl와 0.1% ferric chloride 100 µl를 차례로 넣고 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, vitamin C를 표준물질로 하여 vitamin C에 준하는 환원력으로 나타내었다(Oyaizu, 1986). Linoleic acid 자동산화 억제활성은 99.5% EtOH 2 ml 및 EtOH로 희석한 2.5% linolenate 2.05 ml, 1시간 이상 충분히 aeration시킨 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0) 4 ml에 처리 농도별로 시료 일정량을 첨가한 후 증류수를 첨가하여 최종 10 ml로 조정하였으며, 70°C 암소에서 24시간 동안 반응시켰다. 그리고 3시간 간격으로 반응액 0.1 ml를 취하여 75% EtOH 9.7 ml를 첨가한 후, 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml 및 3.5% HCl·0.02 M ferrous chloride 혼합용액 0.1 ml를 차례로 첨가하여 실온에서 3분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 0.01 mg/ml butyl hydroxy toluene(BHT) 및 0.01 mg/ml vitamin E, 0.01 mg/ml vitamin C를 사용하였다(Lee *et al.*, 2002). Superoxide dismutase(SOD) 유사활성은 각 시료액 0.2 ml에 Tris-HCl 완충용액(50 mM Tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 ml로 반응을 정지시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다(Marklund and Marlund, 1974).

#### In vitro 항암 실험

Cell culture media는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco) 및 RPMI-1640(Gibco)을 1% penicillin-streptomycin(10,000 U/pen/ml, 10,000 µg strep/ml, BioWhittaker) 및 10% FBS(fetal bovine serum, GEMINI)를 첨가하여 사용하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide, Sigma)는 5 mg/ml의 농도가 되게 PBS(phosphate buffer saline, BioWhittaker)에 용해하여 실험에 사용하였다. 세포독성을 측정하기 위해서 1종의 mouse 유래 세포 NCTC(liver cell, NCTC clone 1469)와 3종의 인체 유래 암세포 A549(Lung carcinoma, KCLB 10185), HeLa(Cervix uterine denocarcinoma, KCLB 10002), AGS(Stomach adenocarcinoma, KCLB 21739)를 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 동물 세포주의 배양은 56°C에서 30분간 열실활시킨 10% Fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin 및 Streptomycin이 포함된 DMEM(TM3), RPMI-1640 (A549, HeLa, AGS)에서 배양 하였다. 모든 세포주는 세

포가 culture dish에 80~90% 자랐을 때 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA · 4Na 1 ml을 가한 후 37°C에서 5분간 incubation하여 세포를 떼어낸 뒤 1:3의 비율로 계대 배양하면서 사용하였다. 버섯 추출물의 cytotoxicity를 측정하기 위해 Dnizot and Rita(1986)의 방법에 따라 MTT assay를 실행하였다. 즉, 동물세포를  $5 \times 10^4$  cell/well 농도로 96 well plate에 분주 후 세포가 plate 바닥에 부착될 수 있도록 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 16시간 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거한 후 새 배지를 180  $\mu$ l 씩 분주하고 일정농도로 제조한 버섯추출물 20  $\mu$ l를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 시험물질이 포함된 배지를 제거하고 0.5 mg/ml로 배지에 희석한 MTT시약을 well 당 200  $\mu$ l씩 분주한 다음 96 well plate의 빛을 차단하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, DMSO(dimethyl sulfoxide) 100  $\mu$ l 가하여 MTT-formazan crystal을 용해시키고 Sorenson's buffer(0.1 M NaCl · 0.1 M glycine, pH 10.5) 20  $\mu$ l 처리하여 상온에서 5분 동안 발색을 유도시킨 다음 ELISA microplate reader(ELx800, Bio-tec, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 증식억제효과(Growth inhibitory effect, %)를 세포독성 활성의 지표로 하였다.

#### 항고혈압 활성

ACE 활성 저해효과는 Cheung and Chushman(1971)의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 0.3 M NaCl · 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)로 녹인 12.5 mM HHL(Hip-Hip-Leu, Sigma) 기질 100  $\mu$ l에 시료 5  $\mu$ l를 첨가하고 sodium borate buffer 45  $\mu$ l를 가한 후 37°C에서 5분간 반응시켰다. ACE enzyme은 rabbit lung acetone power(Sigma) 1 g에 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 40 ml을 가하여 4°C에서 하루 동안 교반한 것을 10,000×g에서 4°C, 30분간 원심분리한 후 상등액을 micro tube에 1 ml씩 분주하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다. 5분간 반응 후 ACE enzyme 150  $\mu$ l를 가하고 다시 37°C 항온수조에서 1 시간동안 반응시킨 후 0.5 N HCl 250  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응용액에 ethyl acetate 1.5 ml을 넣고 1분간 혼합한 후 상온에서 600×g, 10분간 원심분리하여 상등액 1 ml을 취한 후 drying oven에서 140°C로 20 분간 완전히 열풍건조하고 1 M NaCl 3 ml을 가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하는 통상법과 ACE enzyme과 sample을 먼저 반응시킨 후 기질을 나중에 첨가하는 방법을 전 처리법으로 측정하였다. 그리고, 혈전 용해활성 측정은 Fibrinogen(Sigma) 및 Thrombin(녹십자, 동결건조분말, 5,000 IU), agarose를 사용하여 fibrin plate를 제조한 후 0.2% fibrinogen용액(pH 7.5인 borate saline buffer로 제조) 5 ml를 혼합하여 제조한 fibrinogen-

agarose 용액에 thrombin 50  $\mu$ l를 첨가하여 fibrin plate를 제조하였다. Plate에 지름 5 mm의 pasteur pipette로 4개 원형을 만들어 각 시료를 20  $\mu$ l씩 농도별로 점적하고 37°C에서 18시간 동안 반응시킨 다음, 효소에 의해 fibrin 막이 용해되어 생성된 clear zone의 크기를 측정하였다. 대조구로서 정제된 혈전용해효소인 Streptokinase(CJ, 1,180 unit/g)의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다(Haverkate and Trass, 1974).

