

톱밥배양한 버들송이의 균사체로부터 단백다당류의 분리 및 정제

하효철* · 박 신¹ · 박경숙 · 이춘우 · 정인창 · 김선희 · 권용일 · 이재성

영남대학교 식품가공학과, ¹대구대학교 농화학과¹

Isolation and purification of protein-bound polysaccharides from the sawdust mycelia of *Agrocybe cylindracea*

Hyo-Cheol Ha*, Shin Park¹, Kyung-Sook Park, Chun-Woo Lee, In-Chang Jung, Seon-Hee Kim, Yong-Il Kwon and Jae-Sung Lee

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea

¹Department of Agricultural Chemistry, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea

ABSTRACT: The characteristics of protein-bound polysaccharides (PBP) which were isolated and purified from the sawdust mycelia of *Agrocybe cylindracea* were investigated. The yield of crude protein-bound polysaccharides (Fr.CB) extracted with boiling water and precipitated with 95% ethanol, was 0.74% based on the original sawdust mycelia. The Fr.CB was purified by the membrane filtration, ion exchange chromatography and gel filtration. The Fr.B fraction of which the molecular weight is over 300 KDa, was isolated from the Fr.CB using membrane filtration, and the yield was 38.6% based on the Fr.CB. This result indicates that high molecular protein-bound polysaccharides are the dominant components of the Fr.CB. Two fractions (Fr.B-1, Fr.B-2) were also isolated from the Fr.B using ion exchange chromatography, and the yields were 17.3% (Fr.B-1) and 10.3% (Fr.B-2), respectively. The Fr.B-1 was concentrated and gel-filtrated, and the single peak, thought to be nearly pure protein-bound polysaccharides, was obtained. The yield of final fraction (Fr.B-1-β) was 42.5% based on the Fr.B-1. The molecular weight of Fr.B-1-β was nearly 710 KDa. The monosaccharides' composition of Fr.B-1-β was analyzed by HPLC, and glucose was the dominant component, and fucose and galactose were also detected. The result of amino acid analysis was that glutamic acid and alanine were detected to a significant level, and cysteine was not detected.

KEYWORDS: *Agrocybe cylindracea*, protein-bound polysaccharide, sawdust media

버섯은 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있으며 항암효과도 뛰어난 것으로 알려져 세계적으로 관심을 모으고 있다. 버섯의 항암효과에 관한 연구로 Chihara 등(1970)은 표고버섯에서 추출한 lentinan 이, Ohkuma 등(1982)은 팽나무버섯의 자실체에서 분리한 단백다당류가 sarcoma-180에 대해 강한 항암효과가 있음을 보고한 바 있다. 또한 Lee 등(1981)이 치마버섯과 목이버섯, Hong 등(1982)이 간버섯의 항암성분에 대해 보고하였고, Cho 등(1988)과 Park 등(1992)이 액체배양한 구름버섯의 균사체에서,

Hyun 등(1990)이 영지버섯의 자실체에서, Kwag 등(1992)이 좀우단버섯의 자실체에서 단백다당류를 열수추출하여 항암성분을 보고한 바 있다. Yoshioka 등(1975, 1985)은 느타리버섯의 자실체로부터 다당류를 추출해 그 특성을 보고하였고, 항암능력이 매우 뛰어난 neutral polysaccharide인 β-(1→3)-D-glucan을 분리하여 구조를 밝혔다. Wang 등(1993)은 쓰가영지의 자실체에서 분리한 14개의 수용성 분획과 15개의 불용성 분획으로부터 강력한 항암력을 가진 7개의 glucan을 얻었으며 수용성 분획인 FIII-2-a는 소량의 단백질과 결합한 β-(1→3)-D-glucan으로서 암세포 억제율이 100%에 달한다고 보고하였다.

*Corresponding author

또한 Saito 등(1989)은 영지버섯의 자실체에서 분리한 다당류 성분인 GLA의 정제 방법과 구조에 대해 보고한 바 있다. Suzuki 등(1989)은 잎새버섯을 액체배양하여 다당류인 β -glucan을 얻어 syngeneic murine tumor system에서의 항암력과 면역조절 기능에 대해 보고하였다. 버들송이는 주름버섯목, 소똥버섯과에 속하는 단실담자균으로서 거의 세계 도처에 자생하는 버섯의 일종이다. 버들송이의 자실체는 뛰어난 조직감을 가질 뿐만 아니라 향미도 대단히 우수하여 농촌진흥청에 의하여 인공재배 기술이 개발되었으나 아직 널리 보급되지는 못한 상태에 있다. 본 연구에서는 버들송이균주를 톱밥배지에서 배양하여 그 균사체로부터 항암성분의 가능성이 있는 단백다당류를 생산하기 위해 단백다당류를 분리, 정제하였으며 그 특성을 규명하였기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지 조성

