

감귤 농축액에서 배양한 운지버섯 배양추출물의 항산화 및 항암활성

이세진 · 문성훈 · 김택¹ · 김진용 · 서정식 · 김대선 · 김율리아 · 김영준 · 박용일*
가톨릭대학교 생명공학부, ¹(주) MAT

Anticancer and Antioxidant Activities of *Coriolus versicolor* Culture Extracts Cultivated in the Citrus Extracts. Lee, Se-Jin, Seong-Hoon Moon, Taeg Kim¹, Jin-Yong Kim, Jeong-Sik Seo, Dea-Sun Kim, Julia Kim, Young-Jun Kim, and Yong-Il Park*. Division of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, Korea, ¹MAT Co. Bukjeju-Gun, Jeju-Do 695-810, Korea – *Coriolus versicolor* was grown in a defined synthetic liquid medium and citrus extracts, and the culture extracts were examined for antioxidant activity, nitrite scavenging activity, and *in vitro* anticancer activity against HeLa, PC-3, HepG2, and A-549 cells. Whereas the culture extracts obtained from the synthetic medium and the un-inoculated citrus extract showed 60 and 22% of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenger activity, the culture extracts obtained from the citrus extracts medium exhibited antioxidant activity up to 89%. The nitrite scavenging activity of the culture extracts obtained from the citrus extracts medium and the synthetic liquid medium, and the un-inoculated citrus extract at pH 1.2 were up to 67, 55, and 34%, respectively. The culture extract obtained from the synthetic liquid medium inhibited the growth of HeLa, PC-3, HepG2, and A-549 up to 66, 23, 18, 10% at 48 h of incubation, respectively; however, the culture extract obtained from the citrus extracts medium inhibited the growth of HeLa, PC-3, HepG2, and A-549 up to 75, 82, 55, and 82%, respectively. As a negative control, the un-inoculated citrus extract was examined in the same way and inhibited the growth of HeLa, PC-3, and HepG2 cells 20, 6, and 15% at 48 h incubation, respectively; the inhibition of A-549 cell growth was negligible. These results clearly showed that the fermentation of *C. versicolor* in the citrus extracts rather than in the defined synthetic medium significantly enhanced the anticancer activity, antioxidant activity, and nitrite scavenging activity.

Key words: *Coriolus versicolor*, citrus extract, anticancer activity, antioxidant activity

버섯은 분류학상 진균류에 위치하며 대부분 담자균류에 속하나 일부는 자낭균 그리고 드물게는 접균류 중에서도 볼 수 있다. 담자균류에 함유된 유효성분 중 항암성분에 대한 연구는 Roland 등[17]에 의해 *Calvatia gigantea*로부터 calvacin을 분리한 이래, 향미성분과 약리효과 때문에 식용 및 약용으로 알려진 버섯류들에 대한 항암효과 연구가 최근에 활발히 진행되고 있다[3, 5]. 이 중 *Letinus edodes*[6, 12], *Coriolus versicolor*[10, 16], *Lepiota procera*[8], *Grifola frondosa*[14], *Lyophyllum ulmarium*[7], *Ganoderma applanatum*[20] 등으로부터 얻은 유효성분중 항암효과를 나타내는 것이 단백다당체라고 알려져 있다. 이들 단백다당체는 종양에 대한 생체고유의 방어력을 높여줌으로서 간접적으로 종양세포를 저지하고, 암세포나 병균을 직접 죽이는 대식세포의 수를 증가시킨다고 보고하였다[6]. 이런 항암기전은 세포면역반응의 촉진에 기인한 것으로[4, 18] 비경구 투여, 특히 복강 내 주사시 유효하지만 경구투여시에는 효력

이 없었다. 이에 비해 운지버섯(*Coriolus versicolor*)의 단백 다당체는 경구투여를 하여도 항암효과가 유효한 결과를 얻었다고 보고하였다[15]. 또한, 운지버섯(일명 구름버섯)은 그 자실체에서 추출한 성분에 대한 항암효과에 관해 많은 연구 결과가 보고되었다[10, 15, 16, 18]. 운지버섯은 봄부터 가을에 걸쳐 활엽수의 썩은 줄기나 가지에 군생하고 전 세계적으로 분포하여 생육시기와 장소에 구애받지 않고 쉽게 채취가 가능하며 민간요법에 이용되어온 약용버섯이다. 한편, 제주지역을 중심으로 대량 생산 되고 있는 온주 밀감은 매년 생산량이 급증하고 있으나, 재배여건에 따른 지역적 제한 때문에 감귤에 대한 연구가 다른 분야에 비해 매우 미흡하다. 이로 인해 감귤을 원료로 하는 가공제품의 생산에 관심을 기울이고 있고, 용도개발을 통한 고부가 가치 제품을 생산하려는 노력을 하고 있다[9, 19].