#### 항보체 활성

보체 대체경로(alternative complement pathway)에 대한 효과는 보체원인 신선한 사람 혈청과 gelatin veronal buffer[GVB(gelatin 1 g, NaCl 8.65 g, sodium barbiturate 2.06 g/D.W 1 l, pH 7.4)]-ethylene glycol-bis(2-amino ethylether)-N,N,N', N'-tetraacetic acid(EGTA) Mg<sup>2+</sup> 그리고 100 mg/ml, 10 mg/ml 농도의 시료를 각각 50  $\mu$ l 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 750  $\mu$ l의 gelatin veronal buffer와 양의 감각적혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte,  $1 \times 10^8$  cell/ml)를 250  $\mu$ l씩 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 4°C, 650×g에서 10 분간 원심분리한 후 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하였다(Kabat and Mayer, 1964).

#### Xanthine oxidase 저해 활성

Xanthine oxidase 저해 활성은 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)로 용해한 2 mM xanthine 1 ml을 첨가하고 xanthine oxidase(2 unit) 0.1 ml 및 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1 mg/ml 농도의 시료 0.1 ml을 넣은 후 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 완료 후 20% trichloroacetic acid(TCA) 1 ml을 가하여 반응을 정지시키고 제단 백을 위하여 반응액을 여과한 다음, 292 nm에서 흡광도를 측정하여 xanthine oxidase의 저해 활성도를 나타내었다(Noro *et al.*, 1983).

#### 통계처리

실험결과는 one-way ANOVA 사용하여 분석하였으며 실험군 간의 통계적 유의성은  $p < 0.01$  및  $p < 0.05$  수준에서 최소유의차 검정(LSD)을 하였다(STATISTIX, 1996).

## 결과 및 고찰

#### 성분 분석

갈황색 미치광이버섯의 다당류 및 단백질 함량을 측정 한 결과, Table 1과 같이 균사체 추출물(EGM)의 경우 다당류의 함량은 80.14%, 총 단백질 함량은 5.04% 이었으며, 배양여액 농축물(SGB)의 다당류 함량은 78.68%, 단

**Table 1.** Functional components of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB)

Components	EGM	SGB
Polysaccharide (%)	80.14 ± 1.11	78.68 ± 1.04
Protein (%)	5.04 ± 0.12	4.75 ± 0.37
Phenol content (mg/ml)	3.50 ± 1.19	3.32 ± 1.04
$\beta$ -Glucan content (%)	5.91 ± 1.01	3.28 ± 0.09

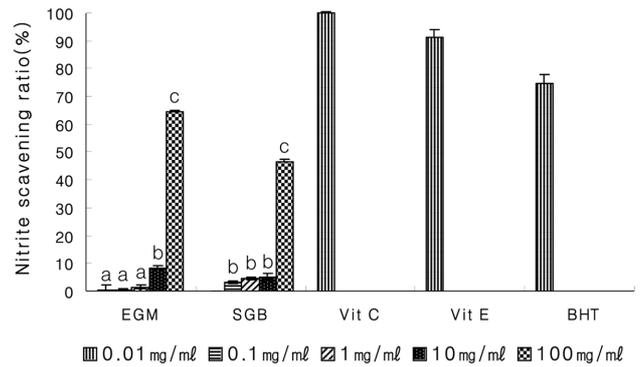
백질 함량은 4.75%였다.

페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사 산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지고 있고, phenolic hydroxy기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화효과 및 항암 등의 생리활성 기능도 가지고 있는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 EGM 및 SGB의 페놀화합물 함량을 측정 한 결과 EGM는 3.50 mg/ml, SGB는 3.32 mg/ml로 나타나 유사함을 알 수 있었다.

알칼리 용해성과 알칼리 비용해성  $\beta$ -glucan의 건조 중량을 측정하여 갈황색 미치광이버섯의  $\beta$ -glucan 함량을 측정 한 결과 EGM의 경우  $\beta$ -glucan의 함량은 5.91% 이었으며, SGB의 경우 3.28%의 함량을 나타내었다. Hong et al.(2004)의 연구 결과 아카리쿠스버섯 자실체를 가압 추출 한 경우 32.34%, 4배의 ethanol 첨가하여 추출한 경우에는 35.97%의  $\beta$ -glucan의 함량을 나타내 본 균사체 추출물에 비해 상당히 많은 양이 존재하는 것으로 밝혀졌다.  $\beta$ -Glucan은  $\beta$ -1,6-glucosyl 분지를 가진  $\beta$ -1,3 결합으로 연결되어 있는 다당류로 버섯류의 세포벽을 구성하면서 단백질 혹은 기타 세포벽 성분과 결합한 형태로도 존재하기도 한다.

