

## *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류 (II)

—열수추출 다당류의 분리 및 특성—

조수묵 · 이재훈 · 한상배 · 김환목 · 유승현<sup>1</sup> · 유익동\*

한국과학기술연구원 생명공학연구소

<sup>1</sup>충남대학교 농생물학과

## Immuno-stimulating Polysaccharides from the Fruiting Bodies of *Fomitella fraxinea* (II)

—Isolation and characterization of hot-water extracted polysaccharides—

Soo-Muk Cho, JaeHoon Lee, Sang-Bae Han, Hwan-Mook Kim,

Seung-Hun Yu<sup>1</sup> and Ick-Dong Yoo\*

Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, P.O. Box 115,

Yusong, Taejon 305-600, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, Chungnam National University,

Taejon 305-764, Korea

**ABSTRACT:** Polysaccharide FHW was extracted from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea* with hot-water treatment and then fractionated into FHW-I and FHW-II on DEAE-Cellulose chromatography. FHW-I and FCW-II were further purified into FHW-Ia and Ib, FHW-IIa and IIb on gel permeation chromatography, respectively. A small amount of uronic acid was detected and glucose, galactose, fucose, and mannose were found to be main sugars in the polysaccharides. Protein was detected in FHW-Ia, FHW-IIa, and FHW-IIb, but not in FHW-Ib. FHW-Ia was identified to be a fuco-gluco-mannogalactan with molecular weight of 19,000 and FHW-Ib was a gluco-fuco-mannogalactan of 15,000. FHW-IIa and FHW-IIb were galacto-mannoglucan and their molecular weights were estimated to be 31,000 and 9,000, respectively. Both FHW-Ib and FHW-IIb did not show an absorption band characteristic of the  $\beta$ -glycosidic linkage in IR spectra. FHW-IIb showed a strong immuno-stimulating activity but the other three polysaccharides showed a weak activity.

**KEYWORDS:** *Fomitella fraxinea*, hot-water extracted polysaccharides, immuno-stimulating activity

*Fomitella fraxinea* (Fr.) Imaz.는 구멍장이버섯과에 속하는 목재부후성 담자균으로 민간에서는 "아카시아 영지"로 알려져 있다. 형태적으로 영지와 유사하여 오래 전부터 민간 약재로 사용되었지만 약효 성분은 알려져 있지 않다. 저자들은 이 버섯의 자실체 유래 중성염 추출 다당류의 물리화학적 특성 및 항암 면역 활성을 보고하였다(Cho 등, 1995). 이 다당류는 분자량이 적은 heteropolysaccha-

ride이며, 담자균 유래 항암면역활성 다당류로 알려져 있는  $\beta$ -glucan(Mizuno 등, 1992; Franz, 1989, Chihara 등, 1970)과는 분자량 및 구성당에서 상이하였으며, *Agaricus blazei*(Mizuno, 1989) 및 *Phellinus linteus*(Song 등, 1995)로부터 분리된 항암면역활성 다당류와는 구성당 및 분자량은 유사하였으나 당구성비에서 큰 차이를 보였다.

다당류의 종류는 사용되는 균주, 추출 용매, 추출 온도, 및 추출 용매 농도 등 다양한 요인에 의하여 결정되는데, 다당류의 추출 방법으로는 중성염, 열

\*Corresponding author

수 및 알칼리 추출법등이 사용되어 왔다(松田, 1989). 본 연구에서는 *Fomitella fraxinea*의 자실체를 중성염 추출 후 다시 열수 추출하여 얻은 다당류가 항암면역활성을 지니고 중성염 추출 다당류와는 다른 특성을 지니고 있어 그들의 물리화학적 특성 및 활성을 보고한다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

강원도 원주 지역에 분포하는 *Fomitella fraxinea* (Fr.) Imaz를 아카시 나무(*Robinia pseudo-acacia*)의 절주목으로부터 채취하였다.