이에 따라 본 연구에서는 유리당, 유기산, 무기질 등이 다량 함유된 감귤농축액을 배양배지로 하여 운지버섯 균사체를 액체 배양한 배양추출물과 일반합성배지에서 배양한 운지버섯 배양추출물을 이용하여 *in vitro*에서 다양한 암세포에 대한 항암효과 및 항산화 효과를 비교 조사하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-32-340-3512, Fax: 82-32-340-3865

E-mail: yongil382@catholic.ac.kr

재료 및 방법

희석 감귤농축액과 일반 합성배지에서의 운지버섯 균사체 배양

평판배지의 운지버섯 균사체를 액체배지(glucose 6 g, maltose 1.8 g, malt extract 6 g, yeast extract 1.2 g, D.W 1 l, pH 6)에 접종하고 30°C에서 4일간 진탕 배양한 종균 10 ml씩을 각각 100 ml의 상기의 일반 배양배지와 12% 희석 감귤농축액(pH 3.7)에 접종하여 30°C에서 6일간 진탕배양(150 rpm, Vision Scientific Co.)하면서 균사체 증식도를 비교하였다. 균사체 증식도는 배양 후 Whatman filter paper #4로 여과한 후 80°C에서 24시간 건조하여 건조 중량을 측정하였다. 실험에 사용한 감귤 농축액은 제주도 남제주군 한남리 소재 제주도 지방개발공사에서 생산하여 시판 중인 제주 감귤 농축액(62 brix)를 구입하여 살균 증류수로 12% 되게 희석하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 희석 감귤 농축액의 pH는 3.7이었다.

발효조를 이용한 버섯균사체 배양 및 배양 추출물의 제조

평판배지의 운지버섯 균사체를 상기의 일반 합성배지에 접종하고 30°C에서 3일간 배양한 종균을 homogenizer로 균질화하여 7-l jar fermentor(Hanil Co.)를 이용하여 working volume 4 l의 일반 합성배지(상기의 액체배지)와 증류수로 희석한 (12%) 감귤농축액에 각각 접종량이 10%(v/v)되게 집중하여 통기량 1 vvm으로 30°C에서 7일간 배양하였다. 배양완료 후 발효조의 온도를 100°C로 조정하여 3시간 동안 열처리하여 추출한 다음 filter paper(Whatman No.2)로 여과하여 그 여액을 운지버섯 배양추출물로 하여 실험에 사용하였다. 대조구인 버섯을 배양하지 않은 희석 감귤농축액 자체도 상기와 동일한 조건으로 열처리 한 후 여과하여 실험에 사용하였다.

암세포 및 배양배지

실험에 사용된 암세포는 HeLa(female cervix adenocarcinoma), PC-3(male prostate adenocarcinoma), A-549(male lung carcinoma), HepG2(human hepatoblastoma)세포를 원자력 병원 세포생물학연구소로부터 분양받아 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였으며, 세포배양은 T-75 flask(TPP, Switzerland)로 37°C, 5% CO₂ incubator(NUAIRE Co, USA)에서 배양하였다. 배지는 2 mg/ml sodium bicarbonate(Sigma, USA), 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco Laboratories, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI1640(Gibco Laboratories, NY, USA) 배지를 사용하였다.