**항산화효과**

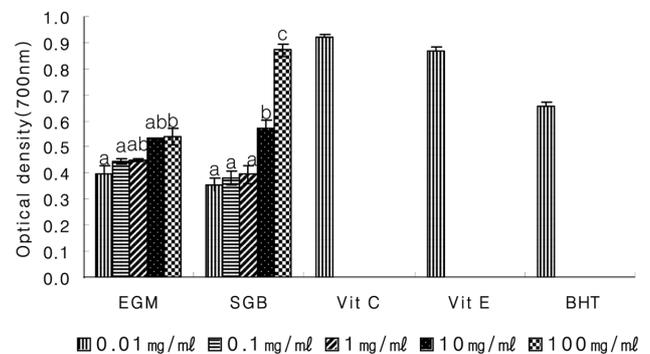
아질산염은 그 자체가 독성을 나타내어 일정 농도 이상 섭취하게 되면 혈액중의 헤모글로빈이 산화되어 met-hemoglobin을 형성하여 met-hemoglobin증 등 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 단백질 식품 및 의약품, 잔류 농약 등에 존재하는 제 2급 및 제 3급 아민 등의 아민류와 아질산염이 반응하여 발암성 물질인 nitrosamine을 생성하는 것으로 보고되어 있다(Peter, 1975). 따라서 갈황색 미치광이버섯 추출물의 아질산염 소거 작용의 효과를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 강한 활성을 나타내었는데, SGB는 0.1 mg/ml과 1 mg/ml의 농도에서 10% 이하의 효과를 보였으며, 100 mg/ml의 농도의 경우 EGM는 64.68%로 가장 높은 아질산염 소거능을 보였고 SGB는 42.70%의 효과를 나타내었고 0.01 mg/ml 이하의 농도에서는 아질산염 소거능이 없는 것으로 나타났다. 그러나 대조군으로 사용한 비타민 C 및 E, BHT에 비해서는 그 효과가 미약하였



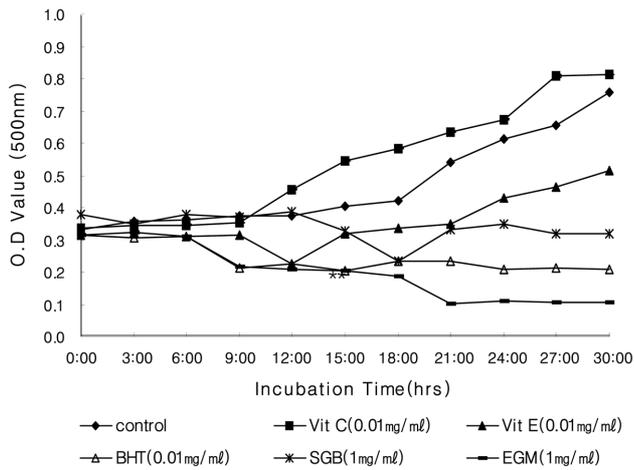
**Fig. 1.** Nitrite scavenging activities of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB) at pH 1.2. <sup>a-c</sup>Means the different letters differ significantly (p < 0.01).

다. 위장 내의 낮은 pH 조건에서는 nitrosamine이 쉽게 형성되므로 낮은 pH에서 아질산염 소거 활성이 높은 것은 nitrosamine 형성을 효과적으로 억제하는데 많은 효과를 나타낼 것이라 생각된다. *Ganoderma lucidum*(영지버섯)의 에테르추출물 및 *Lentinus edodes*(표고버섯)의 butanol추출물의 pH 1.2 에서 아질산염 소거 작용의 효과가 68.3% 및 68.2%로 나타나 본 시료들에 비해 강함을 알 수 있었다(Lee et al., 1997).

그러나, Lee et al.(1997)은 *Ganoderma lucidum*(영지버섯) 및 *Agaricus bisporus*(양송이버섯) butanol 추출물은 44.4% 및 43.4%에 불과하며, *Lentinus edodes*(표고버섯) 및 *Agaricus bisporus*(양송이버섯) 에테르추출물에서는 효과가 전혀 없다고 보고하여 갈황색 미치광이버섯 추출물보다 소거효과가 낮음을 알 수 있었다. 아질산염 소거 작용이 우수한 버섯류를 아질산염 및 아민이 존재할 수 있는 생체 식품 및 가공식품과 함께 섭취하도록 함으로써 니트로사민에 의한 암 발생을 저하할 수 있을 것으로 생각된다. 환원력의 경우 EGM는 Fig. 2와 같이 100 mg/ml



**Fig. 2.** Reducing powers of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB). <sup>a-c</sup>Means the different letters differ significantly (p < 0.01).

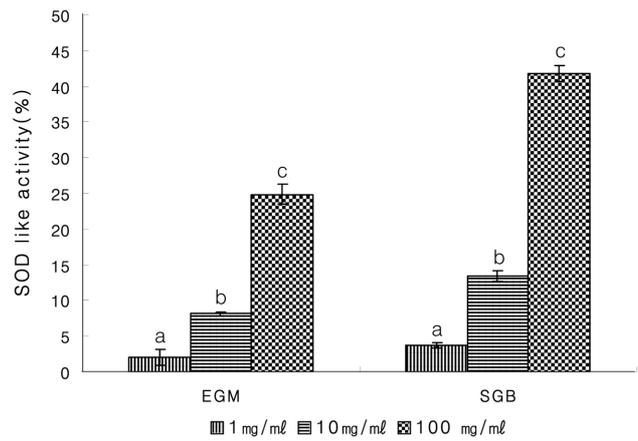


**Fig. 3.** Antioxidant effects of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB) on the autoxidation rate of the linoleic acid store at 70°C.

및 10 mg/ml 농도에서 0.54로 높았으며, 1 mg/ml에서 0.45, 0.1 mg/ml에서 0.43, 0.01 mg/ml에서 0.39의 순이었다. SGB는 100 mg/ml의 농도에서 0.87로 가장 높았으며, 10 mg/ml에서 0.57, 1 mg/ml에서 0.40, 0.1 mg/ml에서 0.38, 0.01 mg/ml에서 0.36 순으로 환원력을 확인 할 수 있었다. 그러나 대조군으로 사용한 0.01 mg/ml의 비타민 C 및 E, BHT에 비해서는 그 효과가 낮음을 알 수 있었다.

