

아위버섯 열수추출물 및 유기용매 분획물의 생리활성 효과

김준호*

상지대학교 이공과대학 정밀화학신소재학과

Physiological Activities of Hot Water Extract and Solvent Fractions of *Pleurotus ferulea*

Jun-Ho Kim*

Department of Fine Chemistry and New Materials, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

(Received 14, October 2011., 1st Revised 31, October 2011., Accepted 9, November 2011)

ABSTRACT: To investigate the physiological activities of hot water extract and solvent fractions isolated from *Pleurotus ferulea*, antioxidative, fibrinolytic, thrombin inhibitory, and α -glucosidase inhibitory activities were examined. *Pleurotus ferulea*, hot water extract was fractionated into hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water fraction. Each of these was assayed individually. The antioxidative activities of ethyl acetate and butanol fractions were 86.79% and 87.82%, respectively. Using the fibrin plate method, only the ethyl acetate fraction showed a plasmin activity of 0.08 units/ml. Thrombin inhibitory activities of chloroform and ethyl acetate fractions were 74.90% and 71.08%, respectively. In the α -glucosidase inhibitory activity test, butanol fraction showed the highest activity at 49.67%. From the above results, we anticipate that solvent fractions of *Pleurotus ferulea* can be used as a materials for the development of biofunctional foods for cardiovascular diseases.

KEYWORDS: Antioxidative activity, Fibrinolytic activity, α -Glucosidase inhibitory activity, *Pleurotus ferulea*, Thrombin inhibitory activity

서 론

버섯의 2차대사산물은 다양한 생리활성을 나타내 오랜 전부터 질병 치료와 예방의 목적으로 사용되고 있으며, 최근에는 기능성 화장품과 식품의 재료로도 사용되고 있어 이용 분야는 더욱 넓어 질것으로 기대된다. 특히 약용버섯의 생리활성 물질은 독성이 없는 안전한 물질로 확인되어 장기간 섭취하여도 부작용이 나타나지 않는 큰 장점을 갖고 있어 제약과 기능성 식품과 음료 개발에 이용되고 있으며, 이 같은 생리활성 물질을 함유하고 있는 다양한 버섯들이 알려져 있다 (김 등, 2007). 생리활성 물질의 양과 활성이 버섯과 버섯이 자란 환경에 따라 차이가 나타나 약용버섯 채집에 채집 장소가 중요한 요소가 되고 있다. 국내에 자생하는 버섯은 약 1600여 종으로 알려 있으며, 송이버섯, 능이버섯, 표고버섯으로 대표되는 식용 가능한 버섯이 약 400여 종이 있고, 상황버섯, 표고버섯, 구름버섯 같이 약용으로 사용되는 버섯 약 100여 종이 알려져 있다 (안, 1992).

암, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병은 한국인의 사망원인 중 높은 비율을 나타내는 노인성 질환들로 한번 발생하면 완치가 힘들고, 회복에 많은 시간이 소모되며 경제적인 부담이 큰 질환들로 오랜 시간의 노후를 보내야하는 현대인에게는 두려

움의 대상이 되고 있다. 최근, 이 같은 성인병 예방물질을 자연에서 찾으려는 경향이 높아지면서 자연스럽게 생약의 원료인 버섯에 대한 관심이 증가하고 있다. 질병치료에 사용되어 왔던 화학약품은 치료효과는 높지만 부작용이 나타나기 때문에 활성은 조금 떨어지지만 부작용을 나타내지 않는 약용버섯을 이용한 제약과 기능성 식품의 개발에 관심이 높아지고 있다.