### 다당류의 추출, 분획 및 정제

중성염 추출 후 회수한 자실체 0.5 kg(Cho등, 1995)에 물 5 l를 첨가하여 95°C에서 4시간 동안 3회 반복 추출하였다. 다당류를 침전시키기 위하여 추출액에 4배의 ethanol을 첨가하고 4°C에서 24시간 동안 정치시킨 후 원심 분리하였다. 침전물을 물 500 ml에 용해시켜 10°C에서 48시간 동안 투석(MWCO : 3500, Spectrum사)한 후, 투석내액을 동결 건조하여 열수추출 다당류 FHW 2 g을 얻었다(Fig. 1). FHW 1 g을 5 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.7)에 녹여 동일 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose(Cl- form, Merck사) 컬럼에 loading한 다음 이온 크로마토그래피를 행하였다. 컬럼을 완충액 600 ml로 용출한 후, NaCl로 0에서 1N까지 gradient elution 하였으며 분획당 15 ml를 모았다. 당과 단백질의 함유양상에 따라서 적당히 분획한 뒤 얻어진 분획들은 투석하여 염을 제거하고 동결건조하였다. 이온 크로마토그래피에서 얻어진 각각의 분획은 Toyopearl HW65F gel(Tosoh사)을 사용하여 겔 여과 크로마토그래피를 실시하였다. 컬럼에 시료 100 mg을 loading한 후 분당 1 ml로 컬럼을 물로 용출시키면서 5 ml씩 모았다. 모아진 분획은 동결건조하여 분말 상태로 얻어 건조기에 보관하였다.

### 다당류의 물리화학적 특성 조사

구성 성분의 정량 당은 phenol-sulfuric acid

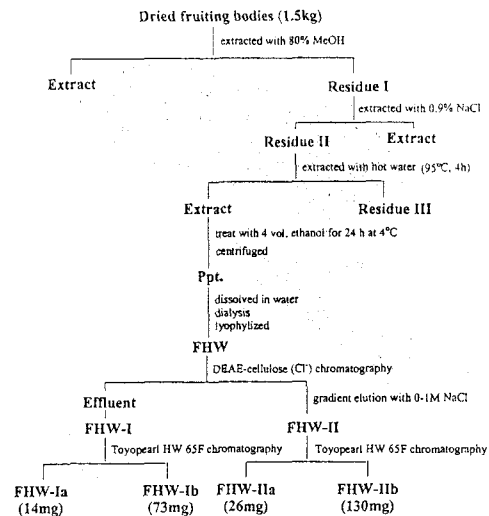


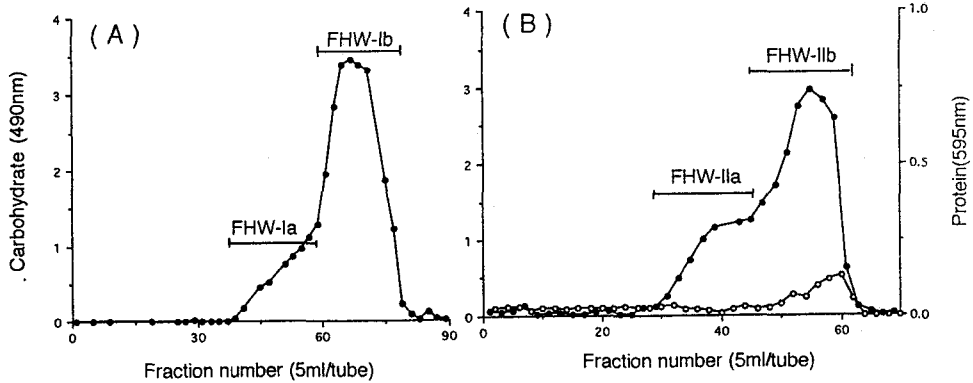
Fig. 1. Preparation scheme of hot water extracted polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*.

