

## 추출 및 침전조건에 따른 아가리쿠스버섯에서 분리한 조단백다당류의 특성 및 암세포 증식억제 효과

홍주현 · 윤광섭<sup>1</sup> · 최용희\*

경북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>대구가톨릭대학교 식품산업학부

### Characteristics of Crude Protein-bound Polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by Extraction and Precipitation Conditions and Its Antitumor Effect

Joo-Heon Hong, Kwang-Sup Youn<sup>1</sup>, and Yong-Hee Choi\*

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

<sup>1</sup>Faculty of Food Science and Industrial Technology, Catholic University of Daegu

Efficient extraction method of crude protein-bound polysaccharide (CPBP) from *Agaricus blazei* Murill was established. CPBP yields by ultrasonic and hot water extractions were 13.0 and 7.8%, respectively. Pressure extraction for 3 hr gave the highest  $\beta$ -glucan content; no significant difference was observed between 2 and 3 hr extraction. Four volumes added ethanol gave the highest yields of CPBP and  $\beta$ -glucan contents at 10.89 and 35.97%, respectively. Decomposition temperature of CPBP was 240-365°C, showing relatively good thermal stability. In SRB (sulforhodamine B) assay, CPBP treatment at 1,000  $\mu$ g/mL for 72 hr inhibited proliferations to A549, MCF-7, and AGS cancer cells by 43.9, 21.4, and 32.5%, respectively.

**Key words:** *Agaricus blazei* Murill, CPBP,  $\beta$ -glucan, antitumor

## 서 론

최근에 여러 종류의 버섯들이 항암효과가 있음이 알려졌는데 버섯이 항암효능을 나타내는 주된 원인은 버섯 속에 함유되어 있는 단백다당체(protein-bound polysaccharide) 때문이라는 것이 밝혀지고 있다(1,2). 현재 버섯유래의 항암효과를 갖는 다당류는 표고버섯(*Lentinus edodes*)으로부터 lentinan, 치마버섯(*Schizophyllum commune*)으로부터 schizophyllan, 구름버섯(*Coriolus versicolor*)으로부터 krestin 등이 있으며 이들은 일본과 동남아 등지에서 면역증강성 항암제로 시판되고 있다(3-5). 이러한 버섯들 중에 항암효과가 가장 뛰어난 것으로 알려져 있는 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 흰들버섯, 신령버섯이라고도 하며 주름버섯목, 주름버섯과, 주름버섯속에 속하는 버섯으로 길모양은 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)과 유사하지만, 버섯 대가 두껍고 길며 향기가 강력한 것이 특징이다. 아가리쿠스버섯은 혈당, 혈압 강하효과와 콜레스테롤 저하, 항종양, 암예방 및 제암효과가 있으며, 함유되어 있는 단백다당체는 인

터페론을 활성화해서 암세포를 소멸 또는 억제하는 간접적인 효과가 있다고 알려져 있다(6,7). 아가리쿠스버섯에서 중요한 생리활성을 나타내는 물질은  $\beta$ -glucan이며, 구조는  $\beta$ -(1-6)-glucosyl의 분지를 가진  $\beta$ -(1-3)-glucan임이 밝혀졌다.  $\beta$ -glucan은 면역활성제의 기능, 항산화능, 생체조직 재생과 치유기능, 항생제, 항균, 항바이러스 및 대식세포를 자극하여 돌연변이 세포를 인식하고 공격하는 항종양 효과가 있다고 보고되고 있다(8-10). 아가리쿠스버섯에 함유되어 있는 단백다당체는 추출 후 에탄올 침전을 통해 침전불인 조단백다당류(crude protein-bound polysaccharide)를 정제하여 얻을 수 있으며,  $\beta$ -glucan, 단백질, 다당류등이 복잡하게 결합되어 있다(11). 조단백다당류는 추출액에서 분리된 crude한 물질이지만, 위암, 간암 및 폐암세포주의 항암효과 연구에서 뛰어난 저해효과를 보였으며, 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서도 활성이 뛰어난 물질임이 확인되었다(12). 항암효과를 갖고 있는 단백다당체는 담자균류의 수용성 추출액을 정제함으로써 제조될 수 있는 것으로 알려져 있으나(13) 대부분 열수추출방법을 이용하는 관계로 유용성분을 추출하는데 한계가 있으며(12,14), 산업화를 위해 필수적인 문제인 유용성분을 효율적으로 추출할 수 있는 추출공정에 관한 연구는 미비한 실정이다. 또한, 가공공정시 중요한 인자인 열안정성에 관한 연구로는 differential scanning calorimetry(DSC)와 thermal gravimetric analyzer(TGA)를 이용한 전분류의 연구가 대부분으로(15,16) 전분 이외의 다른 다당류에 관한 연구는

\*Corresponding author: Yong-Hee Choi, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Sankyuk-Dong, Taegu 702-701, Korea  
Tel: 82-53-950-5777  
Fax: 82-53-950-6772  
E-mail: yhechoi@knu.ac.kr

미흡한 실정이다.

아가리쿠스버섯을 비롯한 항암성 물질을 검색하는 방법으로 암세포 억제능력을 측정하는 *in vitro* 검색방법인 sulforhodamine B(SRB) assay가 있다. SRB assay의 장점으로 단기간에 1,000 개 이상의 항암제를 가지고 60종류의 인체 암세포에 대한 효과를 알아보는데 사용될 수 있으므로 기존의 MTT assay와 XTT assay에 비해 더 쉽고 더 빠르다(17,18).

