

아가리쿠스 버섯에서 생리활성물질의 추출 및 정제

†최 정 우 · 류 동 열 · 김 영 기 · 홍 익 기 · 권 명 상 · 한 진 수
서강대학교 화학공학과, ¹강원대학교 환경생물공학부, ²강원대학교 수의학과, ³삼성생명과학연구소
(접수 : 2000. 6. 8., 게재승인 : 2000. 6. 19.)

Extraction and Purification of Bioactive Materials from *Agaricus blazei* Fruiting Bodies

Jeong-Woo Choi†, Dong-Yeul Ryu, Young-Kee Kim, Eok-Gui Hong¹, Myung-Sang Kwun², and Jin-Soo Han³
Department of Chemical Engineering, Sogang University, C.P.O. Box 1142, Seoul 100-611, Korea

¹Department of Environmental & Biological Engineering, Kangwon National University, Chunchon, Kangwondo 200-701, Korea

²Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chunchon, Kangwondo 200-701, Korea

³Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea

(Received : 2000. 6. 8., Accepted : 2000. 6. 19.)

β -Glucan, a kind of polysaccharide which is particularly abundant in *Agaricus blazei*, is known as the bioactive materials, especially anticancer agents. The process development of the isolation and the purification process of water soluble β -glucans from *A. blazei* was achieved. and the process operation variables were optimized. Crude polysaccharides (CR.PS) were obtained from *A. blazei* by hot water extraction, filtration, solvent precipitation, dialysis, and freeze drying. Neutral and acidic fraction of polysaccharides were separated from crude polysaccharides by ion chromatography and then high molecular weight and low molecular weight fraction were separated from neutral fraction by gel chromatography. Quantitative and qualitative analysis of each compounds were performed with FT-IR, NMR spectroscopy. Based on these analysis, the optimal conditions of temperatures, operating time, organic solvent volume for precipitation and dialysis time were determined .

Key Words : *Agaricus blazei* Murill, β -glucan, hot water extraction, optimization

서 론

20세기 이후의 산업과 의학의 눈부신 발전은 인류의 삶을 풍요롭게 함과 동시에 급격한 고령화 사회로의 변화를 수반하고 있다. 그러나 의학의 발전에도 불구하고 최근 심장질환, 암질환과 같은 각종 질병의 발생률 및 이로 인한 사망률은 오히려 증가하는 경향을 나타내고 있어, 국내외적으로 채소, 과일, 곡류 등 천연산물을 이용한 약품 및 기능성 식품의 개발에 많은 관심을 가지고 있다.

질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물 중 가장 주목받고 있는 버섯은 분류학상 균류(Fungi)중 진균류(Eumycetes)에 속하며 대부분은 담자균류(Basidiomycetes)의 일종으로, 일반적으로

단백질, 아미노산, 효소, 비타민, 무기염류, 지방질 및 당 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양성분을 함유하고 있고, 광범위한 약리작용을 가지고 있어 전통적으로 민간약의 체제로 널리 활용되어 왔다(1). 최근에는 여러 종류의 버섯들이 항암효과가 있음이 과학적으로 검증되었는데 항암효능을 나타내는 주요 성분은 버섯 속에 함유되어 있는 다당체라고 밝혀져 있다(2). 이들은 기존의 합성 항암제와는 달리 직접 암세포에 작용하기보다는 숙주 매개성 면역활성화(host mediate immunity) 기능을 보유하고 있어, 면역계와 관계 있는 보체(complement) 및 macrophage를 활성화하여 암세포의 생물학적 반응을 변화시켜서 치료효과를 나타내므로 독성 및 부작용이 거의 없는 장점을 갖고 있다(3). 이러한 버섯들 중에 항암효과가 가장 뛰어난 것은 아가리쿠스 버섯으로 생 버섯의 자실체는 85-87%가 수분으로 되어있고 건조 성분은 단백질 40-45%, 당질 38-45%, 섬유질 6-8%, 회분 5-7%, 지방질 3-4%로 구성되어 있다(4). 아가리쿠스 버섯은 혈당, 혈압 강하효과와 콜레스테롤 저하, 항종양, 암예방, 제암효과가 있는 것으로 알려져 있다(5-7). 아가리쿠스 버섯이 함유하고 있는 다당체는 인터페론을 활성화해서 암세포를 소멸, 또는 억

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Sogang University, C.P.O. Box 1142, Seoul 100-611, Korea
Tel : 02-705-8480, Fax : 02-711-0439
E-mail : jwchoi@ccs.sogang.ac.kr

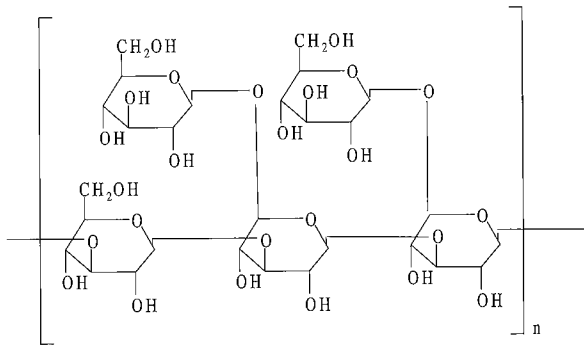


Figure 1. Structural formula of β -(1,3),(1,6)-glucan.