본 연구에 사용한 균주는 영남대학교 식품가공학과 생물공학실험실에 보관중인 *Agrocybe cylindracea* (일본의 야생균주 채집)이며 보존용배지는 *Agrocybe* Complete Medium(Lee 등, 1989)을 사용하였는데 그 조성은 starch 2.0%, bactosoytone 0.4%, yeast extract 0.6%, KH_2PO_4 0.046%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, agar 1.5%이다. 균사체 배양을 위한 톱밥배지의 조성은 참나무톱밥 70%, 미강 15%, 밀기울 15%로 하였으며 수분함량을 65%로 조절하였다.

조단백다당류의 추출

톱밥배지에서 배양한 *Agrocybe cylindracea*로부터 단백다당류의 추출은 Fig. 1과 같은 방법으로 실시하였다(Park 등, 1992). 즉 시료 400 g에 10배량의 증류수를 가하여 100°C에서 3시간 동안 추출한 후 3,000×g에서 20분간 원심분리하여, 그 상등액을 여과하였다. 여과액을 감압농축기로 10분의 1용량으로 농축한 다음 3배량의 ethanol을 가하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 이때 30, 50, 70 및 95% ethanol을 사용하여 ethanol 농도별 침전물의 수율을 비교하였다. 생성된 침전물을 5,000×g에서 30분간

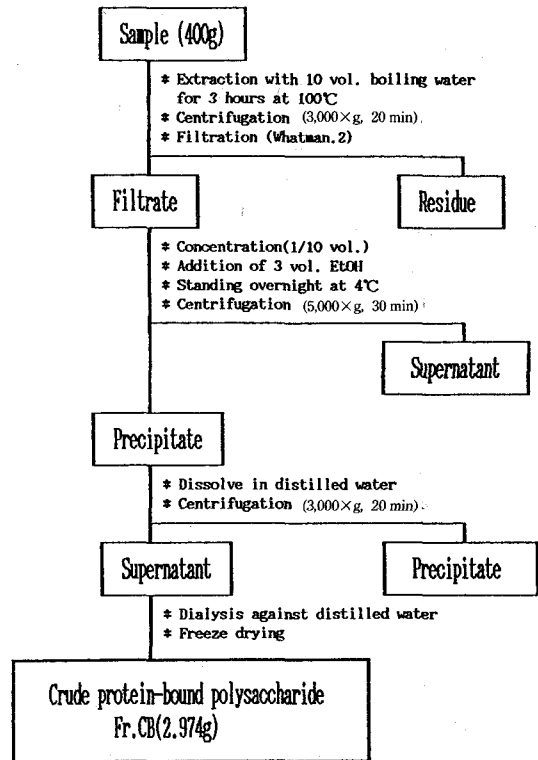


Fig. 1. The extraction procedure of crude protein-bound polysaccharides.

원심분리하여 회수하고 이를 소량의 증류수에 녹여 다시 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 불용성 불순물을 제거하였다. 증류수로 24시간 투석한 다음 동결건조하여 조단백다당류를 얻었다.

조단백다당류의 분석

조단백다당류 중 당의 함량과 단백질 함량을 분석하였다. 총당의 정량분석은 phenol-sulfuric acid법(Chaplin 등, 1986)으로 실시하였다. 즉 5%(w/v) phenol 0.2 ml와 sulfuric acid 1 ml를 시료와 반응시킨 후 UV-Visible spectrophotometer(Pharmacia LKB, Ultrospec Plus)를 사용하여 485 nm에서 흡광도를 측정하여, glucose 표준곡선을 기준으로 시료중 당의 함량을 정량하였다. 총단백질의 정량분석은 Bradford의 방법(1976)에 따라 실시하였다. Bradford reagent 1 ml를 시료와 반응시킨 후 UV-Visible spectrophotometer를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Bovine serum albumin(Si-