갈황색 미치광이버섯 추출물의 첨가가 2.5% linoleic acid의 자동산화 속도에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 3과 같았다. 즉, EGM와 SGB의 경우 확연하게 linoleic acid의 자동산화를 억제함을 확인할 수 있었다. 특히, EGM은 저장기간 동안 대조군보다 낮은 과산화물가를 나타내었으며, 30시간 이후에서는 1 mg/ml 농도에서 EGM은 0.19의 값을 나타내어 합성항산화제인 butyl hydroxy toluene(BHT)의 0.208와 vitamin E의 0.52보다 높은 항산화활성을 나타내었다. 시료 농도 1 mg/ml에서 SGB는 자동산화가 시작된 지 18시간 후에 0.234의 값을 나타내어 BHT보다 높은 항산화력을 보였으나 자동산화가 진행한 지 21시간 후부터 급격히 산화가 일어나기 시작하여 EGM에 비해 거의 항산화효과가 나타나지 않았으나, 대조군과 vitamin E에 비해서는 높은 항산화력을 나타내었다. 따라서, 갈황색미치광이버섯의 균사체 추출물과 배양액 농축물에서도 항산화력을 확인할 수 있었다.

유산소 호흡하는 모든 생명체는 정상적인 대사 과정에서 free radical과 활성산소를 생성한다. 즉 미토콘드리아 내의 호흡이나 단핵 세포의 작용, 여러 효소들의 반응에 의해 자연적으로 발생하게 되며 이러한 활성산소는 그 자체로 화학적 친화력이 크기 때문에 모든 세포 성분과 반응하여 세포의 구조적, 기능적 변화를 가져온다(Nohl and Jordan, 1986). 생물체의 생체 내에서 불가피하게 생성되



**Fig. 4.** Comparison of SOD like activities of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB). <sup>a-c</sup>Means the different letters differ significantly (p < 0.01).

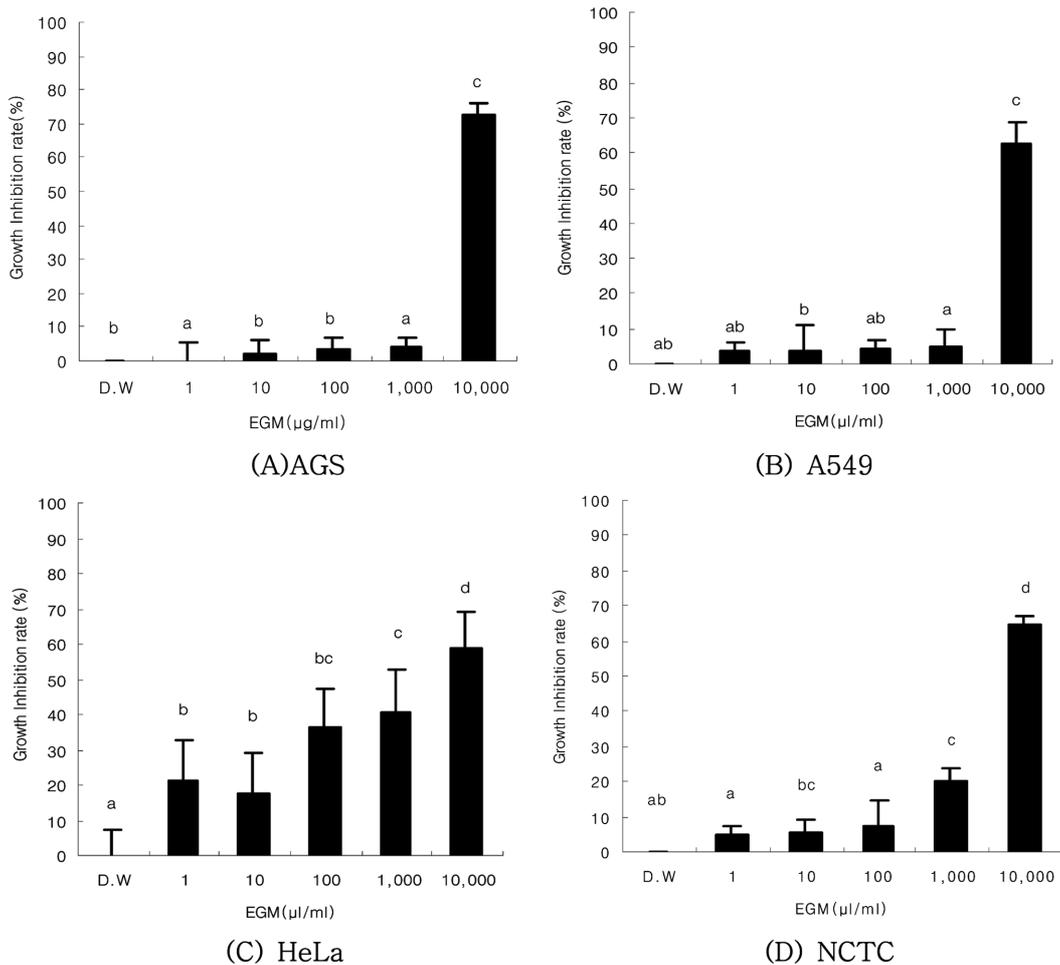
는 환원 산소종은 생체세포의 구성요소에 유해한 수산화나 유도체를 생성시키므로 과다한 활성산소는 세포에 있어서 매우 해롭다. Superoxide dismutase(SOD)는 생체 내에서 superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 산소로 산화시켜주는 천연산화제로 알려져 있으며 활성위치에 결합되어 있는 전이금속이온의 종류에 따라 Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD 등 세 가지의 다른 metalloform으로 존재하고 있다 (Halliwell, 1974).

