

## 송이(*Tricholoma matsutake*)에서 분리된 균사 배양액의 Tyrosinase 억제효과

우현정 · †양덕조  
충북대학교 자연과학대학 생명과학부  
(접수 : 2002. 12. 2., 게재승인 : 2003. 1. 22.)

## Inhibitory Effect of the Extracts of *Tricholoma matsutake* Mycelia on Tyrosinase Activity

Hyun-Jung Woo, and Deok-Cho Yang<sup>†</sup>  
School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea  
(Received : 2002. 12. 2., Accepted : 2003. 1. 22.)

In this study, the optimum conditions for mycelium culture of the mushroom *Tricholoma matsutake* and the inhibitory effect of the mycelium extracts on tyrosinase activity have been examined. When the extracts of the *Tricholoma matsutake* mycelia were tested for inhibitory activity on tyrosinase, it was found that the components extracted with ethyl acetate and water showed the highest inhibitory activity. The effect of antioxidants on the growth of mycelium and tyrosinase-inhibiting activity was also investigated. The results showed that tocopherol inhibited the growth in a concentration-dependent manner. In terms of tyrosinase-inhibiting activity, however, tocopherol was found to enhance the inhibitory activity.

**Key Words** : Tyrosinase, inhibition, extraction, antioxidants

### 서론

Melanin은 태양 광선 중 유해한 자외선으로부터 생체를 보호하는 중요한 방어 수단으로 동물, 식물, 및 미생물에 널리 존재한다(1). 그러나 과도한 melanin 합성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯을 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 식품을 갈변시킴으로써 품질 저하의 원인으로 작용한다(2). Melanin은 자외선을 받은 melanocyte에서 tyrosinase(EC 1.14.18.1)가 활성화되면 이 활성화된 tyrosinase가 tyrosine을 산화시켜 생성된다. Melanin 생합성에 관여하는 효소는 tyrosinase 외에 tyrosinase-related protein 1(TRP-1; EC 1.14.18.-) 및 dopachrome tautomerase(TRP-2; EC 5.3.3.12)가 있으나 melanin 합성의 결정적인 효소는 tyrosinase로 tyrosinase 단독으로도 melanin 생성이 가능한 것으로 알려져 있다(3). 또한 melanin 생성과정 중 중요요인으로 작용하는

자외선은 tyrosinase와 자동 산화반응 과정 모두를 촉진시킨다. Tyrosinase가 효소적 작용을 나타내는 동안  $O_2^{\cdot -}$ 가 생성되며 생성된  $O_2^{\cdot -}$ 는 SOD의 작용과 전이금속에 의한 fenton 반응을 거쳐  $\cdot OH$ 로 될 수 있다. 이어서  $\cdot OH$ 는 자동산화반응을 개시시켜 melanin 생성을 촉진시킬 수 있다(4, 5).

현재까지 알려진 tyrosinase 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid 유도체, kojic acid, azelaic acid, corticosteroids, retinoids, arbutin 등이 있으나, 이들의 안정성과 경제성 등의 문제점으로 사용에 있어서 어려움이 있다(6, 7).

이에 본 연구에서는 자연산 송이(*Tricholoma matsutake*)에서 분리된 균사를 배양하여 분획층에서 tyrosinase 활성을 억제하는 효과를 이해하고자 하였다(8). 따라서 배양액의 유기용매별 분획에서 tyrosinase 활성 억제 효과를 측정하였다. 또한 활성 산소가 자동산화반응을 개시시켜 melanin 생성을 촉진시킨다는 점에 착안, 항산화제를 첨가한 배지로 세포배양에 따른 성장률과 tyrosinase 활성 저해에 대한 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 임업연구원에서 분양 받은

<sup>†</sup> Corresponding Author : School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea  
Tel : +82-43-261-2293, Fax : +82-43-261-2293  
E-mail : dcyang48@hotmail.com

*Tricholoma matsutake* 공시균주인 KFRI432와 속리산에서 구입한 *T. matsutake*의 자실체로부터 분리한 균사인 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T를 종균으로 하여 종균보존 고체 배지에서 배양하여 사용하였다. *T. matsutake*의 자실체로부터 균주 분리는 PDA(potato dextrose agar)배지에 자실체의 갖과 대 부분을 잘라 25℃ 항온 배양기에서 7일간 방치 후 배지로 뺀어 나온 균사를 동일배지로 옮겨 분리하였다. 균주 보존용 배지는 PDA배지를 사용하였고 배양을 위한 배지는 변형한 티엠엠(TMM)액체배지를 이용하였으며 그 조성은 다음과 같다: 1.5% starch, 0.5% glucose, 0.3% yeast extract, 0.1% peptone, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, pH 5.5.

