

원형질체 융합 및 핵전이에 의한 새로운 담자균류의 개발에 관한 연구(I). 융합균사체의 항암성분

김병각,* 문 철, 윤종명, 김채균, 김하원,¹ 최응칠
서울대학교 약학대학 미생물약품화학교실, ¹서울시립대학교

Studies on Development of New Basidiomycetes by Protoplast Fusion and Nuclear Transfer I. The Antitumor Components of the Protoplast fusants

Byong Kak Kim,* Chul Moon, Jong Myung Yoon, Chae Kyun Kim,
Ha Won Kim¹ and Eung Chil Choi

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea; and
¹Seoul City University, Seoul 130-743, Korea

Abstract - To find pharmacologically active hybrids among the inter-order protoplast fusants of *Lentinula edodes* and *Ganoderma lucidum* the antitumor test was performed and the fusant P22 was selected among them. The hot water and alkaline extracts from the cultured mycelia of P22 were purified and separated into four fractions by DEAE-cellulose anion exchange chromatography. When a dose of 20 mg/kg/day of each fractions was injected into ICR mice by i.p., the tumor inhibition ratio of Fr. IV against solid sarcoma 180 was the higher than any other fraction. Fr. IV was a protein-bound polysaccharide which was composed of 69.12% polysaccharide and 9.76% protein and the molecular weight of Fr. IV was 6.7×10^4 dalton.

Key words - *Lentinula edodes*; *Ganoderma lucidum*; protoplast fusant P22; tumor inhibition ratio; protein-bound polysaccharide.

고등균류의 자실체인 버섯은 자연상태에서 균사 접합에 의해 재배되어 왔으나 환경의 악화, 병충해의 발생 등으로 안정재배가 어려워 생산력이 급격히 떨어지게 되었고, 이에 따라 새로운 품종 및 육종 방법의 연구가 필요하게 되었다. 이러한 연구의 일환으로서 원형질체 융합기법에 의한 유전자 전이기술이 개발되어 잡종이나 형질전환된 신품종의 개발이 가능하게 되었고,¹⁻³⁾ 본 연구실에서도 보다 약리활성이 큰 새로운 담자균류를 개발하기위해 영지속 균

주간의 원형질체 융합,⁴⁾ 영지와 구름버섯의 원형질체 융합⁵⁾ 구름버섯과 표고의 원형질체 융합⁶⁾ 및 영지와 표고의 원형질체 융합⁷⁾에 성공하였고, 항암작용, 간염치료작용, 후천성 면역 결핍성바이러스 복제억제작용, 인터페론 유발작용 등이 보고된 표고와 고혈압, 간염 및 신경쇠약 치료작용, 항암작용, 항앨러지작용 등 다양한 약리활성을 나타낸다고 보고된⁸⁻¹⁰⁾ 영지의 원형질체 융합체의 배양균사체를 열수 추출하여 sarcoma 180에 대한 항암력을 검색하여 우수한 항암력을 가진 융합체 P22를 선발하였고, 이 융합균사체로부터 추출한 성분의 항암작용 및 그화

*교신저자 : Fax 02-872-1795

항암특성에 대한 연구 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주, 배지조성, 배양방법 - *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. DMC-1 과 *Ganoderma lucidum* (Curt ex FR.) Karsten DMC-1의 영양요구성 둘 연변이주인 *Lentinula edodes* 4 (PABA): LE 4와 *Ganoderma lucidum* 1(hypoxanthine): GL1의 원형질체 융합체와 핵전이체를 CCM slant (glucose 20 g, peptone 4 g, yeast extract 4 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, agar 20 g)에서 7일간 배양(27±1 °C)한 융합체의 균사체를 200 ml의 액내배지(glucose 20 g, peptone 4 g, yeast extract 4 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g)에서 배양하여 1L 배지에 20% (v/v)로 접종하여 10일간 진탕배양(27±1 °C, 45 g)하여 각각 5 L의 배양액을 얻었다.