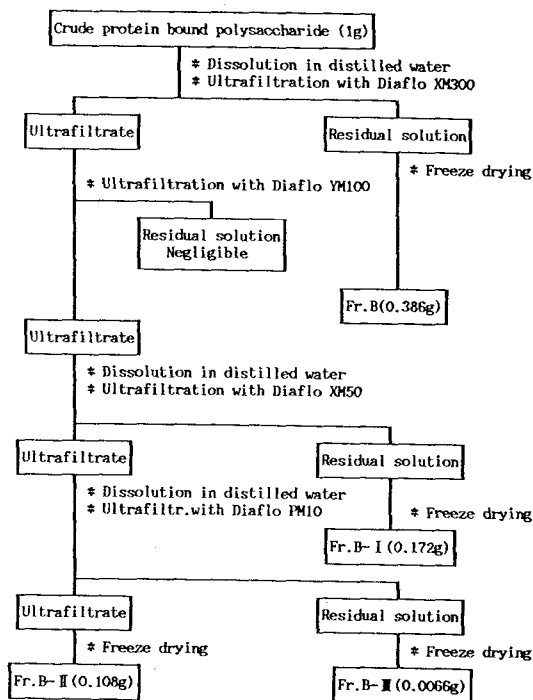


Fig. 2. Fractionation of protein-bound polysaccharides from *A. cylindracea* by the membrane filtration.

gma Co.) 표준곡선을 기준으로 시료중 단백질의 함량을 정량하였다.

박막여과에 의한 분획

단백다당류의 정제를 위하여 분자크기에 따라 분리 가능한 박막여과에 의한 분획을 시도하였다. 버들송이균의 톱밥균사에서 ethanol 침전법으로 회수한 조단백다당류 시료 1g을 100 ml의 증류수에 녹인 다음 Fig. 2와 같이 Diaflo XM300(MW cutoff: 300,000), YM100(MW cutoff: 100,000), XM50(MW cutoff: 50,000), PM10(MW cutoff: 10,000)의 박막여과막을 차례대로 사용하여 분획하였다. 이때 박막여과를 위하여는 Amicon Diaflo system에 질소가스를 사용하였으며 각 단계의 박막여과에서 원래 용량의 5분의 1가량이 되도록 여과, 농축하였다.

DEAE-sephadex column chromatography

박막여과에 의한 분획에서 회수된 분자량 300,000 이상의 분획을 DEAE-sephadex를 사용하여 정제하

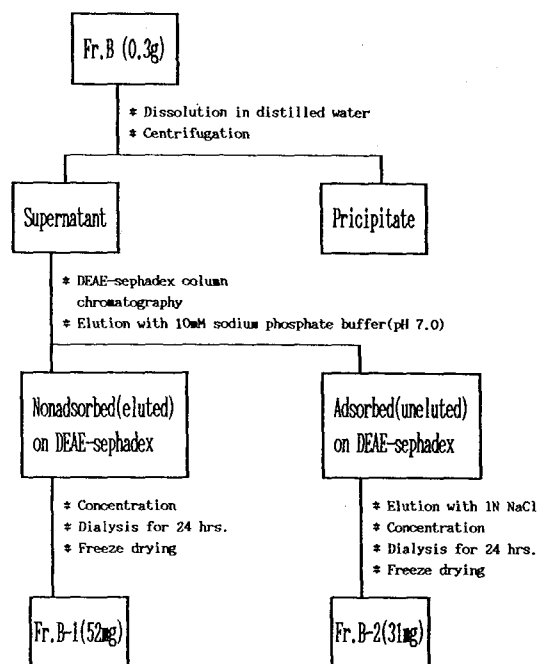


Fig. 3. DEAE-sephadex ion exchange column chromatography of Fr. B.

였다. DEAE-sephadex A-50(Pharmacia Co.)은 Cooper의 방법(1977)으로 처리하였다. 즉, 0.2N HCl로 처리한 후 0.2N NaOH로 처리하고, 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 중성이 되게 반복해서 세척하였다. 이어서 수지의 기포를 제거한 다음 유리관(2.5×30 cm)에 충전한 후 시료의 농도를 100 mg/10 ml로 하여 유리관에 적용하였다. 시료는 step-wise 방법으로 전개하였으며 280 nm에서의 흡광도 측정으로 단백질의 용출을 확인한 다음 이들 단백질 peak에 대해 phenol-sulfuric acid법(Chaplin, 1986)에 의해 당류검정을 실시함으로써 단백질다당류를 확인하였다.

