

## 항보체 활성을 갖는 *Phellinus linteus* 균사체 생산의 최적화

서 호 찬\*

국제뇌교육종합대학원대학교 뇌교육학과

### Optimization for Production of *Phellinus linteus* Mycelia with Anti-Complement Activity

Ho-Chan Seo\*

Department of Brain Education, University of Brain Education, Cheonan 330-841, Korea

Received July 13, 2010; Accepted September 6, 2010

To produce the functional food materials from edible mushrooms, hot-water extracts from 70 kinds of mushroom mycelia were examined for anti-complementary activity and *Phellinus linteus* showed the highest activity through the complement fixation test. The maximum production of *Phellinus linteus* mycelia with anti-complementary activity was observed in culture medium containing soluble starch 3.0%, peptone 0.3%, yeast extract 0.4%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1%,  $K_2HPO_4$  0.2% and in the culture conditions controlled at initial pH 7.0, 30°C and 150 rpm by the rotary shaker. In addition, the maximum production of mycelial dry weight was 15 mg/mL after 18 days under the optimal conditions, and anti-complementary activity was reached to 88% in 5 L-jar fermenter.

**Key words:** anti-complementary, *Phellinus linteus*, mycelia

#### 서 론

식품의 기능은 영양을 위주로 하는 1차 기능, 맛과 기호성의 2차 기능 그리고 질병의 예방과 치료에 도움이 되는 생체조절의 3차 기능으로 분류된다. 최근 식품의 3차 기능에 대한 관심이 증가되면서 일반 식품으로부터 다양한 생리 활성을 나타내는 기능성 성분에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 담자균류인 버섯은 특유의 맛과 향을 가지고 있고 탄수화물, 단백질, 비타민, 무기질과 같은 영양소를 골고루 함유하고 있으며 항암활성, 면역증강효과 및 항산화 효과 등의 약리효과 때문에 건강식품 및 의약품 소재로 많이 이용되고 있다[Lee와 Bang, 2001]. 버섯의 생리활성 물질은 *Lentinus edode*로부터 분리한 letinan[Lee 등, 2009], *Schizophyllum commune*으로부터의 schizophyllum[Alam 등, 2010], *Griofola frondosa*로부터 분리한 grifolan[Croan 등, 2004]이며 이들은 항암 효과[Tsakagoshi와 Ohashi, 1974; Chung 등, 1994]와 더불어 항바이러스 활성[Yamada 등, 1986; Song 등, 1995], 항응고 활성[Lee 등, 1997] 및 혈당 강하 작용[Kiyohara 와 Yamada, 1993]도 보고되고 있다. 버섯에서 분리한 생리활성 물질의 구조는  $\beta$ -D-1,3-glucose의 직쇄구조에  $\beta$ -D-1,6-

glucose가 측쇄로 결합되어 있으며 D-galactose 및 D-mannose 등이 일정 비율로 결합되어 있는 다당류 형태이다[Jang 등, 2009; Padilha 등, 2009; Kalyoncu 등, 2010].

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 분류학적으로 소나무 비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 진흙버섯속(Phellinus)에 속하는 백색부후균으로 항암력이 매우 우수한 버섯으로 관심의 대상이 되고 있다[Choi 등, 1996]. 상황버섯(*P. linteus*)의 자실체 열수 추출물은 위암, 식도암, 십이지장, 결장암, 직장암 등의 소화기 계통의 암[Ikekawa 등, 1968]을 비롯하여 간암 수술 후 화학요법을 병행할 때 면역기능 향진에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 자궁출혈, 월경불순, 장출혈, 오장기능을 활성화시키고 해독작용을 하는 것으로 알려져 있다[Kim 등, 2003; Kim 등, 2004; Orange와 Ballas, 2006].

