

Article

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Process for *Inonotus obliquus* Using Response Surface Methodology

Dong-Yeon Kim, Hui Teng, Yong-Hee Choi*

School of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

반응표면분석법을 이용한 차가버섯의 초음파 추출공정 최적화

김동연 · 텡후이 · 최용희*
경북대학교 식품공학부

Abstract

This study was conducted to monitor the yields of useful substances extracted from *Inonotus obliquus*. Optimization of ultrasonic assisted extraction process was carried out by using response surface methodology under different extraction conditions. A central composite design was applied to investigate the effects of independent variables such as extraction time (X_1), ethanol concentration (X_2) and extraction temperature (X_3) on dependent variables such as soluble solid yield (Y_1), total phenol contents (Y_2), total flavonoid contents (Y_3) and browning color (Y_4). Soluble solid yield was affected by ethanol concentration and extraction temperature. The maximum soluble solid yield was 18.02% at 20.47 min (X_1), 42.85% (X_2) and 69.57°C (X_3) in saddle point. Total phenol contents were highly affected by ethanol concentration and extraction temperature. The maximum total phenol contents were 71.57mg GAE/g at 21.60min (X_1), 45.19% (X_2), 69.68°C (X_3). The electron donating ability was affected by extraction temperature and extraction time. Total flavonoid contents were affected by only extraction temperature. The maximum total flavonoid contents were 35.98 mg RE/g at 22.53min (X_1), 46.37% (X_2), 69.56°C (X_3) in saddle point. The browning color was highly affected by extraction time, ethanol concentration and extraction temperature. The maximum browning color was at 22.00 min (X_1), 46.89% (X_2), 69.71°C (X_3) in saddle point. As a result, the optimum extraction conditions were predicted; extraction time of 21.50 min, ethanol concentration of 44.87% and extraction temperature of 69.635°C.

Keywords : *Chaga*, *Inonotus obliquus*, Response surface methodology, Ultrasonic assisted extraction

서론

최근 사람들의 생활수준이 높아짐에 따라 건강에 대한 관심이 과거에 비해 높아졌다. 따라서 섭취함으로써 건강해지는 기능성 식품에 관한 연구들이 해마다 무수히 행해지고 있다. 그 중에서도 버섯은 예로부터 맛과 영양이 풍부해 우리의 먹거리 뿐 아니라 약용으로도 많이 쓰여지고 있다. 최근 버섯에는 항암효과가 있다는 것이 알려지기 시작하면서 그에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 버섯 가운데 차가버섯이 최근 탁월한 항암효과로 우리나라 뿐만 아니라 세계적으로 각광받고 있다.

차가버섯은 자작나무시루뻨버섯이라고도 불리며, 이름에서도 알 수 있듯이 시베리아와 북아메리카, 북유럽 등 북위 45도 이상 지방의 검은 자작나무에 덩이로 자생하는 버섯이다. 학명은 *Inonotus obliquus*이며 Hymenochaefaceae과에 속한다. 일반적으로 관찰되는 덩어리부분은 불완전세대로 불규칙한 균핵형이다. 버섯은 크기가 9~25cm이고, 표면

은 암갈색 또는 검은색으로 거북등과 같이 갈라져 있으며, 조직은 쉽게 부서지고, 자르면 검은색으로 변색된다. 자실층은 배착형이며, 표면은 관공형이고, 종종 수피 아랫부분에 군데군데 발생되며, 크기는 1~10cm 정도의 불규칙한 조각형태이고, 두께는 0.5~1cm이다.

우리나라에서 최근 들어서야 차가버섯에 관한 연구를 시작한데 비해 러시아에서는 1958년부터 차가버섯의 생리활성 물질에 관한 연구가 시작되었다. 차가버섯 추출물이 항종양 활성을 나타낸다고 보고되었으며(Bulatov 등, 1959) 차가버섯 중의 steroides 또는 aromatic polyphenol 화합물들이 활성을 나타낸다고 보고되었다(Shivrina, 1967). 차가버섯 중에는 lanosterol, inotodiol(Kier, 1961)과 Betulin(Kahlos and Hiltunen, 1983)과 같은 triterpene 성분들이 풍부하고 기타 sterol류(Ludwiczak and Wrzeciono, 1975)도 존재한다고 보고되었다. 차가버섯의 inotodiol 성분이 항종양 활성을 가지며 lanosterol, esgosterol과 같은 triterpene alcohol들은

Received: June 24, 2012 / Revised: August 7, 2012 / Accept: November 12, 2012

*Corresponding Author: Yong-Hee Choi, Tel. 82-53-950-5777, Fax. 82-53-950-6772, Email. yhechoi@knu.ac.kr

©2012 College of Agricultural and Life Science, Kyungpook National University

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, Provided the Original work is Properly cited.