**FE-SEM(Field Emission Scanning Electron Microscope) 촬영**

송이 균사확인을 위한 FE-SEM촬영은 Park 등의 방법을 변형하여 사용하였다(9). PDA배지에서 4주간 생육한 균사체의 말단 부분을 10mm×10mm로 잘라 전처리 과정을 거친 후 gold coating해 충북대학교 공동실습관에 있는 LEO 1530FE로 1,000배에서 촬영하였다.

**균사체 배양**

액체 배양 시 100ml의 삼각플라스크에 액체 배지 50ml을 분주한 후 PDA배지에서 배양한 균사를 10mm×10mm 크기의 절편으로 만들어 한조각씩 접종하여 배양하였다. 고체 배양은 25℃ 항온 배양기에서 암상태로 이루어졌으며, 액체 배양은 25℃ 암상태에서 진탕배양(rotary shaker 120rpm)하였다.

**추출법**

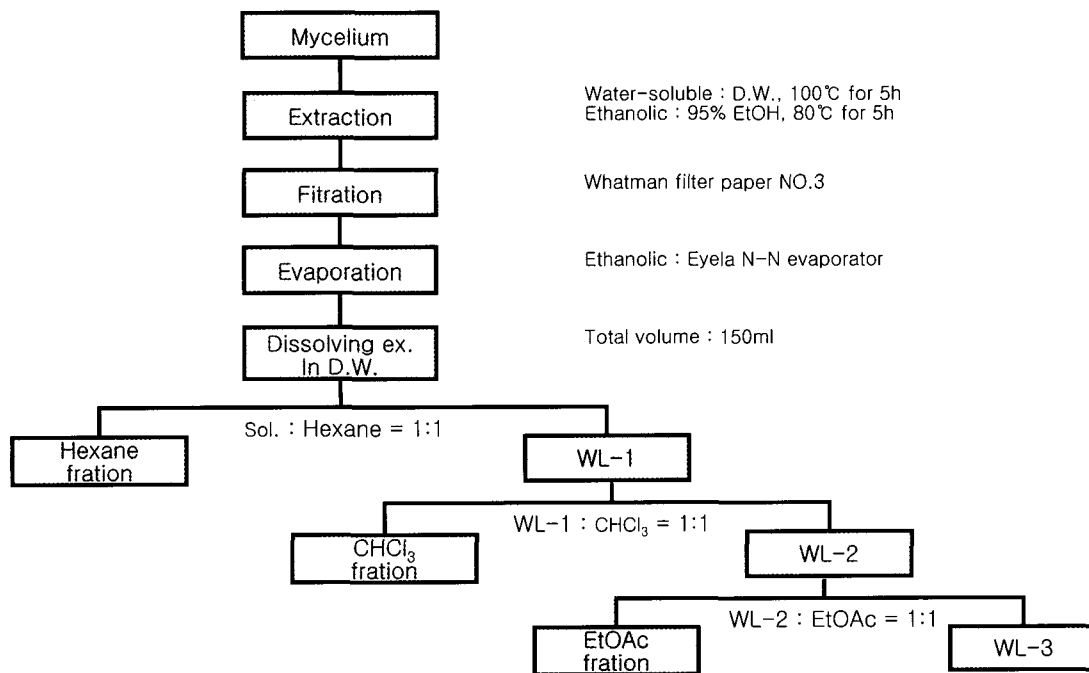
균사를 TMM배지에서 3주간 배양한 후 여과(whatman filter paper No. 3)하여 균사체와 배양액을 분리하였다. 균사체는 24℃에서 하루동안 건조해 수분을 제거한 후 증류수 또는 에탄올을 용매로 하여 추출하였다. 열수 추출은 균사체 10g에 증류수 150ml를 첨가한 후 100℃에서 5시간 동안 추출하였다. 에탄올 추출은 균사체 10g에 95% ethanol을 첨가하여 80℃에서 5시간 동안 추출하였다. 각 추출물은 여과한 후 용매 분획에 사용하였다.