DPPH에 대한 수소공여능에 의한 항산화 활성 측정

감귤농축액에서 배양한 운지버섯 배양추출물(Extract-I), 일

반배지에서 배양한 운지버섯 배양추출물(Extract-II), 버섯을 접종하지 않은 감귤농축액 자체(Extract-III)에 대한 항산화 활성 측정은 Blois[2]와 Lee 등[13]의 방법을 수정하여 사용하였다. 0.4 mM DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 900 µl에 각 추출물 시료 용액 100 µl 첨가하여 10초 동안 진탕한 다음, 2시간 반응 시킨 후에 DPPH에 대한 수소공여능(electron donating ability, EDA)을 517 nm에서 측정하였다. 각 추출물의 최종농도는 0.3, 1.2, 3.6, 그리고 6.0 mg (mg/ml)로 조제하여 각 농도별에 대한 항산화활성을 측정하였으며, 기존 항산화제로 알려진 BHA(Butylated hydroxyanisole), BHT(Butylated hydroxytoluene)을 각각 25 µM 농도로 처리하여 대조군으로 사용하였다.

아질산 소거능 측정

발암성인 니트로사민의 체내생성에 있어서 가장 직접적인 생성인자가 아질산으로서 이들 아질산을 효과적으로 제거하는 것이 니트로사민 생성억제에 직결되므로 각 배양추출물 시료의 아질산염 소거능을 Lee 등[11]의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 1 mM NaNO₂ 용액 2 ml에 각 추출물 용액 1 ml(60 mg)을 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 6.0으로 조정한 다음 반응용액의 최종 부피를 10 ml로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 반응액을 각각 1 ml씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 ml, Griess 시약(30% acetic acid에 각각 조제한 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용하기 직전에 조제) 0.4 ml를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에 방치시킨 후 흡광도를 520 nm에서 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 ml를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은 $100 - [(시료첨가군의 흡광도 - 시료의 흡광도/무첨가군의 흡광도 - 시료의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다.

암세포 생육저해능 측정

배양한 각 암세포를 96 well plate에 1.5×10^4 cells/100 µl/well로 배양을 하고 24시간 후 버섯배양추출물 시료를 각 농도(0.6, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0 mg/ml 배지)별로 처리하여 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 48시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양 하였다. MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용한 Cell viability assay는 배양종료 2시간 전에 빛을 차광하고 cell proliferation assay solution(CellTiter 96[®] Aqueous Cell Proliferation Assay, Promega Co. USA)을 20 µl/well 을 처리하고, 흡광도를 ELISA reader로 490 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도와 비교하여 세포증식율을 백분율로 환산 하였다[1].

결과 및 고찰

회석 감귤농축액과 일반 합성배지에서의 운지버섯 균사체 증식 비교

일반 합성배지와 회석 감귤농축액배지에서 운지버섯 생육을 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 일반배지의 경우, 배양 4일째 균사체 건조량이 5 g/l로 최대성장을 보였으며, 운지버섯 균사체 증식에 반비례적으로 최종 pH는 감소하는 경향을 보이며, 증식속도가 최적일 때 최종 pH는 pH 4.4 이었다. 정지기에 도달되었을 때, 최종 pH가 증가하였다. 이런 결과로 인해 운지버섯 균사체 증식은 배지의 pH에 상당히 의존적임을 알 수 있었다. 회석 감귤농축액 배지의 경우, 감귤의 유리된 유기산의 영향으로 pH가 약산성으로 운지버섯 균사체 증식의 대수증식기가 합성배지의 대수증식기 보다 길었다. 이는 운지버섯이 pH에 대한 내성을 유지하는 것으로 사료된다. 그러나 배양시간이 지남에 따라 감귤 농축액의 낮은 pH에서도 운지버섯의 증식이 일반 합성배지와 유사한 증식을 보였고, 배양 5일째 균사체 건조량이 7 g/l로 최대성장을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 운지버섯 균사체를 발효기에서 대량 배양하여 균사체 배양 추출물을 제조하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

버섯 배양추출물의 항산화 효과

항산화물질의 가장 특징적인 역할은 oxidative free radical과 반응하여 산화력을 억제시키는데 있다. 회석한 감귤농축액에서 배양한 운지버섯 배양추출물(Extract-I)과 일반 합성배지에서 배양한 운지버섯 배양추출물(Extract-II), 그리고 접종하지 않은 감귤농축액 자체(Extract-III)에 의한 항산화 효과를 DPPH에 의한 전자공여능소거작용을 측정하여 Fig. 2