방법(Dubois등, 1956)으로 단백질은 Bradford 방법(Bradford, 1976)으로 정량하였다. D-glucose (Sigma)와 bovine serum albumin(Bio-rad사)를 표준품으로 사용하였다. Uronic acid의 함량은 D-glucuronic acid(Sigma)를 표준품으로 사용하여 meta-hydroxyphenyl 방법(Blumenkrantz and Hansen, 1973)으로 측정하였다.

**구성당 분석** 다당류 2 mg을 1 ml의 Trifluoroacetic acid(TFA)에 녹여 완전 가수분해한 후, 전보의 방법으로(Cho등, 1995) sugar alditol acetate를 얻었다. 생성된 sugar alditol acetate를 chloroform으로 추출하여 전과 같은 조건에서 GC 분석을 행하였다.

**분자량 측정** 분자량 표준품으로 dextran (Sigma)을 사용하여 고압 액체 크로마토그래피에 의하여 분자량을 결정하였다. TSK-GMPW(7.5×300 mm, Tosoh사)컬럼을 사용하였으며, 검출기는 RI detector와 280 nm에서 UV detector를 동시에 사용하였다.

**아미노산 분석** 단백-다당류를 100°C 염산으로 처리하여 생성된 아미노산들 phenylisothiocyanate로 유도체화 시킨 뒤 Pico-tag 유리 아미노산 분석 컬럼(3.9×300 mm, Waters, USA)으로 분석하였다.



**Fig. 2.** Elution profiles of FHW-1 (A) and FHW-II (B) on Toyopearl HW65F gel column chromatography. The gel permeation column ( $\phi$  2.1×100 cm) was eluted with water. The sugar and protein were measured by phenol sulfuric acid method (-●-) and Bradford's method (-○-), respectively.

**IR spectrum** 다당류 0.5 mg과 KBr 0.5 mg을 잘 혼합한 후 막자 사발에서 마쇄하여 KBr pellet를 만든 다음 FT-IR spectrophotometer(Laser Precision Analet RFX-65s)를 사용하여 IR spectrum을 얻었다.

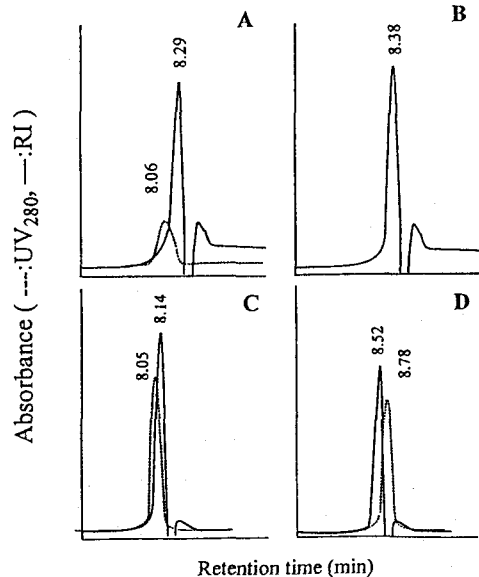
**항암 면역 증강 활성 측정**

Mouse의 spleen cell을 적출, 정제하여 시료 다당류 또는 양성 대조구인 lipopolysaccharide (LPS)로 2일간 면역화 시킨 뒤, 576 nm에서 흡광도를 조사하여 antibody forming cell(AFC)을 계수하고 활성의 지표로 사용하였다(Song등, 1995).