**용매분획**

열수 추출물은 증류수로 150ml로 부피를 맞춰준 후 용매분획에 이용하였고 에탄올 추출물은 감압 농축(Rotavapor 115 Ex, Brinkman)하여 에탄올을 증발시킨 후 증류수를 이용, 150ml로 부피를 맞추어 주었다. 각각의 추출물과 배양액 50 ml에 동량의 Hexane을 가하여 용매분획을 하고 남아있는 수용성 층을 상기와 같은 방법으로 chloroform을 첨가하여 chloroform 분획을 얻었다. 남아있는 수용성 층에 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 ethyl acetate 분획을 얻었다. 각각의 용매 분획과 남은 수용성 층을 감압 농축한 후 최종부피가 5 ml이 되도록 증류수로 녹여 tyrosinase 활성 억제 시료로 사용하였다(Fig. 1).

**Tyrosinase 저해활성 측정**

Tyrosinase 활성의 억제는 Jung 등의 방법을 변형하여 사용하였다(6). 5mM L-DOPA 용액(0.7 ml) 및 시료 용액(0.2ml)의 혼합액에 효소액(0.1 ml, 20 units/ml)을 첨가하여 26℃에서 1



**Figure 1.** Procedure for extraction and fractionation of mycelium, *T. matsutake*. (WL-1; 1st water layer extract, WL-2; 2nd water layer extract, WL-3; 3rd water layer extract, EtOAc; Ethyl acetate)

분간 반응시켜 475nm에서 흡광도(U-3400 spectrophotometer, HITACHI)를 측정한 후 다음 식에 의해 tyrosinase 활성 억제율을 산출하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

$$\text{Inhibition of tyrosinase activity (\%)} = [1 - (S-B)/C] \times 100$$

S : 효소액 및 시료용액 첨가 시 흡광도 변화값

B : 효소액 대신 0.1M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 첨가 시의 흡광도 변화값

C : 시료용액 대신 0.1M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 첨가 시의 흡광도 변화값

### 항산화제 처리

Ascorbic acid (0.005-0.1 mM), glutathione (GSH, 1-50 μM), tocopherol(0.5-10 mM)를 계대배양 시 첨가하여 암상태에서 4주간 배양 후 성장률 및 tyrosinase 활성 억제율을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

본 연구는 *T. matsutake*에서 분리한 3개의 균주와 임업연구원에서 분양 받은 1개의 공시균주를 이용하여 이루어졌다. 실험실에서 분리한 균주, 즉 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T 균주와 분양 받은 공시균주, KFRI432의 자라는 모양이나 성장 속도에 현저한 차이가 보였다. 공시균주 KFRI432는 투명한 균사가 서서히 퍼지며 배지 속으로 침투해 자라는 것이 관찰되었다. 이에 반해, 실험실 자체에서 분리된 YxT, WxT의 경우 말단 쪽은 투명하며 배지 속으로 침투하여 자라 KFRI432와 같았으나, 가운데 부분은 흰눈송이와 같은 형태의 균총이 배지 위로 자라는 것이 관찰되었고 NK<sub>3</sub>T의 경우 KFRI432와 비슷하게 투명한 균사가 자라는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 액체 배지에서는 KFRI432, YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T 모두 하얗고 둥근 구슬 형태로 균사가 자랐으나 성장 속도나 그 조밀함에 있어서 차이점이 있었다(Fig. 3). 4주간 PDA(potato dextrose agar)배지에서 배양한 균주의 말단부위를 FE-SEM으로 촬영해본 결과 KFRI432의 경우 균사가 일정한 방향으로 자라며, 끝이 둥글고 껍질구조와 후막포자가 보이지 않아 기존의 연구결과와 일치함을 보였다(10). 그러나 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T의 경우, 일정한 방향이 아닌 그물처럼 얽혀 있으며 후막포자로 보여지는 둥근 포자가 발견되어 KFRI432와는 다소 차이점을 나타내었다(Fig. 4). 또한 균사의 성장속도에서도 현저한 차이가 나타나 4주간 배양한 균사체의 건조량이 KFRI432는 0.025g으로 성장이 매우 저조한 반면, YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T는 각각 0.382, 0.374, 0.361g으로 15배 정도의 좋은 성장속도를 보였다(Fig. 5). 특히 KFRI432의 배양액에서는 송이향이 나는 데 반해 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T의 경우 송이 향과는 다른 구수한 향이 느껴졌다. 이렇게 현저한 차이점들에 의해 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T를 송이의 균사로 판단하는 데는 어려움이 있다. 그러나 기존의 여러 논문에서 많은 경우 송이의 자실체에서 분리한 균사가 흰눈송이 같은 형태로 자란다는 발표가 있어 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T가 진정한 송이균은 아닐지라도 송이 내에 함께 공존하고 있는 외생균근균일 가능성이 매우 높다(11, 12). 이에 균사의 동정실험은 현재 수행 중에 있다.