상황버섯은 희귀 한방 약재로 각광받지만 인공 배양에 의한 자실체 생산은 배양 기간이 길고 버섯 재배기술의 부족과 비효율적인 재배사 구조, 종균의 적기 구입으로 인한 부담으로 생산에 어려움이 작용하지만 액체 배양에 의한 균사체 생산은 항상 일정한 조건에서 배양이 가능하므로 품질이 우수한 균사체를 저비용으로 대량 생산이 가능하며 자실체 형성을 필요로 하지 않고 단지 생리 활성물질의 생산이 목적이라면 고체 배양보다 매우 유리한 조건을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 상황버섯으로부터 항보체 활성물질과 균사체를 생산하기 위하여 액체 배양의 최적 생산조건을 검토하고자 한다.

\*Corresponding author

Phone: +82-41-529-2761; Fax: +82-41-556-7772

E-mail: hcseobravo@ube.ac.kr

## 재료 및 방법

**균주의 분리 및 선별.** 각종 버섯에서 항보체 활성균주를 선별하기 위해 보관균주(고려대학교 생명공학연구소) 50여종과 양주 임업협동조합(양주시, 경기도)에서 분양 받은 20여종의 균주를 대상으로 PDB (potato dextrose broth) 배지에 25°C에서 25일간 배양하였다. 배양 후, 균사체 생산과 항보체 활성이 뛰어난 균주를 1차적으로 선별하고 이 선별균주를 상기의 배양조건에서 배양을 하여 배양 상등액이 제거된 균사체를 대상으로 항보체 활성이 뛰어난 균주를 최종균주로 하였다.

**종균생산.** 종균 생산을 위한 배지는 PDA (potato dextrose agar, Difco, Sparks, MD)로 하였으며 배양접시 중심부에 버섯 균주를 접종하여 30°C, 7일간 배양한 후, 콜크보오러(지름 8 mm)로 배지상의 균사를 punching하여 제조된 disk 5개를 종균으로 사용하였다.

**사용배지 및 배양조건.** 항보체 활성의 최적 배양조건을 검토하기 위한 배지는 PDB를 기본배지로 하여 200 mL를 500-mL baffle flask에 넣고 초기 pH 7.0, 30°C, 120 rpm에서 7일간 배양하였다. Fermentor(주) 이노바이오, 금산군, 충남) 배양은 5-L 배양조에 working volume을 2 L로 하여 상기와 동일한 환경 조건에서 배양하였다.

**균사체량 측정.** 균사체량 측정은 103~105°C의 건조기에서 미리 건조한 유리섬유(Whatman G/FB, Maidstone, England)에 배양된 시료 10 mL를 여과하여 2시간 건조시킨 후, desiccator에서 방냉 후의 무게와 여과 전의 유리섬유 무게의 차이로 측정된 다음 건조 균사체량 (mg/mL)으로 환산하였다.

**항보체 활성물질의 추출.** 균사체의 항보체 활성물질을 추출하기 위하여 배양된 액상배지를 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하고 얻어진 균사체를 여과지(whatman No. 42)로 여과시킨 후, 증류수로 3회 세척하고 동결건조를 하였다. 동결건조된 균사체를 aluminium oxide와 함께 막자사발에 넣어 분쇄하고 열수추출을 4시간동안 행한 후, 원심분리(5,000 rpm, 30분, 한일과학산업(주), 인천)하여 얻어진 상등액을 동결건조하여 균사체의 열수추출물을 항보체 활성의 시료로 이용하였다.

**항보체 활성의 측정.** 항보체 활성은 Mayer[1961]의 방법에 따라 측정하였다. 정상인의 혈청 (NHS, normal human serum)과 2% gelatin, 3 mM Ca<sup>2+</sup>, 10 mM Mg<sup>2+</sup>가 함유된 GVB<sup>++</sup> (gelatin veronal buffered saline, pH 7.2)과 시료를 각각 50 µL씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB<sup>++</sup>를 350 µL씩 가하고 이것을 10~100배로 연속 희석하였다. 여기에 750 µL의 GVB<sup>++</sup>와 양의 감작 적혈구(IgM haemolysin sensitized sheep erythrocyte)를 250 µL씩 가하고 37°C, 1시간 동안 반응시킨 후, PBS (phosphate buffered saline pH 7.4)를 2.5 mL를 가하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 412 nm에서 측정하였다.