Sepharose 2B gel filtration chromatography

DEAE-sephadex column에서 단백질다당류로 확인된 분획을 Diaflo PM30(MW cutoff: 10,000) 박막을 이용하여 여과, 농축하였다. Sepharose 2B(Pharmacia Co.)를 충전한 gel column(2.5×40 cm)에 농축 시료 10 ml를 적용하여 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 전개하였다. 흡광도 측정(280 nm)으로 단백질의 용출을 확인한 다음 이들 단백질

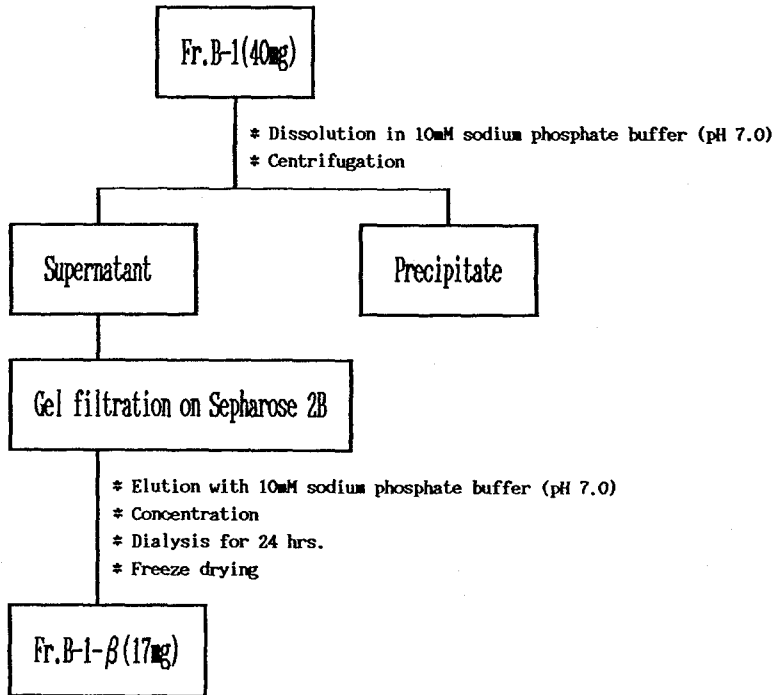


Fig. 4. Purification by gel filtration chromatography.

peak에 대해 phenol-sulfuric acid법으로 당 반응을 실시하여 485 nm에서 흡광도를 측정함으로써 단백 다당류를 확인하였다.

Gel filtration에 의한 단백다당류의 분자량 측정

단일 단백다당 peak로 확인되는 Fr.B-1-β의 분자량을 gel filtration 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 sepharose 2B column(2×95 cm)의 void volume(v_0)을 구하고, column을 완전히 수세한 후 표준단백질과 단백다당류를 혼합해서 column에 적용하여 각각의 elution volume(v_e)를 구한다. 표준단백질의 분자량에 대하여 v_e/v_0 값을 plot 한 검량선과 대비하여 단백다당류의 분자량을 추정하였다. 이때 표준 단백질은 blue dextran(MW 2,000,000), thyroglobulin bovine(MW 669,000), alcohol dehydrogenase(MW 150,000)를 사용하였다.

단당류 분석

TLC에 의하여 단당류의 정성적 검정을 실시하

였다. 즉 단백다당류로 확인된 분획을 2N HCl 0.25 ml로 용해시켜 tube를 봉하고 100°C에서 5시간 가열분해하였으며 Silica gel plate(Merck Co. 20×20 cm)에 표준단당류와 함께 시료액을 찍은 다음 2-propanol/acetone/0.1M lactic acid(2:2:1, v/v/v)의 용매를 사용하여 전개하였다. 전개후 발색제, diphenylamine/aniline/phosphoric acid(5:5:1, v/v/v)를 분무하고 건조한 후 10분 동안 100°C에서 가열하여 발색시키고 단당류를 정성적으로 검정하였다(Chaplin 등, 1986). HPLC를 이용한 단당류 분석을 위하여 단백다당류로 확인된 분획을 2N HCl 용액으로 100°C에서 8시간 가수분해시켜 여과한 후, 여액을 vacuum pump로 감압 건조하여 16 mM NaOH(v/v) 50 μl와 함께 섞어 시료를 조제하였으며, 각 표준당(농도 0.2%)에 대해서도 같은 방법으로 행하였다. 이때 column은 Cabopak PA₁(4×250 mm)을 사용하였다.