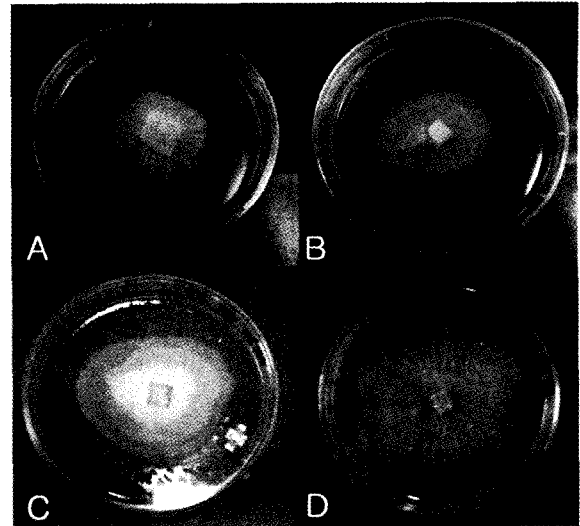


Figure 2. Mycelia of from *T. matsutake* on PDA (potato dextrose agar) medium(A : KFRI432, B : YxT, C : WxT, D : NK<sub>3</sub>T).

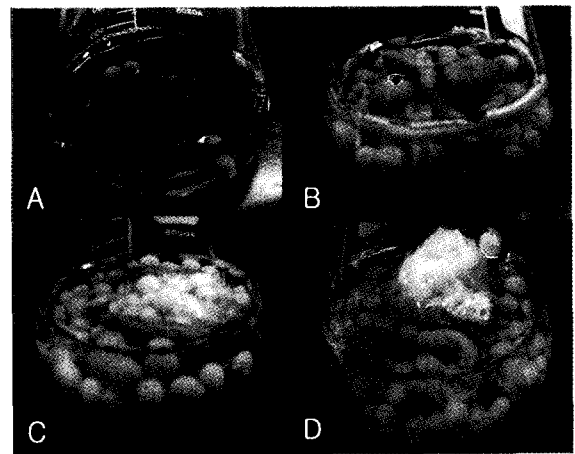


Figure 3. Mycelia of *T. matsutake* on TMM liquid medium for 2 weeks(A : KFRI432, B : YxT, C : WxT, D : NK<sub>3</sub>T).

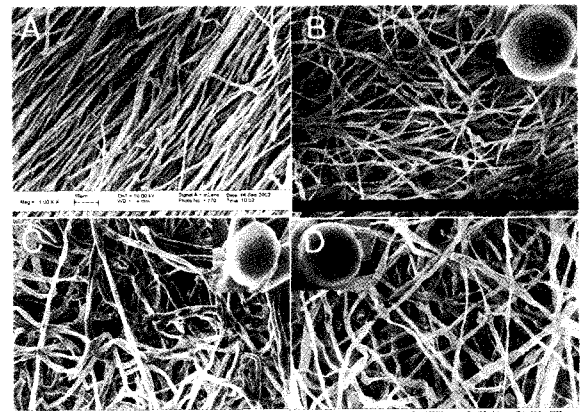


Figure 4. Photograph of Pine mushroom(*T. matsutake*) mycelia by FE-SEM(×1000)(A : KFRI432, B : NK<sub>3</sub>T, C : YxT, D : WxT).