항보체 활성은 ITCH<sub>50</sub> 즉 총보체 용혈 저지율 (Inhibition of 50% Total Complement Hemolysis)로 나타내었다.

$$\text{ITCH}_{50} (\%) = \frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} - \text{TCH}_{50} \text{ of sample}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}} \times 100$$

**Periodate 산화.** 열수 추출물 20 mg을 취하여 acetate buffer (pH 4.5, 10 mL)에 용해시킨 후, 50 mM NaIO<sub>4</sub> 5 mL를 가하여 4°C의 암실에서 3일간 산화시켰다. 이 반응액에 ethylene glycol 5 mL를 가해 1시간 동안 실온에 방치한 후, 투석하여 NaBH<sub>4</sub> 20 mg을 가해 1시간 교반시켰으며 0.1 M acetic acid로 중화한 후, 투석 및 동결건조하여 항보체 활성을 검토하였다 [Yamada 등, 1984].

**Pronase 처리.** 열수 추출물 20 mg을 취하여 10 mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 Tris-HCl buffer(pH 7.9, 20 mL)에 용해시킨 후, pronase(20 units)를 가하여 37°C에서 48시간 반응시켰다. 이 반응액을 100°C에서 5분간 가열, 반응을 정지시킨 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 투석 및 동결건조하여 항보체 활성을 조사하였다 [Yamada 등, 1984].

## 결과 및 고찰

**항보체 생산균주의 선별.** 항보체 생산균주를 선별하기 위하여 보관균주 50 여종과 임업협동조합에서 분양 받은 20여종의 균주를 PDB 배지에서 25°C, 25일간 배양하여 얻어진 균사체를 열수추출한 후 항보체 활성을 측정하였다(Table 1). 각각의 항보체 생산 균주 중, *P. linteus*가 항보체 활성이 65.3%로 다른 균주와 비교하여 볼 때 가장 뛰어난 것을 알 수 있었으며 최종균주로 선정되었다.

본 균주가 생산하는 항보체 활성의 본체를 파악하기 위해 열수 추출물을 pronase 처리와 periodate 산화를 행한 후, 항보체 활성을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 pronase로 처리한 시료는 무처리균과 비교하여 차이가 없었던 반면 periodate로 산화시킨 시료는 항보체 활성이 크게 감소함에 따라 *P. linteus*가 생산하는 항보체 활성의 본체는 다당에 기인되는 것으로 추정되었다.

**탄소원의 영향.** 선별균주 *P. linteus*의 항보체 활성과 균사체 생육에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위해 PDB 배지에 탄

Table 1. Anti-complement activity of hot-water extract from mushroom mycelia by liquid culture

Mushroom	Inhibition of TCH <sub>50</sub> (%)
<i>Flammulina velutipes</i>	33.3
<i>Ganoderma lucidum</i>	40.3
<i>Grifola frondosa</i>	56.1
<i>Lentinus edodes</i>	30.2
<i>Lyophllum cinerascens</i>	45.4
<i>Phellinus linteus</i>	65.3
<i>Pholiota nameko</i>	33.2
<i>Pleurotus osteratus</i>	45.3
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	24.3

\*Cultivation was carried out at 25 for 25 days in PDB medium.

\*The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 mg/mL.