종양의 활성을 지연시키고 triterpene acid류는 종양세포를 불활성화시킨다고 보고되었다(Loviagina and Shivrina, 1962). 일본에서는 카바노아나타케라고 부르고 있으며 HIV-1 protease의 저해 효과가 보고되었으며(Ichimura et al., 1998) 항돌연변이 활성 또한 보고되었다(Saitoh et al., 1996). 또한 차가버섯에 포함된 페놀 화합물들은 free radical을 제거하는 능력이 탁월하므로(Cui et al., 2005) 산화 스트레스로 인한 질병들, 즉 암, 고혈압, 그리고 Alzheimer's and Parkinson's diseases와 같은 뇌관련 퇴행성 질환들과 자가면역질환들의 유병율을 감소시킨다고 최근 보고된 바 있다(Nakajima et al., 2007; Zheng et al., 2009).

차가버섯의 알려진 유효성분으로는 β -glucan, 트리체페놀산, 호로마도젠, 폴리페놀, 옥시페놀카르본산, 휘노친, 차가산, 바닐라산, 파라옥시향산, 프테린, 스테롤, 리그닌 등의 많은 생리활성성분이 있는 것으로 알려져 있으며 특히 항산화력에 있어서는 알려진 어떤 버섯보다도 SOD 유사 활성을 나타내는 물질이 가장 많다는 분석결과도 있다(星崎, 1998).

본 연구에서는 차가버섯의 유용성분을 초음파 추출법을 이용하여 최적의 추출 조건을 확립하고자 하였다. 이 때 중심합성실험계획에 의해 추출 시간, 용매의 농도, 추출 온도를 독립 변수로 하여 이 조건에 따른 유용성분을 반응 표면분석법으로 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 차가버섯은 대구시의 약령시장에서 구입한 것을 분쇄기로 분말화한 후 40mesh 표준망체에 통과시켜 20°C의 암소에 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

초음파 추출 공정

초음파 추출 (ultra sonicate extraction)에 사용된 추출장치는 추출 온도 0~70°C, 추출 시간 0~120min으로 조절이 가능하다. 차가버섯의 최적 추출 조건을 선정하기 위해서 추출용매로 에탄올 농도(ethanol concentration) 25~75%를 사용하

Table 1. Box-behnken design(BBD) matrices with three levels and four variables and analytical results from *Inonotus obliquus*

Exp No. ^{a)}	Extraction Time (min)	Ethanol Concentration (%)	Extraction Temperature (°C)	SSYb)	TPCc)	TFCd)	BCe)
				(%)	(mg GAE/g)	(mg RE/g)	(O.D)
1	10(-1)	25(-1)	60(0)	18.74	46.46	23.85	0.72
2	10(-1)	75(1)	60(0)	11.28	39.69	24.76	0.62
3	30(1)	25(-1)	60(0)	15.20	52.40	27.71	0.80
4	30(1)	75(1)	60(0)	12.84	42.09	24.96	0.66
5	20(0)	25(-1)	50(-1)	14.39	46.66	25.88	0.71
6	20(0)	25(-1)	70(1)	17.21	67.25	33.07	0.95
7	20(0)	75(1)	50(-1)	12.42	37.55	22.22	0.58
8	20(0)	75(1)	70(1)	14.11	46.13	25.16	0.74
9	10(-1)	50(0)	50(-1)	15.41	53.14	28.95	0.84
10	30(1)	50(0)	50(-1)	16.80	63.09	30.45	0.98
11	10(-1)	50(0)	70(1)	17.64	67.79	36.01	1.08
12	30(1)	50(0)	70(1)	19.94	74.68	39.01	1.19
13	20(0)	50(0)	60(0)	15.61	57.10	29.60	0.92
14	20(0)	50(0)	60(0)	15.66	61.93	28.95	0.95
15	20(0)	50(0)	60(0)	15.16	55.78	31.10	0.91