단백다당체의 추출 - 본 배양 후 각 배양액 5 L를 감압 여과하여 배양균사를 얻고 이를 증류수로 3회 세척한 후, 80~90 °C로 6시간 동안 3회 열수 추출하였다. 감압 여과로 균사체를 제거한 후 추출액을 감압 농축한 다음, 3배의 냉각된 95% ethanol을 가해 4 °C에서 24시간 방치하여 침전을 완결시켰다. 상정액은 버리고 침전물을 4 °C에서 7일간 투석한 후, 원심분리하여 상정액과 불용성 침전으로 분리하고 상정액은 감압 농축, 동결 건조하여 수용성의 갈색 건조 분말을 얻었다.

항암력의 검색 - 실험 동물은 4~5 주령의 ICR 마우스(♂, 20~25 g)를 서울대학교 실험 동물 사육장에서 공급받아 사용하였다. 사육장은 인공 조명에 의하여 조명 시간을 오전 7시부터 오후 7시까지 12시간으로 조절하였으며 실내 온도는 18~23 °C로 유지하였다. 사료는 고품사료(삼양사)를 사용하였고, 급수는 수도물을 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다. ICR 마우스의 복강내에서 7일간 배양된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 생리식염수로 세척한 후, sarcoma 180 세포만을 분리하였다. 생리식염수로 2×10⁶ cells/ml 이 되도록 부유액을 만들고, 이 부유액 0.1 ml (2×10⁵ cells/mouse)를 ICR 마우스의 왼쪽 서혜부에 피

하 이식하여 고품암을 유발시켰다. 암세포를 이식하고 24시간 후부터 생리식염수에 녹인 시료를 각각 20 mg/kg/day 의 용량으로, 대조군에는 생리식염수를 0.1 ml씩 매일 1회 10일간 연속하여 복강 내에 주사하였다. 모든 투여 시료는 121 °C, 1.1 kg/cm²에서 15분간 고압증기 멸균하였다. 암세포 이식 후 30일째 되는 날 실험 동물을 치사시키고, 유발된 고품암을 적출하여 그 중량을 측정하고 다음 식에 의거하여 종양 저지 백분율(percent inhibition ratio=I.R., %)을 계산하였다.

$$I.R. (%) = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

C_w : 대조군의 평균 종양 중량

T_w : 시료투여군의 평균 종양 중량

단백다당체의 추출, 분리 및 정제 - 상기의 실험에 의해 선별한 융합체 P22를 배양한 후, 배양액 100 L를 감압 여과하여 배양 균사를 얻고 증류수로 3회 세척한 다음 80~90 °C로 5시간 동안 3회 열수 추출하였다. 감압 여과한 추출액을 감압 농축한 다음, 3배의 냉각된 95% ethanol을 가하고 4 °C에서 24시간 방치하여 침전을 완결시켰다. 침전물을 4 °C에서 7일간 투석한 후, 원심분리하여 상정액을 감압 농축, 동결 건조하여 수용성의 갈색 건조 분말(이후 Fr.I이라 칭함) 7.8 g을 얻었다. 한편, 불용성 추출 잔사는 20~30 °C에서 10시간 동안 5% NaOH 용액에서 3회 알칼리 추출하여 감압 여과한 다음 여액을 1N CH₃COOH 용액으로 중화하고 감압 농축한 후, 상기와 동일한 방법을 실시하여 불용성의 짙은 갈색 건조 분말(이후 Fr.II라 칭함) 6.8 g을 얻었다. 상기에서 분리한 Fr.I 7.0 g을 탈이온수에 용해시킨 후, 원심분리하여 얻은 상정액을 diethylaminoethyl(DEAE)-cellulose resin (Cl⁻ form, Sigma Chem. Co., U.S.A.)으로 충전시킨 column(4 cm φ × 47 cm)에 적용시켰다. 탈이온수로 1 ml/min의 유속으로 용출시켜 effluent를 분획당 5 ml 씩 분취하였다. 각 분획에 대해 anthrone 반응과 Lowry-Folin test를 실시하여 다당체와 단백질을 확인하고 anthrone 반응 양성 분획들을 모아 감압 농축 후, 4 °C에서 탈이온수로 3일간 투석하고 동결 건조하여 황색 건조 분말(이후 Fr.III라 칭함) 1.59 g을 얻었다. DEAE-cellulose에 흡착된 성분