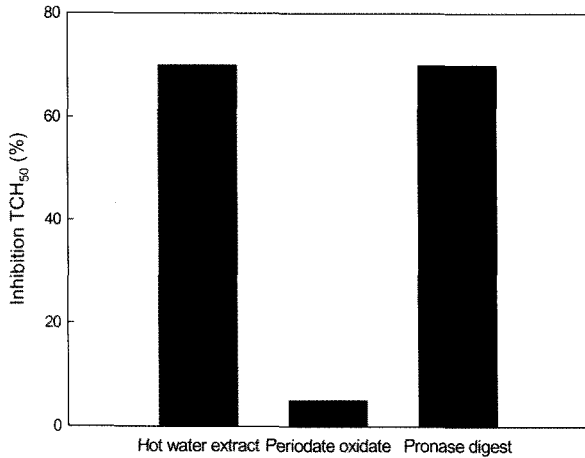


Fig. 1. Comparison of anti-complement activity to periodate oxidate and pronase digest of hot water extract with *Phellinus linteus* Mycelia. The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 µg/mL.

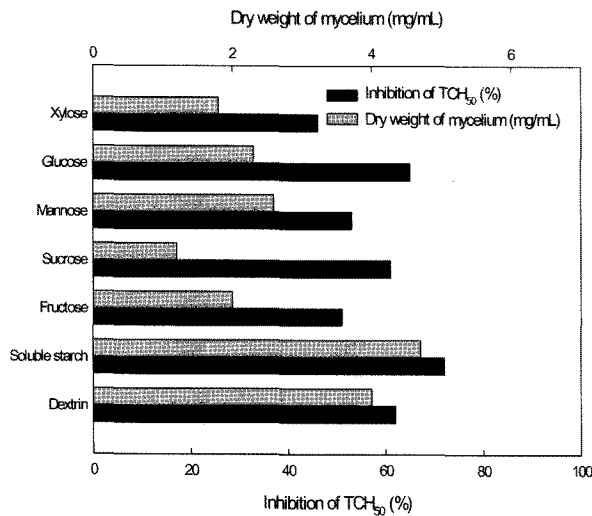


Fig. 2. Effects of carbon sources on mycelium growth and anti-complement activity. Carbon sources of 3.0% (w/v) were added to potato dextrose broth (PDB) medium. Cultivation was carried out with rotary shaker controlled at 30°C and 120 rpm for 7 days. The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 µg/mL.

소원 3.0% 첨가하여 30°C, 120 rpm의 조건에서 7일간 배양한 후, 균사체 열수추출물에 대한 항보체 활성을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 soluble starch가 72%의 가장 높은 항보체 활성과 균사체 생육(4.7 mg/mL)을 보였으며 단당류와 함께 다당류에서 항보체 활성과 균사체 생육이 높게 나타낸 것을 알 수 있었다. 이는 *P. linteus*의 균사체 생육에 대한 glucose의 효과를 보고한 Lee 등[1995]의 결과와 유사한 경향을 나타내었으며 soluble starch 3.0%가 효과적이라 보고한 Song 등[1995]과의 결과와 일치하였다.

**질소원의 영향.** 탄소원으로 3.0% soluble starch를 첨가한 기본배지에 각각의 무기태, 유기태 질소원을 첨가하여 항보체 활성과 균사체 생육에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 항보체 활성은 peptone, sodium nitrate, ammonium sulfate

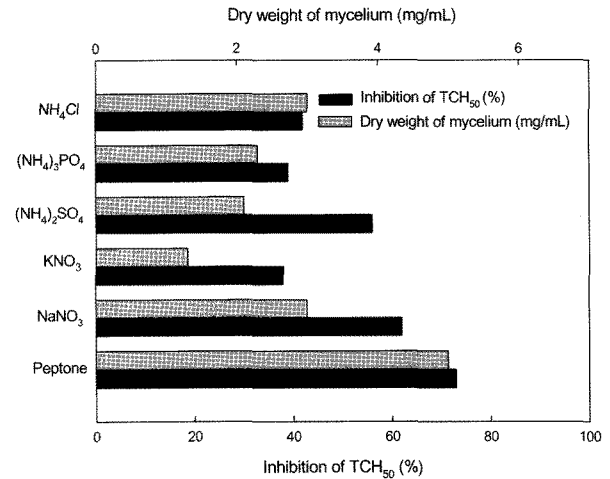


Fig. 3. Effects of nitrogen sources on mycelium growth and anti-complement activity. Nitrogen sources of 0.3% (w/v) were added to PDB medium containing 3.0% soluble starch. Cultivation was carried out rotary shaker controlled at 30°C and 120 rpm for 7 days. The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 µg/mL.