본 연구에서는 다양한 생리활성물질을 함유하고 있는 아가리쿠스버섯 조단백다당류를 효율적으로 추출하기 위하여 추출 및 에탄올 침전조건에 따른 화학적 특성을 비교 평가하였으며, 추출된 조단백다당류의 열분해특성 및 SRB assay에 의한 인체 암세포 증식 억제 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험에 사용된 아가리쿠스 건버섯은 경상북도 경산시 소재 성림농장에서 구입하여 분쇄 후  $-18^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 조단백다당류의 추출공정

아가리쿠스버섯 분말로부터 조단백다당류(crude protein-bound polysaccharide, CPBP)의 추출공정은 Fig. 1과 같다. 시료와 추출 용매비를 1:20으로 조절하여 가압, 초음파 및 열수추출을 행하였다. 가압추출 조건은 150 KPa에서 30분, 1, 2, 3시간으로 하였으며, 초음파추출은 ultrasonic processor(VCX 400, Sonic & Materials inc., CT, USA)를 이용하여  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 20 kHz, 400 watts로 3시간 및 열수추출은  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간을 각각 추출하였다. 추출 후 원심분리하여 상층액을 얻고 1/3로 농축한 다음 4배의 에탄올을 가해 조단백다당류를 침전시킨 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 방치하였다. 원심분리하여 침전된 조단백다당류를 분리하고 소량의 증류수로 침전물을 용해 후 dialysis tube (MWCO: 12,000 Da, D-0655, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 넣고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 3일간 투석하고 동결건조하여 분석용 시료로 사용하였다. 또한 조단백다당류의 침전조건에 따른 특성을 평가하기 위하여 추출 농축액에 침전 용매인 에탄올을 1, 2, 3, 4, 5배량을 가해 조단백다당류를 침전, 분리, 투석 후 동결건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

### 당 함량

당 함량 분석은 Saha 등(19)의 방법에 따라 phenol-sulfuric acid법으로 실시하였다. 즉, 5% phenol(w/v) 0.2 mL와 sulfuric acid 1 mL를 시료 0.2 mL와 반응시킨 후 glucose를 표준당으로 하여 UV-visible spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 단백질 함량

시료의 단백질 함량은 Lowry-Folin방법(20)으로 분석하였다. 즉, 시료 0.5 mg에 Lowry-Folin 반응을 실시한 후 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co.)을 표준단백질로 하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 당 조성

시료 10 mg을 5 mL의 2 M trifluoroacetic acid(TFA)에 녹여  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 가수분해한 다음 sodiumborohydride

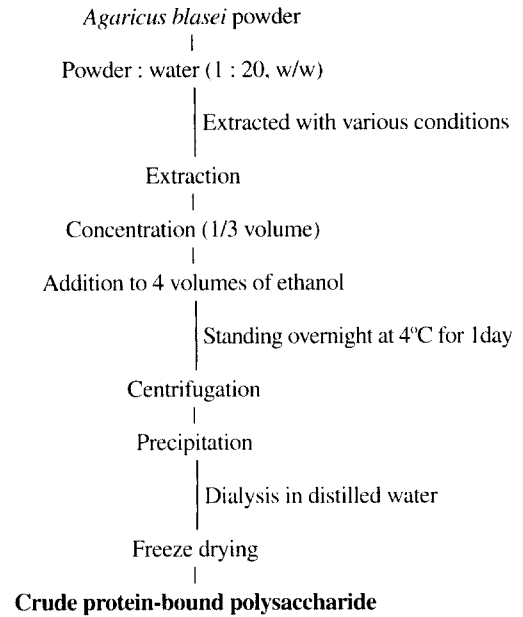


Fig. 1. Process for extraction of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill.

( $\text{NaBH}_4$ )로 환원시키고 acetic anhydride로 acetylation하여 sugar alditol acetate를 얻었다. 생성된 sugar alditol acetate를 chloroform으로 추출하여 GC(HP6890, Hewlett Packard Co., Cambridge, MA, USA)분석을 행하였다. GC분석은 fused silica capillary SP-2330(0.32 mm $\times$ 30 m, Supelco Co.) column을 사용하였고 carrier gas는 He, detector는 flame ionization detector였으며 column 온도는 초기에  $200^{\circ}\text{C}$ 로 2분간 유지시키고  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로  $250^{\circ}\text{C}$ 까지 서서히 증가시켜 4분간 유지하면서 분석하였다. 이때 injector와 detector의 온도는  $250^{\circ}\text{C}$ 와  $260^{\circ}\text{C}$ 이었다.

### 아미노산 조성

아미노산 분석은 시료 0.5 g에 6 N HCl 10 mL를 가하고 질소가스를 5분간 충전 후 밀봉하여  $110^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 가수분해시킨 다음 냉각하고 HCl은 감압 농축하여 제거하였으며 증류수로 남은 HCl을 세척한 후 건조시켰다. 건조시킨 시료를 구연산 완충액(pH 2.2)으로 용해하여 5 mL로 정용하고 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과한 후 아미노산 분석기(Pharmacia Biotech, Biotech. Co., Zurich, Switzerland)로 분석하였다. 분석컬럼은 amino acid analysis column Na form( $\Phi 4.6 \times 250$  mm)을 사용하였으며 이동상은 buffer A(0.2 M sodium citrate, pH 3.20), buffer B(0.2 M sodium citrate pH 4.25), buffer C(1.2 M sodium citrate pH 4.25), buffer D(0.4 M sodium hydroxide)를 동량으로 혼합한 용액으로 하였으며, 유속은 0.4 mL/min, 발색시약은 닌하이드린, 분석시간은 42분으로 하였다.

### $\beta$ -Glucan 함량

$\beta$ -Glucan 함량은 McCleary와 Glennie-Holmes의 효소적 방법(21)에 따라 Megazyme  $\beta$ -glucan kit(Megazyme Pty. Ltd., Australia)를 사용하여 측정하였다. 즉, 시료 0.2 g에 ethanol(50%, v/v)을 가한 후 lichenase(1000 U/mL, Megazyme Ltd.)와  $\beta$ -glucosidase(40 U/mL, Megazyme Ltd.)을 가하여 가수분해를 하고 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Table 1. Chemical properties of crude protein-bound polysaccharide (CPBP) from *Agaricus blazei* Murill by various extraction conditions**

Extraction conditions		CPBP yield (%)	Sugar content (%)	Protein content (%)
Pressure <sup>1)</sup>	30 min	9.43 ± 0.17 <sup>42)</sup>	60.38 ± 1.52 <sup>c</sup>	10.79 ± 0.52 <sup>cd</sup>
	1 hr	9.86 ± 0.21 <sup>4c</sup>	65.33 ± 1.65 <sup>b</sup>	11.59 ± 0.32 <sup>bc</sup>
	2 hr	10.01 ± 0.11 <sup>c</sup>	72.04 ± 1.89 <sup>a</sup>	11.87 ± 0.11 <sup>b</sup>
	3 hr	10.58 ± 0.24 <sup>b</sup>	73.44 ± 1.04 <sup>a</sup>	10.27 ± 0.28 <sup>d</sup>
Hot water	100°C, 3 hr	7.80 ± 0.16 <sup>c</sup>	58.70 ± 1.23 <sup>c</sup>	8.83 ± 0.39 <sup>c</sup>
Ultrasonic	25°C, 3 hr	13.0 ± 0.53 <sup>a</sup>	58.79 ± 1.51 <sup>c</sup>	21.91 ± 0.95 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Extraction at 150 KPa.

