

큰눈물버섯(*Psathyrella velutina*) 균사배양물로부터 분리한 단백다당체 PVMP의 면역활성

정경수[#] · 이지선

충남대학교 약학대학 미생물면역 학교실

(Received August 27, 2004; Revised September 23, 2004)

Immunoactivities of PVMP, a Protein-polysaccharide Fraction Isolated from Mycelial Culture of *Psathyrella velutina*

Kyeong-Soo Chung[#] and Ji-Seon Lee

Laboratory of Microbiology and Immunology, College of Pharmacy, Chung-Nam National University, Daejon 305-764

Abstract - In the previous report, we described the marked antitumor and immunomodulatory activities of PVP, a protein-polysaccharide fraction of a Korean wild mushroom *Psathyrella velutina*. In this study, a protein-polysaccharide fraction, PVMP, was prepared from the shake-cultured mycelia of the same mushroom and its immunoactivities as well as chemical compositions were investigated. At 200 µg/ml, PVMP weakly stimulated the BALB/c mouse splenic lymphocytes to form lymphoblasts and upregulated the expression of CD25 molecules, but failed to stimulate peritoneal macrophages. In chemical analysis these two protein-polysaccharide fractions were found to be quite different in that the carbohydrate contents of PVMP and PVP, respectively, was 85.3% and 41.2%. These results reveals that PVMP, unlike PVP, is a moderate immunostimulator on the immune system.

Keywords □ *Psathyrella velutina*, mycelium, PVMP, protein-polysaccharide, lymphoblast, CD25, immunostimulation

담자균류(basidiomycetes)의 다당체/단백다당체가 숙주의 면역 기능을 활성화시켜 항암효과를 나타낸다는 사실은 잘 알려진 바와 같다.¹⁻⁷⁾ 본 연구자들은 야생 담자균류 즉 야생 버섯류로부터 새로운 항암면역활성 단백다당체를 개발하기 위한 연구를 수행해 오고 있으며⁸⁻¹⁴⁾ 최근에는 큰눈물버섯(*Psathyrella velutina*)로부터 분리한 단백다당체 PVMP의 항암면역 활성을 보고한 바 있다.¹⁵⁾ PVP는 야생 큰눈물버섯 자실체를 채집하여 그로부터 열수추출 및 알콜침전, 투석 등을 거쳐 제조한 단백다당체 분획으로서 ICR 생쥐 복강에 이식한 sarcoma 180 암세포의 증식을 92.8% 억제하였고 BALB/c 생쥐의 비장 백혈구에 대해 lymphoblast 생성 증가 효과를 나타내었으며 T lymphocyte를 활성화시켜 Interleukin-2 receptor α-chain(CD25)의 발현을 증가시키는 등 현저한 항암·면역활성을 나타내었다.¹⁵⁾ 그러나 큰눈물버섯은 아직까지 재배 방법이 개발되지 않았을 뿐만 아니라 버

섯의 크기도 작아 그 자실체를 이용한 의약품 또는 기능성 식품 등의 생산은 어려움이 예상된다. 이처럼 자실체를 대량 확보하기 어려운 경우에는 균사체를 분리하여 액체 배양함으로써 유효성분을 대량 생산할 수 있다.^{12,14)} 다만, 자실체(버섯)에서 확인된 약리 활성 성분이 균사체에서도 그대로 얻어진다는 보장이 없기 때문에 균사 배양물을 대상으로 한 별도의 연구가 반드시 수행되어야 한다. 구름버섯(雲芝: *Coriolus versicolor*)⁵⁾이나 상황버섯(*Phellinus linteus*)⁸⁾은 균사체를 액체배양하여 항암면역요법제로 사용하고 있는 좋은 예이다. 따라서 본 연구자들은 큰눈물버섯으로부터 균사체를 무균적으로 분리한 후 액체배지내에 진탕배양하고 그 균사배양물로부터 단백다당체를 분리하여 그의 면역활성을 규명코자 하였다.

실험 방법

큰눈물버섯 균주 분리

대전광역시 계족산 지역에서 채집한 오염되지 않은 야생 큰눈물버섯 자실체로부터 이미 보고한 바¹²⁾와 같이 균주를 분리하였

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5927 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) chung_es@cnu.ac.kr

다. 즉, 신선한 어린 자실체 갓부위에서 조직 절편을 무균적으로 떼어내 감자-포도당-한천(Potato Dextrose Agar=PDA, Difco사) 배지에 올려 놓고 25°C에서 7일간 배양한 후 조직 절편으로부터 성장해 나온 균사체 선단부를 잘라내어 다시 신선한 PDA 평판 배지에 이식하고 이로부터 성장한 균사체를 PDA 사면배지에 이식하여 큰눈물버섯 균주로 사용하였다.