^{a)}The number of experimental conditions by central composite design

^{b)}Soluble solid yield

^{c)}Total phenol contents

^{d)}Total flavonoid contents

^{e)}Brown color

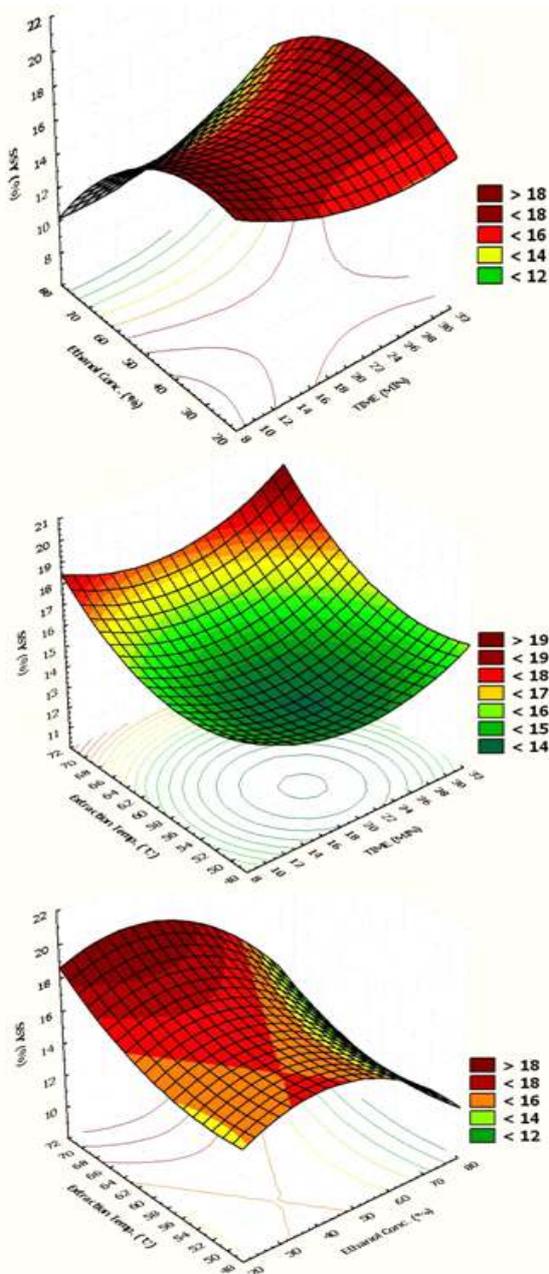


Fig. 1. 3D surface plots and 2D contour plots reflect the effect of process variables on soluble solid yield.

였으며 추출시간(extraction time) 10~30min, 추출 온도(extraction temperature) 50~70°C로 추출 공정변수를 변화시키면서 실험을 시행하였다.

차가버섯 추출물의 제조

추출 용매로 에탄올 35ml/g의 solvent to sample ratio를 사용하였다. 즉 차가버섯 분말 1g에 35ml의 에탄올을 가하고

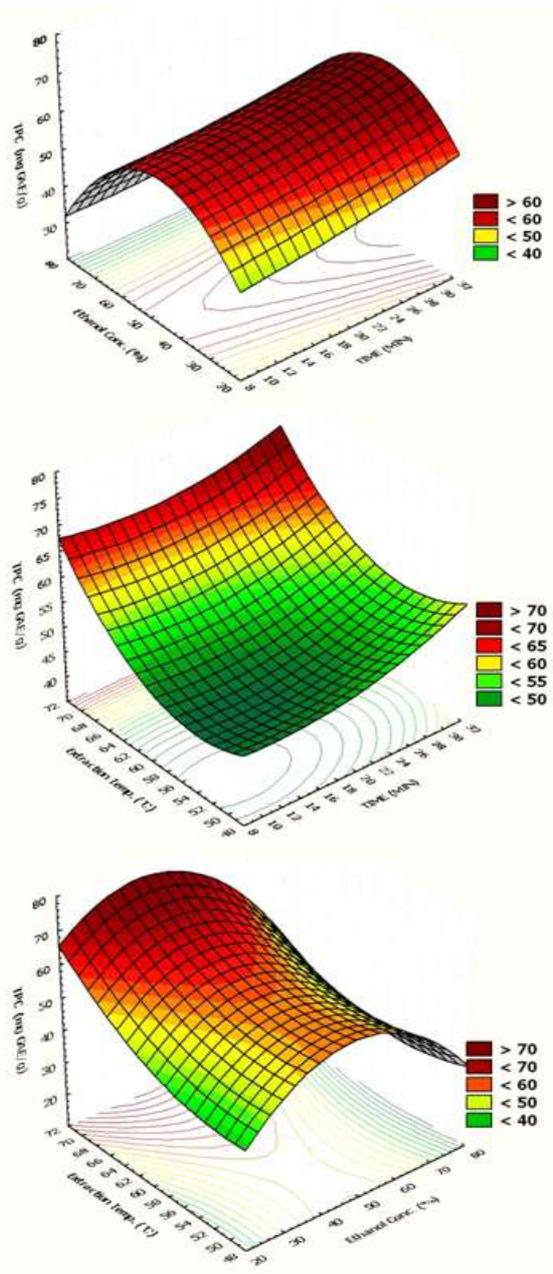


Fig. 2. 3D surface plots and 2D contour plots reflect the effect of process variables on Total phenol contents.