한국인의 사망원인 중 가장 큰 비율을 나타내는 악성 종양의 원인 중 하나로 알려진 활성산소는 대사과정과 면역과정에서 발생되며 정상세포의 세포막, 지질, 핵산, 단백질 등에 반응하여 암이나 노화세포로 발전시키는 것으로 알려져 있다. 이 활성산소의 양을 줄이는 항산화물질인 비타민 C와 비타민 E가 버섯에도 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다 (홍 등, 2004a). 정상 상태에서는 혈관의 혈액응고계와 섬유소용해계가 균형을 이루고 있지만 어떠한 원인에 의해 혈관 벽이 손상되면 출혈이 일어나며 혈소판과 섬유소원이 응집하고 이 혈소판에서 나온 thrombin이 섬유소원을 섬유소로 만들어 혈소판과 섬유소의 응집체인 고분자의 불용성 섬유소 혈전 (fibrin clot)이 형성되어 출혈을 막게 된다. 이때 생긴 혈전이 조직의 재생 후 혈액 내 plasmin에 의해 완전히 용해가 되지 않으면 혈관을 따라 흐르며 뇌출혈, 뇌혈전증, 심부전증, 심근경색증 등의 혈관계 질환을 초래 한다 (김, 1998; Daka and Semba, 1995). 따라서 혈관계 질환은 혈전을

*Corresponding author <E-mail : jhokim@sangji.ac.kr>

용해시킴으로써 치료할 수 있으며, 혈전형성의 필수효소인 트롬빈의 활성을 억제하여 혈전생성 억제로 혈관계 질환을 예방할 수 있다. 최근 탄수화물의 소화를 지연시킴으로써 소장에서의 포도당 흡수를 억제하여 혈당량을 감소시켜 당뇨병이나 비만의 발생을 억제하려는 목적으로 소장에서 작용하는 탄수화물 분해효소인 α -glucosidase 저해제에 관한 많은 연구가 이루어고 있다 (김 등, 2007).

여러 종류의 버섯이 성인병 치료와 예방에 관련된 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 상황버섯 (Choi *et al.*, 1996), 표고버섯 (Chihara *et al.*, 1970), 구름버섯 (Tsukagoshi and Ohashi, 1974)의 다당류가 항암물질로 알려져 있으며, 팽이버섯 (Shin and Choi, 1998) 뽕나무버섯 (Kim and Kim, 1999)과 활미송이버섯 (Kim and Kim, 2001), 쓴송이버섯 (Kim, 2002)으로부터 활성이 큰 혈전용해효소와 석이버섯으로부터 혈당강하 효과가 큰 물질이 확인되었다 (Choi *et al.*, 2000).

아위버섯 (*Pleurotus ferulea*)은 다양한 종류의 유리 아미노산을 많이 포함하고 있어 맛이 우수하며, 외인성 항산화물질인 비타민C와 비타민E를 다량 함유하고 있어 높은 항산화 효과가 기대되는 약용과 식용으로 이용되고 있는 버섯이다 (홍, 2004a). 또한, 아위버섯은 새송이버섯의 변이종으로, 담자균류의 느타리버섯과 (*Pleurotaceae*) 느타리버섯속 (*Pleurotus*)에 속하는 버섯으로 중앙아시아 일대의 초원에서 자생하는 아위 (*Ferula assa-foetida*)라는 약용식물에 기생 혹은 부생하는 버섯으로 알려져 있다. 아위 버섯의 약리효과로는 콜레스테롤저해 효과, 포도당 흡수저해 효과, 유해산소제거 효과 (홍 등, 2004b) 등이 알려져 있지만 노인성질환 관련 생리활성에 관하여 알려진 것이 별로 없는 실정이다.

본 실험은 아위버섯을 제약이나 기능성식품의 재료로 사용하기 위한 기초자료를 얻기 위해, 아위버섯의 열수추출물과 유기용매 분획물의 항산화효과, 혈전용해효과, 트롬빈저해효과, 항당뇨효과를 확인하고 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

아위버섯과 시약

아위버섯 (*Pleurotus ferulea*)은 (주)뜰아채 세화중군 개발원 (충남 천안시 동남구 풍세면)에서 구입하여 사용하였으며, 생리활성 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, fibrinogen, thrombin, 효모유래 α -Glucosidase, p-nitrophenyl-a-D-glucopyranoside, Hepes 등은 Sigma사 제품이고, H-D-phenylalanine-L-pipecolyl-L-arginine-paranitroaniline dihydrochloride (S-2238)는 Chromogenix (Orangeburg, New York, USA)의 제품이었으며, 그 밖의 시약은 모두 일등급이었다.