균사체 배양¹²⁾

PDA 사면 배지상에 보존 중인 큰눈물버섯 균주를 소량의 담자균 배양용 액체 배지(배지 1l 당 성분: 포도당 50 g, 웨튼 10 g, yeast extract 10 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, CaCl₂ 0.3 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.04 mg, CuSO₄ · 5H₂O 0.01 mg, MnCl₂ · 4H₂O 0.07 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 mg, 이하 '액체배지'라 칭함)와 함께 미리 멸균한 가정용 믹서(Osterizer 12 Speed Blender)로 균질화하였다. 이를 액체배지 50 mL가 담긴 250 mL-플라스크에 5 mL씩 접종, 25°C에서 180 rpm으로 10일간 진탕 배양하였다. 얻어진 배양물을 재차 균질화시킨 후 액체배지에 10%(v/v)씩 접종하여 10일간 진탕 배양하여 최종 균사배양물(Fig. 1)을 획득하였다.

단백다당체 제조⁹⁾

균사체 배양물을 균질화시킨 후 고압멸균기로 121°C에서 40분간 열수 추출하였다. 감압여과하여 추출액을 분리한 후 잔사는 재차 열수 추출을 시행하였다. 1, 2차 열수 추출액을 합하여 원심분리하고 그 상등액을 60°C 수육상에서 5배 감압농축하였다. 이에 95% 에탄올을 3배량 가하고 4°C에 하룻밤 방치하여 침전을 생성시켰다. 4°C에서 2,800 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전물을 얻고 이를 60°C 정도의 중류수에 재용해시켜 cellulose 투석막(Sigma. molecular weight cut off : 12,000)에 넣어 중류수를 교체하면서 4°C에서 4일간 투석하여 저분자 물질을 제거하고 동결건조하여 단백다당체를 획득하였다. 이를 "PVMP"



Fig. 1 - The shake-cultured mycelia of *Psathyrella velutina*.

(*Psathyrella velutina* mycelium protein-polysaccharide)라 칭하였다.

단백다당체 PVMP의 당함량 분석

시료중 당함량은 포도당을 표준당으로 하고 anthrone 시약을 발색시약으로 하여 비색법¹⁶⁾으로 정량하였다.

비장 백혈구 혼탁액 제조 및 배양

이미 보고한 방법¹⁰⁾에 의거하여 다음과 같이 비장세포 혼탁액을 제조하였다. 즉, SPF(specific pathogen-free) male BALB/c 생쥐의 비장을 적출한 후 100-mesh의 stainless steel screen를 통과시켜 단세포로 분리하였다. 인산염원총액(PBS, pH 7.2)으로 2회 세척한 후, red blood cell lysing buffer(Sigma)를 이용, 적혈구를 용혈시키고 다시 PBS로 2회 세척한 후 fetal bovine serum(Hyclone)을 10% 첨가한 RPMI 1640 배지(10 mM HEPES buffer, penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 µg/ml 첨가)(이후 "10% FBS-RPMI 1640 배지"라 칭함)로 희석하여 2 × 10⁶ cells/mL 되도록 비장 백혈구 혼탁액을 제조하였다. 단백다당체 시료는 10% FBS-RPMI 1640 배지에 1 mg/mL로 용해시킨 후 0.20 µm membrane filter로 여과 멸균하고 필요에 따라 희석하여 사용하였다. 비장 백혈구 혼탁액을 6 mL culture tube에 500 µL 분주하고 배지 또는 시료를 500 µL를 가하여 5% CO₂ 대기하에서 48시간 배양하였다. 모든 실험군은 3개씩 중복 실험하였다.