각 추출조건에 따라 초음파 추출을 한 후 Whatman 여과지를 사용하여 여과하였다. 여과되어 나온 여과액에 해당하는 용매를 첨가하여 100ml로 정용화한 것을 차가버섯의 추출물로 하여 분석용 시료로 사용하였다.

최적화 실험계획

초음파 추출을 이용한 차가버섯의 최적 추출 조건을 수립

하기 위해 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 사용하였으며 예비실험의 결과를 바탕으로 중심 합성계획 (central composite design)을 실시하였다. 즉 추출 공정의 독립변수 (X_n)는 추출 시간(X_1)와 추출 온도(X_2), 에탄올의 농도(X_3)에 대한 실험범위를 선정하여 3단계로 부호화하였으며 Table 1에 나타내었다. 또한 이들의 독립 변수에 영향을 받는 종속변수는 Soluble solid yield(Y_1), Total phenol contents(Y_2), Total flavonoid contents(Y_3), Brown color(Y_4)로 3회 반복으로 측정하여 각각 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 의한 최적조건의 예측은 SAS (statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하였으며 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_{23}X_3X_1 + b_{23}X_2X_1 + b_{23}X_3X_2$$

추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 종속변수의 contour map을 이용하여 분석하였다.

이화학적 성분 분석

추출수율

추출 수율은 항량을 구한 수기에 추출물 5mL를 취하고

60°C에 1차 증발시킨 후 105°C에서 증발 건조시켜 무게를 측정하였고, 사용된 원료 양의 백분율로 나타내었다.

총페놀 함량

총페놀 함량은 시료 추출물 100 μ l에 Folin ciocalteau 시약 50 μ l와 2% Na₂CO₃용액 300 μ l를 가하여 혼합하고 실온에서 15분간 방치 후 증류수 1ml를 가하여 진탕한 후 분광광도계를 사용하여 725nm에서 비색 정량하였다. 이 때 표준곡선은 gallic acid(Sigma Aldrich Chemical Co., USA)를 이용하여 작성하였다.

총플라보노이드 함량

총플라보노이드 함량은 시료 70 μ l에 증류수 430 μ l, 5% NaNO₂ 50 μ l, 10% Al(NO₃)₃ · 9H₂O 50 μ l를 가하여 실온에서 6분 동안 방치한 후 1N NaOH 500 μ l를 가하여 진탕한 후 분광광도계를 사용하여 510nm에서 비색 정량하였다. 이 때 표준곡선은 rutin(Sigma Aldrich Chemical Co., USA)을 이용하여 작성하였다.

갈색도

갈색화 반응 생성물질의 농도를 나타내는 갈색도는 차가 버섯 추출물에 증류수를 3배 희석하여 분광광도계를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 일부 갈색화 반응 생성물들은 항산화 효과를 나타낸다.

Table 2. Polynomial equation calculated by RSM program for extraction of Inonotus obliquus

Responses	The second order polynomiala)	R ²	significance
Soluble solid yield (Y ₁)	Y ₁ = 0.476913 - 0.007589X ₁ + 0.002018X ₂ - 0.020575X ₃ + 0.000097X ₁ ² + 0.000051X ₂ X ₁ - 0.000031X ₂ ² + 0.000023X ₃ X ₁ - 0.000011X ₃ X ₂ + 0.000099X ₃ ²	0.9082	0.0375
Total phenol contents (Y ₂)	Y ₂ = 649.619 + 2.989087X ₁ + 16.31254X ₂ - 24.49821X ₃ + 0.06252X ₁ ² - 0.020476X ₂ X ₁ - 0.131083X ₂ ² - 0.044167X ₃ X ₁ - 0.069333X ₃ X ₂ + 0.307044X ₃ ²	0.9698	0.0027
Total flavonoid contents (Y ₃)	Y ₃ = 1740.5 - 10.90972X ₁ + 30.30278X ₂ - 64.45833X ₃ + 0.313889X ₁ ² - 0.093333X ₂ X ₁ - 0.236444X ₂ ² + 0.095833X ₃ X ₁ - 0.108333X ₃ X ₂ + 0.634722X ₃ ²	0.9407	0.0137
Brown color (Y ₄)	Y ₄ = 1.653333 - 0.000472X ₁ + 0.042748X ₂ - 0.069592X ₃ + 0.000262X ₁ ² - 0.000035X ₂ X ₁ + 0.000402X ₂ ² - 0.000058X ₃ X ₁ - 0.000078X ₃ X ₂ + 0.000711X ₃ ²	0.9899	0.0002