제하는 간접적인 효과가 높으며 특히 다른 버섯류와는 달리 고형암뿐만 아니라 복수암, S상결장암, 난소암, 유방암, 폐암, 간장암 등에도 효과가 있다고 한다. 항암효과를 나타내는 항암활성 다당체는 β -glucan으로 조사되어져 있고, 구조는 Figure 1과 같이 β -(1-6)-glucosyl의 가치를 가진 β -(1-3)-glucan임이 밝혀졌다(8).

이와 같이 아가리쿠스 버섯의 성분 분석 및 항암 효과를 갖는 다당체에 대한 광범위한 연구가 이루어졌음에도 불구하고, 자실체로부터 다당체의 효과적 분리, 정제를 위한 연구는 전무한 형편이어서 분리, 정제는 고전적인 열수추출방법에 의존하고 있다. 따라서 본 연구에서는 아가리쿠스 버섯에서 생리활성물질을 추출, 정제하는 보편적 방법인 열수추출법을 이용한 분리, 정제 공정을 제안하고, 제안된 공정의 여러 가지 운전변수를 이용하여 분리, 정제 효율을 최대화함으로써 최적화된 분리, 정제 공정을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용된 아가리쿠스 버섯 자실체는 강원대학교 환경생물공학부에서 재배하고 동결 건조한 것을 사용하였다. 실험에 사용된 기타 시약들은 ACS reagent grade의 시약을 구입하여 사용하였다.

조다당체(crude polysaccharide)의 추출, 분리

동결 건조한 아가리쿠스 버섯 50 g은 막자사발을 이용하여 3-5 mm의 균일한 크기를 갖도록 분쇄한 후 증류수에 넣어 500 mL로 만든 후 65, 80, 95°C에서 4~10시간 동안 열수추출을 수행하였다. 추출액의 분리를 위하여 여과지(Whatman No. 1 filter paper)를 이용하여 여과후 여과액을 evaporator로 50 mL까지 농축한 후 2~5배량의 에탄올(순도 95%이상)을 넣고 4°C에서 24시간동안 침전 대기하였다. 원심분리를 통하여 상등액을 제거하고 침전물을 분리하여 소량의 증류수로 침전물을 녹인 후 dialysis tube(MWCO: 12,000 Da)에 넣고 3일간 투석을 실시하였다. 투석 후 침전물을 여과하여 제거하고 동결건조하여 조다당체(CR.PS)를 최종적으로 분리하였다.

중성다당체와 산성다당체의 분리

1.5 g의 조다당체(CR.PS)를 20 mL의 deionized distilled water (DDW)에 용해시켜 원심분리하여 고형분을 DEAE cellulose resin이 충전된 ion chromatography column에 적용시켜 DDW를

전개용매로 용출하였다. 흡착되지 않는 용출액을 동결건조하여 중성다당체(ion chromatography neutral fraction; IN)를 분리하였다. Column에 흡착된 성분을 분리하기 위하여 0~2M NaCl수용액을 전개용매로 사용하여 용출하였고 용출액에 포함된 NaCl을 제거하기 위하여 용출액을 dialysis tube (MWCO: 12,000 Da)에 넣고 4일간 투석한 후 동결건조하여 산성다당체(ion chromatography acidic fraction; IA)를 분리하였다.