본 실험의 갈황색미치광이버섯 추출물의 SOD 유사활성의 측정 결과, Fig. 4와 같이 EGM와 SGB에 있어서 모두 농도 의존적으로 활성증가를 나타내었고, SOD 유사활성의 측정 결과 SGB와 EGM 모두 100 mg/ml 농도에서 40% 이상의 활성을 나타내었으며, 1 mg/ml 이하의 농도에서는 두 버섯 추출물 모두 낮은 유사활성을 나타내었다. *Eucalyptus rostrata*의 80% ethanol 추출물 중 ethyl acetate로 다시 추출한 후 분리한 tannis 및 flavonol glycosides 등의 화합물이 SOD의 활성을 나타내는 것을 보고하였다. 따라서 본 연구 결과를 토대로 항산화활성을 나타내는 버섯추출물로부터 노화와 성인병의 예방 및 치료를 위한 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다 (Okamura, 1993).

**In vitro 항암활성**

3종의 human 유래 암세포 및 1종의 mouse 유래 정상 세포에 대한 갈황색 미치광이버섯 추출물의 세포독성 실험은 Fig. 5 및 6에 나타내었다.

EGM의 경우 10 mg/ml의 농도에서는 모든 세포에서 58.88% 이상으로 성장 억제율이 높았으며, SGB의 경우 자궁암 세포인 HeLa에서 44.92%의 높은 세포성장 억제 효과를 나타낸 반면, 정상 간세포주인 NCTC에서도 76.76%로 높은 세포 성장억제 효과를 나타내었다. 또한,



**Fig. 5.** Dose-response effects of 40% ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) on the cytotoxicity of AGS stomach cancer cell, A549 lung cancer cell, HeLa cervix cancer cell and NCTC normal cell. <sup>a-d</sup>Means the different letters differ significantly ( $p < 0.01$ ).

EGM 및 SGB는 AGS 와 A549를 제외한 나머지 세포주에서 1 mg/ml 이하의 농도에서도 36.06% 이상의 세포 성장억제를 나타내는 것을 알 수 있었다.

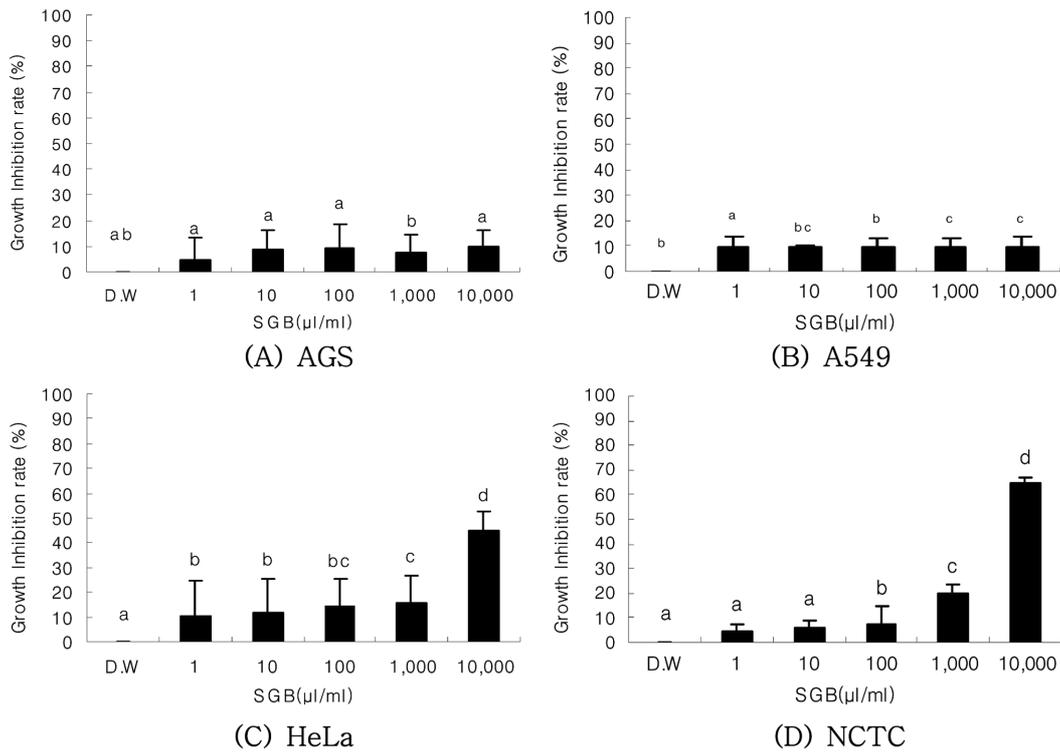
지금까지 Park and Lee(1998)가 *Lentinus edodes*(표고버섯)과 *Pleurotus ostreatus*(느타리버섯)의 항암효과에 대해 보고하였고, *Coriolus versicolor*, *Lepiota procera*, *Grifola frondosa* 등에서 추출한 단백다당체(protein-bond polysaccharide, PBP)가 항암 효과를 나타내는 것보다는 면역계의 host mediated 면역반응에 관여하여 면역기능을 회복 시켜주거나, 생체내에서 감염방어 등의 면역기능을 나타내는 보호체계를 활성화시킨다고 알려져 있다(Denert and Tucker, 1973; Zhang *et al.*, 2007). 특히 macrophage를 활성화시켜 이물질에 대한 탐식기능을 증진시키고, 종양 세포에 대하여 독성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Moradali *et al.*, 2007). 따라서 표고버섯뿐만 아니라 버섯 종류에 들어 있는 단백다당체는 인터페론생성을 촉진하는 물질이 종양에 대한 생체 고유 방어력을 높여줌으로써 간접적으로 종양세포의 증식을 저해하는 것으로 생각

되며, 본 실험에 사용된 갈황색 미치광이버섯 균사체 및 배양액 추출물 내에 항암 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 생각되었다.