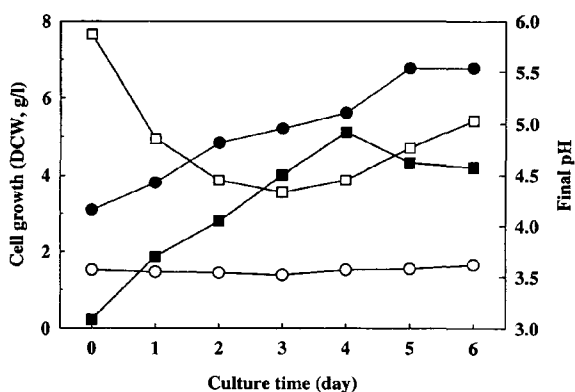


Fig. 1. Comparison of the growth of *Coriolus versicolor* on the synthetic liquid and the citrus extract media. Cultivation was carried out at 30°C for 6 days under constant shaking at 150 rpm. The values obtained were the mean of triplicates. ●, Cell growth of *C. versicolor* in the citrus extract medium; ○, Final pH of the citrus extract medium; ■, Cell growth of *C. versicolor* in the synthetic liquid medium; □, Final pH of the synthetic liquid medium.

에 나타내었다. Extract-I, II 그리고 III 모두 처리농도가 높아질수록 항산화력이 증가하였으며, 특히 Extract-I 처리농도 1.2 mg/ml 이상부터 항산화 효과가 약 50% 이상을 나타내었다. 각 배양추출물의 처리농도가 6.0 mg/ml일때, Extract-I은 89%, Extract-II는 60%, 그리고 Extract-III는 22%의 항산화 효과를 나타내어 Extract-I이 항산화능이 가장 높았으며, 알려진 항산화 물질인 BHA와 BHT 보다도 약 1.8배 그리고 4.1배 정도 높은 항산화 활성을 나타내었다. 실험 결과 회석 감귤농축액 자체 또는 일반 합성배지에서 운지버섯을 배양했을 때 보다 회석 감귤농축액에 운지버섯을 배양하였을 때 그 배양추출물의 항산화 효과가 현저히 상승하는 결과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 2).

버섯 배양추출물의 아질산 제거 효과

버섯 배양추출물의 아질산 제거능에 대한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Extract-I, II 그리고 III에 대한 pH 별(pH 1.2, 3 그리고 6) 아질산염 제거능은 pH가 낮을수록 효과적이며, 항산화 활성과 같은 결과로 회석 감귤농축액에서 배양한 운지버섯 추출물, 회석 감귤농축액 자체 또는 일반 합성배지에서 배양한 추출물보다 아질산 제거능이 가장 우수함을 보였다. pH 1.2에서 Extract-I, II 그리고 III에 의한 아질산염 제거능은 각각 67%, 55%, 그리고 34%였다. 니트로사민의 전구물질인 아질산염과 아민이 식품 내에 널리 존재하고 있으므로 이들을 함유하고 있는 식품물을 동시에 섭취했을 때 니트로사민이 생성될 가능성 있다. 특히, 니트로사민은 산성 pH에서 용이하게 생성되고 그 생성 최적 pH가 인체의 위의 pH 조건과 유사하므로 인체의 위내에서 니트로사민의 생성이 매우 높다. Fig. 3의 결과에서 배양추출물의 아질산 제거능이 pH 1.2에서 가장 효과적으로 제거하

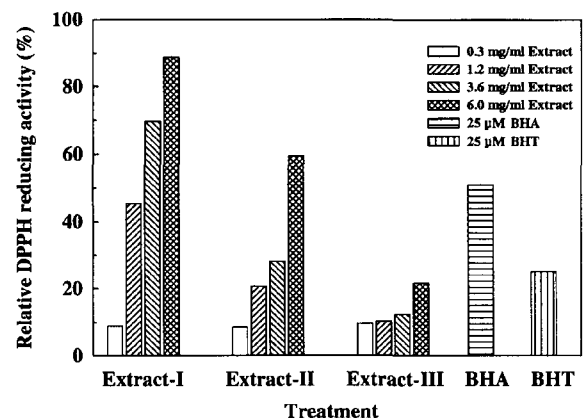


Fig. 2. Comparison of DPPH radical scavenging activity of *Coriolus versicolor* culture extracts obtained from the synthetic liquid and the citrus extract media. Extract-I is the *C. versicolor* culture extract obtained from the citrus extract medium, Extract-II is the *C. versicolor* culture extract obtained from the synthetic medium, and Extract-III is the un-inoculated citrus extract. Experimental details are as described in Materials and Methods.