은 2 M NaCl 로 용출시킨 후, 분취한 각 분획에 대해 anthrone 및 Lowry-Folin test를 실시하여 다당체와 단백질을 확인한 후 anthrone 반응 양성 분획들을 모아 4 °C에서 3일간 투석하고 동결 건조하여 갈색 건조 분말(이후 Fr.IV 라 칭함) 2.56 g을 얻었다.

단백다당체의 항암 실험 - 고형암의 경우 항암력 검색 방법과 같은 방법으로 시행하였고, 복수암은 sarcoma 180 세포를 생리식염수로 2×10^6 cells/ml이 되도록 부유액을 만들고 이 부유액 0.1 ml (2×10^5 cells/mouse)을 ICR 마우스의 복강에 이식하여 복수암 유발에 사용하였다. 시료의 투여는 암세포를 이식하고 24시간 후부터 생리식염수에 녹인 시료를 각각 일정 용량으로 매일 1회씩 10일간 연속하여 복강 내에 주사하였다. 대조군에는 생리식염수를, 양성 대조군으로 Krestin 20 mg/kg/day를 0.1 ml씩 주사하였다. 모든 투여 시료는 121 °C, 1.1 kg/cm²에서 15분간 고압증기멸균하였다. 결과 판정은 복수암의 경우 암세포 이식 후 대조군과 시료 투여군의 생존 여부를 관찰하여 평균 생존일(mean survival day)을 계산한 다음, 평균 생존 백분율(mean survival rate, T/C, %)로 항암 효과를 조사하였다.

$$T/C(\%) = \frac{\text{Mean survival days of treated mice}}{\text{Mean survival days of control mice}} \times 100$$

항암성분의 화학적 분석 - 단당류의 분석은 각 시료 5 mg을 3% HCl-MeOH 2 ml과 함께 capped test tube에 넣고 질소로 충전한 후, teflon으로 밀봉시키고 80 ± 5 °C에서 20시간 methanolysis 하였다. 여과하여 감압 농축 후 pyridine 1 ml에 녹인 다음, hexamethyldisilazane (HMDS) 0.2 ml과 trimethylchlorosilane (TMCS) 0.2 ml을 가하고 격렬히 진탕하여, Gas Liquid Chromatography (GLC)를 실시하였다. 표준품으로 glucose, galactose, mannose, fucose, xylose 및 ribose (Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 동일한 조건으로 실시하여 각 당의 retention time으로 시료의 당을 동정 확인하고 peak의 면적으로부터 각 단당류를 정량하였다. 다당체의 함량 측정은 glucose, galactose, mannose, fucose, xylose 및 ribose의 혼합물을 표준으로 삼아 anthrone 반응