#### 항고혈압 활성

체내에 널리 분포되어 있는 Angiotensin converting enzyme(ACE)는 renin-angiotensin aldosterone의 angiotensin I을 생리적 혈압상승 물질인 angiotensin II로 전환시키고, 혈관 이완작용이 있는 bradykinin을 분해시키는 효소이다. Angiotensin II가 증가되면 catecholamine 값이 증가되고, 혈관이 수축되며 동시에 항이뇨 호르몬인 aldosterone의 분비가 촉진됨에 따라 Na<sup>+</sup> 및 수분 배설이 억제되어 순환 혈액량이 증가되어 혈압 상승을 일으킨다. 그러므로 ACE 활성 억제는 혈관 수축을 막고 체내 수분 저류를 막아 혈압을 낮추는 효과를 나타낸다.

ACE 활성 저해 효과 측정은 기질이 ACE의 저해물질로 작용하거나, ACE의 순도에 따라서 혼입될 수 있는 이종의 효소에 의해 ACE저해물질이 분해될 수도 있기 때문에 시



**Fig. 6.** Dose-response effects of supernatant of *Gymnopilus spectabilis* broth (SGB) on the cytotoxicity of AGS stomach cancer cell, A549 lung cancer cell, HeLa cervix cancer cell and NCTC normal cell. <sup>a-d</sup>Means the different letters differ significantly ( $p < 0.01$ ).

**Table 2.** ACE inhibition rate of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB)

Gymnopilus spectabilis	General method inhibition rate(%)	Pretreatment method inhibition rate (%)
EGM	8.186 ± 0.053	10.184 ± 0.223
SGB	0	0

**Table 3.** Fibrinolytic activity of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB)

Gymnopilus spectabilis	Fibrinolytic activity (Streptokinase) (unit/g)
EGM	1,180
SGB	1,011

료와 기질을 ACE와 함께 반응시키는 통상법(General method)과 미리 시료를 ACE와 반응시킨 후 기질을 첨가하여 반응시키는 전처리법(Pretreatment method)을 이용하였다. EGM 및 SGB의 ACE 저해 활성을 측정된 결과 Table 2와 같이 EGM의 경우 통상법에서는 8.186 ± 0.053% 이고, 전처리법에서는 10.184 ± 0.223로 나타났으나, SGB의 경우 ACE 저해활성이 없었다. 항 고혈압기능성 소재로 가장 많이 사용되고 있는 고등어 근육단백질의 angiotensin 저해활성보다는 약한 것으로 나타났다(Yeun *et al.*, 1992).

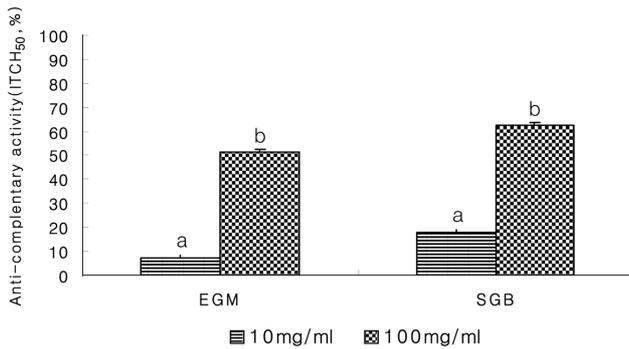
그리고 Fibrin plate법(Haverkate and Trass, 1974)에 따라 EGM 및 SGB의 혈전용해 활성을 측정된 결과는 다음의 Table 3과 같다.

EGM의 경우 대조구인 Streptokinase 1,180 unit/g과 같은 1,180 unit/g의 활성을 보였고, SGB에서는 대조구보다 낮은 1,011 unit/g의 활성을 보였다.

Choi *et al.*(1999)은 *Daedaleopsis styracina*(때죽도장버섯), *Trichaptum abietium*(웃솔버섯), *Coriolus versicolor*(운지버섯), *Pisolithus tinctorius*(모래발버섯), 그리고 *Tricholomopsis decora*(장식솔버섯)의 버섯추출액에서도 높은 혈전용해 활성을 나타냈다고 보고하였다. 따라서, 갈 황색 미치광이버섯의 균사체 추출물과 배양여액 농축물의 혈전용해 활성이 확인이 되었으며, 이를 분리정제한다면 혈관계 질병에 사용 가능할 것으로 기대된다.

**항보체 활성**

Alternative complement pathway의 영향을 검토한 결과, Fig. 7과 같이 100 mg/ml 농도에서 EGM의 경우 51.48%, SGB의 경우 62.65%의 항보체 활성도를 보였으며, 10 mg/ml 농도에서는 EGM가 7.01%, SGB가 17.74%의 항보체 활성도를 나타내었다. 이와 같이 항보체 활성효과를 나타내는 것은 추출물들이 C3활성화를 주축으로 하는



**Fig. 7.** Anti-complementary activity of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB). <sup>a-b</sup>Means the different letters differ significantly ( $p < 0.01$ ).

alternative complement pathway를 활성화시키는 것으로 볼 수 있으며, 이들이 숙주의 macrophage, lymphocyte의 활성화 등과 관련된 면역력을 증강시킬 수 있을 것으로 생각된다.