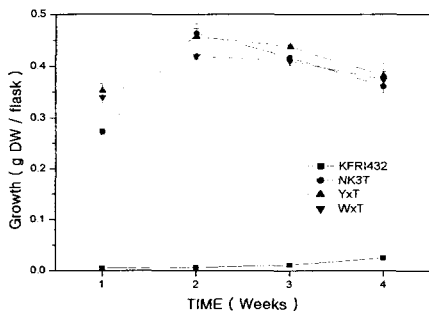
3주간 배양된 KFRI432, YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T를 이용해 tyrosinase 활성 억제 실험을 실시하였다. 증류수와 에탄올을 이용한 추출물과 세포외분비물의 tyrosinase 활성 억제율을 보기 위한 배양액을 각각 회수하여 hexane, chloroform, ethyl acetate로 분획한

**Table 1.** Inhibition of tyrosinase activity by crude extracts and solvent fractions from mycelia of *Tricholoma matsutake* and mycelium isolated from *T. matsutake*

Material	Extraction with	Inhibition of tyrosinase activity (%)				
		Extract	Fraction			
			Crude	Hexane	CHCl <sub>3</sub> <sup>1)</sup>	EtOAc <sup>1)</sup>
KFRI432	extracellular fluid	134.26±14.28	-34.98±3.77	37.67±3.65	147.47±1.02	25.53±2.36
	D.W.	-23.52±2.80	-25.28±1.40	52.35±3.27	114.57±6.05	55.85±5.47
	EtOH <sup>1)</sup>	-5.16±1.40	-16.60±0.47	-25.60±3.00	48.68±7.66	59.25±2.80
YxT	extracellular fluid	66.04±3.93	-15.39±4.40	81.11±2.54	59.49±5.47	48.80±7.57
	D.W.	48.80±5.17	-22.19±2.93	-36.82±2.81	77.74±3.26	64.19±3.30
	EtOH <sup>1)</sup>	66.11±2.80	-14.44±0.76	-26.51±3.00	89.46±3.27	102.55±1.86
WxT	extracellular fluid	59.25±0.47	-3.35 ±1.17	-44.73±0.93	73.98±1.87	66.41±0.46
	D.W.	18.86±3.67	-42.95±0.47	-4.23±2.30	90.30±3.88	51.15±5.40
	EtOH <sup>1)</sup>	40.15±3.74	-13.38±1.40	-33.18±3.27	65.57±1.47	89.13±1.87
NK <sub>3</sub> T	extracellular fluid	-4.45±0.47	-35.99±4.54	-31.50±3.27	40.24±2.33	86.98±3.28
	D.W.	21.97±0.93	-39.46± 4.94	-20.49±3.74	53.34±0.47	77.81±3.73
	EtOH <sup>1)</sup>	26.44±2.33	-12.01±1.87	-36.97±2.34	41.64±3.07	85.81±1.87

1) CHCl<sub>3</sub> ; chloroform, EtOAc ; ethyl acetate, EtOH ; ethyl alcohol  
 2) WL ; the water layer extract after ethyl acetate fractionation

후, tyrosinase 활성 억제 실험을 진행하였다. Tyrosinase 활성 억제율은 Table 1에서 제시한 바와 같이 4가지 균주 모두 ethyl acetate 분획층과 수층에서 tyrosinase 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 특히 KFRI432의 ethyl acetate 분획층과 YxT의 수층에서 억제율이 100%를 넘어 이는 tyrosinase 활성 억제뿐만 아니라 이미 존재하던 melanin 색소까지도 파괴하는 것으로 추론되어진다.



**Figure 5.** Influences of culture periods on mycelia of *T. matsutake* growth.

주기별 균사 성장율을 비교한 결과 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T의 경우 2주 동안에 건중량이 0.457, 0.420, 0.463g으로 가장 좋은 성장을 보였다. 그에 비해 4주에서는 0.383, 0.374, 0.361g으로 줄어들어 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T의 최적성장 주기가 2주임을

알 수 있었다. 반면 공시균주인 KFRI432의 경우에는 균사가 계속 성장하는 것으로 나타났으나 4주 배양 후 건중량이 0.026g으로 YxT의 0.354g에 비해 현저히 낮은 성장을 보였다(Fig. 5). 또한 비교적 높은 성장을 보인 WxT를 이용한 ethyl acetate 분획층의 주기별 tyrosinase 활성 억제 비교결과 3주 배양 시 94.94%로 가장 높은 억제율을 보였으나 2주의 93.67%와 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 송이에서 분리한 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T를 대량배양 할 경우에는 시간과 오염도의 문제점을 고려하여 균사의 최적 배양기간을 2주 정도로 설정하는 것이 효율적이라고 판단된다.