<sup>2)</sup>The same superscripts in the same column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test. The values are mean ± S.D. of 3 replications.

### Uronic acid 함량

Uronic acid 함량은 D-glucuronic acid를 표준품으로 사용하여 meta-hydroxydiphenyl 방법(22)을 사용하여 측정하였다. 즉, 시료 3 mg을 포함하는 용액 0.2 mL가 들어 있는 tube에 0.0125 M sodium tetraborate/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.2 mL를 가한 후 냉장 보관하고 vortex mixer로 섞는다. Tube를 100°C의 water bath에서 5분간 가열 후 냉각시킨 다음 20 µL meta-hydroxydiphenyl reagent를 가하고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 열특성

조단백다당류의 열분해 온도를 분석하기 위하여 TGA(TG/DTA320 & SSC5200H Disk Station, Seiko Inc., Tokyo, Japan)로 온도에 따른 무게감량을 측정하였다. 이때 가열속도는 10°C/min. 온도는 25-650°C까지로 질소기류(50 mL/min) 하에서 분석하였다.

### 암세포주 배양

인체 폐암 세포주 A549(human non small cell lung), 유방암 세포주 MCF-7(human breast adenocarcinoma cell) 및 위암세포주인 AGS(human gastric adenocarcinoma cell)는 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. A549, MCF-7 및 AGS는 10% FBS(fetal bovine serum), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin이 함유된 RPMI 1640(Gibco, Grand Island, NY, USA)배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### SRB(Sulforhodamine B) assay

암세포(A549, MCF-7, AGS)를 5 × 10<sup>4</sup> cells/mL 농도로 조절 한 후에 96-well plates에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면, 아가리쿠스버섯 조단백다당류가 각각 10, 50, 250, 1,000 µg/mL의 농도로 조절 된 시료를 100 µL 가한 다음 24시간 및 72시간 배양하였다. 이때 blank에는 시료와 10% FBS를 함유한 배지만 넣고 대조군에는 세포와 시료 대신에 DMSO를 첨가하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 차가운 TCA(trichloroacetic acid, final concentration 10%) 100 µL를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하고 건조하였다. 각각의 well에 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB용액을 100 µL씩 첨가하고 실온에서 1시간 동안 염색한 다음 1% acetic acid로 4-5회 세척하여 건조시켰다. Well에 10 mM Tris buffer 100 µL로 염색을 충분히 녹인 다음 ELISA(enzyme linked immunosor-

bent assay) reader(ELISA Processor II, Behring Co., Marburg, Germany)로 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

### 통계처리

실험 결과는 평균 ± 표준편차(Mean ± S.D.)로 나타내었으며, 통계처리는 SAS(statistical analysis system) package를 이용하여 Duncan's multiple range test 및 student's t-test로 조사하였다(23).

## 결과 및 고찰

### 추출조건에 따른 조단백다당류의 화학적 특성

**조단백다당류의 추출수율, 당 함량 및 단백질 함량:** 일반적으로 담자균류의 단백질다당류 추출은 주로 증성염, 열수 및 알카리 용매를 이용하는 화학적 추출방법이 많이 이용되고 있으나 유용성분 추출 시 장시간을 요구하여 산업화에 어려움이 있다. 추출조건에 따른 조단백다당류의 추출수율, 당 및 단백질 함량을 Table 1에 나타내었다. 일반적으로 많이 이용되고 있는 열수추출과 물리적 추출방법인 가압 및 초음파를 이용하여 추출한 결과 조단백다당류 함량은 초음파 추출공정에서 13.0%로 가장 많이 추출되었고 열수추출에서 7.80%로 가장 적게 추출되었다. 가압추출을 한 경우 추출시간이 증가함에 따라 조단백다당류 함량이 증가되었으며 3시간 추출에서 10.58%로 가장 많이 추출되었다. 최(24)는 아가리쿠스버섯에 함유되어 있는 고분자 물질의 경우 추출온도가 높아질수록 단백질다당류의 함량이 증가한다고 보고하였다. 당 함량은 열수추출이 58.7%로 가장 적었으며 가압추출 3시간에서 73.44%로 가장 많이 함유되었고 추출시간이 증가함에 따라 당 함량도 증가하였다. 단백질 함량은 열수추출시 8.83%로 가장 적게 함유되어 있었으며, 가압추출을 한 경우 2시간에서 11.87%로 다른 추출시간보다 단백질 함량이 많았고, 초음파 추출에서 21.91%로 가장 많이 함유되어 다른 추출방법과는 상이하였다. 초음파에너지는 충격력을 갖고 있으므로 식물체의 조직 및 미생물의 세포벽과괴에 이용되며 호프, 보리 등의 단백질 추출, 옥수수껍질로부터 다당류 추출의 효율성을 증가시킨다고 보고되고 있다(25).