고분자다당체와 저분자다당체의 분리 및 분자량 결정

고분자량의 다당체(gel chromatography high molecular weight fraction; GH)와 저분자량의 다당체(gel chromatography low molecular weight fraction; GL)를 분리하고 분자량을 결정하기 위해 gel filtration법을 이용하였다. Gel filtration 충전물로는 Sepharose CL-4B (detection range of molecular weight: $10^4 \sim 10^7$)를 사용하였다. 측정은 분자량을 알고 있는 standard dextran인 D-375 (MW 3.75×10^4), D-4650 (MW 4.65×10^5), blue dextran (MW 2.00×10^6)을 각각 500 mg씩 0.01M sodium phosphate buffer solution (pH 6.4)에 용해시켜 gel filtration column에 전개하였다. 용출 유속은 2 mL/min이고, 5 mL/fraction으로 auto fraction collector를 setting하여 용출하였다. 각 fraction은 sulfuric acid로 가수분해하여 phenol을 발색시약으로 하는 phenol-sulfuric acid법으로 처리한 후, 각 fraction을 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 측정된 흡광도를 이용하여 표준 분자량 측정곡선을 작성하였다. 조다당체에서 ion chromatography column을 통해 분리된 중성다당체(IN) 500 mg을 0.01M sodium phosphate buffer solution (pH 6.4)에 용해시켜서 gel filtration column에 standard dextran과 같은 방법으로 전개하였다. 용출된 각 fraction은 phenol-sulfuric acid 법으로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 다당류의 농도를 정량화 하였다. 분리된 GH와 GL의 체류시간을 표준 dextran의 체류시간과 비교하여 GH, GL의 분자량을 계산하였다.

탄수화물과 단백질 양 측정

아가리쿠스 버섯은 건조질량기준으로 탄수화물이 38-45%, 단백질이 40-45%, 섬유질이 6-8%, 재가 5-7%, 지방이 3-4%로 이루어져 있다고 알려져 있다. 탄수화물과 단백질이 80% 이상 대부분으로 추출, 분리공정으로 얻은 물질(CR.PS, IN, IA, GH, GL)에 함유된 탄수화물과 단백질의 양을 정량 분석을 통하여 확인하였다. 탄수화물은 glucose를 표준 탄수화물로 사용하여 phenol-sulfuric acid법으로 정량적으로 분석하였고, 단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bradford 시약으로 발색 반응하는 Bradford법으로 정량 분석하였다(9).

단당류 분석의 전처리 및 분석장치

추출된 물질의 단당류 분석을 위하여 추출물질(CR.PS, IN, IA, GH, GL) 1mg을 2M TFA (Trifluoro acetic acid)에 넣고 100°C에서 2시간동안 가수분해시킨다. Evaporator를 이용하여 TFA를 제거하고, 다시 증류수로 녹인 후 evaporator를 이용하여 TFA를 완전히 제거한다. 처리된 추출물질에 1 mL의 증류수를 넣고 15,000 rpm 에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 10배 희석하여 10 μ L를 HPLC system를 이용하여 주입하여 분석하였다. HPLC system은 Bio-LC DX-300 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)에 검출기로 PED2 with integrated amperometer를 이용하여,

AI-450 on-line software로 데이터 분석을 수행하였다. 칼럼은 CarboPac PA1(4.5×250 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였다.

¹H, ¹³C-NMR과 FT-IR분석

추출물질(CR,PS, IN, IA, GH, GL)의 구조 분석을 위하여 D₂O를 용매로 사용하여 ¹H, ¹³C-NMR(Varian, Unity-inova 500) 분석을 수행하였다. 또한 작용기의 확인을 위하여 KBr disc method로 FT-IR (Magna-IR 560) 분석을 하였다. 느타리버섯에서 추출한 β-glucan을 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 FT-IR spectrum을 확인하고 추출한 물질의 FT-IR spectrum과 비교하였다.

공정 최적화

본 연구에서는 아가리쿠스 버섯 자실체에서 생리활성물질을 분리, 정제하는 방법으로 열수추출, 여과, 용매침전, 투석, 건조 등의 공정으로 조다당체(CR,PS)를 추출하였고, CR,PS를 이온크로마토그래피법으로 중성다당체(IN)와 산성다당체(IA)로 분리하였으며, 겔크로마토그래피법으로 고분자다당체(GH)와 저분자다당체(GL)로 분리하였다. 이상의 연속적 공정 중에서 분리, 정제 수율의 향상을 위하여 추출공정의 최적화를 통하여 분리수율의 향상을 도모하였다. 분리 수율 향상을 위하여 추출공정의 운전 변수인 추출온도, 추출용매량, 추출시간, 침전용매선택, 침전용매량, 투석시간 등의 최적화 실험을 수행하였다. 각 공정운전변수를 최적화하기 위하여 다른 공정변수들을 일정하게 유지한 상태에서 특정 공정변수만을 최적화하는 방법을 사용하였으며 기본 운전조건으로는 추출온도 80℃, 추출시간 6시간, 추출대상의 2배의 추출용매량, 투석시간 3일을 사용하였다.