**결과 및 고찰**

**항암 면역 활성 다당류의 추출, 분획 및 정제**

*Fomitella fraxinea* 자실체를 중성염으로 추출하고 추출물을 제거한 후 열수 추출하였다. 열수 추출물을 에탄올로 처리하여 다당류를 침전시키고, 침전물을 이온 크로마토그래피와 겔여과, 크로마토그래피로 정제하였다(Fig. 1). 이온교환 컬럼 크로마토그래피에 의하여 열수 추출물 FHW를 완충용액 용출 분획 FHW-I과 NaCl 용출 분획 FHW-II로 나누었다(자료 미제시). FHW-I과 FHW-II는 각각 흰색 분말과 갈색 분말의 다당류로서 모두 물에 잘 용해되었다. FHW-I과 FHW-II를 Toyopearl HW65F 겔여과크로마토그래피한 결과 FHW-I과



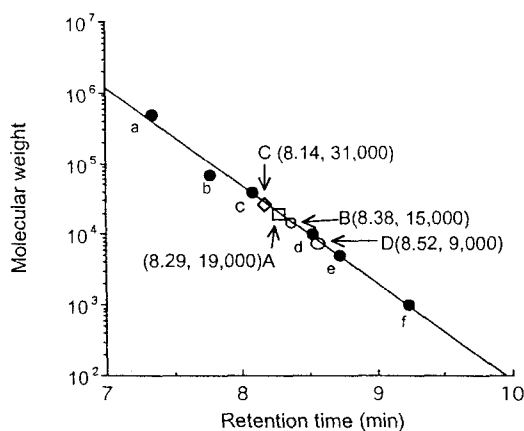
**Fig. 3.** HPLC profiles of FHW-Ia (A), FHW-Ib (B), FHW-IIa (C), and FHW-IIb(D).

FHW-II는 broad한 용출 양상을 보였으며(Fig. 2), 당의 chromatogram에 따라 FHW-I은 FHW-Ia와 Ib로 구획하였고 FHW-II는 분자량이 비교적 큰 FHW-IIa와 분자량이 작은 FHW-IIb로 구획하였다. 단백질이 검출되지 않고 당만이 검출된 것으로 보아 FHW-Ib는 순수한 다당류로서 추정되었고, FHW-Ia, IIa, 및 IIb는 당과 단백질이 비슷한 시간에 용출 되었으므로 단백-다당체로서 추정되었

**Table 1.** Some properties of hot-water extracted polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*

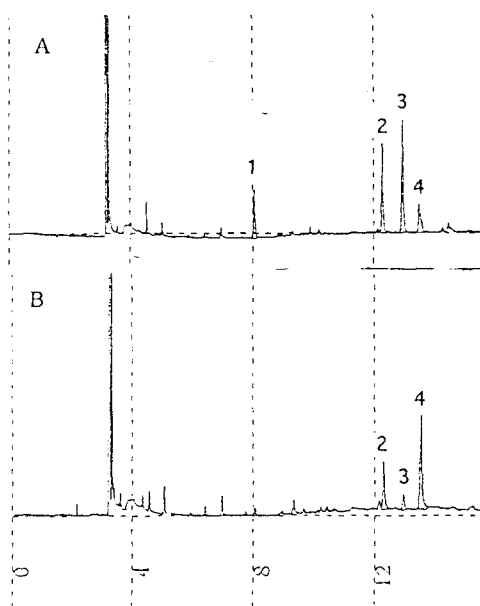
Fraction	Total sugar (%)	Protein (%)	Uronic acid ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Constitutive sugar (molar ratio)							Average molecular weight
				Glc	Fuc	Gal	Man	Xyl	Ara	Rha	
FHW	83	2.1	62	1.0	0.2	0.7	0.7	+	+	+	11,000
FHW-I	97	0.2	21	1.0	0.6	2.4	1.5	—	—	—	14,000
FHW-Ia	100	0.1	19	1.0	0.3	1.4	1.0	—	—	—	19,000
FHW-Ib	100	N.A.*	15	1.0	1.1	3.2	2.4	—	—	—	15,000
FHW-II	66	0.3	74	1.0	+	0.3	0.5	+	+	—	14,600
FHW-IIa	91	0.1	77	1.0	+	0.3	0.6	+	+	+	31,000
FHW-IIb	76	0.2	74	1.0	+	0.2	0.5	—	+	+	9,000

\*Not available.