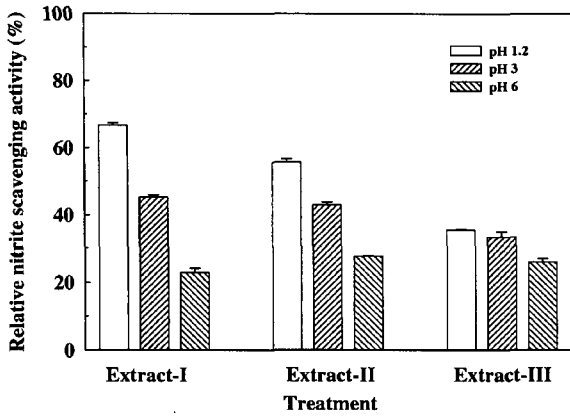


Fig. 3. Comparison of nitrite scavenging activity of *Coriolus versicolor* culture extracts obtained from the synthetic liquid and the citrus extract media. Extract-I is the *C. versicolor* culture extract obtained from the citrus extract medium, Extract-II is the *C. versicolor* culture extract obtained from the synthetic medium, and Extract-III is the un-inoculated citrus extract. Experimental details are as described in Materials and Methods.

였으므로 생체내에서 아질산 제거능이 아주 효율적으로 작용할 것으로 사료된다. 아질산 제거능이 우수한 배양추출물을 아질산염과 아민이 존재할 수 있는 생체식품 및 가공식품과 함께 섭취하면 니트로사민에 의한 암의 발생을 예방하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 3).

버섯 배양추출물에 의한 암세포 생육 저해 효과

희석 감광농축액에서 배양한 운지버섯 배양추출물(Extract-I)과 일반 합성배지에서 배양한 운지버섯 배양추출물(Extract-II), 그리고 접종하지 않은 감광농축액(Extract-III)을 농도별로 HeLa, PC-3, HepG2와 A-549 세포 배양액에 처리하여 48시간 배양한 후 암세포에 대한 생육 저해 효과를 Fig. 4에 나타내었다. Extract-I은 모든 암세포의 생육을 현저히 저해하였고, 저해양상이 각각의 암세포마다 약간의 상이성을 보였다. Extract-I의 처리농도가 6.0 mg/ml일 때, HeLa, PC-3, HepG2, 그리고 A-549 세포의 생육 저해율은 각각 75%, 82%, 45%, 그리고 82%이었다. Extract-I에 의한 각 암세포