을 실시한 후, 625 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량선으로부터 다당체의 함량을 측정하였다. 단백질의 함량 측정은 Cooper의 방법¹¹⁾에 따라 Lowry-Folin 법으로 실시하였다. Bovine serum albumin (BSA, Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 표준으로 사용하여 Lowry-Folin 반응을 실시한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량선으로부터 시료 중의 단백질 함량을 측정하였다. Hexosamine 함량 분석은 Elson-Morgan 법¹²⁾에 따라 실시하였다. 표준 glucosamine에 대한 시약 A-1은 acetylacetone 1.5 ml + 0.5 N Na₂CO₃ 50 ml, 시료에 대한 시약 A-2는 acetylacetone 1.5 ml + 1.25 N Na₂CO₃ 50 ml로 하고 시약 B는 p-dimethylaminobenzaldehyde 1.6 g을 c-HCl 30 ml에 용해시킨 후 96% ethanol 30 ml을 가하여 조제하였다. 각 시료 10 mg을 1 ml의 3N-HCl과 함께 capped test tube에 넣고 공기를 질소로 치환한 후 teflon으로 밀봉하였다. 100 °C에서 15시간 동안 가수분해시킨 후 여액을 감압 농축하여 H₂O 1 ml에 용해하였다. 각각의 시료와 표준 glucosamine 0.5 ml에 시약 A-1 및 A-2를 각각 1 ml 가하고 96 °C에서 1시간 반응시킨 후 급냉시켰다. 96% ethanol 10 ml와 시약 B 1 ml를 가하고 실온에서 1시간 방치한 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucosamine을 이용하여 작성한 검량선으로부터 hexosamine의 함량을 측정하였다. IR 분석은 시료 1 mg을 KBr disc 법으로 Perkin-Elmer IR 20을 이용하여 분석하였다. Fr. IV의 분자량을 측정하기 위하여 표준당으로 분자량 2,000,000, 480,000, 162,000 및 38,000인 dextran(이상 Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 이용하여 sepharose CL-4B gel filtration chromatography를 실시하였다.

결과 및 고찰

항암력의 검색 및 항암성 융합체의 선발 - 표고와 영지의 원형질체 융합체들의 균사체를 열수 추출하여 얻은 분말에 대하여 sarcoma 180 고형암에 대한 항암 실험을 실시한 결과, P22의 종양억제율은 71.70%로 높게 나타났으며 성장속도도 빨랐다 (Table I). 따라서, P22를 항암성 융합체로 선발하

Table I. Antitumor activities of parents, protoplast fusants and nuclear transferants between *L. edodes* and *G. lucidum* against solid form of sarcoma 180

Group	Dose (mg/kg/day)	Average tumor weight(g) (mean±S.D.)	Inhibition ratio (%)	Complete regression (No. of mice)
Control	saline	6.75±1.55		
Krestin	20	4.02±1.50**	40.44	0/6
<i>L. edodes</i>	20	2.54±1.52**	62.37	1/6
<i>G. lucidum</i>	20	3.29±1.43**	51.26	0/6
LAG1P2S1	20	4.10±2.43*	39.26	0/6
2S2	20	4.54±2.02	32.74	0/6
18	20	3.30±1.98**	51.11	0/6
22	20	1.91±1.11**	71.70	1/6
30	20	3.83±2.81*	43.26	1/6
33	20	2.81±1.70**	58.37	0/6
38	20	4.33±2.30	35.85	0/6
39	20	2.85±1.87**	7.78	1/6
40	20	4.49±1.93*	33.48	0/6
47	20	2.86±1.40**	57.63	1/6
58	20	6.20±2.56	8.15	0/6
60	20	4.31±2.90	36.15	1/6
61S1	20	3.10±1.25**	54.07	0/6
61S2	20	5.24±2.51	22.37	0/6
68	20	3.69±1.07**	45.33	0/6
69	20	4.00±2.69	40.74	0/6
82	20	4.40±1.40*	34.81	0/6
LAG1N2	20	5.56±2.39	17.63	0/6
6	20	6.47±2.18	4.15	0/6
10	20	2.47±1.07**	63.41	0/6
12	20	1.75±0.77**	74.07	0/6
13	20	2.33±2.19**	65.48	0/6
15	20	4.63±0.89*	31.41	1/6
19	20	2.96±1.79**	56.15	0/6
24	20	4.68±1.59*	30.67	0/6
25	20	4.22±1.54*	37.48	0/6
26	20	4.32±2.68	36.00	0/6
27	20	5.23±2.14	22.52	1/6
32	20	3.48±2.57**	48.44	0/6
34	20	3.80±2.65*	43.70	0/6
39	20	5.53±2.55	18.07	1/6
50	20	1.49±1.16**	77.93	0/6
59	20	4.73±2.56	29.93	2/6
60	20	2.47±2.07**	63.41	0/6
62	20	2.33±1.85**	65.48	1/6
63	20	4.85±1.73	28.15	1/6

*p<0.05, **p<0.01

여 이후의 모든 실험을 실시하였다.