**당 조성 및 아미노산 조성:** 조단백다당류의 당 및 아미노산 조성은 Table 2, 3에 나타내었다. 추출조건에 따른 조단백다당류의 당조성은 glucose(77.40-83.80%), galactose(9.17-16.47%), fucose(2.95-5.09%) 및 mannose(2.52-4.82%)이었으며, glucose가 대략 80%로 주요 구성분임을 알 수 있었다. 가압추출 30분에서는 mannose가 미량 검출되었고 상대적으로 galactose가

**Table 2. Monosaccharide composition of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by various extraction conditions**

Extraction methods	Monosaccharide composition (%)				
	Fucose	Galactose	Glucose	Mannose	
Pressure <sup>1)</sup>	30 min	2.95 ± 0.05 <sup>2)</sup>	16.47 ± 0.14 <sup>a</sup>	81.44 ± 1.38 <sup>ab</sup>	trace
	1 hr	4.50 ± 0.06 <sup>d</sup>	10.68 ± 0.07 <sup>d</sup>	81.54 ± 1.33 <sup>ab</sup>	3.28 ± 0.06 <sup>b</sup>
	2 hr	4.73 ± 0.03 <sup>c</sup>	9.93 ± 0.05 <sup>c</sup>	82.56 ± 1.49 <sup>ab</sup>	2.78 ± 0.03 <sup>d</sup>
	3 hr	4.16 ± 0.08 <sup>c</sup>	9.17 ± 0.05 <sup>f</sup>	83.80 ± 2.14 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.03 <sup>c</sup>
Hot water	100°C, 3 hr	4.98 ± 0.08 <sup>b</sup>	11.60 ± 0.13 <sup>c</sup>	80.90 ± 0.87 <sup>b</sup>	2.52 ± 0.05 <sup>c</sup>
Ultrasonic	25°C, 3 hr	5.09 ± 0.05 <sup>a</sup>	12.68 ± 0.16 <sup>b</sup>	77.40 ± 1.12 <sup>c</sup>	4.82 ± 0.06 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Extraction at 150 KPa.<sup>2)</sup>The same superscripts in the same column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test. The values are mean ± S.D. of 3 replications.**Table 3. The content of total amino acids of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by various extraction conditions (unit: mg/g)**

Amino acid	Extraction conditions					
	Pressure <sup>1)</sup>				Hot water	Ultrasonic
	30 min	1 hr	2 hr	3 hr	100°C, 3 hr	25°C, 3 hr
Aspartic acid	11.54	12.44	12.28	10.17	7.56	30.43
Threonine	4.64	5.18	5.41	5.35	3.73	14.15
Serine	3.76	3.99	4.36	5.02	4.25	15.32
Glutamic acid	16.03	16.28	15.80	13.56	10.96	41.37
Proline	7.34	5.89	8.14	2.61	2.19	6.37
Glycine	7.34	7.39	6.66	4.89	4.94	15.16
Alanine	6.20	6.58	6.65	6.05	3.82	17.64
Valine	5.52	2.77	4.59	3.39	2.13	13.42
Methionine	1.16	1.20	1.26	1.10	0.83	4.13
Isoleucine	3.78	4.50	4.73	3.86	2.11	13.27
Leucine	5.52	6.37	6.57	5.65	3.08	21.04
Tyrosine	1.14	1.38	1.44	1.68	1.09	6.41
Phenylalanine	3.36	3.89	4.16	3.87	2.29	13.45
Histidine	2.68	2.95	3.14	2.94	1.70	7.77
Lysine	7.28	7.66	7.43	6.06	4.51	18.81
Arginine	4.66	5.17	5.01	4.21	3.17	16.52
Total	91.92	93.65	97.64	80.42	58.36	255.26

<sup>1)</sup>Extraction at 150 KPa.

16.47%로 많이 함유되어 있었다. Mizuno(1)는 아가리쿠스버섯에서 추출 분리한 다당류는 glucose, galactose, mannose 및 xylose로 구성된 heteroglucan이라고 하였으며, Lee 등(26)은 상항버섯에서 추출 및 분리한 다당류의 당 조성은 glucose(40.8%), galactose(14.4%), mannose (17.8%), xylose(6.8%) 및 arabinose (16.2%)로 구성되어 있다고 보고하였고, Jong과 Birmingham(27)은 표고버섯에서 분리한 다당류인 lentinan은 glucose, galactose, mannose 및 xylose로 구성되어 있다고 하여 버섯종류에 따라 다양함을 알 수 있었다. 추출조건에 따른 아미노산 함량을 분석한 결과 모든 처리구에서 glutamic acid, aspartic acid가 각각 10.96-41.37 mg/g, 7.56-30.43 mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었다. 열수추출의 경우 총 아미노산 함량이 58.36 mg/g으로 가장 적었으며, 초음파추출이 255.26 mg/g으로 가장 많이 함유되어 있어 단백질 함량에 대한 분석결과와 일치하였다. 가압추출의 경우 추출시간이 증가함에 따라 아미노산 함량이 증가되었으나 3시간 추출에서는 총 아미노산 함량이 80.42 mg/g으로 가장 적게 함유되어 추출시간 및 조건에 따라 상이함을 알 수 있었다.

Tryptophan을 제외한 필수아미노산의 함량은 열수추출이 32%로 가장 적었고 초음파추출이 38.5%로 가장 많이 함유되어 있었다. Kim 등(28)은 상항버섯에서 분리 정제된 다당류의 아미노산 조성은 acidic side chain을 가지는 aspartic acid와 glutamic acid가 가장 많이 함유되어 있다고 보고 하였는데, 본 연구결과와 유사하였다.

**β-Glucan 및 uronic acid 함량:** 추출조건에 따른 β-glucan 및 uronic acid 함량은 Table 4와 같다. β-glucan은 버섯류의 세포벽을 구성하면서 단백질 혹은 기타 세포벽 성분과 결합한 형태로 존재하기 때문에, 모든 β-glucan을 추출하기는 매우 어려우며 추출, 정제된 β-glucan 내에 기타 성분들이 일부 혼입된다고 보고되고 있다(29). 아가리쿠스버섯에 함유되어 있는 단백질다당류는 β-glucan, β-glucan-protein complex, hetero-β-glucan 및 uronic acid를 포함하는 acidic β-glucan등으로 다양하게 구성되어 있다(1,2). 버섯의 주요 생리활성물질로 알려져 있는 β-glucan 함량은 가압추출 3시간에서 32.34%로 가장 많이 함유되어 있었으며, 일

**Table 4.  $\beta$ -Glucan and uronic acid content of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by various extraction conditions**

Extraction methods		$\beta$ -Glucan (%)	Uronic acid ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
Pressure <sup>1)</sup>	30 min	25.77 $\pm$ 1.23 <sup>c2)</sup>	26.79 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup>
	1 hr	29.74 $\pm$ 1.17 <sup>b</sup>	34.3 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>
	2 hr	32.28 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	35.43 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>
	3 hr	32.34 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	35.9 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>
Hot water	100°C, 3 hr	24.32 $\pm$ 1.28 <sup>c</sup>	28.6 $\pm$ 1.44 <sup>b</sup>
Ultrasonic	25°C, 3 hr	19.03 $\pm$ 1.49 <sup>d</sup>	4.5 $\pm$ 0.71 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Extraction at 150 KPa.