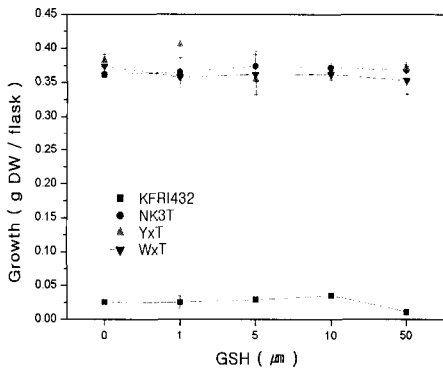
Tyrosinase에 의해 발생된 활성산소는 자동산화반응을 개시하여 melanin 생성을 촉진한다. 그래서 균사 배양 배지에 항산화제인 ascorbic acid, glutathione(GSH), tocopherol을 농도별로 처리하였다. Ascorbic acid 처리 시 KFRI432에서는 0.05mM 처리구에서 무처리구보다 3.3배 성장이 양호하였으며 YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T에서는 별다른 차이를 보이지 않았다(Fig. 6). Glutathione 처리의 경우 KFRI432에서만 50μM 처리구에서 무처리구보다 2.3배 성장이 저조하였을 뿐, 별다른 차이를 보이지 않았으며, Tocopherol의 경우 다른 항산화제 처리구와는 달리 처리 농도가 높아질수록 성장이 억제되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 7, 8). 이는 기내 배양 식물의 경우 일정량의 항산화제를 처리하면 성장이 촉진된다는 보문과는 다른 결과를 보였다(13, 14). 광합성을 위해 광장에 노출되는 식물세포와

**Table 2.** Effects of antioxidants on inhibition of tyrosinase activity by ethyl acetate fractions from WxT

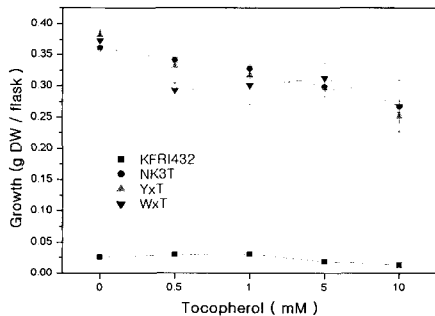
Antioxidants	Inhibition of tyrosinase activity (%)				
Ascorbic acid (mM)	0	0.005	0.01	0.05	0.1
	90.30±3.88	96.17±0.50	98.34±2.89	95.92±3.61	92.12±0.17
glutathione (μM)	0	1	5	10	50
	90.30±3.88	93.63±0.62	94.34±0.16	93.94±0.18	93.38±0.26
tocopherol (mM)	0	0.5	1	5	10
	90.30±3.88	98.95±0.13	99.19±0.29	100.15±0.22	100.00±0.28

WxT cultured in 50ml TMM liquid medium at 23°C in dark condition. The data represent the mean ±SE of triplicates measured after 3 weeks culture.

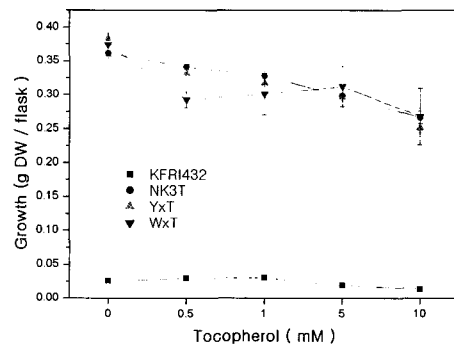
는 달리 곰팡이의 경우 대개 암상태에서 배양되므로 산화적 스트레스를 적게 받으며, 자체적으로 충분한 항산화제가 생산된다고 생각된다(15). 그러나 지용성 비타민인 Tocopherol의 경우 오히려 cell 주위와 배지 윗부분에 막을 형성함으로써 산소공급에 영향을 주어 성장을 억제하는 것으로 보여진다. 항산화제를 처리한 WxT의 ethyl acetate 분획층에서 tyrosinase 활성을 측정된 결과 무처리구에 비해 항산화제 처리구에서 모두 높은 tyrosinase 활성 억제를 나타냈다. 특히 tocopherol 처리구에서는 효소 활성이 현저하게 억제 되었는데, 5, 10mM 처리에서 100%가 넘는 효소 활성 억제를 보였다(Table 2).



**Figure 6.** Effects of ascorbic acid on growth from mycelia of *T. matsutake* and mycelium isolated from *T. matsutake* growth.



**Figure 7.** Effects of glutathione(GSH) on growth from mycelia of *T. matsutake* and mycelium isolated from *T. matsutake* growth.