단백다당체의 분리 및 정제 - 원형질체 융합체 P 22의 배양액 100 L로부터 배양 균사체를 열수 추출하여 갈색 분말 Fr. I 7.8 g을 얻었고 추출 잔사를 상온에서 알칼리 추출하여 짙은 갈색 분말 Fr. II 6.

8 g을 얻었다. Fr. I에 DEAE-cellulose anion exchange chromatography를 실시하여 중성 다당체 분획인 황색 분말 Fr. III 1.59 g과 산성 다당체 분획인 갈색 분말 Fr. IV 2.56 g을 각각 분리하였다. 그 elution 양상은 Fig.1과 같다. 또한, Fr. IV에

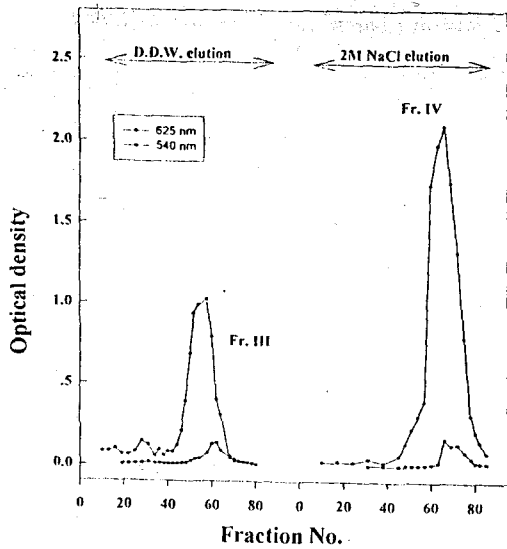


Fig. 1. The elution pattern of Fr. I by DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

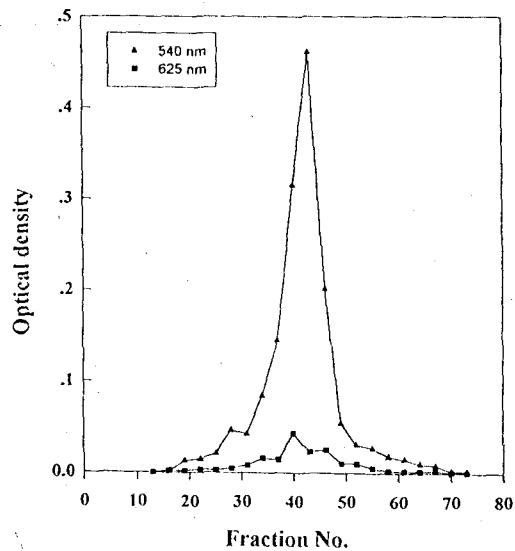


Fig. 2. The elution pattern of Fr. IV by sepharose CL-4B gel filtration chromatography.

spharose CL-4B gel filtration chromatography를 실시하여, 그 elution 양상을 Fig. 2에 나타내었다.