<sup>2)</sup>The same superscripts in the same column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test. The values are mean  $\pm$  S.D. of 3 replications.

**Table 5. Chemical properties of crude protein-bound polysaccharide (CPBP) from *Agaricus blazei* Murill by added ethanol ratios**

Solvent ratios (Extract : Ethanol)	CPBP yield (%)	Sugar content (%)	Protein content (%)
1 : 1	9.74 $\pm$ 0.47 <sup>b1)</sup>	78.25 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	5.19 $\pm$ 0.46 <sup>e</sup>
1 : 2	10.12 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>	60.45 $\pm$ 2.17 <sup>c</sup>	7.03 $\pm$ 0.33 <sup>d</sup>
1 : 3	10.59 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	62.41 $\pm$ 1.29 <sup>c</sup>	10.04 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>
1 : 4	10.89 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	69.1 $\pm$ 2.29 <sup>b</sup>	11.92 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>
1 : 5	10.28 $\pm$ 0.45 <sup>ab</sup>	70.08 $\pm$ 2.35 <sup>b</sup>	13.97 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>

*Agaricus blazei* Murill by added ethanol ratios.

<sup>1)</sup>The same superscripts in the same column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test. The values are mean  $\pm$  S.D. of 3 replications.

**Table 6. Monosaccharide composition of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by added ethanol ratios**

Solvent ratios (Extract : Ethanol)	Monosaccharide composition (%)			
	Fucose	Galactose	Glucose	Mannose
1 : 1	4.70 $\pm$ 0.02 <sup>c1)</sup>	10.72 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	82.32 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>	2.26 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
1 : 2	5.05 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	10.55 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	81.34 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	3.07 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
1 : 3	5.01 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	10.39 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	80.58 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	4.02 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
1 : 4	5.18 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	9.33 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	80.61 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	4.88 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
1 : 5	5.07 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	9.25 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	80.72 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	4.96 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>The same superscripts in the same column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test. The values are mean  $\pm$  S.D. of 3 replications.

반적으로 많이 이용되고 있는 열수추출보다 25% 이상의 함량 증가를 얻을 수 있었다.  $\beta$ -glucan 함량은 초음파추출에서 19.03%로 가장 낮았는데, 이는 초음파 추출공정을 이용하여 추출 분리된 조단백다당류의 분석에서 당 함량이 상대적으로 적었으며 단백질함량이 많이 함유되어 있었기 때문이라고 사료되며,  $\beta$ -glucan의 대부분은 glucose로 구성된 다당류라고 보고되고 있다. Uronic acid 함량은 초음파 추출에서 4.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 적었고 가압추출 3시간에서 35.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 많이 함유되어 있었다. 가압조건에서 2시간과 3시간의 추출은  $\beta$ -glucan 함량에서 뚜렷한 차이가 발견되지 않아 가압추출 2시간이 생리활성물질의 추출 조건으로 효과적임을 알 수 있었다.

#### 침전조건에 따른 조단백다당류의 화학적 특성

조단백다당류의 수율, 당 함량 및 단백질함량: 선정된 추출 방법에서 얻어진 추출물에 대한 침전조건에 따른 단백질함량의 수율, 당 및 단백질 함량을 Table 5에 나타내었다. 현재 버섯 및 미생물 배양 등에서 단백질다당류를 분리하는 방법으로 열수로 추출한 다음 에탄올로 침전시키는 방법이 주로 이용되고 있으며, 얻어진 침전물이 항암효과를 가지는 단백질다당류로 일반적으로 인정하고 있다(30,31). 또한 에탄올은 아세톤보다 침

전 수율은 낮지만 용매의 독성에 대한 염려가 없는 관계로 대부분 사용하고 있으며 처리 후 침전물질은 단백질다당류가 대부분이고, 여기에 일부 단백질 등이 포함되어 있다고 알려져 있다. 추출농축액에 대해 침전 용매인 에탄올 첨가 비율이 증가함에 따라 조단백다당류 함량이 증가하였으며, 4 배의 에탄올 첨가에서 10.89%로 가장 추출수율이 높았다. Maziero와 Bononi (13)는 에탄올 첨가량이 증가할수록 식용버섯에서 추출된 다당류의 수율이 향상되었으며 5 배 첨가가 가장 우수하였고 처리 온도는 상온보다는 0°C 부근의 저온에서 수율이 높았다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향이였다. 또한 당 함량은 1 배 첨가에서 78.25%로 가장 많이 함유되어 있었으며 나머지 침전조건에서는 침전 용매량이 증가할수록 증가하는 경향이였고 60%이상의 높은 함량을 보였다. 단백질 함량은 5배 첨가에서 13.97%로 가장 많이 함유되었고 침전용매량이 증가할수록 증가하였다.

당 조성 및 아미노산 조성: 침전조건에 따른 조단백다당류의 당 및 아미노산조성은 Table 6, 7에 나타내었다. 구성당을 분석한 결과, 당 조성은 각각 glucose(80.58-82.32%), galactose(9.25-10.72%), fucose(4.70-5.18%) 및 mannose(2.26-4.96%)이었으며

**Table 7. The content of total amino acids of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by added ethanol ratios** (unit: mg/g)

Amino acid	Solvent ratios (extract : ethanol)				
	1	2	3	4	5
Aspartic acid	5.69	7.38	7.79	12.70	14.03
Threonine	3.11	3.80	4.25	6.29	6.92
Serine	3.10	3.89	4.24	5.94	7.35
Glutamic acid	7.23	9.44	10.42	15.59	18.32
Proline	1.65	3.27	3.21	5.59	3.65
Glycine	2.98	3.81	4.27	6.51	7.39
Alanine	3.21	3.94	4.30	6.77	7.78
Valine	2.29	2.39	4.41	5.95	5.90
Methionine	0.79	0.75	0.91	1.36	1.63
Isoleucine	2.42	2.76	2.69	4.26	4.71
Leucine	3.55	3.90	3.97	6.23	7.01
Tyrosine	1.08	1.15	1.43	1.93	2.34
Phenylalanine	2.22	2.70	2.51	4.01	4.47
Histidine	1.77	2.17	2.05	3.51	3.40
Lysine	3.43	4.45	5.58	7.89	9.33
Arginine	2.67	3.31	3.67	5.43	6.00
Total	47.20	59.10	65.70	99.98	110.23

<sup>1</sup>The same superscripts in the same column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test. The values are mean  $\pm$  S.D. of 3 replications.