결과 및 고찰

다당류 분자량의 측정

Figure 2는 표준 Dextran들과 중성 다당체(IN)를 겔 크로마토그래피에 적용하고, 용출되는 fraction을 페놀-황산법으로 발색 반응시켜서 490 nm에서의 흡광도를 측정한 그림이다. Blue dextran의 elution volume은 160 mL, D-4640의 elution volume은 210 mL, D-375의 elution volume은 280 mL, GH의 elution volume은 140 mL, GL의 elution volume은 310 mL로 측정되었다.

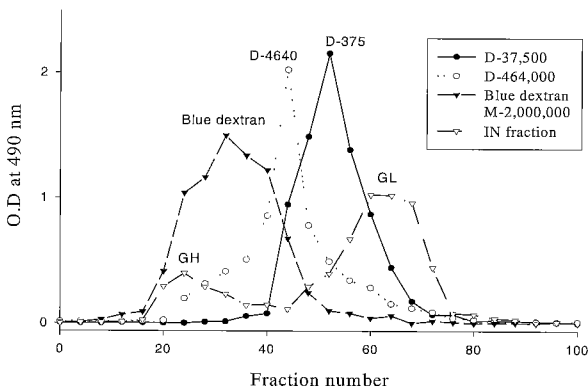


Figure 2. Elution of standard dextrans and IN fraction by Sepharose CL-4B gel filtration.

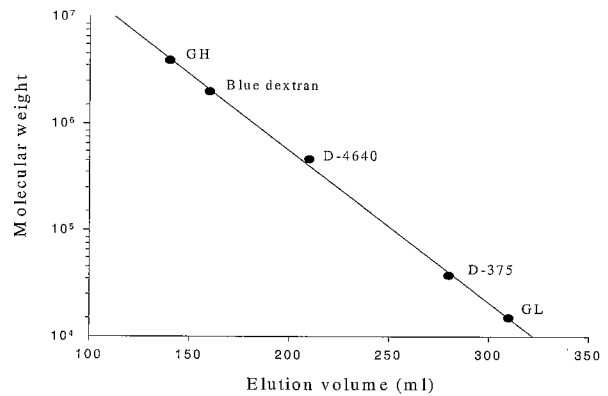


Figure 3. Determination of molecular weight of GL and GH by gel filtration.

Figure 3은 분자량을 알고 있는 표준 dextran의 elution volume을 측정하여 작성한 분자량 측정용 표준곡선이다. 이 표준곡선에 따라 IN을 column에 적용해 분리된 GH와 GL의 분자량은 각각 3.90×10⁶, 1.50×10⁶로 측정되었으며, IN 100 mg을 적용해 분리된 GH, GL의 양은 각각 24 mg, 53 mg으로 분자량이 낮은 GL이 분자량이 높은 GH에 비하여 IN에 많이 포함되어있음을 확인할 수 있다.

총 탄수화물 및 단백질의 정량화

탄수화물의 정량화는 페놀-황산법으로 glucose의 농도에 따른 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하고, 이를 기준으로 측정된 흡광도를 탄수화물의 양으로 환산하였다. Figure 4에 각 분리단계에서 추출된 물질들의 탄수화물 함량을 백분율로 표시하였다. GH가 63%로 가장 많은 탄수화물을 함유하고 있고, IA가 44%로 가장 낮은 탄수화물을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

단백질량의 정량화는 표준단백질(BSA: bovine serum albumin)의 농도에 따른 흡광도를 측정하고 이에 따른 표준단백질 농도와 흡광도에 대한 표준 곡선을 작성하였으며 이를 이용하여 각 분리단계의 추출물질들의 단백질 함유량을 측정하였다. Figure 4에서 볼 수 있듯이 단백질 함유량이 가장 많은 것은 22.96%를 함유한 IA이고, 가장 적은 것은 1.82%를 함유한 GH이다. 이것은 이온크로마토그래피 충전물인 DEAE cellulose resin이 CR,PS의 단백질을 대부분 흡착시키기 때문인 것으로 보인다.

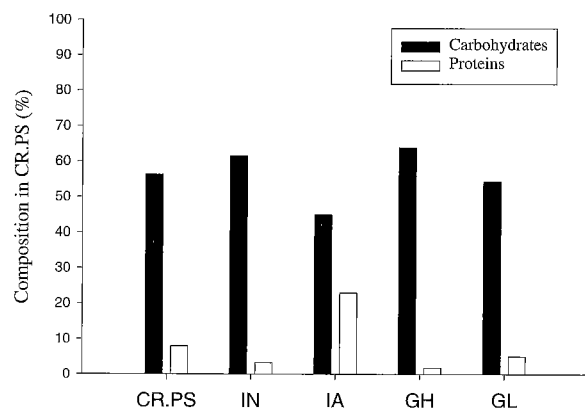


Figure 4. Comparison of total carbohydrates and proteins quantities of products.