면역형광염색 및 유세포분석(flow cytometric analysis)^{11,17)}

세포 혼탁액 300 µL를 FACS tube로 옮겨 원심분리하여 상등액을 제거하고, 10배 희석한 FITC-conjugated anti-mouse CD25 monoclonal antibody(Pharmingen) 용액 20 µL씩을 가하여 빙욕상에서 30분간 면역형광염색을 시행하였다. 2회 세척한 후 300 µL로 혼탁시키고 죽은 세포를 분별하기 위하여 propidium iodide(250 µg/mL) 30 µL씩을 첨가하여 즉시 유세포 분석하였다. 사용한 유세포분석기는 Becton Dickinson사의 FACSCalibur이며 사용한 분석 프로그램은 CellQuest였다. FSC/SSC dual parameter dot plot에서 FSC threshold를 설정하고 10,000개의 세포에 대한 자료를 취합하였으며 이들을 다시 FSC/FL3 dual parameter dot plot에 나타내어 FL3-negative인 세포(viable cell)를 분석 대상으로 하고 이들을 FSC histogram 및 FL1(CD25) histogram에 나타낸 후 분석하였다.

복강대식세포 spreading 실험

BALB/c 생쥐의 복강에 차가운 PBS(pH 7.2) 5 mL을 주사하고 고르게 문질러 준 후 복강 세척액을 회수하였다. 원심분리하여 상등액을 제거하고 10% FBS-RPMI 1640 배지에 1 × 10⁶ cells/

ml로 부유시켜 flat-bottomed 96-well culture plate에 200 µl씩 가하였다. 37°C, 5% CO₂ 대기하에서 1시간 배양하여 플라스틱 용기에 부착시킨 후 37°C로 데워 놓은 10% FBS-RPMI 1640 배지로 3회 세척, 부착되지 않은 세포들을 제거하였다. 여기에 시료 용액을 200 µl씩 가하고 다시 2시간 배양한 후 현미경 사진을 촬영하여 spreading된 세포를 계수, 그 백분율을 계산하였다.

통계처리

모든 실험 data는 Student's t-test를 시행하여 유의성을 검토하였으며 유의수준은 p<0.05 이하로 하였다.

실험결과 및 고찰

단백다당체 PVMP의 물리화학적 성상

큰눈물버섯 배양 균사체로부터 추출한 단백다당체 PVMP는 연한 회황색 내지 담황색 무정형 분말로서, 중류수나 생리식염수 등에 잘 녹으며 anthrone 시약을 이용한 비색법으로 정량한 결과 당함량은 85.3%로서, 큰눈물버섯 자실체로부터 분리한 단백다당체 PVP의 당함량(41.2%) 보다 2배 이상 높았다. 따라서 PVMP와 PVP는 서로 상이한 단백다당체임을 알 수 있었다.

PVMP의 Lymphoblast 생성 자극 효과

BALB/c 생쥐 비장 임파구에 PVMP 등을 가하고 48시간 배양한 후 유세포분석(flow cytometrical analysis) 기법으로 분석한 결과, Table I에 나타낸 바와 PVMP는 200 µg/ml 농도에서 완만한 lymphoblast 생성 자극 효과를 나타내었다. 즉 세포직경과 비례하는 유세포 분석 parameter인 FSC 값이 대조군의 경우 343.41이었으나 PVMP 200 µg/ml 처리군에서는 387.28로 증가(p<0.001)하였다. 뿐만 아니라 lymphoblast 비율이 대조군의 경우 33.9%였으나 PVMP 200 µg/ml 처리군에서는 49.8% (p<0.001)로 증가하였다. 이로써 큰눈물버섯 배양균사로부터 분리한 단백다당체 PVMP도 큰눈물버섯 자실체로부터 분리한 단백다당체 PVP와 유사하게 lymphoblast 생성 자극 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다. 그러나 PVMP는 100 µg/ml 및 50 µg/ml 농도에서는 lymphoblast 생성 자극 효과를 나타내지 못하여 PVP보다 그 효과가 미약함을 알 수 있었다.

PVMP의 T cell 활성화 효과

전항에서 확인한 lymphoblast 생성 자극 효과가 어떤 면역세포를 활성화시킴으로써 나타난 결과인지를 확인하기 위하여 BALB/c 생쥐 비장 임파구에 PVMP 등을 가하고 48시간 배양한

Table I - *In vitro* Lymphoblastogenic effect of PVMP on the splenic lymphocytes of a BALB/c mouse

Stimulant	Con. (µg/ml)	FSC ^a		% Lymphoblast ^b	
		Mean±SD	% Increase	Mean±SD	% Increase
Medium	-	343.41±2.97	-	33.9±0.84	-
ConA ^c	5	458.94±4.53***	33.64	73.0±0.3***	115.1
PVMP ^d	200	387.28±2.80***	12.78	49.8±1.4***	46.7
	100	348.46±4.78	1.47	33.3±2.6	-1.91
	50	349.09±2.85	1.66	34.9±1.3	2.77
PVP ^e	100	376.55±3.67***	9.65	42.0±1.6***	23.75

^aFSC is an abbreviation of forward scatter, a flow cytometric parameter, which corresponds to the size of a cell.