**Table 8.  $\beta$ -Glucan and uronic acid contents of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by added ethanol ratios**

Solvent ratios (extract : ethanol)	$\beta$ -Glucan (%)	Uronic acid ( $\mu$ g/mg)
1 : 1	25.73 $\pm$ 1.10 <sup>dl</sup>	30.95 $\pm$ 1.83 <sup>c</sup>
1 : 2	29.39 $\pm$ 1.19 <sup>c</sup>	31.23 $\pm$ 1.42 <sup>c</sup>
1 : 3	33.5 $\pm$ 1.56 <sup>b</sup>	31.49 $\pm$ 2.20 <sup>c</sup>
1 : 4	35.97 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup>	36.45 $\pm$ 1.33 <sup>b</sup>
1 : 5	35.48 $\pm$ 1.11 <sup>ab</sup>	39.69 $\pm$ 1.87 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>The same superscripts in the same column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test. The values are mean  $\pm$  S.D. of 3 replications.

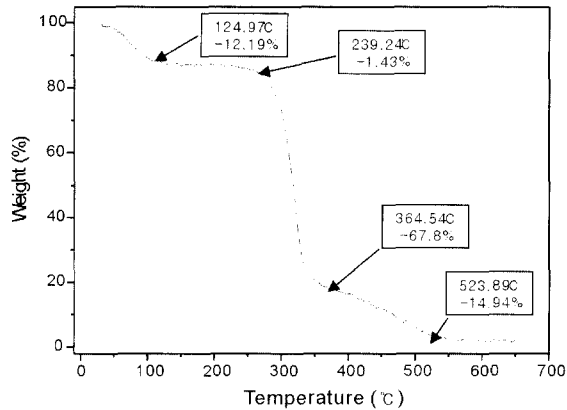
구성당의 비율에는 차이를 보였다. 아미노산 함량을 분석한 결과 glutamic acid, aspartic acid가 각각 7.23-18.32 mg/g, 5.69-14.03 mg/g로 가장 많이 함유되어 있었다. Glutamic acid와 aspartic acid는 버섯의 전형적인 정미성분으로 MSG(monosodium glutamate)같은 역할을 한다고 알려져 있다(32). 구성 아미노산은 침전용매량이 증가할수록 아미노산 함량도 증가되었으며, 필수아미노산인 threonine, leucine, isoleucine, valine, lysine, methionine, phenylalanine, tryptophan 중 tryptophan을 제외한 7종의 아미노산의 함량은 구성아미노산의 총합량 중 약 37%를 차지하였다.

**$\beta$ -Glucan 및 uronic acid 함량:** 침전조건에 따른 조단백다당류의  $\beta$ -glucan 및 uronic acid 함량은 Table 8에 나타내었다.  $\beta$ -Glucan은 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 전이를 막는 것으로 알려져 있으며 혈당 및 혈청콜레스테롤 강하작용으로 당뇨병과 고지혈증 개선효과가 있는 것으로 보고되고 있다(33). 침전용매량이 증가함에 따라  $\beta$ -glucan 함량과 uronic acid 함량은 증가되었는데,  $\beta$ -glucan은 4배의 에탄올 첨가에서 35.97%로 가장 높았고 uronic acid는 5배 첨가에서 39.69  $\mu$ g/mg으로 가장 많이 함유되어 있었다. 생리활성 물

질을 함유하고 있는 조단백다당류의 추출수율과 생리활성물질인  $\beta$ -glucan 함량을 고려할 때 에탄올 4배 첨가량을 최적 침전 조건으로 선정하였다.

#### 열분해 특성

아가리쿠스버섯의 생리활성이 알려져 있는  $\beta$ -glucan 함량이 가장 우수한 조건인 가압추출 2시간과 4 배의 에탄올 첨가를 통해 추출 분리된 조단백다당류 동결건조 분말을 TGA를 이용하여 온도증가에 따른 조단백다당류의 무게감량을 정량적으로 측정하여 열분해 특성을 분석하였다(Fig. 2). 조단백다당류는 단백질과 다당류등이 복잡하게 결합되어 있는 고분자물질로 열분해가 여러 단계로 이루어져 있었다. 선정된 추출조건에서 추출 분리된 조단백다당류의 첫 번째 열분해 단계는 25-125°C의 온도범위로 수분의 증발이 일어나는 단계이었고, 두 번째 단계인 125-239°C에서 성분의 용융이 서서히 일어났으며 세 번째 단계인 240-365°C는 성분의 열분해가 일어나는 온도범위이었다. 네 번째 단계인 365-524°C는 분해 후 잔류물에 char가 형성된 후 char형성물이 서서히 열 저하가 일어나는 단계임을 확인하였다. Char 형성물은 식물성 원료를 400-700°C로 가온하여 charcoal상태로 가공하는 것으로 흡착능이 뛰어난 무취의 흑



**Fig. 2.** TGA curve of crude protein-bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by pressure extraction at 150 KPa for 2 hours.