탄수화물의 단당 성분 분석

Table 1은 각 단계 추출물질들에 함유된 탄수화물의 단당성분과 함량을 HPLC를 이용하여 측정된 값이다. Glucose는 특히 CR.PS와 IN에 많이 포함되어 있으며, galactose와 manntose는 GH에 가장 많이 함유되어 있고, fructose와 glucosamine은 각 추출물질에 조금씩 고루 함유되어 있음을 확인하였다.

^1H , ^{13}C -NMR과 FT-IR 분석

KBr disc method에 의한 β -glucan과 조다당체(CR.PS)의 FT-IR spectrum을 Figure 5의 (a)와 (b)에 각각 표시하였다. 구입한 β -glucan은 느타리버섯에서 추출한 것으로 본 실험에서 추출한 CR.PS의 FT-IR spectrum과 비교한 결과, 3300-3400 cm^{-1} 에서 당 고리의 전형적인 O-H의 stretching 흡수피크가 수소결합에 의해 이동되어 나타나고, 2900 cm^{-1} 부근에서 C-H stretching 진동이 일어나고, 1630 cm^{-1} 에서 C-O stretching 진동이 일어나며, 1000-1100 cm^{-1} 에서는 C-H와 C-O bending 진동이 일어나는 대부분의 피크가 일치함을 확인할 수 있어 분리된 CR.PS는 β -glucan임을 확인하였다.

Figure 6 (a)와 (b)는 각각 CR.PS의 ^1H , ^{13}C -NMR을 측정된 결과이다. Figure 6 (a)의 ^1H -NMR의 signal은 4.42, 4.18, 3.80, 3.60, 3.41, 3.29 ppm이고 이에 해당되는 수소는 C-1, C-6, C-5, C-4, C-3, C-2 위치에 있는 수소임을 알 수 있었다(10). 또한, Figure 6 (b)의 ^{13}C -NMR의 signal은 102.8, 86.1, 74.8, 73.2, 68.3, 60.7 ppm이고 이에 해당되는 탄소는 C-1, C-3, C-5, C-2, C-4, C-6 위치에 해당되는 탄소임을 알 수 있었다(11). 이상의 FT-IR

과 ^{13}C , ^1H -NMR 분석을 통해서 분리된 CR.PS는 전형적인 β -glucan임을 알 수 있었다.

최적 분리공정 조건의 결정

Figure 7 (a)는 동결건조된 아가리쿠스 버섯 10 g을 사용하여 열수 추출온도를 달리 했을 때 생성된 CR.PS의 수율을 나타낸 것이다. 분리수율은 사용된 자실체 건조중량에 대해 생성된 CR.PS의 양을 백분율로 표시하였다. 65°C에서 추출된 CR.PS 양에 비해 95°C에서 추출된 것은 3배 이상이었으며 최적 추출 온도는 추출 수율이 가장 높은 95°C로 결정하였다. Figure 7 (b)는 최적온도로 결정된 95°C에서 열수추출 시간을 달리하였을 때 생성된 CR.PS의 수율을 나타낸 것으로, 추출 시간이 길어질수록 CR.PS의 생성량이 증가하나, 10시간 이후에는 거의 일정한 값을 보이므로 최적 추출시간을 10시간으로 결정하였다. Figure 7 (c)는 최적 침전용매량을 결정하기 위하여 침전용매인 ethanol의 양을 열수추출 액량의 2배, 3배, 4배, 5배로 변화시켰을 때의 CR.PS의 수율을 비교한 것이다. Ethanol의 양이 증가함에 따라 CR.PS의 수율이 증가하지만, 4배 이상의 양에서는 더 이상 수율의 증가가 이루어지지 않아 최적침전 용매량을 추출액의 4배에 해당하는 ethanol량으로 결정하였다. 알려진 생리활성물질들은 분자량이 2만 이상이므로 저분자의 불순물들을 제거하기 위한 투석공정이 필요하다. 최적 투석시간은 생성물에서 저분자 불순물들이 검출되지 않는 최소의 시간으로 결정하였으며, Figure 7 (d)에 투석시간 변화에 따른 CR.PS의 수율을 비교하였다. 7일 동안 투석한 이후에는 저분자 불순물의 투석이 완료되어 CR.PS

Table 1. Comparison of monosaccharides concentrations in each products (nmol)

Product	Fructose	Glucosamine	Galactose	Glucose	Mannose
CR.PS	0.4	0.2	2.3	18.8	0.7
IN	0.6	0.2	4.2	16.8	1.8
IA	0.2	0.2	1.7	5.0	0.4
GH	1.4	0.4	8.1	5.9	3.2
GL	0.4	0.3	2.1	1.2	-