**Fig. 4.** A calibration curve for molecular weight determination. The used standard molecule is dextran and molecular weight is a:  $5 \times 10^5$ , b:  $7 \times 10^4$ , c:  $4 \times 10^4$ , d:  $1 \times 10^4$ , e:  $5 \times 10^3$ , and f:  $1 \times 10^3$ , respectively. A. FHW-Ia, B. FHW-Ib, C. FHW-IIa, D. FHW-IIb.

다(Fig. 3).

상황 버섯의 열수추출 다당류는 heteroglycan이었고(Song등, 1995), *Cryptoporus volvatus* (Kitamura등, 1994) 및 *Armillariella tabescens* (Kiho등, 1992)의 열수추출 다당류는 homoglycan이었지만 모두 수용성이었다. Misaki등(1981)은 *Auricularia auricula-judal*의 자실체 유래 중성염 및 열수추출 다당류의 특성이 다르다고 보고하였다. 따라서 *Fomitella fraxinea* 자실체 유래 중성염과 열수추출 다당류 역시 모두 수용성이나 특성이 다를 것으로 추정되었다.

**Fig. 5.** Gas chromatograms of sugar aditol acetates from FHW-Ib (A) and FHW-IIb (B).  
1. Fucose, 2. Mannose, 3. Galactose, 4. Glucose.

**항암 면역 증강 활성 다당류의 물리화학적 특성**  
정제된 수용성 다당류의 구성 성분 함량, 구성당 분석 및 분자량등의 물리화학적 특성을 조사하여 Table 1에 요약하였다. 모든 분획 다당류들은 공통적으로 소량의 uronic acid를 갖고 있었고 그 양은 다당류 1 mg을 기준으로 15~77  $\mu\text{g}$ 이었다. HPLC 분석 결과로부터 정제된 FHW-Ia, Ib와 FHW-IIa, IIb의 균질성(homogeneity)을 확인하

였다(Fig. 3). 정제된 다당류의 분자량은 Fig. 4와 같이 분자량 표준 곡선에 의하여 계산하였다. 구성당 성분을 GC로 분석한 결과(Fig. 5), FHW를 비롯한 모든 다당류들은 glucose, fucose, galactose 및 mannose로 구성되어 있었고, xylose, arabinose, 및 rhamnose의 양은 극히 소량이었다. 그러나 정제된 다당류 FCW-Ia, FCW-Ib, FCW-IIa, 및 FCW-IIb의 물리화학적 특성은 여러 가지 면에서 차이를 나타냈다.

**FHW-Ia** 단백질이 거의 없는 당 함량 100%인 다당류로서 분자량은 전술한 방법에 의하여 측정된 결과 19,000이었다. 구성당 분석 결과 glucose, fucose, galactose 및 mannose가 몰비 1.0 : 0.3 : 1.4 : 1.0으로 존재하였다. 따라서 이 다당류는 fuco-gluco-mannogalactan으로 결정하였다.

**FHW-Ib** 당 함량 100%로서 단백질이 측정되지 않았으며, 분자량은 FCW-Ia와 비슷한 15,000으로 측정되었다. 구성당은 glucose, fucose, galactose 및 mannose가 1.0 : 1.1 : 3.2 : 2.4의 몰비로 FCW-Ia와 유사한 gluco-fuco-mannogalactan이나 구성비는 약간의 차이를 보였다.

**FHW-IIa** 단백질을 함유한 다당류로서, 당 함량은 91%이며, 단백질 함량은 0.1%이었다. Glucose, galactose, mannose를 1.0 : 0.3 : 0.6의 몰비로 갖고 있는 galacto-mannoglucan이며, 분자량은 31,000으로 측정되었다. 단백질의 아미노산 분석 결과 18종의 아미노산이 검출되었으며, 그 중 threonine, glutamic acid, serine, alanine 및 proline의 함량이 비교적 높았다(Table 2).