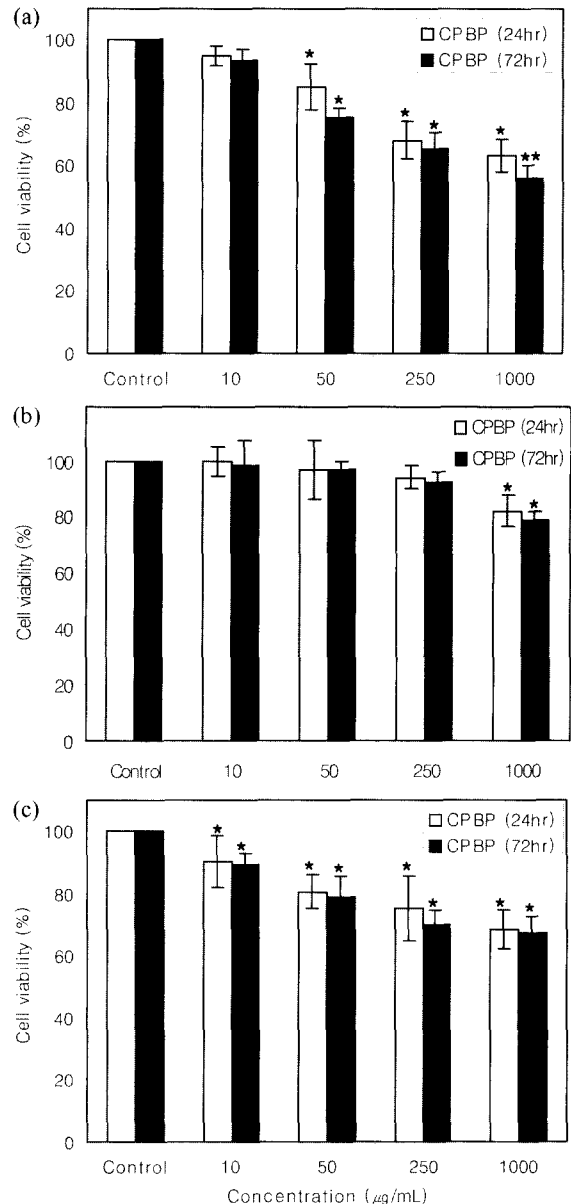
색분말 또는 입상물질인데, 최근에는 자원을 재활용하는 의미에서 폐기물이나 biomass를 이용하여 제조하고 있다(34). Abdelatif 와 Patricia(35)는 무게감소량을 이용하여 물질 구성분의 특성을 알 수 있다고 하였다. 조단백다당류는 240-365°C에서 67.8%의 무게 감소를 보여주어 비교적 높은 온도에서도 열적 특성이 안정한 물질이었다. Shama(36)는 양송이버섯과 느타리버섯에서 추출, 분리 및 건조한 cellulose, hemicellulose 및 crude polysaccharide의 TGA와 DTG연구에서 열분해에 의한 성분의 무게감소는 250-350°C 부근에서 53-62% 감소되었고, 400-550°C에서 대략 20%의 감소가 일어났으며, 250-350°C에서 분해된 성분은 다당류 및 cellulose였고, 400-550°C에서는 char 형성 물질의 분해가 일어난다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향이었다.

**암세포 증식억제 효과**

본 연구에서는 인체 폐암세포(A549), 유방암세포(MCF-7) 및 위암세포(AGS)를 이용하여 선정된 조건인 가압추출 2시간 및 4배의 에탄올 첨가에 의해 추출 분리된 조단백다당류의 암세포에 대한 증식억제 효과를 SRB assay 방법으로 살펴보았다 (Fig. 4).

A549의 경우 10 µg/mL 농도로 24시간 및 72시간 처리하였을 때는 큰 차이를 볼 수 없었지만, 50 µg/mL이상의 농도에서는 농도가 높아짐에 따라 암세포 생존율이 감소함을 확인할 수 있었다. 1,000 µg/mL 농도에서 72시간 처리시에는 43.9%의 암세포 손상을 보여주어 MCF-7과 AGS에 비해 암세포 증식억제 효과가 가장 높게 나타났다. AGS의 경우도 A549와 유사하였는데, 아가리쿠스버섯 조단백다당류의 농도가 증가할수록 암세포 생존율은 감소하였으며 처리시간이 24시간에서 72시간으로 증가함에 따라 암세포 증식억제 효과가 높아지는 경향이었다.

MCF-7의 경우는 모든 농도에서 처리 24시간까지는 대조구에 비해 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었으나, 1,000 µg/mL 농도에서 72시간 처리를 하였을 때에는 21.4%로 대조구에 비하여 일부 감소하였으나 다른 암세포주에 비하여는 세포손상이 미비하였다. 이러한 결과는 아가리쿠스버섯 조단백다당류가 완전히 정제된 물질이 아닌 관계로 항암효과가 제한적이었으며, 아가리쿠스버섯의 생리활성물질로 알려진 β-glucan류 이외에 기타 방해물질이 많이 함유된 까닭이라고 사료된다. Chun 등(37)은 아가리쿠스버섯 열수추출물에 대한 간암, 대장암등의 암세



**Fig. 3.** Antitumor effect of crude protein-bound polysaccharide (CPBP) from *Agaricus blazei* Murill against A549 (a), MCF-7 (b), and AGS (c) cell line.

CPBP was extracted at 150 KPa for 2 hours. The values are mean ± S.D. of 3 replications. Data was analyzed by student's t-test. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

포주 성장저해 활성 측정에서 농도가 증가함에 따라 암세포 손상정도가 증가하였으며 각각 1,000 µg/mL 농도에서 65%와 36%의 저해율을 보였다고 하였다. 또한, Mizuno 등(10)은 아가리쿠스버섯 유래 단백질다당류에 있어서 단백질은 활성에 필수적이나 상황버섯 유래 단백질다당류에서는 단백질이 활성에 관여하지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서는 세 가지 종류의 암세포주에 대한 증식억제 효과를 측정하여 아가리쿠스버섯에서 추출 분리된 조단백다당류에 대한 항암효과에 접근하였으나 항암효과의 기전과 그 효과에 대한 보다 과학적인 접근이 이루어져야 할 것이다.