^{a)}X₁ : Extraction time (min) X₂ : Ethanol concentration (%) X₃ : Extraction temperature, (°C)
Y = b₀ + b₁X₁ + b₂X₂ + b₃X₃ + b₁₁X₁² + b₂₁X₂X₁ + b₂₂X₂² + b₂₃X₃X₁ + b₂₃X₂X₁ + b₂₃X₃X₂

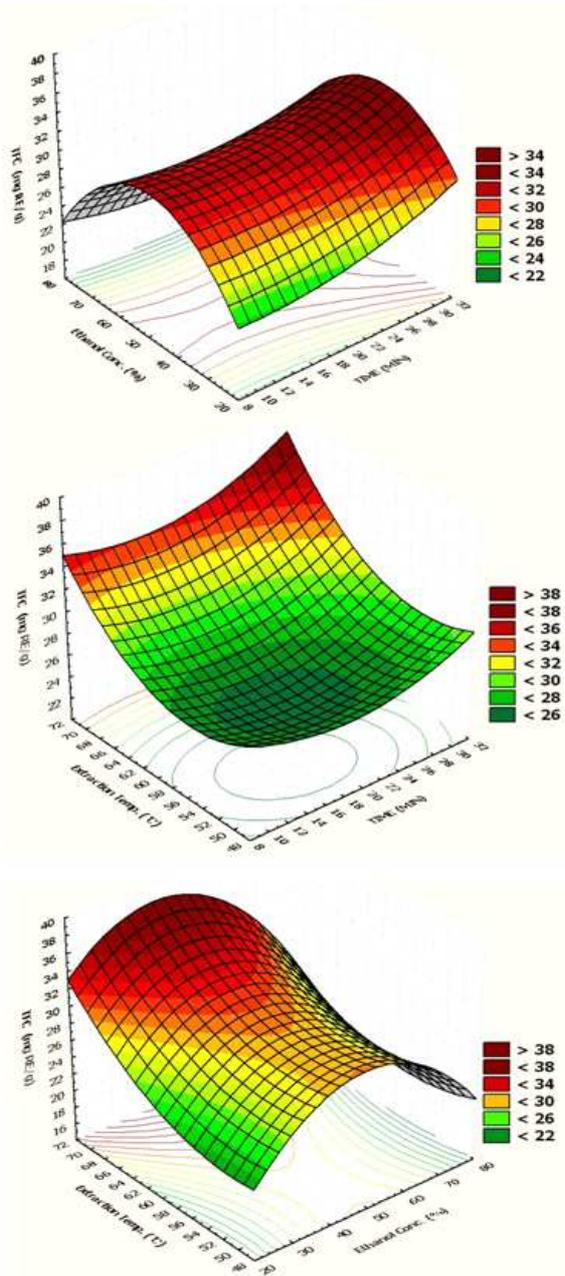


Fig. 3. 3D surface plots and 2D contour plots reflect the effect of process variables on Total flavonoid contents.

결과 및 고찰

추출 수율

추출 조건에 따른 차가버섯 추출물의 추출 수율은 Table 1에 나타내었고, 그 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 2와 같다. 추출물의 회귀식에서 R²값은 0.9082로 측정되었으며 5% 이내에서 유의성을 보였다. 본 연구에서 차가버섯