**FHW-IIb** FCW-IIa와 같이 단백질을 함유한 다당류로서, 단백질의 함량은 0.2%이고 당 함량은 76% 정도이었다. 분자량 9,000인 비교적 작은 크기의 다당류로서 glucose, galactose, 및 mannose가 1.0 : 0.2 : 0.5의 몰비로 구성되어 있으며 FHW-IIa와 유사한 galacto-mannoglucan이었다. 아미노산 분석 결과 FHW-IIa와 같이 18종의 아미노산이 검출되었으며 그중 threonine, glutamic acid, serine, alanine 및 aspartic acid 등의 함량이 비교적 높았다.

**IR 분석** Fig. 6은 항암 변역 활성 다당류, FHW-Ib와 FHW-IIb의 IR spectrum으로서 다당

Table 2. Amino acid contents of FHW-IIa and FHW-IIb

Amino acid	% Amount	
	FHW-IIa	FHW-IIb
Thr	18.3	17.7
Glu	15.6	15.0
Ser	13.2	10.1
Ala	12.3	10.8
Pro	9.4	9.9
Asp	8.1	10.0
Gly	8.1	8.9
Val	4.6	4.3
Leu	2.8	3.1
Lys	2.5	3.3
His	1.4	1.6
Iso	1.2	1.4
Arg	0.8	1.3
Phe	0.7	1.0
Tyr	0.4	0.9
Met	0.2	0.2
Cys	0.2	0.2
Trp	0.1	0.5

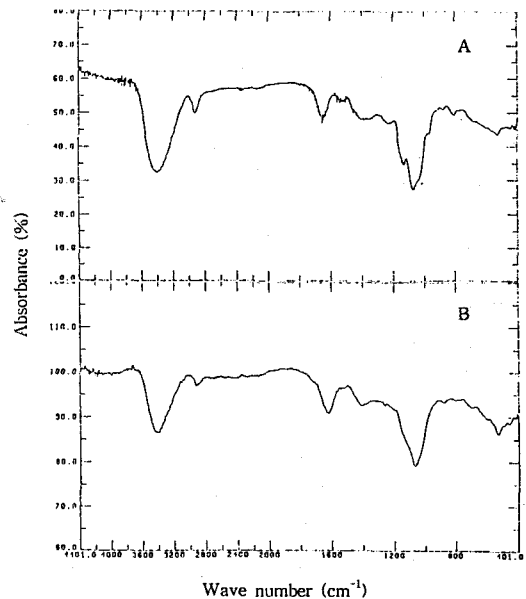


Fig. 6. IR spectra of FHW-Ib (A) and FHW-IIb (B).

류에서 전형적으로 나타나는 peak 즉 3400  $\text{cm}^{-1}$  부근에서 당의 hydroxy기로부터 유래하는 O-H stretch, 1544~1346  $\text{cm}^{-1}$  부근에서 C~H bend

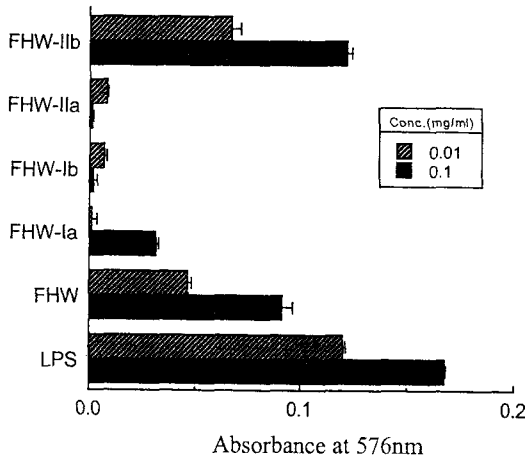


Fig. 7. Immuno-stimulating activity of hot-water extracted polysaccharides from *Fomitella fraxinea*.

및  $1049\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-O stretch를 볼 수 있었다. 그러나  $\beta$ -glycosidic linkage에 기인하는 peak ( $850\sim 890\text{ cm}^{-1}$ )는 관찰되지 않았다.