열수추출물과 유기용매 분획물

아위버섯 자실체를 잘게 나누고 음지에서 건조 후 20배

(wt/vol)의 증류수를 가하고 환류 냉각시키면서 3시간 동안 가열 추출 후 asperator를 이용하여 감압여과 (Whatman, No. 1)하고 동결 건조하여 열수추출물 시료로 사용하였다. 열수추출물을 같은 부피의 헥산 (hexane), 클로로포름 (CHCl_3), 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 부탄올 (butanol)로 차례로 3번 씩 추출 후 각각의 추출물을 농축시키고, 동결 건조하여 분획물로 얻었다. 실험에 사용한 열수추출물 (100 mg/ml)과 함께 준비한 분획물 시료는 50% DMSO와 증류수에 100 mg/ml로 준비하여 항산화활성과 혈전용해활성, 트롬빈저해활성과 α -glucosidase 저해활성 측정에 사용하였다.

전자공여능 측정

전자공여능은 Blois (1958) 및 Kim 등 (1997)의 실험과정에 따라 측정하였다. 준비한 열수추출물이나 분획물 0.4 mL를 각각 시험관에 취하고 5.6 mL의 1×10^{-4} M의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ethanol 용액을 가하여 6 mL이 되도록 하였다. 4분간 반응시키고 다시 여과한 다음, 총 반응시간이 10분이 되면 525 nm에서 흡광도를 측정하였고 (UV-1201, Shimadzu Co., Japan), 다음 계산식에 의해 전자공여능을 산출하였다.

$$\text{전자공여능} = \{1 - (\text{O.D.}_{\text{시료}} / \text{O.D.}_{\text{증류수}})\} \times 100$$

혈전용해활성 측정

Haverkate와 Trass (1974)의 fibrin plate법에 따라 2% gelatin용액에 녹인 0.5% (w/v) fibrinogen용액 10 mL와 0.05 M barbital 완충용액 (pH 7.5)에 녹인 트롬빈 (100 NH units) 30 μ l을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin plate막을 만들었다. 준비한 열수추출물과 용매별 분획물 20 μ l 씩을 fibrin plate위에 점적하고 36°C에서 18시간 방치한 후 용해면적을 측정하였다. 대조구로는 플라스민 (plasmin) (0.5 unit/ml)을 사용하였으며, 추출액의 혈전용해 활성은 대조구의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 계산하였다.

트롬빈 저해활성 측정

트롬빈에 대한 저해활성은 Doljak 등 (2001)의 실험 방법을 이용하였다. 즉, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin을 포함하는 HBSA 완충용액 (pH 7.5) 40 μ l에 트롬빈용액 (0.5 NIH units/ml) 50 μ l를 첨가하고 섞는다. 준비한 아위버섯 열수추출물이나 분획물 (10 mg/ml) 10 μ l를 첨가하고 실온에서 15분간 incubation 후, H-D-phenylalanine-L-pipecolyl-L-arginine-paranitroaniline dihydrochloride (S-2238)를 이용하여 준비한 기질 용액 (0.5 mM) 50 μ l을 가하고 5분 동안 incubation시킨 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다 (UV-1601PC, Shimadzu, Japan). thrombin 활성 저해율은 다음 식에 의해 산출하였다.

저해율(%) = $[1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도}) / (\text{시료 무첨가구의 흡광도})] \times 100$
 각 흡광도는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임

α-glucosidase 저해활성 측정

α-glucosidase에 대한 저해활성은 Watanabe 등 (1997)의 실험 방법을 이용하였다. 즉, 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 α-glucosidase (0.7 U, sigma)와 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (5 mM)를 용해시켜 각각 효소와 기질 용액을 만든 다음 효소 용액 50 μL, 준비한 열수추출물이나 분획물 (10 mg/ml) 10 μL 및 완충용액 890 μL을 넣고 섞은 다음 5분 동안 실온에서 preincubation하고, 준비한 기질 용액 50 μL을 가하고 다시 5분 동안 incubation시킨 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다 (UV-1601PC, Shimadzu, Japan). α-glucosidase 활성 저해율은 다음 식에 의해 산출하였다.