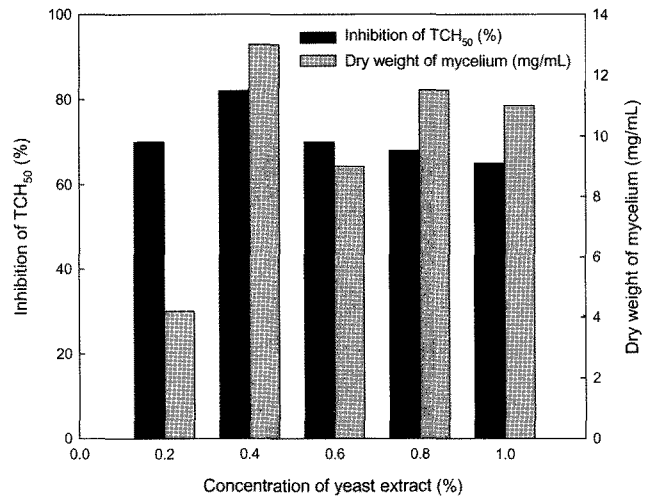


Fig. 4. Effects of yeast extract concentrations on mycelium growth and anti-complement activity. Cultivation was carried out 30°C for 7 days in PDB medium containing 3.0% soluble starch and 0.3% peptone. The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 µg/mL.

순으로 균사체 생육은 peptone, sodium nitrate, ammonium chloride의 순으로 활성이 높았다. 0.3% peptone을 첨가하였을 때 가장 높은 항보체 활성(73%)과 균사체 생육(5.1 mg/mL)을 나타내었으며 이의 결과는 Song 등[1995]이 보고한 *P. linteus*의 생육조건에서 peptone의 결과와 일치함을 알 수 있었다. Choi 등[1996]은 *P. linteus*의 생육조건에서 유기질소원과 생육 인자로 작용하는 yeast extract 첨가가 생육이 증가하였다고 보고하였다. 이에 yeast extract를 0~1.0% 농도를 달리하여 항보체 활성에 미치는 영향을 검토한 결과(Fig. 4) 0.4%의 농도에서 82%의 항보체 활성과 13 mg/mL의 균사체 생육을 나타내었다. 한편 C/N ratio가 항보체 생산에 미치는 영향을 검토하기 위해 soluble starch 농도를 1~4%에서 질소원(peptone)으로 C/

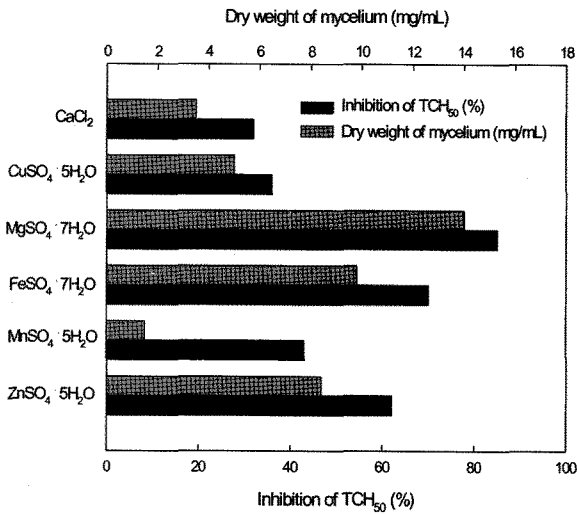


Fig. 5. Effects of inorganic salts on mycelium growth and anti-complement activity. Cultivation was carried out at 30°C for 7 days in PDB medium containing 3.0% soluble starch, 0.3% peptone and 0.4% yeast extract. The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 µg/mL.