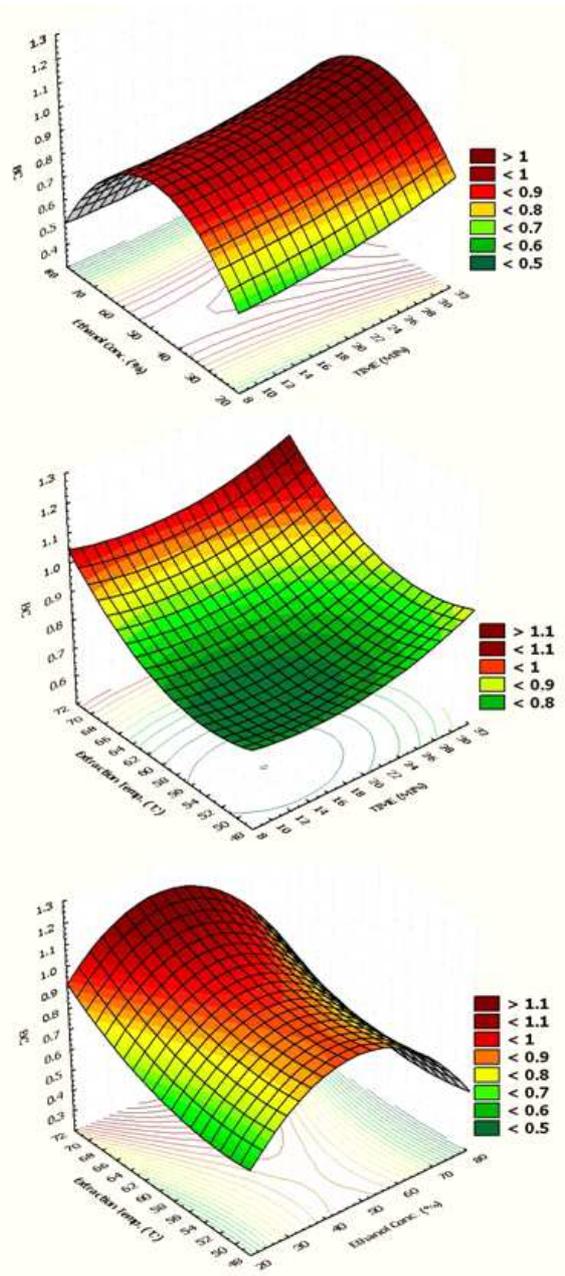


Fig. 4. 3D surface plots and 2D contour plots reflect the effect of process variables on Brown color.

추출물의 추출 수율은 Table 3에 나타난 바와 같이 에탄올 농도와 추출온도에 유의하게 영향을 받고 있으며 특히 에탄올 농도가 추출 온도와 비교 시 매우 유의하게 영향을 주는 것으로 나타났다(p<0.01). 반응표면분석 결과 예측된 정상점은 안장점으로 Table 4에 나타난 바와 같이 추출시간 20.47 min, 에탄올 농도 42.85%, 추출 온도 69.57 °C에서 추출수율 18.02%로 최대값을 나타내었다.

총 페놀함량

추출 조건에 따른 차가버섯 추출물의 총 페놀함량은 Table 1에 나타내었고, 그 결과에 따른 총 페놀함량에 대한 반응표면 회귀식은 Table 2와 같다. 추출물의 회귀식에서 R²값은 0.9698로 높은 상관관계를 보였으며 1% 이내에서 유의성이 인정되었다. 차가버섯 추출물의 총 페놀함량은 Table 3에서와 같이 추출 시간, 에탄올 농도, 추출 온도 세 가지 조건 모두 유의하게 영향을 받고 있으며, 특히 에탄올 농도와 추출 온도가 매우 유의하게 영향을 주는 것으로 나타났다(p<0.01). 예측된 정상점은 안장점의 형태였으며, 능선분석을 실시하여 본 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 추출시간 21.60 min, 에탄올 농도 45.19%, 추출 온도 69.68 °C에서 총 페놀함량 71.57 mg GAE/g으로 최대값을 나타내었다.

Table 3. Regression analysis for regression model of variables in extraction condition

Response conditions	F Ratio		
	X ₁	X ₂	X ₃
Soluble solid yield	0.25	19.51***	8.58**
Total phenol contents	7.51*	26.54***	36.40***
Total flavonoid contents	2.53	6.20*	22.90***
Brown color	21.39***	46.80***	105.22***

*Significant at 10% level; **Significant at 5% level; ***Significant at 1% level

총 플라보노이드함량

추출 조건에 따른 차가버섯 추출물의 총 플라보노이드함량은 Table 1에 나타내었고, 그 결과에 따른 총 페놀함량에 대한 반응표면 회귀식은 Table 2와 같다. 추출물의 회귀식에서 R²값은 0.9408이고 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. 차가버섯 추출물의 총 플라보노이드함량은 Table 3에서와 같이 에탄올 농도, 추출 온도 유의하게 영향을 받고 있으며, 특히 추출 온도가 에탄올 농도와 비교 시 매우 유의하게 영향을 주는 것으로 나타났다(p<0.01). 예측된 정상점은 안장점의 형태였으며, 능선분석을 실시하여 본 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 추출시간 22.53 min, 에탄올 농도 46.37%, 추출 온도 69.56 °C에서 총 플라보노이드함량 35.98mg RE/g으로 최대값을 나타내었다.