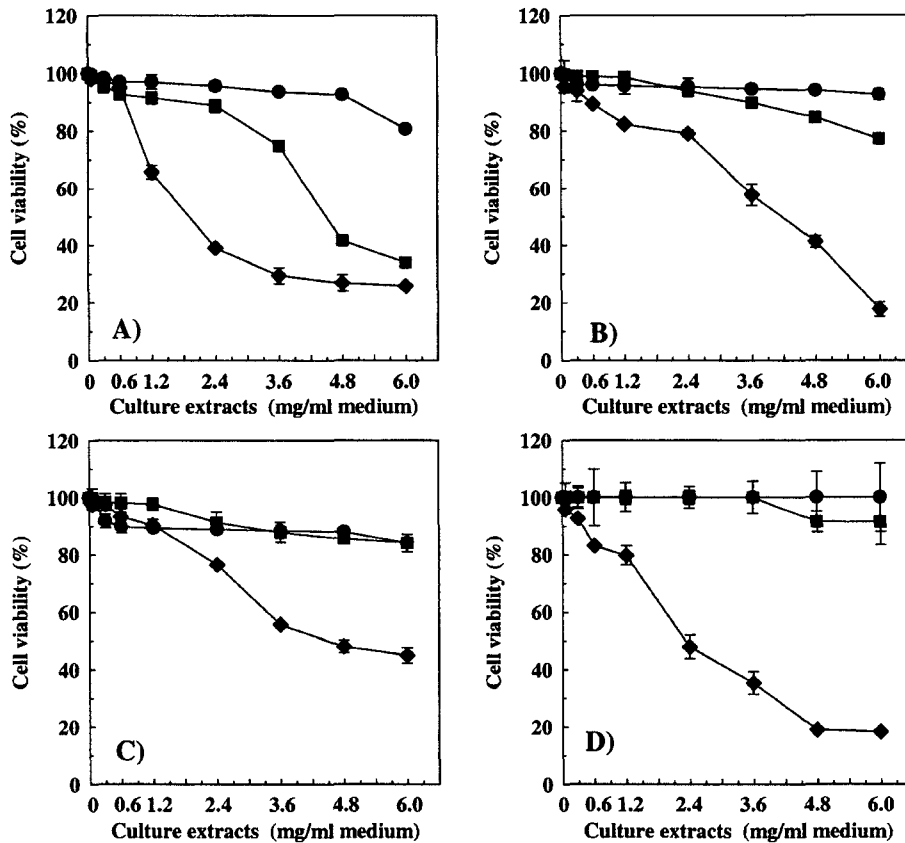


Fig. 4. Inhibition of cancer cell growth by *Coriolus versicolor* culture extracts obtained from the synthetic liquid and the citrus extract media. Cells were seeded at a density of 1.5×10^4 cells/100 ml/well in 96-well plates with RPMI1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mg/ml sodium bicarbonate and 1% penicillin-streptomycin. Twenty four hours after the growth, different concentrations of each *C. versicolor* culture extracts were added to each well and 48 h after the further growth, the cell viability was determined by MTT assay on a microplate reader. Cancer cell lines used were A) HeLa (female cervix adenocarcinoma) cell, B) PC-3 (male prostate adenocarcinoma) cell, C) HepG2 (human hepatoblastoma) cell, and D) A-549 (male lung carcinoma) cell. Values obtained were the mean of triplicates. ●, the un-inoculated citrus extract (Extract-III); ■, the *C. versicolor* culture extract (Extract-II) obtained from the synthetic liquid medium; ◆, the *Coriolus versicolor* culture extract (Extract-I) obtained from the citrus medium.

의 생육저해를 일으키는 초기 처리농도와 IC₅₀은 암세포마다 상이한 결과를 나타내었다. HeLa 세포의 생육저해를 일으키는 초기농도와 IC₅₀은 0.6 mg/ml와 1.8 mg/ml이었고, PC-3 세포의 경우는 2.4 mg/ml와 4.2 mg/ml이었고, HepG2 세포는 1.2 mg/ml와 4.5 mg/ml이었으며, A-549 세포는 1.2 mg/ml와 2.4 mg/ml이었다. 따라서, Extract-I에 의한 항암효과는 HeLa, A-549, PC-3, 그리고 HepG2 세포 순으로 항암활성이 높게 나타남을 알 수 있었다. 한편, 일반 합성배지에서 배양한 운지버섯 배양추출물(Extract-II)은 4 종류의 암세포 중에서 HeLa 세포에 대해서만 현저한 생육저해를 나타내었다. 생육저해를 일으키는 초기농도와 IC₅₀은 2.4 mg/ml와 4.5 mg/ml이었고, 생육 저해율은 66%이었다. 접종하지 않은 회색 감귤농축액인 Extract-III의 암세포 생육저해는 4 종류의 암세포에서 거의 일어나지 않았다(Fig. 4).

결과적으로 회색 감귤농축액 자체 또는 일반 합성배지에서 운지버섯을 배양했을 때 보다 회색 감귤농축액에 운지버섯을 배양하였을 때 그 배양추출물의 항산화 효과, 아질산 제거능 및 항암효과가 현저히 상승하는 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 현재 본 연구실에서는 이들 활성물질의 규명에 대한 연구를 진행하고 있다.