아미노산 분석

Waters사의 pico.tag 아미노산 자동분석기를 사용하였다. 단백다당류 분획을 6N HCl 용액으로 105°C

에서 24시간 가수분해시켜 여과한 후 여액을 감압 건조하여 ethanol:water:triethylamine(2:2:1, v/v/v) 20 μ 와 함께 섞어 진공펌프로 완전히 건조한다. 여기에 ethanol:water:triethylamine:phenylisothiocyanate(7:1:1:1, v/v/v/v) 30 μ 를 첨가하여 실온에서 20분 동안 방치하고 진공펌프로 완전히 건조한다. 이것을 pico.tag 용액(Eluent A) 250 μ 로 희석해서 분석기에 주입하였으며, 각 표준아미노산(농도 250 pmol)에 대해서도 같은 방법으로 행하였다.

결과 및 고찰

조단백다당류의 수율 및 분석

ethanol 농도별 조단백다당류의 수율은 Table 1과 같이 ethanol 농도가 30%일 때 0.480 g이었으며 ethanol 농도가 95%일 때 2.974 g으로서 ethanol 농도가 증가함에 따라 조단백다당류의 수율이 증가함을 볼 수 있는데, 이는 조단백의 회수에서 보편적으로 95% ethanol 침전을 이용하고 있는 것과 일치하는 결과라고 사료된다. 한편 침전에 사용한 ethanol의 농도에 따른 총당 및 총단백질 함량은 Table 2와 같이 30% ethanol로 침전시켰을 때 총당 비율이 가장 높고, 95% ethanol로 침전시켰을 때 총당 비율이 가장 낮았다. 침전물 중에는 단백다당류 외에 단순다당류 및 단순단백질도 함유되어 있으며

Table 1. Yield of crude protein-bound polysaccharides according to ethanol concentration.

| Fr.CB | Ethanol concentration (%) | | | |
|-----------|---------------------------|-------|-------|-------|
| | 30 | 50 | 70 | 95 |
| Yield (g) | 0.480 | 1.002 | 1.904 | 2.974 |

Table 2. Total sugar and protein contents of the crude protein-bound polysaccharides. (Unit: %)

| Contents | Ethanol concentration (%) | | | |
|-------------|---------------------------|------|------|------|
| | 30 | 50 | 70 | 95 |
| Total sugar | 95.1 | 93.4 | 92.2 | 70.2 |
| Protein | N.D | N.D | N.D | 6.2 |

N.D: not detected

로 위의 결과를 단백다당류 수율과의 상관관계로 나타내기는 어려우나, 다만 ethanol의 농도에 따라 회수되는 성분의 조성이 달라질 수도 있음을 보여 주고 있다. 또한 단백다당류 뿐만 아니라 다당류의 항암효과가 많이 보고되고 있으므로 경우에 따라서는 항암성 다당류를 회수하기 위하여 저농도 ethanol에 의한 분획침전의 응용가능성도 검토하여야 할 것으로 생각된다.

단백다당류의 분리와 정제

버들송이버섯 톱밥배지 400 g을 열수추출, 여과, Ethanol 침전을 거쳐 동결건조한 조단백다당류(Fr. CB)는 재료의 0.74%에 해당하는 2.974 g을 얻었다 (Table 1). 이 Fr.CB를 박막여과, ion exchange chromatography 및 gel filtration을 이용하여 분리 정제하였다. Fr.CB를 박막여과에 의해 분획한 결과 분자량 30만 이상의 분획(Fr.B)이 38.6%로 거의 대부분을 차지하여 고분자 단백다당류가 주된 성분임을 확인할 수 있었다. 이들 30만 이상의 고분자물 분획인 Fr.B를 DEAE-sephadex A-50 column에서 step-wise 방법으로 분획한 결과 Fr.B 분획으로부터

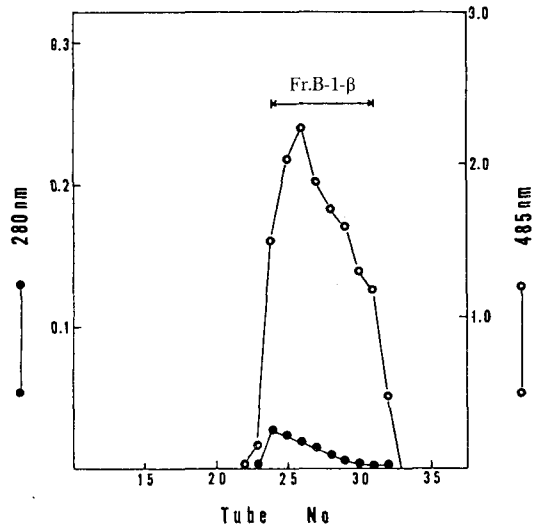


Fig. 5. The Sepharose 2B gel filtration chromatography of Fr.B-1 eluted by 0.01M sodium phosphate buffer (pH 7.0). Solvent: 0.01M sodium phosphate buffer (pH 7.0), Flow rate: 0.25 ml/min, Volumn: 4 ml/tube