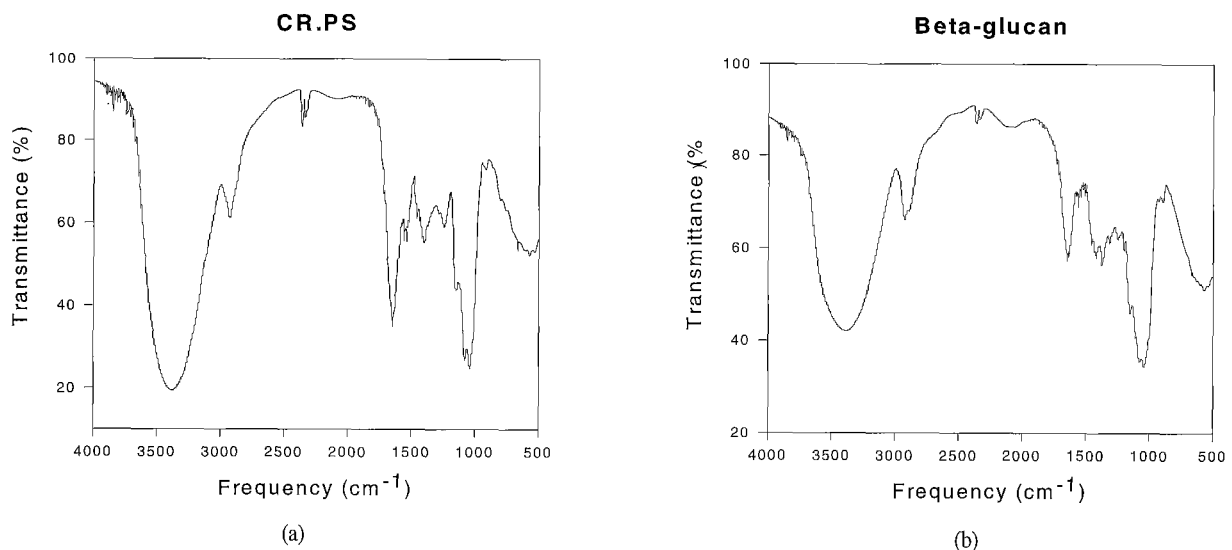


Figure 5. FT-IR spectrum comparison of β -glucan and extracted CR.PS.

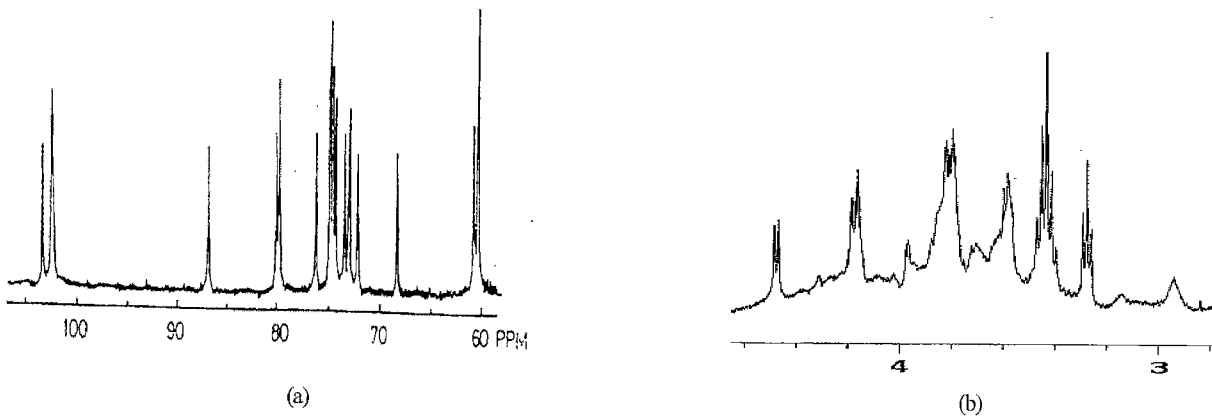


Figure 6. NMR spectrum of CR.PS in D₂O (a) ¹H-NMR (b) ¹³C-NMR.