#### 항암 면역 증강 활성

*Fomitella fraxinea* 자실체로부터 열수 추출한 다당류 및 양성 대조구 LPS를 면역화된 세포에 0.01, 0.1 mg/ml의 농도로 처리하여 항암 면역 활성을 조사하였다(Fig. 7). 그 결과 열수 추출물 FHW는 증성염 추출물 FCW(Cho 등, 1995)보다 활성이 높았으나, 이온 크로마토그래피에서 완충액으로 용출된 FHW-I을 겔여과크로마토그래피하여 정제한 FHW-Ia, -Ib는 항암 면역 활성이 없었다. NaCl로 용출된 FHW-II을 겔여과크로마토그래피하여 얻은 FHW-IIa 및 IIb는 다른 활성 양상을 보였다. 분자량이 적은 FHW-IIb에는 높은 활성이 있었지만, 분자량이 큰 FHW-IIa에는 활성이 없었다. 즉 heterogalactan인 FHW-Ia와 FHW-Ib 그리고 heteroglucan인 FHW-IIa는 항암면역활성을 보이지 않았으나, heteroglucan인 FHW-IIb는 항암 활성을 나타냈다. 활성 다당류 FHW-IIb는 FHW-Ia 및 Ib와 크기가 비슷하고, FHW-IIa와는 구성당 및 구성당의 몰비가 유사하다. 그리고 FHW-IIa 및 IIb는 모두 단백질을 함유한 다당류이다. 또한 IR spectrum의 분석에 의하면 FHW-Ib 및 FHW-

IIb는  $\beta$ -type의 다당류가 아닌 것으로 추정된다. 그러므로 어떤 요인이 활성에 있어서 결정적으로 중요한지는 아직까지 분명하지 않다.

다당류의 항암면역활성에 관한 많은 연구 결과로부터, 다당류의 물리화학적 특성·구조와 활성과의 관계에 대한 많은 사실들이 보고되었다(Lee, 1994). 기존의 보고된 항암 면역활성 다당류들은 분자량이 큰 거대 물질로서, Schizophyllan은  $4.3 \times 10^6$ (Tabata 등, 1981), Lentinan은  $1 \times 10^6$ (Chihara 등, 1970), 그리고 Krestin은  $2 \times 10^6$ (Hirase 등, 1976)의 분자량을 가지고 있다. 따라서 작은 분자량의 다당류가 항암 면역 활성을 가지고 있다는 본 연구 결과는 활성의 필요조건으로서 생각되었던 거대 분자량의 요구성을 재고하게 한다. 또한 *Pleurotus citrinopileatus* 유래 항암 면역 활성 열수추출 다당류도 분자량이 11,000인 적은 물질이었다(Zhang 등, 1994). 이와 관련하여 single-helix conformation을 가진 다당류가 항암 면역활성을 갖고 있다는 보고(Saito 등, 1991)는 시사하는 바가 크다. 왜냐하면 거대 분자량은 triple-helix conformation 형성에 필요하다고 생각되어져 왔기 때문이다(Yanaki 등, 1986). 활성에 중요하다고 생각되어져 온 요소들 - 분자량, conformation, branching degree, 당 결합 양식, 구성당 성분, 당이외의 성분 - 뿐만 아니라, 다당류의 항암 면역 활성 작용기작도 다당류의 구조와 활성 관계 규명에 함께 고려되어야 한다.

#### 적 요

*Fomitella fraxinea*의 자실체로부터 열수 추출법에 의하여 다당류를 추출한 뒤, 분획정제하여 다당류에 대한 물리화학적 특성 및 항암 면역 활성을 조사하였다. 정제된 다당류에서 소량의 uronic acid가 측정되었으며, 주 구성당으로서 glucose, fucose, galactose, 및 mannose가 존재하였고, 소량의 xylose, arabinose, 및 rhamnose가 검출되었다. FHW-Ib에서 단백질은 측정되지 않았으며, FHW-Ia는 분자량이 19,000인 fuco-gluco-mannogalactan으로 FHW-Ib는 분자량 15,000인 gluco-fuco-mannogalactan으로 각각 동정되었다.