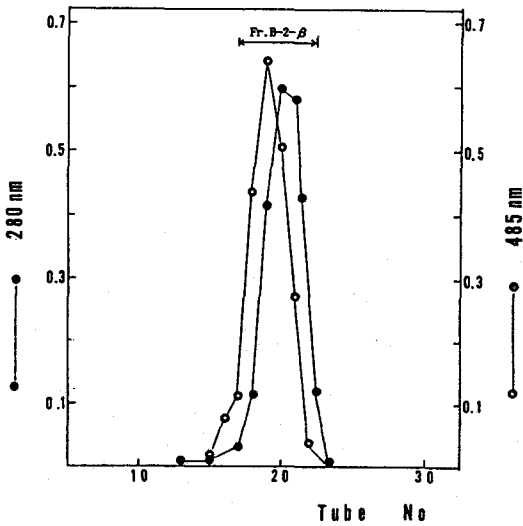


Fig. 6. The Sepharose 2B gel filtration chromatography of Fr.B-2 eluted by 0.01M sodium phosphate buffer (pH 7.0). Solvent: 0.01M sodium phosphate buffer (pH 7.0), Flow rate: 0.45 ml/min, Volumn: 4 ml/tube

Table 3. Total sugar and protein contents of each fraction isolated from the sawdust mycelia of *Agrocybe cylindracea*. (Unit: %)

| Fraction | Total sugar | Protein |
|----------|-------------|---------|
| CB | 70.2 | 6.2 |
| B | 78.0 | 21.5 |
| B-1 | 82.2 | 6.2 |
| B-1-β | 89.4 | 0.8 |

두개의 단백당류 분획을 얻을 수 있었는데 그 수율은 Fr.B를 기준으로 각각 17.3%(Fr.B-1) 및 10.3%(Fr.B-2)였다. 이들 분획을 농축한 다음 sepharose 2B column으로 gel filtration을 실시한 결과 거의 순수한 단일 단백당류 peak를 얻을 수 있었다(Fig. 5, 6). 이들 중 특히 neutral polysaccharide인 Fr.B-1을 분획하여 얻은 Fr.B-1-β의 수율은 Fr.B-1을 기준으로 42.5%에 달하였다. 정제과정에 따른 총당과 총단백질의 함량을 분석한 결과 조단백당류(Fr. CB)에 비하여 30만 이상 분획(Fr.B)에서 총당과 총단백질 함량이 증가하여 알콜침전물 중에서 막분리를 이용하여 분자량이 작은 불순물의 제거효과를

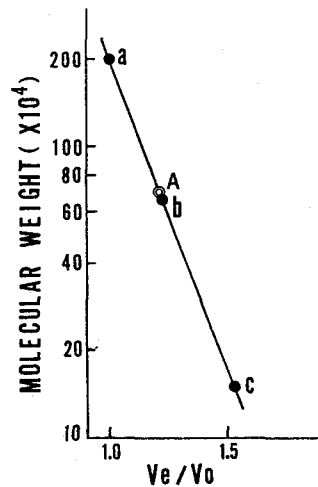


Fig. 7. Determination of molecular weight of Fr.B-1-β by Sephadex 2B gel filtration. V_o : void volum, V_e : elution volumn of each protein, a: blue dextran (MW 2,000,000), b: thyroglobulin bovine (MW 669,000), c: alcohol dehydrogenase (MW 150,000), A: Fr.B-1-β

관찰할 수 있었다. Ion exchange column(Fr.B-1)과 gel column(Fr.B-1-β)으로 분리 정제하는 과정에서 총당 함량은 증가하였으나 총단백질 함량은 감소하는데 이는 크로마토그래피로 정제하는 과정중 비단백당류성 단백질이 제거되는 것을 보여주고 있다 (Table 3).