갈색도

추출 조건에 따른 차가버섯 추출물의 갈색도는 Table 1에 나타내었고, 그 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 2와 같다. 추출물의 회귀식에서 R²값은 0.9893으로 매우 높은 상관관계를 보였으며 1% 이내에서 유의성이 인정되었다. 본 연구에서 차가버섯 추출물의 갈색도는 Table 3에 나타난 바와 같이 추출 시간, 에탄올 농도, 추출 온도 이 세가지 조건 모두에 매우 유의하게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(p<0.01). 반응표면분석 결과 예측된 정상점은 안장점으로 Table 4에 나타난 바와 같이 추출시간 22.00 min, 에탄

Table 4. Predicted values of optimum conditions for the maximized responses to variables by the ridge analysis by their response surface

Responses	Extraction conditions ^{a)}				
	X ₁	X ₂	X ₃	Maximum	Morphology
Soluble solid yield (%)	20.47	42.85	69.57	18.02	saddle point
Total phenol contents (mg GAE/g)	21.60	45.19	69.68	71.57	saddle point
Total flavonoid contents (mg RE/g)	22.53	46.37	69.56	35.98	saddle point
Brown color (O.D)	22.00	46.89	69.71	1.11	saddle point

^{a)}X₁ : Extraction time (min), X₂ : Ethanol concentration (%), X₃ : Extraction temperature (°C)

Table 5. The optimum range of extraction conditions for response variables by superimposing of contour maps for functional component from *Inonotus obliquus*

Leaching condition	Optimum range	Optimum condition
X ₁ Extraction time (min)	20.47 ~ 22.53	21.50
X ₂ Ethanol concentration (%)	42.85 ~ 46.89	44.87
X ₃ Extraction temperature (°C)	69.56 ~ 69.71	69.635

올 농도 46.89%, 추출 온도 69.71 °C에서 갈색도 1.11 O.D로 최대값을 나타내었다.

최적 추출 조건 예측

EtOH를 추출 용매로 하여 초음파 추출 공정을 통한 차가버섯 유효성분 추출 시, 추출 시간(X₁), 에탄올 농도(X₂), 추출 온도(X₃)를 추출 조건으로 하여 이로부터 추출 조건 최적화를 위해 추출물의 특성인 추출 수율(Y₁), 총 페놀함량(Y₂), 총 플라보노이드함량(Y₃), 갈색도(Y₄)의 contour map을 분석한 결과 Table 5와 같이 추출 시간 21.50 min, 에탄올

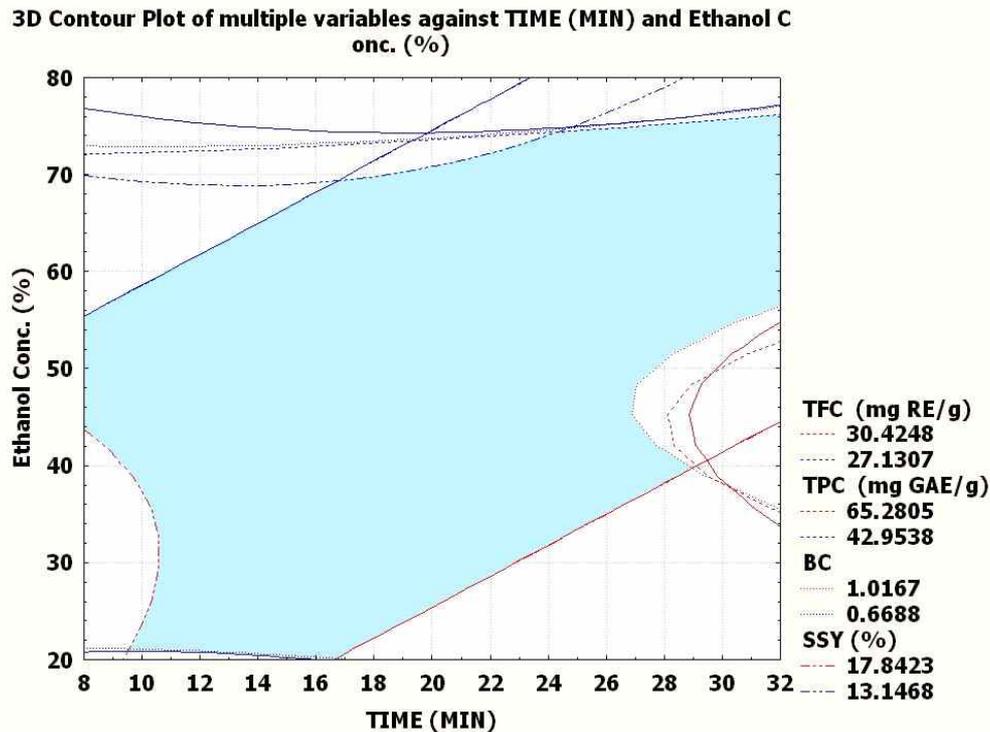


Fig. 5. Imposed contour plots of multiple variables against time and ethanol concentration.