저해율(%) = $[1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도}) / (\text{시료 무첨가구의 흡광도})] \times 100$

각 흡광도는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

결과 및 고찰

용매별 분획물의 수율

아위버섯 500 g을 음지에서 건조한 결과 52 g의 건조물을 얻었다. 이 건조물을 열수추출 후 여러 종류의 용매를 이용하여 추출한 분획물의 수율을 측정하고 결과 핵산 분획물이 0.03%, 클로로포름 분획물 0.27%, 에틸아세테이트 분획물 0.40%, 부탄올 분획물 34.61%, 물 분획물 40.98%로 물 분획물의 수율이 가장 높았다 (Table 1). 그러나 핵산 분획물의 양이 너무 작아 실험에 사용하지 못하였다.

항산화효과

DPPH radical 소거능을 이용하여 열수추출액과 유기용매 분획물의 활성산소 제거능력을 측정하고 결과 열수추출액은 23.90%의 비교적 낮은 항산화활성을 함유하고 있었으며, 클로로포름 분획물 69.30%, 에틸아세테이트 분획물 86.79%, 부탄올 분획물 87.82%, 물 분획물은 62.24%의 항산화활성을 나타냈다 (Fig. 1). 아위버섯은 외인성 항산화제인 비타민C와 비타민E를 많은 양 함유하고 있는 것으로 알려져 높은 항산화 효과를 기대하였다 (홍, 2004a). 실험 결과 열수추출

Table 1. The fraction yields of *Pleurotus ferulea* Extract

	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water
Yield(%)	0.03	0.27	0.40	34.61	40.98

Fraction yields were described as the percent of dry substance of fractions based on the dry substance *Pleurotus ferulea*

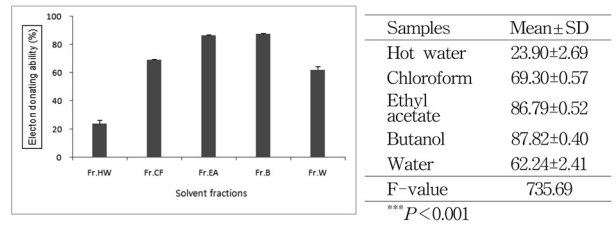


Fig. 1. Electron donating activities of solvent fractions obtained from *Pleurotus ferulea* extracts by DPPH assay. Fr.HW, Hot water extract Fr.CF, Chloroform fraction Fr.EA, Ethyl acetate fraction Fr.B, Butanol fraction Fr.W, H₂O fraction. 1) : mean ± SD from 3 replicates.

물의 항산화효과는 높지 않은 활성이었지만 에틸아세테이트와 부탄올 분획물이 86.79%와 87.82%의 높은 활성을 나타냈다. 아위버섯 열수추출물의 항산화활성은 새송이버섯 것과 대의 열수추출물 항산화활성 58.39%와 21.42%에 비해 갓보다는 작지만 대와 비슷한 활성을 나타냈으며 (Kim et al., 2005), Kim 등에 의해 보고된 팽이버섯 열수추출액의 항산화활성 30.6% 보다는 조금 작은 활성을 보였다 (Kim et al., 2002).

혈전용해 활성

혈전의 주성분인 피브리노를 이용한 fibrin plate 방법으로 준비된 분획물의 혈전용해 활성을 측정하였다. 측정 결과, 열수추출물, 클로로포름 분획물, 물 분획물에서는 활성을 나타내지 않고 에틸아세테이트 분획물에서 0.08 plasmin unit의 작은 활성을 나타내고 부탄올 분획물은 작은 흔적을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2). 준비된 분획물이 열수추출물과 열수

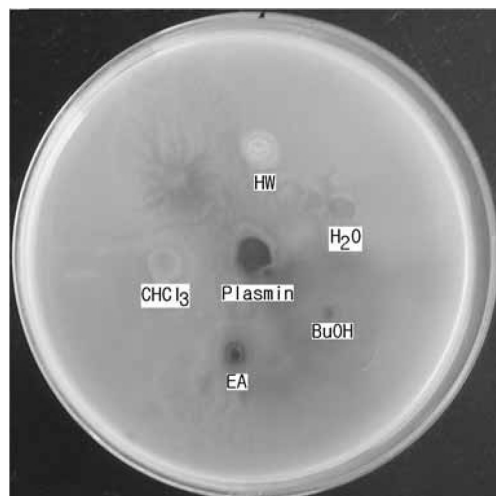


Fig. 2. Fibrinolytic activity of solvent fractions obtained from *Pleurotus ferulea* extracts by fibrin plate method. HW: Hot water extract, CHCl₃ : Chloroform fraction, EA : Ethyl acetate fraction; BuOH : Butanol fraction, H₂O : H₂O fraction.