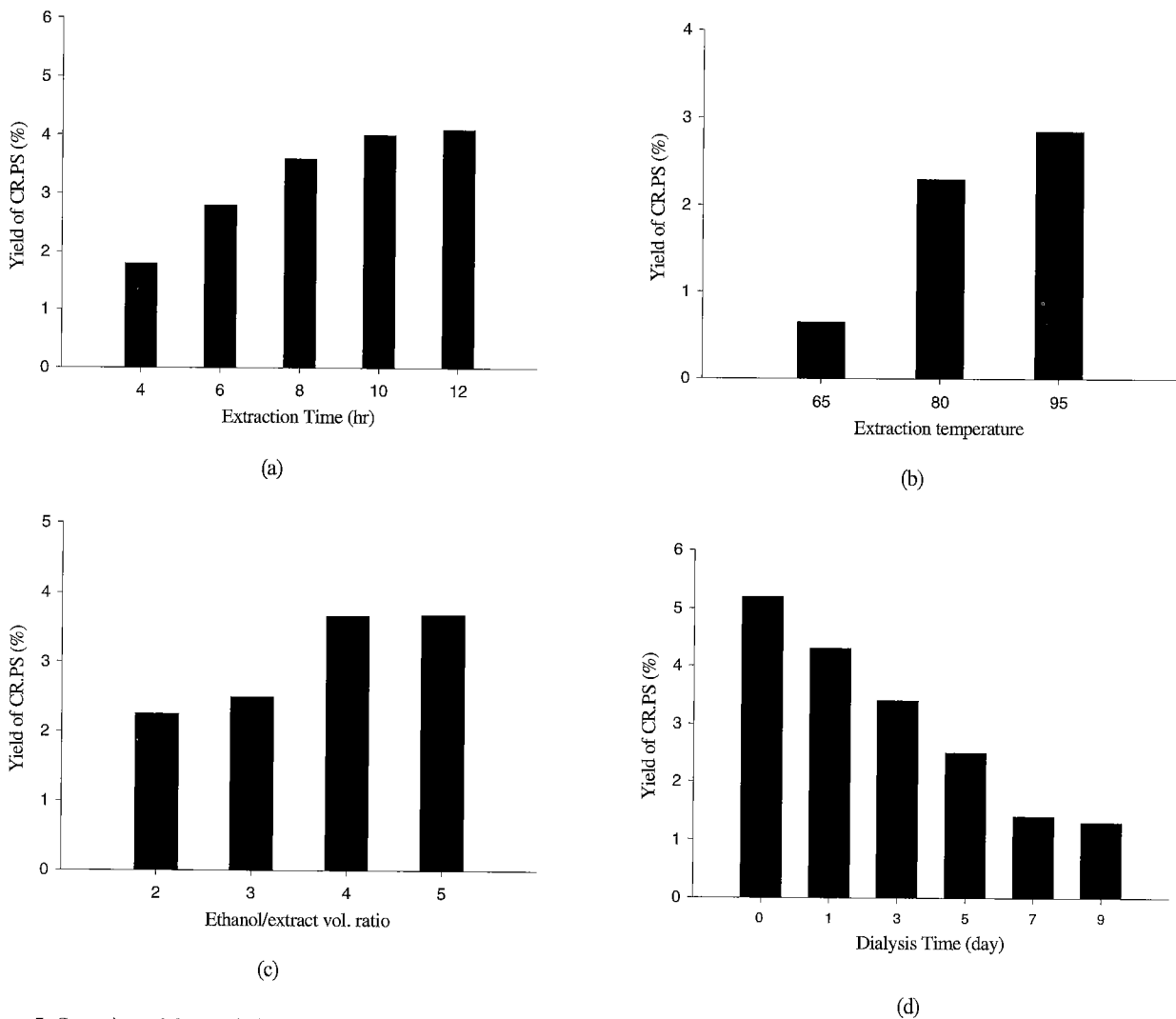


Figure 7. Comparison of CR.PS yields according to various operation parameter (a) extraction temperature, (b) extraction time, (c) ethanol/extract volume ratio for precipitation, (d) dialysis time.

의 양의 변화가 거의 없으므로 고분자량 다당체를 얻기위한 최적 투석시간을 7일로 결정하였다. 투석을 하지 않은 CR.PS와 7일간 투석한 것을 비교해보면 70%이상 감소함을 알 수 있었다. 이는 투석되는 분자량이 12,000 이하인 불순물이 침전액 전체의 70% 이상에 해당함을 알 수 있게 하였다.

갓, 대 분리 실험

Figure 8은 아가리쿠스 버섯에서 갓과 대의 조다당류 함유량을 비교하기 위한 실험의 결과이다. CR.PS가 버섯의 갓에서보다 대에서 2배 이상 추출됨을 나타내어, 아가리쿠스 버섯의 생리활성물질은 주로 대에 존재함을 확인할 수 있었다.