단백당류의 분자량

단백당류의 분자량 측정은 neutral polysaccharide인 Fr.B-1-β에 대해서 실시하였다. 표준단백질과 단백당류를 Sepharose 2B column을 이용하여 용출시켜 검정한 결과 Fr.B-1-β의 분자량은 710 KDa 부근이었다. 즉 이 단백당류는 분자량 60만 이상의 거대분자로 밝혀졌다(Fig. 7). Wang 등(1993)이 *Ganoderma tsugae*의 자실체로부터 얻은 단백당류의 분획중에서 평균분자량 70만인 FIII-1-a 분획이 *Sarcoma 180*에 대한 억제율이 78.6%에 달한다는 보고와 연관시켜 이 분획이 항암성이 강한 단백당류일 가능성이 높을 것으로 추정된다.

단백당류의 당당류 조성

먼저 당당류의 유무를 알아보기 위해 TLC를 실

Table 4. Monosacchaide contents of each fraction isolated from the sawdust mycelia of *Agroc-ybe cylindracea*. (Unit: %)

| Fraction | Fucose | Galactose | Glucose | Mannose |
|----------|--------|-----------|---------|---------|
| CB | 2.26 | 5.88 | 81.87 | 0.10 |
| B-1-β | 21.20 | 7.38 | 71.42 | N.D* |
| B-2-β | 6.92 | 26.41 | 20.33 | 46.34 |

*N.D: not detected

Table 5. The amino acid composition of the protein moiety of each fraction. (Unit: %)

| Amino acid | Fr.CB | Fr.B-1-β | Fr.B-2-β |
|---------------------|-------|----------|----------|
| Aspartic acid | 8.0 | 8.69 | 15.45 |
| Glutamic acid | 12.2 | 12.92 | 19.69 |
| Serine | 10.92 | 9.8 | 10.49 |
| Glycine | 9.19 | 9.73 | 15.11 |
| Histidine | 3.8 | 1.48 | 2.08 |
| Arginine, Threonine | 6.44 | 5.38 | 5.65 |
| Alanine | 11.88 | 12.94 | 7.62 |
| Proline | 7.55 | 6.77 | 1.45 |
| Tyrosine | 3.8 | 3.75 | 0.95 |
| Valine | 7.4 | 6.98 | 5.08 |
| Methionine | 2.26 | 2.21 | 0.43 |
| Cysteine | 0.75 | N.D | 3.33 |
| Isoleucine | 4.6 | 9.86 | 2.19 |
| Leucine | 5.76 | 5.38 | 4.41 |
| Phenylalanine | 3.16 | 2.83 | 1.54 |
| Lysine | 2.23 | 1.29 | 4.53 |

*N.D: not detected

시하였다. 표준시약의 TLC는 Chaplin 등(1986)의 결과와 거의 일치하였으며 R_f 값은 전반적으로 약간 높았다. Fr.CB와 Fr.B-2-β에서 glucose, galactose, mannose 등의 세가지 단당류가 검출되었으며, Fr.B-1-β에서는 glucose 만 확인되었다. 그러나 HPLC에 의한 단당류 분석결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 Fr.CB, Fr.B-2-β 분획에서 glucose, galactose, mannose 및 fucose의 4가지 단당류가 검출되었다. 다만 Fr.B-1-β에서만 mannose가 검출되지 않았다. 지금까지 담자균으로부터 탐색된 단백단당류의 함양성

능과 단당류의 조성, 평균 분자량 그리고 단백질 함량 사이에는 일정한 관계가 정립되지 못했으며 다만 모든 경우 glucose가 주성분을 이루고 있다는 점은 명백하다.

아미노산 분석

버들송이버섯의 톱밥균사체를 열수추출하여 95% ethanol로 침전한 후 각 fraction에 대해 아미노산을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 조단백다당류인 Fr. CB 분획에서는 glutamic acid, serine, alanine 등이 비교적 고농도로 검출되었으며, Fr.B-2-β 분획에서는 aspartic acid, glutamic acid, glycine이 비교적 고 농도로 검출되었다. 반면 neutral polysaccharide(Fr. B-1-β) 분획에서는 glutamic acid, alanine이 비교적 많이 검출되었고 cysteine은 검출되지 않았다.