추출물의 유기용매 분획물이므로 열에 약한 효소는 열수 추출과정에서 대부분 변성된 것으로 생각된다. 따라서 열에 강한 이 물질은 효소 보다는 flavonoid나 페놀유도체 화합물로 예상할 수 있다 (Oh and Kim, 2007). 에틸아세테이트 분획물은 혈전용해 활성은 작지만 열을 가하여 제조하는 제약과 기능성 제품 개발 시 큰 장점으로 작용할 수 있을 것이다. 열을 가하지 않은 아위버섯 완충용액 추출물에서는 높은 활성이 확인되어 열을 가하지 않거나 작은 열을 가하여 만드는 식품에서는 좋은 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다 (미발표). 높은 혈전용해 활성을 나타내는 버섯으로는 팽이버섯 (Shin and Choi, 1998), 뽕나무버섯 (Kim and Kim, 1999)과 할미송이버섯 (Kim and Kim, 2001), 쓴송이버섯 (Kim, 2002) 등이 알려져 있다.

트롬빈 저해활성

혈전형성 단계의 필수 효소인 트롬빈의 활성을 저하시켜 혈전 형성을 억제 시키는 트롬빈저해 물질로 사용 가능성을 확인하기 위해 트롬빈 저해활성을 측정하였다. 측정된 결과 열수추출액이 3.15%의 매우 낮은 트롬빈 저해효과를 나타냈지만, 유기용매 분획물의 클로로포름 분획물 74.90%, 에틸아세테이트 분획물 71.88%, 부탄올 분획물 10.98%, 물 분획물 1.10%로 클로로포름과 에틸아세테이트 분획물이 70% 이상의 높은 저해활성을 나타냈다 (Fig. 3).

α -glucosidase 저해활성

α -glucosidase 저해효과를 이용하여 혈당강하효과를 측정된 결과 열수추출물은 2.95%의 매우 낮은 저해활성을 나타냈지만, 유기용매 분획물의 저해활성은 클로로포름 분획물 18.53%, 에틸아세테이트 분획물 23.25%, 부탄올 분획물 49.67%, 물 분획물 5.70%로 비교적 작은 활성을 나타냈다 (Fig. 4). 아위버섯 에탄올 추출물의 포도당 흡수 저해효과는 3-8%로 아위버섯 열수추출물의 α -glucosidase 저해효과 2.95%와 비슷한 것으로 발표되었다 (홍 등, 2004b). 그러나 아위버섯 열수추출물의 부탄올 분획물에서 49.67%의 높은 활성을 나타내 부탄올이 에탄올 보다 더 효과적인 α -glucosidase 저해물질 추출용매로 생각 된다.

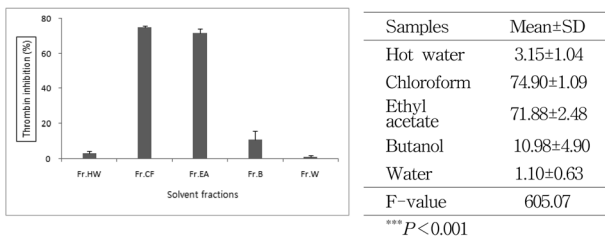


Fig. 3. Thrombin inhibitory activities of solvent fractions obtained from *Pleurotus ferulea* extracts. Fr.HW, Hot water extract Fr.CF, Chloroform fraction Fr.EA, Ethyl acetate fraction Fr.B, Butanol fraction Fr.W, H₂O fraction. 1) : mean ± SD from 3 replicates.

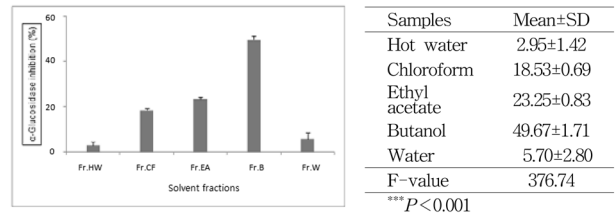


Fig. 4. α -Glucosidase inhibitory activities of solvent fractions obtained from *Pleurotus ferulea* extracts. Fr.HW, Hot water extract Fr.CF, Chloroform fraction Fr.EA, Ethyl acetate fraction Fr.B, Butanol fraction Fr.W, H₂O fraction. 1) : mean ± SD from 3 replicates.