^bThe cells satisfying a marker set on a FSC histogram to include larger cells were taken as lymphoblasts.

^cCon A : concanavalin A.

^dPVMP : the protein-polysaccharide fraction prepared from the shake-cultured mycelia of *Psathyrella velutina*.

^ePVP : the protein-polysaccharide fraction prepared from the carpophores of *P. velutina*.

***Significant at p<0.001.

Table II - Effect of PVMP on the expression of CD25 on the splenic lymphocytes of a BALB/c mouse

Stimulant	Conc. (µg/ml)	FL1 (CD25)		% CD25 ⁺ cells	
		Mean±SD	% Increase	Mean±SD	% Increase
Medium	-	8.20±0.66	-	13.37±0.63	-
ConA ^a	5	92.24±0.56***	1024.49	87.84±0.44***	557.14
PVMP ^b	200	9.92±0.41*	20.90	19.26±0.68***	44.08
	100	7.83±0.31	-4.58	12.78±0.64	-4.37
	50	8.20±0.24	-0.07	12.98±0.46	-2.90
PVP ^c	100	11.61±1.13**	41.58	25.74±1.56***	92.53

^aCon A : concanavalin A.

^bPVMP : the protein-polysaccharide fraction prepared from the shake-cultured mycelia of *Psathyrella velutina*.

^cPVP : the protein-polysaccharide fraction prepared from the carpophores of *P. velutina*.

*Significant at p<0.05, **significant at p<0.01, ***significant at p<0.001.

후 유세포분석(flow cytometrical analysis) 기법을 이용하여 세포매개성면역(cell-mediated immunity)의 근간이 되는 T cell의 활성화 정도를 분석하였다. 즉, T cell 활성화 지표분자(activation marker molecule)로 널리 알려져 있는 CD25(interleukin-2 receptor α chain, p55)의 발현정도를 분석한 결과 Table II에 나타낸 바와 같이 PVMP는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 CD25 발현을 유의적으로 증가시킴으로써 T cell 활성화 효과가 입증되었다. 즉 배지 대조군의 CD25에 의한 평균 형광광도(Mean FL1) 값이 8.20이었으나 PVMP 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 9.92($p<0.05$)로 20.9% 증가하였고, 배지 대조군의 CD25+ 세포 비율이 13.37%였으나 PVMP 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 19.26%($p<0.001$)로서 대조군에 비해 CD25+ 세포가 약 44% 증가한 것으로 해석된다. 이로써 큰눈물버섯 배양균사로부터 분리한 단백다당체 PVMP도 그 자실체로부터 분리한 단백다당체 PVP와 유사하게 T cell 활성화 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다. 그러나 그 효과는 PVP보다 매우 약한 것으로 나타났다. 즉 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 PVP는 CD25 발현을 41.6% 유의적으로 증가시켰으나 PVMP는 효과를 발휘하지 못하였다.

PVMP의 복강 대식세포 spreading 효과

Fig. 2 패널 C에서 볼 수 있드시 PVP는 많은 복강 대식세포를 자극하여 2시간 만에 배기용기 바닥에 불규칙한 형태로 퍼지도록 하였다. 그러나 PVMP(Fig. 2 패널 B)는 대조군(Fig. 2 패널 C)과 비교할 때 별다른 차이를 나타내지 않았다. 이를 육안 관찰하여 spreading을 일으킨 비율을 산출한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 PVP는 복강 대식세포의 spreading을 현저 증가시킨 반면에 PVMP는 거의 효과가 없음을 알 수 있었다.

동일한 버섯으로부터 제조된 단백다당체들이 면역활성에 있어서 큰 차이를 보인 가장 큰 이유는 이들 두 단백다당체 시료가

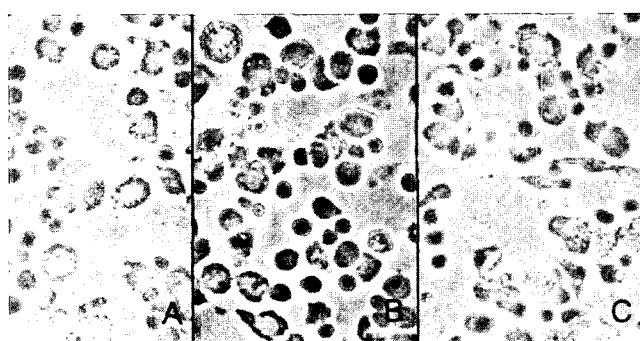


Fig. 2 - *In vitro* spreading of BALB/c mouse peritoneal macrophages by PVMP and PVP, the protein-polysaccharide fractions isolated respectively from the carpophores and the shake-cultured mycelia of *Psathyrella velutina*. Each data point is the mean of three experiments. The numbers shown are the concentration of the protein-polysaccharides in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