FHW-IIa 및 FHW-IIb에서는 소량의 단백질이 측정되었고, 아미노산 분석 결과 threonine, glutamic acid, serine, alanine 및 aspartic acid의 양이 비교적 높게 존재하였다. FHW-IIa 및 FHW-IIb는 galacto-mannoglucan이며 분자량은 각각 31,000 및 9,000이었다. FHW-Ib와 FHW-IIb의 IR spectrum 분석 결과 이 두 다당류는  $\beta$ -type이 아님이 밝혀졌다. 항암 면역 활성화는 FHW-Ia, FHW-Ib, 및 FHW-IIa에서는 거의 없었고 FHW-IIb에서는 높았다.

### 참고문헌

- Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**: 484-489.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chihara, G., J. Hmuri, Y.Y. Maeda, Y. Arai, and F. Fukuoka. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially, lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) SING. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
- Cho, S.M., Lee, J.H., Han, S.B., Kim, H.M., Yu, S.H. and Yoo, I.D. 1995. Immunostimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*.: Characterization of polysaccharides extracted with neutral sodium chloride solution. *Kor. J. Mycol.* **23**: 285-297.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Franz, G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med.* **55**: 493-497.
- Hirase, S., Nakai, S. and Aktsu, T. 1976. Structure studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). I. Fractionation with barium Hydroxide. *Yakugaku Zasshi.* **96**: 413-418.
- Kiho, T., Shiose, Y., Nagai, K. and Ukai, S. 1992. Polysaccharides in fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 2110-2114.
- Kitamura, S, Hori, T., Kurita, K., Takeo, K., Hara, C., Itoh, W., Tabata, K., Elgsaeter, A. and Stokke, B.T. 1994. An antitumor, branched (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*. *Carbohydr. Res.* **263**: 111-121.
- Lee, J.H. 1994. Antitumor and immunostimulating activity of fungal polysaccharides. *The microorganisms and industry.* **20**: 14-21.
- Misaki, A., Kakuta, M., Sasaki, T., Tanaka, M. and Miyaji, M. 1981. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1-3)-beta-D-glucan of *Auricularia auricula-juda*, and other polysaccharides containing (1-3)-glycosidic linkages. *Carbohydr. Res.* **92**: 115-129.
- Mizuno, T. 1989. Development and utilization of bioactive substances from medicinal and edible mushroom fungi (1). *The chemical times.* **1**: 12-21.
- Mizuno, T., Ando, M., Sugie, R., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Matsuura, A. 1992. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, Ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporus confluens*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 34-41.
- Saito, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S. and Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation

- and biological response for (1→3)- $\beta$ -D-glucans in the activation of coagulation factor G from limulus ameocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydr. Res.* **217**: 181-190.
- Song, K.S., Cho, S.M., Lee, J.H., Kim, H.M., Han, S.B., Ko, K.S. and Yoo, I.D. 1995. B-lymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**: 2105-2108.
- Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S. and Misaki, A. 1981. Ultrasonic degradation of Schizophyllan, antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* FRIES. *Carbohydr. Res.* **89**: 121-135.
- Yanaki, T., Itoh, W. and Tabata, K. 1986. Correlation between the antitumor activity of Schizophyllan and its triple helix. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2415-2416.
- Zhang, J., Wang, G., Li, H., Zhang, C., Mizuno, T., Ito, H., Suzuki, C., Okamoto, H. and Li, J. 1994. Antitumor polysaccharides from a chinese mushroom, *Yuhuangmo*, the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1195-1201.
- 松田和雄. 1989. 多糖の分離・精製法. 學會出版社.