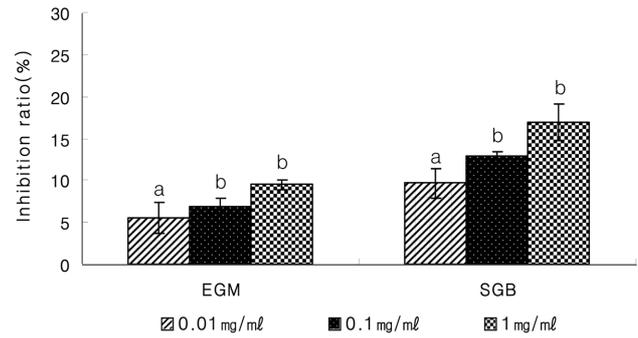
최근 들어 보체계(complement system)를 활성화하는 물질들(항보체 활성 물질)이 생체의 면역 부전상태를 개선 혹은 치료하는 면역요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 가능성이 제시되고 있으며, 이들은 보체계 등과 관련이 있는 면역계를 활성화시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Ito, 1986).

Hamazaki *et al.*(1980)은 schizophyllan이 숙주의 대식세포와 T 임파구 등의 활성화에 영향을 미치는 것임을 밝혔고, *Volvariella volvacea*(표버섯)의 자실체에서 분리한 다당체인 항암 성분인 VVG가 숙주의 보체계 및 대식세포, 항체, T 임파구, NK 세포 등의 체액성 면역과 세포성 면역에 영향을 주어 현저히 저하된 면역 활성을 증강시킴으로서 항암 효과를 나타낸다고 보고하였다(Kishida *et al.*, 1989).

#### Xanthine oxidase 저해 활성

요산이 혈액 중에서 이상 증가하게 되면 낮은 용해성으로 인하여 골절에 축적되어 통풍을 유발하며, 신장에 침착되어 신장질환을 일으킨다고 알려져 있다. 통풍의 치료에 사용되는 약물인 allopurinol은 xanthine oxidase에 의하여 alloxanthin으로 산화된 다음, 이것이 xanthine oxidase에 강하게 결합하여 요산 생성의 최종단계에 관여하는 xanthine oxidase의 효소 활성을 저해함으로써 요산의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Lehninger, 1988).

체내 uric acid 생성인자인 xanthine oxidase 저해활성은 Fig. 8에서 보듯이 1 mg/ml 농도에서 EGM의 경우 9.53%, SGB의 경우 16.92%의 저해를 보였으며, 0.1 mg/ml 농도에서는 EGM가 6.94%, SGB가 12.88%의 저해효



**Fig. 8.** Comparison of xanthine oxidase inhibition ratios of ethanol extract of *Gymnopilus spectabilis* mycelium (EGM) and supernatant of its broth (SGB). <sup>a-b</sup>Means the different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

과를 나타내었다. 따라서, 어느 정도 uric acid 생성을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

## 적 요

독버섯인 갈황색 미치광이버섯의 균사체 추출물(EGM) 및 배양여액 농축물(SGB)의 생리활성을 탐색하였다. 다당류 및 단백질, 페놀화합물, 총  $\beta$ -glucan 함량은 EGM의 경우 각각 80.14%, 5.04%, 3.50 mg/ml, 5.95%이었으며, SGB는 78.68%, 4.75%, 3.32 mg/ml, 3.28%로 나타났다. 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 EGM의 경우 100 mg/ml 처리 시 64.68%이었다.

환원력의 경우 EGM는 10 mg/ml 처리 시 0.54였으며, SGB는 100 mg/ml의 농도에서 0.87로 가장 높았고 10 mg/ml에서 0.57을 나타내었다. 그리고 linoleic acid의 자동산화 억제 실험에서 EGM의 경우 반응 30시간 이후에는 1 mg/ml 농도에서 합성항산화제인 butyl hydroxy toluene (BHT)나 vitamin E보다 높은 항산화활성을 나타내었다. 암세포 성장억제는 EGM의 경우 10 mg/ml의 농도에서 모든 세포에서 약 59%이상의 억제율을 보였으며, SGB의 경우 자궁암 세포인 HeLa에서 45%의 억제 효과를 나타낸 반면, 정상 간세포주인 NCTC에서도 76.76%의 억제를 나타내었다. 혈전용해 활성에서는 EGM의 경우 Streptokinase의 1,180 unit/g과 동일한 활성을 보였고, SGB는 1,011 unit/g을 나타내었다. ACE 저해활성에서 EGM의 경우 통상법에서는  $8.186 \pm 0.053\%$ 이고, 전처리법에서는  $10.184 \pm 0.223$ 로 나타났으나, SGB의 경우 ACE 저해활성이 없는 것으로 나타났다. 항보체 활성의 경우 100 mg/ml 농도에서 EGM의 경우 51.48%, SGB의 경우 62.65%의 활성도를 보였으며, 10 mg/ml 농도에서는 각각 7.01% 및 17.74%를 나타내었다.