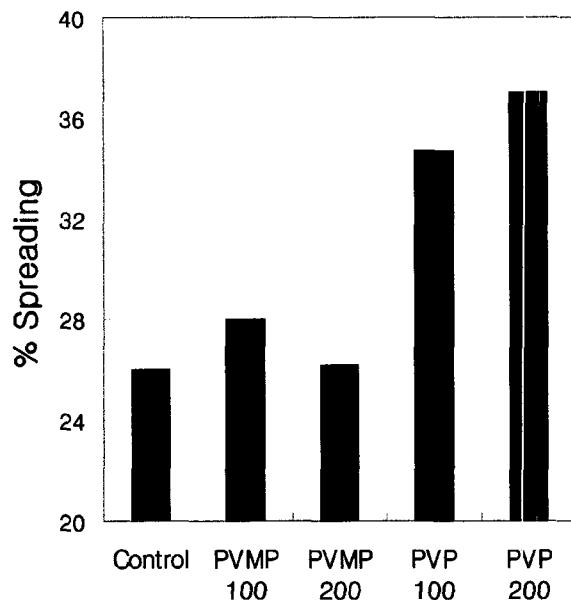


Fig. 3 - *In vitro* spreading of BALB/c mouse peritoneal macrophages by PVMP and PVP, the protein-polysaccharide fractions isolated respectively from the carpophores and the shake-cultured mycelia of *Psathyrella velutina*. A: medium control, B: PVMP (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), C: PVP (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

기원 생물만 같을 뿐 실제로는 서로 상이한 단백다당체일 수 있기 때문이다. 즉 PVP는 야생큰눈물버섯 자실체 즉 아생버섯으로부터 제조한 단백다당체로서 그중 다당체 함량이 41.2%에 불과하나, PVMP는 큰눈물버섯으로부터 균사를 분리하여 액체배지에 진탕 배양한 후 그로부터 제조한 단백다당체로서 그 다당체 함량이 85.3%에 달하는 등 두 시료간에 화학적 조성부터 크게 다름에 유념할 필요가 있다. 자실체와 균사체 간에 성분의 차이가 나는 이유는 버섯의 생활사를 살펴봄으로써 이해가 가능하다.¹⁸⁾ 즉 자실체에서 유래한 포자가 빌아하면 균사로 자라며 이들 균사체는 영양 흡수 및 성장을 주요 기능으로 갖고 몇 달 동안 눈에 띄지 않게 꾸준히 성장하며 영양을 축적하게 된다. 그러다 자실체 발생에 적합한 최적 조건이 갖추어 지는 몇 일 정도의 짧은 기간에 균사체로부터 자실체가 자라 나와 포자를 생성하여 퍼뜨리게 된다. 이때 균사체에서 발현되지 않고 있던 다양한 유전자가 발현되어 다양한 2차 대사물을 생성하는데 그 대표적인 예가 색소, 독성분, 항균성분 등을 들 수 있다. 그 결과 백색 내지 미황색 정도의 균사체에서 저마다 다양한 색상과 형태를 지닌 버섯이 발생하는 것이다. 따라서 균사체와 자실체는 성분에 큰 차이가 있을 수 있으며 실제로 버섯과 균사체에 성분상의 현저한 차이가 있는 좋은 예는 버섯류의 렉틴에 관한 연구들에서 찾아 볼 수 있다.¹⁹⁾ 많은 렉틴들이 팽이버섯을 포함한 다양한 버섯 자실체에서 발견되고 있지만 인공적으로 배양한 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 균사체에서는 전혀 발견되지 않거나 또는 자실체와 전혀 다른 렉틴이 발견되기도 하는 것이다.²⁰⁾