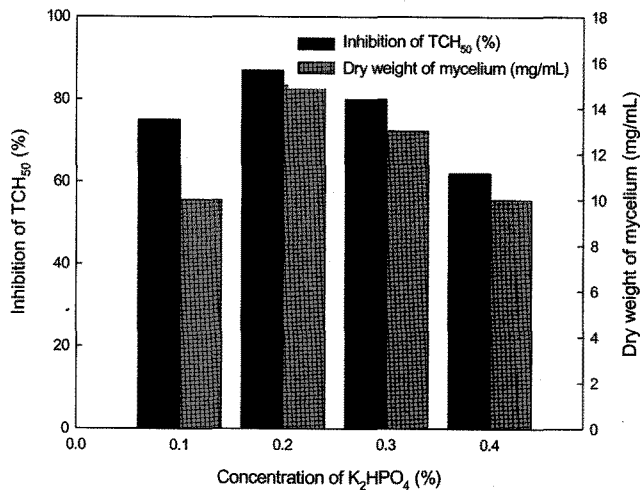


Fig. 6. Effects of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> concentrations on mycelium growth and anti-complement activity. Cultivation was carried out at 30°C for 7 days in PDB medium containing 3.0% soluble starch, 0.3% peptone, 0.4% yeast extract and 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 µg/mL.

N ratio를 5-40 범위로 조정하면서 항보체 활성과 균사체 생육을 조사한 결과 soluble starch 농도에 따라 항보체 활성의 증감을 보일 뿐 각 soluble starch 농도별 C/N ratio의 영향은 크지 않았으며 soluble starch 3.0%, peptone 0.3% 첨가 시(C/N ratio 10) 75%의 최대 항보체 활성을 나타내었다(data not shown).

**무기염의 영향.** 항보체 활성과 균사체 생육에 미치는 무기염류와 금속이온의 영향을 검토하기 위해 각각을 0.1%의 농도에서 상기에서 검토한 최적배지에 첨가하였다. 그 결과 Fig. 5에서와 같이 Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup> 등의 첨가 시 항보체 활성과 균사체 생육이 상승하였으나 Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Mn<sup>2+</sup>에서는 균사체 생육이 감소하는 경향을 나타내었다. Mg<sup>2+</sup> 첨가 시에는 항보체

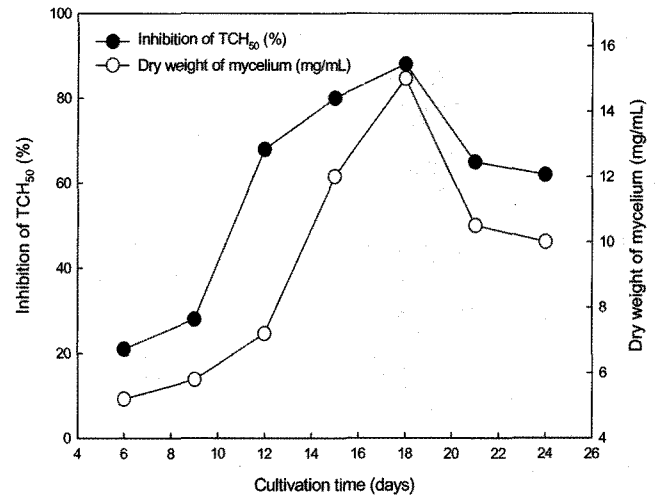


Fig. 7. Time course of mycelium growth and anti-complement activity in jar fermentor. Cultivation was carried out in PDB medium containing the optimal component ratio under the following condition; working volume 2 L, impeller speed 30 rpm, 1 vvm, 30°C and initial pH 7.0. The anti-complementary activity was assayed at concentration of 1,000 µg/mL.