적요

아위버섯으로부터 성인병 치료와 예방 관련된 생리활성 물질을 확인하고 이 물질의 추출을 위한 최적 조건을 확립하기위해 아위버섯 열수추출물과 유기용매 분획물을 사용하여 성인병 관련 생리활성을 측정하였다. 아위버섯 열수추출액에서는 작은 항산화효과, 트롬빈저해효과, 혈당강하효과가 확인되었지만 혈전용해효과는 나타나지 않았다. 그러나 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물에서 86.79%와 87.82%의 높은 항산화효과가 확인 되었으며, 에틸아세테이트 분획물에서 0.08 plasmin unit의 작은 혈전용해 활성을 확인할 수 있었다. 클로로포름 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 74.90%와 71.88%의 높은 트롬빈저해 효과와 함께 부탄올 분획물에서 49.67%의 혈당강하효과를 확인하였다. 따라서 아위버섯의 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물은 혈관계 질환을 위한 기능성 식품의 개발에 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 상지대학교 교수 연구년제 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

김길영. 1998. 임상지혈혈전학. 군자출판사 1-33.
 김준호, 이은진, 석순자. 2007. 야생버섯 메탄올추출물의 혈전용해 활성과 α -glucosidase 저해 활성. 한국균학회지 35(2):128-132.
 안덕균. 1992. 한국산 약용 균류. 한국균학회지 20:154-166.
 홍기형, 김병용, 김혜경. 2004a. 아위버섯(*Pleurotus ferulae*) 영양 성분 분석. 한국식품과학회지 36:563-567.
 홍기형, 김병용, 김혜경. 2004b. 아위버섯(*Pleurotus ferulae*) 추출물의 생리활성 탐색. 한국식품영양과학회지 33:791-796.
 Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stale free radical. Nature 181:1199-1120.
 Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. Cancer Res. 30:2776-2781

- Choi, H. J., Kim, N. J. and Kim, D. H. 2000. Hypoglycemic Effect of GE974 isolated from *Gyrophora esculenta* in Normal and Diabetic mice. *Kor. J. pharmacogn.* 31(3):268-272.
- Choi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 24:214-222.
- Daka M. D. and Semba, C. P. 1995. Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 6:(suppl)73-77.
- Doljak, B., Stegnar, M., Urleb, U., Kreft, S., Umek, A., Ciglaric, M., Strukelj, B. and Popovic, T. 2001. Screening for selective thrombin inhibitor in mushrooms. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 12:123-128.
- Haverkate, F. and Traas, D. W. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemost.* 32:356-365.
- Kim, H. K., Han, H. S., Lee, G. D. and Kim, K. H. 2005. Physiological activities of fresh *Pleurotus eryngii* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34(4):439-445.
- Kim, H. K., Choi, Y. J., and Kim, K. H. 2002. Functional activities of microwave-assisted extracts from *Flammulina velutipes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34:1013-1017.
- Kim, J. H. 2002. Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma sejunctum*. *Kor. J. Biomed. Lab. Sci.* 8(3):173-177.
- Kim, J. H. and Kim, Y. S. 1999. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 63(12):2130-2136.
- Kim, J. H. and Kim, Y. S. 2001. Characterization of a metalloenzyme from a wild mushroom, *Tricholoma saponaceum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 65(2):356-362.
- Kim, Y. J., Kim, C. K. and Kwon Y. J. 1997. Isolation of antioxidative components of *Perillae semen*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29(1):38-43.
- Oh, H. S. and Kim, J. H. 2007. Physiological functionalities of hot water extract of *Codonopsis lanceolata* and some medicinal materials, and their mixtures. *Korean J. Community Living Sci.* 18:407-415.
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1998. Purification and partial characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol.* 36:20-25.
- 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. *Gann.* 65:557-558
- Watanabe, J., Kawabata, J., Kurihara, H. and Niki, R. 1997. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:177-178.