결 론

한국산 야생담자균인 큰눈물버섯(*Psathyrella velutina*)으로부터 균사체를 분리하여 액체배지에 전탕배양하고 그로부터 단백다당체 PVMP를 분리하였다. PVMP는 수용성 단백다당체로 그중 당 함량은 85.3% 였으며 200 µg/ml 농도에서 BALB/c 생쥐 비장 백혈구에 대하여 lymphoblast 생성 자극 효과를 나타내었으며, T cell 활성화 효과도 발휘하여 CD25 발현을 증가시켰다. 그러나 100 µg/ml 이하의 농도에서는 효과가 관찰되지 않았으며 BALB/c 생쥐 복강 대식세포에 대하여도 활성화 효과가 인정되지 않았다. 이러한 결과들은 큰눈물버섯 균사 배양물로부터 분리한 PVMP의 면역활성이 자실체로부터 분리한 단백다당체 PVP 보다 미약함을 의미하며 따라서 큰눈물버섯 균사배양물로부터 보다 강력한 면역활성을 갖는 단백다당체를 얻기 위해서는 배지의 조성을 달리하거나 배양조건을 달리하는 등 추가적인 연구가 필요함을 말해주고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2002년도 충남대학교 학술연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Borchers, A. T., Keen, C. L. and Gershwin, M. E. : Mushrooms, tumors, and immunity. An update. *Exp. Biol. Med.* **229**, 393 (2004).
- 2) Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L. and Gershwin, M. E. : Mushrooms, tumors, and immunity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **221**, 281 (1999).
- 3) Komatsu, N., Okubo, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S. : Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* **60**, 137 (1969).
- 4) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fraction of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**, 2776 (1970).
- 5) Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. : Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann* **65**, 557 (1974).
- 6) Ohno, N., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. and Yadomae, T. : Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1142 (1984).
- 7) Moon, C.-K., Lee, S.-H., Mock, M.-S. and Kim, D.-O. : Antitumor activity of the polysaccharide-fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its effects on the immune function. *Yakhak Hoeji* **31**, 126 (1987).
- 8) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. W. and Kim, B. K. : Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 336 (1993).
- 9) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Han, M. W. and Kim, B. K. : Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji* **38**, 158 (1994).
- 10) Chung, K. S., Kim, S. B. and Chung, S. H. : Immunoactivities of the protein-polysaccharides of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji* **41**, 105 (1997).
- 11) Oh, J. Y. and Chung, K. S. : Flow cytometrical analysis of the antitumor and immunomodulatory activities of GLB-A and GLB-B, the protein-polysaccharide fractions of the growing tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji* **42**, 487 (1998).
- 12) Cho, K. J. and Chung, K. S. : Antitumor and antileukopenic activity of HCA, the protein-polysaccharide fraction of cultured mycelia of *Hebeloma crustuliniforme*. *Yakhak Hoeji* **43**, 629 (1999).
- 13) Chung, K. S. and Kim, J. H. : Antitumor and immunomodulatory activity of *Lycoperdon pedicellatum*. *Yakhak Hoeji* **44**, 463 (2000).
- 14) Lee, J. S., Lee, I. S., Chung, K. S., Kim, Y. H., Han, Y. H. and Lee, M. H. : Flow cytometrical investigation on antitumor activity of mycelial culture of insect-born fungus *Paecilomyces japonica* DGUM 32001. *Yakhak Hoeji* **45**, 64 (2001).
- 15) Chung, K. S. and Lee, J. S. : Antitumor immunomodulatory activity of PVP, a protein-polysaccharide fraction prepared from a wild mushroom *Psathyrella velutina*. *Yakhak Hoeji* **45**, 617 (2001).
- 16) Norris, J. R. and Ribbons, D. W. : Methods in microbiology Vol. 5B, Academic Press, New York, p. 209 (1971).
- 17) Stewart, C. C. and Stewart, S. J. : Cell preparation for the identification of leukocytes. In "Methods in Cell Biology". Vol. 41. Flow Cytometry (2nd ed.), Part A" by Darzynkiewicz, Z., Robinson, J. P. and Crissman, H. A. (eds.). Academic Press, San Diego p. 39 (1984).
- 18) Carlile, M. J. and Watkinson, S. C. : The Fungi, Academic Press, New York, p. 52 (1994).
- 19) Guillot, J. and Konska, G. : Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology* **25**, 203 (1997).
- 20) Musilek, M., Ticha, M., Volc, J. and Kocourek, J. : Studies on lectins. LXXI. Lectins in mycelial cultures of *Kuehneromyces mutabilis*, *Pholiota*, and *Flammulina velutipes*. : In "Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry (Vol. 7)" (Kocourek, J. and Freed, D. L. J., eds). Sigma Chemical Company, St. Louis p. 53 (1990).