농도 44.87%, 추출 온도 69.64 °C의 최적 추출 조건을 예측할 수 있었다.

요약

본 연구에서는 항암효과가 뛰어난 차가버섯의 초음파 추출 공정 최적화를 위해 반응표면 분석법으로 모니터링하여 최적 추출 조건을 설정하였다. 중심합성계획법에 따라 추출 시간(X_1), 에탄올 농도(X_2), 추출 온도(X_3)를 요인변수로 하고 추출 수율(Y_1), 총 페놀함량(Y_2), 총 플라보노이드함량(Y_3), 갈색도(Y_4)를 종속변수로 하여 시행 하였다. 실험 결과 추출 수율은 에탄올 농도와 추출 온도에 영향을 받을 수 있었다. 안장점에서 추출 조건이 추출 시간 20.47min(X_1), 에탄올 농도 42.85%(X_2), 추출 온도 69.57°C(X_3)일 때, 최대값 18.02%로 나타났다. 총 페놀함량 또한 에탄올 농도와 추출 온도에 영향을 크게 받았다. 최대값은 71.57mg GAE/g으로 나타났으며 이때의 추출 조건은 추출 시간 21.60min(X_1), 에탄올 농도 45.19%(X_2), 추출 온도 69.68°C(X_3)로 나타났다. 총 플라보노이드함량은 추출 온도의 영향을 받은 것으로 나타났고 안장점에서 추출 조건은 추출 시간 22.53min(X_1), 에탄올 농도 46.37%(X_2), 추출 온도 69.56°C(X_3)였고 최대값은 35.98mg RE/g으로 예측되었다. 갈색도는 추출 시간, 에탄올 농도, 추출 온도 이 세가지 조건 모두에 영향을 크게 받았다. 안장점일 때의 추출

시간 22.00min(X_1), 에탄올 농도 46.89%(X_2), 추출 온도 69.71°C(X_3)의 조건에서 최대값이 예측되었다. 앞에서 얻은 결과들을 바탕으로 contour map을 분석한 결과 추출 시간 21.50min, 에탄올 농도 44.87%, 추출 온도 69.64°C의 최적 추출 조건이 예측되었다.

참고문헌

- Bulatov PK, Berezina MP, Jakimov PA (1959) Tsaga ii ee letsebojnoe primenie pri rake IV. Stadii, Leningrad. pp. 326.
- Cui Y, Kim DS, Pack KC (2005) Antioxidant effect of inonotus obliquus. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 79-85.
- Ichimura T, Watanave O, Maruyama S (1998) Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia obliqua*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62: 575-577.
- Kahlos K, Hiltunen R (1983) Identification of some lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus*. *Acta pharmaceutica Fennica* 92: 220-224.
- Kier L (1961) Triterpenes of *Poria obliqua*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50: 471-474.
- Loviagina EV, Shivrina AN (1962) On steroid compound of the Chaga fungus. *Biobimija* 27: 794-800.
- Lucwiczak RS, Wrzecziono U (1975) Forschungen uber die

chemischen Bestandteil de Inonotus obliquus. IV. *Ergosterol*
Focz Chemistry 34: 1701-1705.

Nakajima Y, Sato Y, Konishi T (2007) Antioxidant small phenolic in gredients in inonotus obliquus (persoon) Pilat (Chaga). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) 55: 1222-1226.

Saitoh A, Sato C, Niiyama K (1996) チャガカバノアナダケの変異原性 抑制効果について. 道衛研究報 第46集

Shivrina AN (1967) Chemical characteristics of compounds extracted from inonotus obliquus. *Chemical abstracts* 66: 17271-17279.

Zheng W, Zhang M, Zhao Y, Wang Y, Miao K, Wei Z (2009) Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of Inonotus obliquus. *Bioresour Technology* 100(3): 1327-1335.

星崎 東明 (1998) カバノアナダケ (チャガ). 健全社. オレンジ文庫. pp. 38