**Figure 8.** Effects of tocopherol on growth from mycelia of *T. matsutake* and mycelium isolated from *T. matsutake* growth.

**요 약**

송이의 공시균(KFRI432)과 실험실에서 자체 분리한 균(YxT, WxT, NK<sub>3</sub>T)의 성장속도의 차이와 FE SEM으로 확인한 미세구조의 차이로 공시균과 자체 분리균이 서로 다른 균임을 확인할 수 있었다.

Tyrosinase 활성 억제 실험을 위해 각각 균사체의 열수 추출물, 에탄올 추출물, 배양액을 hexane, chloroform, ethyl acetate로 분획하였다. 그 결과 모든 균의 ethyl acetate 분획층과 수층에서 tyrosinase 활성을 억제하는 것으로 나타났으며, KFRI432의 ethyl acetate 분획층과 YxT의 수층에서 억제율이 100%를 넘어 큰 저해 활성을 보였다.

또한 항산화제 처리 결과 ascorbic acid와 glutathion은 생장을 다소 증가시키거나 별 영향을 주지 못한 반면, tocopherol의 경우 농도가 높아질수록 생장을 억제하는 것으로 나타났다. Tyrosinase 활성 억제에 있어서는 모든 항산화제 처리구에서 무처리구에 비해 높은 억제율을 보였다.

**감 사**

본 연구는 충북대학교 자연과학원 기초과학연구소의 연구비 지원으로 수행되어졌으며 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

1. Bell, A. A. and M. H. Weeler (1986), Biosynthesis and function of fungal melanin, *Ann. Rev. Phtopathol.* **24**, 411-451.

2. Chen, J. S., C. Wei, and M. R. Marshall (1991), Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.
3. Karneyama, K., T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, S. Nishiyama, K. Urabe, and J. Hearing (1993), *J. Invest. Dermatol.* **2**, 126.
4. Koga, S., Nakano, M. and Tero-Kubota, S. (1991), Generation of superoxide during the enzymatic action of tyrosinase, *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 570-575.
5. Korotowski, W., B. Pilas, T. Sarna, and Kalyanaraman, B. (1987), Photionduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins, *Photochem. Photobiol.* **45**, 185-190.
6. Jung, S. W., N. K. Lee, S. J. Kim, and D. Han (1995), Screening of tyrosinase inhibitor from plants, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 891-896.
7. Tomita, K., N. Oda, M. Kamel, T. Miyaki, and T. Oki. (1990), Anew screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*, *J. Antibiotics.* **12**, 1601-1605.
8. Kwak, J. H., Seo U. K., and Han Y. H. (2001), Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 220-223.
9. Lee, S. C., K. B. Lee, and J. B. Park (2000), Effects of dimethylsulfoxide on the cell wall regeneration and cell division of protoplasts isolated from *Panax ginseng* callus, *Kor. J. Plant Tissue Culture* **27**, 429-434.
10. Lee, S. S. and C. K. Sung (1997), The mycelia isolated from the basidiocarps of *tricholoma matsutake* in korea, *The Kor. J. Mycology.* **25**, 121-129.
11. Hall, I. R., G. G. Strong, Y. Wang, and I. Plattner (1992), Progress in research on truffles and other edible fungi in New Zealand. *Mycologiae Vegetazione Mediterranea* **7**, 271-274.
12. Wang, Y., L. Sinclair, I. R. Hall, and Cole, A. L. J. (1995), *Boletus edulis* sensu lato: a new record for New Zealand, *New Zealand J. Crop. Horticult. Sci.* **23**, 227-231.
13. Yang, D. C., Y. H. Kim, H. Y. Choi, C. H. Choi, and D. C. Yang (1995), Effects of anyioxidants on growth and betalain production in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. *Korean Society of Plant Tissue Culture.* **22**, 65-70.
14. Kim, Y. H., K. M .Choi, D. C. Yang, K. Y. Yun, and D. C. Yang (1999), Effect of electron acceptor, electron transport inhibitors and antioxidants on growth and ginsenosides production in hairy root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *J. Ginseng Res.* **23**, 205-210.
15. Park, S. S., J. S. Lee, Bae, G. Y. Kang, K. H. Han, H. C. Min, and Jin T. (2001), Antioxidative activity and structural analysis of the steroid compound from *Fomitella fraxinea*, *Kor. J. Mycology.* **29**, 67-71.