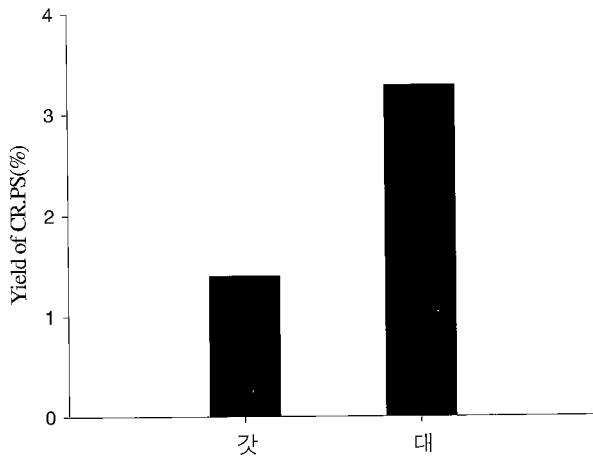


Figure 8. Comparison of CR.PS yields of mustard and stalk

요 약

다당류의 일종인 β -glucan은 아가리쿠스 버섯에 가장 풍부하고 암의 치료와 예방에 매우 중요한 생리활성물질이다. 본 연구에서는 아가리쿠스 버섯에서 β -glucan을 추출, 정제하는 공정을 개발하고 공정운전조건을 최적화하기 위한 실험을 수행하였다.

아가리쿠스 버섯으로부터 열수추출, 여과법, 용매 침전법, 투석법, 동결건조를 통하여 조다당체(CR.PS)를 분리하였고, 조다당체(CR.PS)로부터 이온크로마토그래피법을 이용하여 산성다당체(IA)와 중성다당체(IN)로 분리하였으며, 중성다당체(IN)는 다시 겔크로마토그래피법을 이용하여 고분자 다당체(GH)와 저분자 다당체(GL)로 분리하였다. 각 추출물질들은 FT-IR, NMR spectroscopy를 이용하여 정성, 정량분석을 수행하였다. 각성분의 정성 및 정량 분석을 이용하여 추출온도와 추출시간, 추출용매량, 투석시간 등 공정변수들의 최적 조건을 결정하였다.

감사의 글

본 연구는 농림부의 농림기술개발사업(과제번호 :297075-3)의 지원으로 수행되었으며 연구비 지원에 대하여 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Chang, S. T. and P. G. Miles (1989), Edible Mushroom and Their Cultivation, p27, CRC press, New York.
2. Kim, B. K., J. E. Robbers, K. S. Chung, H. S. Chung, and E. C. Choi (1982), Antitumor Components of *Cryptoporus volvatus*, *Kor. J. Mycol.* **10(3)**, 111-117.
3. Sugihara, T., Y. Yoshioka, and K. Nishioka (1972) Anticomplementary Activity of Antitumor Polysaccharides, *Nature New Biol.* **238**, 59-60.
4. Mizuno, T. (1990), Antitumor Activity and Some Properties of Water Soluble Polysaccharides from the Fruiting Body of *Agaricus blazei Murill*, *Agric. Biol. Chem.* **54(11)**, 2889-2896.
5. Itoh, H., H. Amano, and H. Noda (1994), Inhibitory Action of a (1→6)- β -D-glucan-Protein Complex Isolated from *Agaricus blazei Murill* on Meth a Fibrosarcoma-Bearing Mice and its Antitumor Mechanism, *Jpn. J. Pharmacol.* **66**, 265-271.
6. Mizuno, T., R. Inagaki, T. Kanao, and T. Hagiwara (1990), Antitumor Activity and Some Properties of Water-insoluble Hetero-glycans from "Himematsutake" the Fruiting Body of *Agaricus blazei Murill*, *Agric. Biol. Chem.* **54(11)**, 2897-2905.
7. Kawagishi, H., R. Inagaki, and T. Kanao (1989), Fraction and Antitumor Activity of the Water Insoluble Residue of *Agaricus blazei* Fruiting Bodies. *Carbohydrate Research* **186**, 267-273.
8. Mizuno, T., M. Kato, and M. Shimizu (1984), Fractionation, Structural Features and Antitumor Activity of Water-soluble Polysaccharide from 'Reishi', the Fruit Body of *Ganoderma lucidum*, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **58(9)**, 873-879.
9. Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
10. Dais, P., and A. S. Perlin (1982), High-field, ¹³C-N.M.R. Spectroscopy of -D-Glucans, Amylopectin, and Glycogen, *Carbohydrate Research* **100**, 103-116.
11. Harry E. E. and T. Brain (1994), NMR Spectral Analysis of a Water-insoluble (1→3)-D-Glucan Isolated from *Saccharomyces cerevisiae*, *Carbohydrate Research* **258**, 307-311.