체내 uric acid 생성인자인 xanthine oxidase 저해활성은 1 mg/ml 농도에서 EGM의 경우 9.53%, SGB의 경우 16.92%의 저해효과를 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청에서 지원한 국책기술개발사업 “독버섯 분류 및 독성물질 구명 연구”의 일부 결과이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Carruthers, J. and Carruthers, A. 2004. Botox: beyond wrinkles, *Clinics Dermatol.* **22**: 89-93.
- Cheung, H. S. and Cushman, D. W. 1971. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**: 1637-1641.
- Choi, N. D., Seo, S. Y. and Kim, S. H. 1999. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**: 553-557.
- Chung, K. S., Koo, Y. J., Yoo, J. Y., Choi, S. Y. and Shin, D. H. 1991. Mycelial growth of *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa* in Milk Whey. *Kor. J. Mycol.* **19**: 61-65.
- Chung, K. S., Toon, K. D., Kwon, D. J., Hong, S. S. and Choi, S. Y. 1997. Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT Assay. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 477-482.
- Dennert, G. and Tucker, D. 1973. Antitumor polysaccharide lentinan a T cell adjuvant. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 1727-1735.
- Dnizot, F. D. and Rita, L. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **22**: 271-277.
- Halliwell, B. 1974. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solution to the problems of living with oxygen. *New Phytol.* **73**: 1075-1080.
- Hamazaki, Y., Kuramoto, M., Okamura, K., Yajima, A. and Suzuki, M. 1980. Immunotherapy of uterine cervical cancer by administration of chizophyllan (SPG). *Int. J. Immunopharmacol.* **2**: 173-181.
- Haverkate, F. and Traas, D. W. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemost.* **32**: 356-360.
- Herbert, D., Phipps, P. J. and Strange, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiol.* **58**: 265-430.
- Hong, J. H., Youn, K. S. and Choi, Y. H. 2004. Characteristics of crude protein-bound polysaccharide from *Agricus blazei* Murill by extraction and precipitation conditions and its antitumor effect. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**: 586-593.
- Ito, H. 1986. Effects of the antitumor agents from various natural sources on drug-metabolizing system, phagocytic activity and complement system in sarcoma 180-bearing mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **40**: 435-443.
- Jung, Y. S. 2002. The Research on physiological activities of the *Salicornia herbacea* extract and the possibility of application as new cosmetic materials. Master's Thesis. Kyungsan University, Kyungsan, Korea.
- Kabat, E. E. and Mayer, M. M. 1964. Experimental immunochemistry. Thomas Publisher, Illinois. Pp 133-240.
- Kang, Y. H., Park, Y. K. and Lee, G. D. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**: 232-239.
- Kishida, E., Yoshiaki, S. and Akira, M. 1989. Purification of an antitumor-active, branched (1 → 3)- $\beta$ -glucan from *Volvariella volvacea*, and elucidation of its fine structure. *Carbohydrate Res.* **193**: 227-239.
- Lee, G. D., Chang, H. G. and Kim, H. K. 1997. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**: 432-436.
- Lee, W. C., Yen, W. J., Huang, S. C. and Duh, P. D. 2002. Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chem.* **78**: 347-354.
- Lehninger, A. L. 1998. Principles of biochemistry. Worth publishers INC. New York. p 634.
- Marklund, S. and Marlund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 496-474.
- Mizuno, T. 1999. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). *Int. J. Med. Mushrooms.* **1**: 9-19.
- Mizuno, T., Ohsawa, K., Hagiware, N. and Kuboyama, R. 1986. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from *Maitake*, *Grifola frondosa*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1679-1688.
- Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S. and Hedjaroude, G. A. 2007. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int. Immunopharmacol.* in press.
- Nohl, H. and Jordan, W. 1986. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem. Res. Commun.* **138**: 533-539.
- Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A. and Fukushima, S. 1983. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.* **31**: 3984.
- Odenhal, K. P., Seeger, R., Braatz, R., Petzinger, E., Moshaf, H. and Schmitz-Dräger, C. 1982. Damage *in vitro* to various organs and tissues by rubescenslysin from the edible mushroom *Amanita rubescens*. *Toxicon* **20**: 765-781.
- Okamura, J., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M. and Takahara, Y. 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* **3**: 557-561.
- Ooi, V. E. C. and Liu, F. 1999. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int. J. Med. Mushrooms.* **1**: 195-206.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**: 307-315.
- Park, J. G., Hyun, J. W., Lim, K. H., Shin, J. E., Won, Y. J., Yi, Y. D., Shin, K. H., Chang, I. M. and Woo, W. S. 1993. Antineoplastic effects from traditional medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**: 223-230.
- Park, K. M. and Lee, B. W. 1998. Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from mycelia of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 1236-1242.
- Peter, F. S. 1975. The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Sci. Food Agric.* **26**: 1761
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1974. Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. *Am. J. Ecol. Vitic.* **28**: 49-56.
- STATISTIX. 1996. STATISTIX for windows. User's manual. Analytical software. USA.
- Stephen, J. S., Wan, Y., Snapinn, S. M., DiBattiste, P. M., Zhao, X. Q., Theroux, P., Jang, I. K. and Januzzi, J. L. 2004. Tirofiban therapy for patients with acute coronary syndromes and prior coronary artery bypass grafting in the PRISM-PLUS

- trial. *Am. J. Cardiol.* **93**: 843-847.
- Wayne, H., MacDonald, C. and Currow, D. 2005. Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation. *Lancet Oncol.* **6**: 35-42.
- Yeun, D. M., Lee, T. G., Byun, H. S., Kim, S. B. and Park, Y. H. 1992. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull. Kor. Fish. Soc.* **23**: 229-235.
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K. and Wang, Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci. Technol.* **18**: 4-19.
- Zhijian, H., Haugland, R. P., You, W. and Haugland, R. P. 1992. Phallotoxin and actin binding assay by fluorescence enhancement. *Anal. Biochem.* **200**: 199-204.