항암 작용 - 원형질체 융합체 P22의 배양 균사체로부터 분리 정제한 각 분획에 대하여 sarcoma 180 고형암에 대한 항암 실험을 한 결과, Fr. IV 20 mg/kg/day의 중앙 억제율이 63%로 가장 높게 나

Table II. Antitumor effects of P22 fractions on sarcoma 180 solid tumor

Fraction	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight (g. mean \pm S.D.)	Inhibition ratio (%)	Complete regression
Control		12.54 \pm 2.75	—	0/8
Krestin	20	6.07 \pm 2.94*	51.59	0/8
Fr. I	20	6.51 \pm 3.13*	48.08	0/8
	40	5.78 \pm 2.56*	53.90	1/8
Fr. II	20	8.53 \pm 2.56**	31.97	0/8
	40	8.91 \pm 3.44*	28.94	0/8
Fr. III	20	7.86 \pm 1.98*	37.32	0/8
	40	6.32 \pm 2.14*	49.60	1/8
Fr. IV	20	4.64 \pm 2.30*	62.99	1/8
	40	7.86 \pm 3.06*	37.32	0/8

* p<0.01, ** p<0.05.

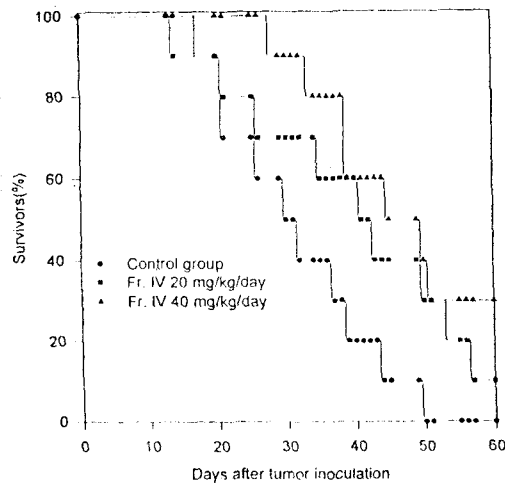


Fig. 3. Effects of Fr. IV on the life span against the ascitic form of sarcoma 180 in ICR mice.

타났다 (Table II). 따라서, 항암력이 가장 높은 Fr. IV를 주 항암 분획으로 결정하고, 이후 모든 항암 실험에 적용하였다. Fr. IV 투여군의 경우 sarcoma 180 복수암에 대한 평균 생존율이 20 mg/kg/day의 용량에서 129%, 50 mg/kg/day 용량에서 150%로 나타나 현저한 수명 연장 효과를 보였다 (Fig. 3, Table III).

항암성분의 화학적 성질 - 각 항암성분의 단당류 분석 결과, 다당체를 구성하는 단당류는 주로 glucose, galactose 및 mannose이었으며 (Table IV). 구성 단당류의 혼합물을 표준당으로 하여 측정한다 당체, BSA를 표준 단백질로 하여 그 검량선으로부터

Table III. Effects of Fr. IV from P22 on ascitic forms of sarcoma 180

Tumor	Group	Dose (mg/kg/day)	Mean survival time (day, Mean±S.D.)	T/C(%)*
S 180	Control	—	30.6±10.4	100.0
	Fr. IV	20	39.6±15.23	129.2
		40	45.8±11.46**	149.6

$$*T/C(\%) = \frac{\text{Mean survival time of treated group}}{\text{Mean survival time of control group}} \times 100$$

** p<0.01

Table IV. Monosaccharide contents of the polysaccharide moiety of each fraction from P22 by G. L. C. analysis

Monosaccharide	Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV
Glucose	32.7	68.1	28.4	53.9*
Galactose	8.2	4.4	23.9	6.7
Mannose	40.1	14.7	19.5	29.3
Fucose	5.2	3.4	4.8	4.7
Xylose	10.7	8.1	23.3	5.4
Ribose	3.1	1.3	N.D.	N.D.**

* Mole percentage. ** N.D. means not detected.