## 요약

아가리쿠스버섯에 함유된 생리활성 물질인 조단백다당류의 효율적인 추출공정을 확립하기 위하여 다양한 추출조건에서의 화학적 특성을 조사하였으며, 추출 분리된 조단백다당류의 열분해 특성 및 SRB assay에 의한 인체 암세포 증식억제 효과를 조사하였다. 조단백다당류의 추출수율은 초음파추출이 13.0%로 가장 높았으며, 열수추출이 7.8%로 가장 낮았다. 추출된 조단백다당류의 당 조성은 약 80%의 glucose와 fucose, galactose 및 mannose로 구성되어 있었으며 가압조건에서 2시간과 3시간의 추출은  $\beta$ -glucan 함량이 각각 32.28%와 32.34%로 뚜렷한 차이가 발견되지 않아 가압추출 2시간이 생리활성물질의 추출조건으로 효과적이었다. 또한 침전조건에 따른 조단백다당류의 침전수율 및  $\beta$ -glucan 함량은 4배 첨가 시 각각 10.89%와 35.97%로 가장 많이 함유되어 있었다. 열분해 특성은 네 단계로 이루어져 있었으며, 240-365°C에서 67.8%의 무게 감소를 보여주어 높은 온도에서도 열적 안정성이 있었다. SRB assay에 의한 인체 암세포 증식억제 효과를 검토한 결과, A549의 경우 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서 72시간 처리 시에는 43.9%의 암세포 손상을 보여주어 MCF-7과 AGS에 비해 암세포 증식억제 효과가 높음을 확인할 수 있었다.

## 문헌

- Misuno T. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2889-2896 (1990)
- Hirokazu K, Ryuichi I, Teturo K, Takashi M. Fractionation and antitumor activity of the water-in-soluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* 186: 267-273 (1989)
- Sasaki T, Takasuka N. Further studies of the structure of lentinan, An antitumor polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Carbohydr. Res.* 47: 99-106 (1976)
- Komatsu N, Okubo S, Kikumoto S, Kimura K, Saito G, Sasaki S. Host mediated antitumor action of *Schizophyllum commune*. *Gann. Jpn. J. Cancer Res.* 60: 557-563 (1971)
- Tsugagoshi S, Ohashi F. Protein-bound polysaccharides preparation, PS-K, effective against sarcoma 180 and rat asites hepatoma AH-13 by use. *Gann. Jpn. J. Cancer Res.* 65: 557-565 (1974)
- Regina CR, Notoya M, Mario SM. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutation Res.* 496: 5-13 (2001)
- Hirokazu K, Aya N, Takayuki Y, Takashi M. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydr. Res.* 183: 150-154 (1988)
- Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2: 1205-1211 (2002)
- Hui LC, Guei RC, Chin CC, Jeng LM. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chem.* 74: 203-207 (2001)
- Mizuno M, Morimoto M, Minate K, Tsucjida H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 434-437 (1998)
- Qun D, Jian Y, Xiao Y, Jinian F. Structural characterization of a water-soluble  $\beta$ -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydr. Res.* 337: 1417-1421 (2002)
- Mizuno T, Inagaki R, Kanto T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Asakura A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble polysaccharides from Himemat-sutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2897-2905 (1990)
- Maziero R, Bononi VL. Science and Cultivation of Edible Fungi. Balkema, Rotterdam, Netherlands. pp. 887-892 (1995)
- Cavazzoni V, Adami A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. *Ital. J. Food Sci.* 1: 9-15 (1992)
- Hyun CK, Park KH, Kim YB, Yoon IH. Differential scanning calorimeter of rice starch. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20: 331-337 (2000)
- Masayuki K, John WD. Calorimetric determination of the amylose content of starches based on formation and melting of the amylose-lysolecithin complex. *J. Food Sci.* 46: 765-771 (1981)
- Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J. Immunol. Meth.* 208: 151-158 (1997)
- Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63 (1983)
- Saha SK, Brewer CF. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glyco-proteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.* 254: 157-167 (1994)
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1954)
- Pamela M, Laura P. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem.* 68: 315-318 (2000)
- Nelly B, Gustav AH. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489 (1973)
- SAS Institute, Inc. SAS User's guide. Statistical Analysis systems Institute, Cary, NC, USA (1993)
- Choi SH. Extraction and purification of physiologically active materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies. MS thesis, Sogang Univ., Seoul, Korea (2000)
- Mason TJ, Paniwnyk L, Lorimer JP. The use of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem.* 3: 253-260 (1996)
- Lee JH, Cho SM, Song KS, Han SB, Kim HM, Hong ND, Yoo ID. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from Mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 213-218 (1996)
- Jong SC, Birmingham JM. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 152-184 (1993)
- Kim GY, Park HS, Nam BH, Lee SJ, Lee JD. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *phellinus linteus* Teng. *Biores. Technol.* 89: 81-87 (2003)
- Ballance GM, Manners DJ. Structural analysis and enzymic solubilization of barley endosperm cell walls. *Carbohydr. Res.* 61: 107-113 (1978)
- Cho SM, Lee JH, Han SB, Kim HM. Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Formitella fraxinea* (II). *Korean J. Mycol.* 23: 340-347 (1995)
- Park KS, Lee JY, Lee SJ, Kim SH, Lee JS. Extraction and separation of protein-bound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor* (Fr) Quel. *Korean J. Mycol.* 20: 72-76 (1992)
- Chen HK. Studies on the characteristics of taste-active components in mushroom concentrate and its powderization. MS thesis. National Chung-Hsing Univ. Taichung, Taiwan (1986)
- Choi JM, Koo SJ. Effect of  $\beta$ -glucan from *Agaricus blazei* Murill on blood glucose and lipid composition in db/db mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1418-1425 (2000)
- Kim HH, Park SK, Kim HS. Preparation of activated coffee char by KOH activation. *Appl. Chem.* 2: 1048-1051 (1998)
- Abdellatif AM, Patricia RD. The effect of mixing and wheat protein/gluten on the gelatinization of wheat starch. *Food Chem.* 81: 533-545 (2003)
- Sharma HS. Analysis of the components of lignocellulose degraded by *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Thermochim. Acta.* 173: 241-252 (1990)
- Chun HS, Choi EH, Kim HJ, Choi CW, Hwang SJ. *In vitro* and *in vivo* antitumor activities of water extracts from *Agaricus blazei* Murill. *Food Sci. Biotechnol.* 10: 335-340 (2001)