활성이 85%, 균사체 생육이 14 mg/mL로 가장 높은 활성을 나타내었다. Song 등[1995]의 보고에 의하면 Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>이온이 항보체 활성과 균사체 생육에 촉진하고 Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>이온이 저해한다는 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 버섯 재배에서 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 ATP 생산에 필수적인 요소로 알려져 있으며 Choi 등[1996]은 버섯의 경우 무기염류 중에서 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 결핍은 균사체 생육에 치명적이라고 보고하였다. 이에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 농도를 0.1~0.4%로 달리하여 항보체 활성과 균사체 생육을 살펴본 결과(Fig. 6) 0.2% 첨가 시에 가장 높은 항보체 활성(87%)과 균사체 생육(15 mg/mL)을 보였다.

이상의 검토 결과들로부터 *P. linteus*의 항보체 생산의 배지 조건을 soluble starch 3.0%, peptone 0.3%, yeast extract 0.4%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, pH 7.0으로 최적화시킬 수 있었다.

**환경인자들과 배양시간의 영향.** 본 균주의 항보체 활성 및 균사체 생육과 관련된 환경인자인 배양온도, 교반조건 및 배양시간의 영향을 최적화한 배지를 사용하여 검토하였다. 배양온도를 10~40°C에서 조사한 결과 30°C에서 항보체 활성이 92%로 최고값을 나타내었으나 균사체 생육은 미미하였다. 한편 500-mL baffle flask에 100 mL의 배지를 넣고 교반속도를 50~200 rpm으로 달리하여 항보체 활성을 검토한 결과 150 rpm의 교반속도에서 50 rpm보다 2배 증가한 85%의 항보체 활성을 나타내었다.

이상의 결과들로부터 확립한 항보체 생산용 최적배지에 *P. linteus*를 impeller speed 150 rpm, 배양온도 30°C 및 working volume 2 L로 한 5-L jar fermentor를 사용하여 검토한 배양시간에 따른 항보체 활성과 균사체 생육의 변화는 Fig. 7과 같다. 균사체 생육과 함께 항보체 활성도 증가하여 배양 18일에서 88%의 최대치를 보였으며 균사체 생육의 증가가 항보체 생산에 영향을 미친다는 Song 등[1995]의 보고와 일치함을 보였다.

## 초 록

각종 버섯에서 항보체 활성균주를 선별하기 위해 보관균주 50 여종과 임업협동조합에서 분양 받은 20여종의 균주를 대상으로 항보체 활성을 검색한 결과, 항보체 활성이 65.3%를 나타낸 상 황버섯(*Phellinus linteus*)을 선별하였다. 본 균주가 생산하는 항 보체 활성의 본체를 파악하기 위해 pronase 처리와 periodate 산 화를 행한 결과 pronase로 처리한 시료는 무처리군과 비교하여 차이가 없었던 반면 periodate로 산화시킨 시료는 항보체 활성이 크게 감소함에 따라 *P. linteus*가 생산하는 항보체 활성의 본체는 다당에 기인되는 것으로 추정되었다. 항보체 생산을 위한 최 적 배양조건은 soluble starch 3.0%, peptone 0.3%, yeast extract 0.4%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, 초기 pH 7.0, 배양 온도 30°C 및 교반속도 150 rpm이었다. 상기의 최적 배양조건에 서 jar fermentor로 18일 배양하였을 때 88%의 항보체 활성과 15 mg/mL의 균사체 생육을 나타내었다.