Table V. Polysaccharide, protein, hexosamine contents of antitumor components of fusant P22

Fraction	Polysaccharide(%)	Protein(%)	Hexosamine(%)
I	76.54	18.04	1.54
II	57.23	20.88	1.23
III	82.89	4.69	0.89
IV	69.12	9.76	1.20

터 구한 단백질, 다당체와 단백질을 결합시키는 hexosamine이 각 분획마다 소량씩 있는 것으로 보아 단백질다당체 결합체인 것으로 보인다(Table V). Fr. IV의 분자량을 측정하기 위해 Sepharose CL-4B gel filtration chromatography를 실시하였을 때 Fr. IV의 분자량은 약 6.7×10^4 dalton이었다. 각 성분의 IR spectra 결과는 일반적인 단백질 결합 다당체의 결과와 유사하였다.

결론

표고와 영지의 원형질체 융합체들에 대해 sarcoma 180 고형암에 대한 항암 실험을 실시하여 항

암력이 우수한 융합체인 P22를 선발하였다. P22의 배양 균사체로부터 열수 추출한 분획 Fr. I을 DEAE-cellulose anion exchange chromatography를 통하여 분획 Fr. III, IV로 분리, 정제하였고, 추출 잔사로부터 알칼리 용성 분획인 Fr. II를 얻었다. Sarcoma 180 고형암에 대한 종양 억제율은 Fr. IV는 62.99%로 가장 우수하였으며, 동계 복수암에 대한 수명 연장 효과도 150%의 유의적인 결과를 나타내었다. Fr. IV는 다당체 69.12%, 단백질 9.76% 및 hexosamine 1.20%로 이루어진 단백질 결합 다당체였고, 분자량은 67 kD이었다.

사사

이 연구에 소요된 경비의 일부는 한국학술진흥재단 및 서울대학교 신의약품개발연구센터(KOSEF-RCNDD)의 연구비로 충당되었으며 이에 감사하는 바입니다.

인용문헌

1. Bok, J. W., Park, S. H., Choi, E. C., Kim, B. K. and Yoo, Y. B. (1990) Studies on protoplast formation and regeneration of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* 18: 115-126.
2. Choi, S. H., Kwak, J. H., Choi, E. C., Kim, Y. C., Yoo, Y. B. and Kim, B. K. (1987) Studies on protoplast formation and regeneration of *Ganoderma lucidum*. *Arch. Pharm. Res.* 10: 58-164.
3. Peberdy, J. F. (1979) Fungal protoplast isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 21-39.
4. Park, S. H., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1989) Studies on protoplast and nuclear fusion of *Ganoderma* species. *Proc. Int. Symp. on New Drug Development from Natural Products*. May 2, 172-207.
5. Park, S. H., Choi, E. C. and Kim, B. K. (1991) Studies on intergeneric protoplast and nuclear fusion between *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*. *Arch. Pharm. Res.* 14: 282-283.
6. Kim, C. K. (1993) Interorder protoplast fusion and nuclear transfer between *Lentinus edodes* and *Coriolus versicolor*. Ph. D. thesis.

- Graduate School, Seoul National University
7. Bok, J. W. (1994) Studies on protoplast fusion between *Lentinula edodes* and *Ganoderma lucidum*. Ph.D. thesis, Graduate School, Seoul National University
 8. Chung, K. S., Choi, E. C., and Kim, B. K. (1984) Studies on constituents of higher fungi of Korea(XLI). An antitumor fraction from the culture filtrate of *Lentinus edodes* DMC-7. *Kor. J. Mycol.* 12: 129-132
 9. Kim, B. K., Park, E. K., and Shim, M. J. (1979) Studies on constituents of higher fungi of Korea(XXIII). Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Arch. Pharm. Res.* 2: 145-151
 10. Park, D. W., Shim, M. J. and Kim, B. K. (1979) Studies on constituents of higher fungi of Korea(XVII). Production of antineoplastic components by the submerged culture of *Lentinus edodes*. *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* 4: 19-30.
 11. Cooper, T. G. (1977) The Tools of Biochemistry, 53-55. J. Willey & Sons, New York.
 12. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. (1987) The Elson- Morgan assay for hexosamine. *Carbohydrate Analysis*, 134. IRL Press, Oxford.

(1996년 8월 28일 접수)