요 약

운지버섯을 회색 감귤농축액과 일반 합성배지에서 각각 배양한 배양물을 열탕 추출하고 여과하여 얻어진 버섯 배양추출물과 버섯을 접종하지 않은 회색 감귤농축액 자체에 대한 항산화 활성, 아질산 제거능, 그리고 항암활성을 조사 비교하였다. DPPH 전자공여를 이용한 항산화 활성에서 회색 감귤농축액에서 얻어진 배양추출물(Extract-I)은 89%, 일반 합성배지에서 얻어진 배양추출물(Extract-II)은 66%, 접종하지 않은 회색 감귤농축액 자체(Extract-III)는 22%의 항산화 활성을 나타내었다. 아질산 제거능은 배양추출물 모두 산성 조건 일수록 증가하였으며, Extract-I은 67%, Extract-II는 54%, 그리고 Extract-III는 34%의 아질산 제거능을 보였다. HeLa, PC-3, HepG2 및 A-549 세포에 대한 항암활성을 조사한 결과, Extract-I은 각각의 암세포들에 대해서 순차적으로 75%, 82%, 55%, 그리고 82%의 높은 생육 저해 활성을 보였다. 반면에 Extract-II는 HeLa cell에 대해서만 66%의 생육저해를 보였고, Extract-III는 모든 암세포의 생육을 저해하지 않는 것으로 조사되었다. 따라서 운지버섯을 회색 감귤농축액에 배양함으로써 일반 합성배지에서 배양하거나 감귤농축액 자체보다 항산화 활성과 항암활성을 현저히 증가시킬 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 가톨릭대학교 교비연구비의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Barltop, J.A., T.C. Owen, A.H. Cory, and J.G. Cory. 1991. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt(MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1**: 611-614.
2. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
3. Bohn, J.A. and J.N. BeMiller. 1995. (1->3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polymers* **28**: 3-14.
4. Chihara, G., J. Hamuro, Y.Y. Maeda, Y. Arai, and F. Fukuroka. 1970. Fraction and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
5. Chung, H. Development of the medicines from mushrooms. 1998. *Microorg. Industry* **24**: 30-41.
6. Fuji, T., H. Maeda, and N. Ishida. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiot.* **31**: 1079-1090.
7. Kazun, C., M. Nishijima, H. Miura, and I. Kamoi. 1990. Structural examination of water-soluble glycans from fruit body of *Lyophyllum ulmarium*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **37**: 765-772.
8. Kim, B.K., M.J. Shin, O.N. Kim, H.W. Kim, and E.C. Choi. 1989. Antitumor components of the cultured mycelia of *Lepiota procera*. *Kor. J. Food Hygiene* **4**: 109-118.
9. Koh, J.S. and S.H. Kim 1995. Physicochemical properties and chemical compositions of Citrus Fruits produced in Cheju. *Agric. Chem. Biotechnol.* **38**: 541-545.
10. Lee, B.W., M.S. Lee, K.M. Park, C.H. Kim, P.U. Ahn, and C.U. Choi. 1992. Anticancer activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 311-315.
11. Lee, G.D., H.G. Chang, and H.K. Kim. 1997. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**: 432-436.
12. Lee, J.W., C.H. Chung, H.J. Jeong, and K.H. Lee. 1990. Anticomplementary and antitumor activities of the Ikal, extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY-105. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 571-577.
13. Lee, J.W., J.H. Do, and K.H. Shim. 1999. Antioxidant activity of the water soluble browning reaction products isolated from Korean Red Ginseng-1. DPPH radical and hydrogen peroxide scavenging. *J. Ginseng. Res.* **23**: 176-181.
14. Mizuno, T., K. Ohsawa, N. Hagiware, and R. Kuboyama. 1986. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1679-1688.
15. Park, E.K. and B.K. Kim. 1977. Antineoplastic components

- of mushrooms- antineoplastic activities of PS-K, a protein-bound polysaccharide of *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. *Kor. J. Mycol.* **5**: 25-30.
16. Park, Y.D., Y.K. Hong, W.K. Whang, J.D. Huh, and S. Park. 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelia cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 223-228.
17. Roland, J.F., Z.F. Chmielewicz, B.A. Weiner, A.M. Gross, O.P. Boening, J.V. Luck, T.J. Bardos, H.C. Reilly, K. Sugiura, C.C. Stock, E.H. Lucas, R.U. Byerrum, and J.A. Stevens. 1960. Calvacin, a new antitumor agent. *Science* **23**: 1897.
18. Shim, M.J. 1981. Studies on constituents and culture of the higher fungi of Korea. *Kor. J. Mycol.* **9**: 49-66.
19. Song, E.Y., Y.H. Choi, K.H. Kang, and J.S. Koh. 1998. Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju Citrus Fruits according to harvest date. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 306-312.
20. Usui, T., Y. Iwasaki, and T. Mizuno. 1983. Isolation and characterization of antitumor β -D-glucans from the fruit body of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydr. Res.* **115**: 273-280.

(Received Sep. 29, 2003/Accepted Nov. 21, 2003)