**Key words:** anti-complementary, *Phellinus linteus*, mycelia

## 참고문헌

- Alam N, Cha YJ, Shim MJ, Lee TS, and Lee UY (2010) Cultural conditions for mycelial growth and molecular phylogenetic relationship in different wild strains of *Schizophyllum commune*. *Mycobiology* **36**, 34-39
- Chihara G, Maeda YY, Suga T, and Hamuro J (1989) Lentinan as a host defence potentiator (HDP). *Int J Immunother* **5**, 145-154.
- Choi JH, Ha TM, Kim YH, and Rho YD (1996) Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor J Mycol* **24**, 214-222.
- Chung KS, Kim SS, Kim HS, Kim KY, and Han MW (1994) Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji* **38**, 158-165.
- Croan SC (2004) Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms. *Forest Prod J* **54**, 68-76
- Hamuro J, and Chihara G (1984) Immunomodulation agents and their mechanism, pp. 409. Marcel Dekker, New york.
- Ikekawa J, Nakamishi M, Uehara N, Chihara G, and Fukuoka F (1968) Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155-157.
- Jang SA, Park SY, Lim JD, Kang SC, Yang KH, Pyo SN, and Sohn EH (2009) The comparative immunomodulatory effects of  $\beta$ -glucans from yeast, bacteria, and mushroom on the function of macrophages. *J Food sci nutr* **14**, 102-108
- Kalyoncu F, Oskay M, Saglam H, Erdogan TF, Tamer AU (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. *J Med Food* **13**, 415-419
- Kim GY, Han Mg Song YS, Shin YI, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Kwak JY, Bae YS, Lee JD, and Park YM (2004) Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF-kappaB. *Biol Pharm Bull* **27**, 1656-1662.
- Kim GY, Oh YH, and Park YM (2003) Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoreicidal activity of macrophage through protein tyrosine kinase and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 399-407.
- Kiyohara H, and Yamada H (1993) Characterization of IL-2 production enhancing and anti-complementary pectic polysaccharides from Kampo. *Phytochem Res* **7**, 367-402.
- Komatsu N, Okubo S, Likumoto S, Kimura K, Saito G, and Sakai S (1969) Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* **60**, 137-143.
- Lee HH, Jong SL, Jae YC, Young EK, and Eock KH (2009) Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of *Lentinus edodes*. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 566-572
- Lee HS, Kweon MH, Lim WJ, Sung HC, and Yang HC (1997) An Anticoagulant Polysaccharide Isolated from the Alkali Extracts of *Coriolus versicolor*. *KOREAN J FOOD SCI TECHNOL* **29**, 369-375.
- Lee JH, Cho SM, Ko KS, and Yoo ID (1995) Effect of cultural conditions on polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202. *Kor J Mycol* **23**, 325-330
- Lee JW, and Bang KW (2001) Biological activity of *Phellinus* spp. *Food Industry and Nutrition* **6**, 25-33.
- Lucas EH, and Ringler RL (1957) Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. *Antibiotics and Chemotherapy* **7**, 1-4.
- Mayer MM (1961) Complement and complement fixation in Experimental Immunology, Thomas Publisher (2nd ed.), pp. 459-461.
- Ohno N, Suzuki I, Oikawa S, Sato K, Miyazaki T, and Yadomae T (1984) Antitumor activity and structure characterization of glucan, extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* **32**, 1142-1151.
- Orange JS, and Ballas ZKK (2006) Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* **118**, 1-10.
- Padilha MM, Avila AL, Sousa JC, Cardoso JV, Perazzo FF, and Carvalho CT (2009) Anti-inflammatory activity of aqueous and alkaline extracts from mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). *J Med Food* **12**, 359-364.
- Song KS, Cho SM, Lee JH, Kim HM, Han SB, Ko KS, and Yoo ID (1995) B-lymphocyte stimulating polysaccharide from *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull* **43**, 2105-2110.
- Tsukagoshi S, and Ohashi F (1974) Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Jpn J Cancer Res* **65**, 557-560.
- Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC, Kojima Y, Kumazawa Y, and Otsuka Y (1984) Studies of polysaccharide from *Anglelica acutiloba*. part I. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Med* **50**, 163-167.
- Yamada H, Nagai T, Cyong JC, Otsuka Y, Tomoda M, Shimizu N, and Gonda R (1986) Relationship between chemical structure and activation of complement by an acidic polysaccharide, plantag-mucilage A, from the seed of *Plantag asiatica*. *Carbohydrate Research* **156**, 137-142.