적 요

*Agroc-ybe cylindracea*의 톱밥배양 균사체로부터 함양효과가 있는 것으로 알려진 단백단당류를 분리, 정제하였으며 그 특성을 조사하였다. *Agroc-ybe cylin-dracea* 균사체로부터 열수추출한 조단백다당류(Fr. CB)의 수율은 ethanol 농도가 95%일 때 2.974 g으로서 원재료인 톱밥균사체를 기준으로 0.74%였다. 이 조단백다당류(Fr.CB)를 박막여과, ion exchange chromatography, 그리고 gel filtration에 의해 정제 하였다. 조단백다당류 Fr.CB를 박막여과하여 분획한 결과 분자량 30만 이상의 분획(Fr.B)이 38.6%를 차지하여 고분자 단백단당류가 주성분임을 알 수 있었다. Fr.B를 ion exchange chromatography로 분리한 결과 2개의 분획이 17.4%(Fr.B-1), 10.3%(Fr.B-2)의 수율로 얻어졌다. 이들 분획을 농축한 다음 gel filtration한 결과 거의 순수한 단일 단백단당류의 peak를 얻을 수 있었다. Fr.B-1을 분리하여 얻은 Fr. B-1-β 분획의 수율은 Fr.B-1을 기준으로 42.5%였다. 함양효과의 가능성이 가장 높은 것으로 판단되는 최종 정제된 분획인 Fr.B-1-β의 분자량은 710 KDa 부근이었으며 단당류의 조성을 HPLC로 분석한 결과, glucose가 주성분이었고 그의 fucose, galactose도 검출되었다. 또한 아미노산 조성을 분석한 결과 glutamic acid, alanine이비교적 많이 검출되었고 cysteine은 검출되지 않았다.

参考文献

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. 1986. Carbohydrate analysis actual approach, P. 2, 10-12, IRL Press. Oxford and Washington DC.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
- Cho, H.J., Shim, M.J., Choi, E.C. and Kim, B.K. 1988. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LVII). Comparison of various antitumor constituents of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **16**(3): 162-174.
- Cooper, T.G. 1977. In the Tools of Biochemistry. A Wiley Interscience Publication. N.Y. and London. p. 136-174.
- Hong, W.B., Chung, K.S., Woo, M.S. and Kim, B.K. 1982. Studies on constituents of higher fungi of Korea (XXXIII). Antitumor components of *Trametes sanguinea*. *Kor. J. Mycol.* **10**(4): 147-154.
- Hyun, J.W., Choi, E.C. and Kim, B.K. 1990. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVIII). Antitumor components of the basidiocarp of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **18**(2): 58-69.
- Kwag, S.D., Bok, J.W., Hyun, J.W., Choi, E.C. and Kim, B.K. 1992. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVIII). Antitumor components of the cultured mycelia of *Paxillus atromentosus*. *Kor. J. Mycol.* **20**(3): 240-251.
- Lee, S.A., Chung, K.S., Shim, M.J., Choi, E.C. and Kim, B.K. 1981. Studies on the antitumor components of Korean basidiomycetes (II). Antitumor components of *Schizophyllum commune* and *Auricularia auricula-judae*. *Kor. J. Mycol.* **9**(1): 25-29.
- Lee, J.S., Park, S., and Park, G.S. 1989. Optimization of media composition and cultivation for the mycelial growth of *Agrocybe cylindracea*. *Kor. J. Food Sci. Tech.* **21**(3): 399-403.
- Ohkuma, T., Otagiri, K., Ikekawa, T. and Tanaka, S. 1982. Augmentation of antitumor activity by combined cryodestruction of sarcoma-180 and protein-bound polysaccharide, EA6, isolated from *Flammulina velutipes* (Curt.ex.FR.) *Sing. J. Pharm. Dyn.* **5**: 439-444.
- Park, K.S., Lee, J.Y., Lee, S.J., Kim, S.H. and Lee, J.S. 1992. Extraction and separation of protein-bound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor* (Fr.) *Quel. Kor. J. Mycol.* **20**(1): 72-76.
- Saito, K., Nishijima, M. and Miyazaki, T. 1989. Structural analysis of an acidic polysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(11): 3134-3136.
- Suzuiki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M. and Yadomae, T. 1989. Antitumor and immunomodulating activities of a β -glucan obtained from liquid cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(2): 410-413.
- Wang, G., Zhang, J., Mizuno, T., Zhuang, C., Ito, H., Mayuzumi, H., Okamoto, H. and Li, J. 1993. Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom *Songshan lingzhi* the fruiting body of a *Ganoderma tsugae*. *Biotech. Biochem.* **6**: 894-900.
- Yoshioka, Y., Emori, M., Ikekawa, T. and Fukuoka, F. 1975. Isolation, purification, and structure of components from acidic polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) *Quel. Carbohydrate Res.* **43**: 305-320.
- Yoshioka, Y., Tabeta, R., Saito, H., Uehara, N. and Fukuoka, K. 1985. Antitumor polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) *Quel.* isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Res.* **140**: 93-100.