

## 영지(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 액체배양에 의한 세포외 항암활성 다당류의 구조분석

이신영\* · 강태수<sup>1</sup>

강원대학교 환경 생물공학부 및 연세대학교 생물산업소재연구센터,  
<sup>1</sup>강원도 농업기술원

### Structural Analysis of the Antitumor Active Exo-polysaccharide Produced by Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum* Mycelium

Shin-Young Lee\* and Tae-Su Kang<sup>1</sup>

Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea  
and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

<sup>1</sup>Kangwon-do Agricultural Research and Extension Service, Chuncheon 200-150, Korea

**ABSTRACT:** Exo-polysaccharide obtained from the submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium was fractionated. The structural analysis of the acidic exo-polysaccharide fraction (BWS-DA-GI), showing high antitumor activity, was carried out and compared to the mycelial acidic fraction (MWS-DA-GI). The major sugar constituents of the fraction of BWS-DA-GI were glucose, galactose and mannose in the molar ratio of 2.5 : 2.1 : 2.5. The minor components in this fraction were xylose and fucose. While the major sugar constituents of the mycelial acidic fraction of MWS-DA-GI were galactose, fucose, mannose and glucose. The trace components in this fraction was xylose. From the results of periodate oxidation, Smith degradation, affinity chromatography and methylation analysis, the chemical structures of the two fractions, BWS-DA-GI and MWS-DA-GI were both determined as  $\beta$ -1,3 glucans. It was also estimated that BWS-DA-GI had a 1 $\rightarrow$ 6 glucosidic linkage and MWS-DA-GI had 1 $\rightarrow$ 4 and 1 $\rightarrow$ 6 glucosidic linkages. The molecular weights of these fractions, BWS-DA-GI and MWS-DA-GI were estimated as  $1.2 \times 10^6$  and  $1.0 \times 10^6$  dalton, respectively.

**KEYWORDS:** Antitumor active exo-polysaccharide, *Ganoderma lucidum*, Structural analysis

영지(*Ganoderma lucidum*) 버섯 유래 다당류는 항암활성 등, 각종 생물활성을 갖는 것으로 보고되고 있다(Eyal, 1991; Jong and Birmingham, 1992).

이들 영지버섯 자실체나 균사체 추출물 유래의 다당류는 평균 분자량이 약 30~100만인  $\beta$ -1,6분지를 보유한  $\beta$ -1,3-glucan으로 Sarcoma 180에 대한 항암 활성은 다당류의 가지정도나 측쇄의 상태에 따라 다르며, 추출 및 분획방법 등에 따라서도 달라져, 물에서 추출한 비교적 분지도가 큰 것은 활성이 강하나, 알카리에 의해 추출된 물불용성 glucan은 분지도가 작고 매우 약한 활성을 나타낸다고 보고되고 있다(水野·川合, 1992; Mizuno *et al.*, 1985). 이 밖에 정제도, 용해도 및 분자량의 크기 등도 항암활성에 영향을 준다고 알려지고 있다(Usui *et al.*, 1981).

그러나 그동안의 연구는 대부분이 영지버섯 자실체나 액체배양의 균사체로부터 열수 또는 알카리 추출하여 얻어진 다당을 대상으로 하여 얻은 결과로 영지 균사체의 액체배양으로 생산한 세포외 다당과 관련하여서는 그 화학특성이 밝혀져 있지 않다. 그동안의 관련 연구로는 Sone *et al.* (1985) 및 Tseng(1984)이 *Ganoderma lucidum* 균사체의 액

체배양 여액에 자실체 및 균사체 유래의 다당과 유사한 다당이 존재함을 보고하였을 뿐이어서 아직은 불분명한 점이 많은 바, 이에 대한 충분한 검토가 필요하다.

그동안 저자 등(이·강, 1996; 이 등, 1996; 이·강, 1997)은 영지균사체의 액체배양에 의해 세포외 다당을 생산하고, 이의 최적화 연구를 수행하였으며, 이들 세포외 다당의 각종분획에 대한 항암활성을 탐색하여 세포외 수용성 산성 다당 분획에서 매우 우수한 항암활성을 가짐을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 우수한 항암활성을 갖는 이 세포외 수용성 산성다당 분획에 대한 구조적 특성을 균사체 유래의 다당과 비교하면서 검토하였고, 이로부터 이 세포외 다당의 화학특성을 밝히고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양

본 연구에 사용한 균주는 *Ganoderma lucidum* ASI 7004로 농촌진흥청에서 분양받았으며, PDA(Potato Dextrose Agar)에서 보존하였다. 배양은 glucose 5%, yeast extract 0.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.1% 및  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%(w/v)의 조

\*Corresponding author

성을 갖는 배지를 사용하여 10 L 용량의 Jar-fermentor (Bioengineering, L1523, Swiss)에서 접종량 5%(v/v), pH 5.0, 온도 30°C, 교반 속도 100 rpm 및 통기량 0.5 vvm으로 7일간 배양하였다.

#### 다당의 분리 및 정제

세포의 수용성 산성 다당분획(BWS-DA-GI)은 Fig. 1에서와 같이 분획, 정제하였다.

배양액을 원심분리(2,500×g, 30 min)하여 얻은 여액을 배제분자량(MWCO)이 100,000인 환외여과장치(Sartocon

Mini SM 17521, Germany)로 24시간 농축하였다. 이 농축액에 2배량의 acetone을 가하였고, 4°C에서 하루 방치한 다음, 생성된 침전물을 2일간 투석한 후, 동결건조하여 세포외 조다당으로 하였다. 세포외 조다당은 실온의 증류수를 가하고, 24시간 동안 교반하면서 용해한 다음, 원심 분리하여, 상등액을 얻어 이를 농축한 후, 동결건조하여 수용성의 세포외 다당으로 하였다. 또 이 세포외 수용성 다당은 DEAE-cellulose(Cl<sup>-</sup>) ion exchange chromatography 및 Sepharose CL-4B gel chromatography를 순차적으로 실시하여 세포외 수용성 산성다당 분획(BWS-DA-GI)으로 정제하

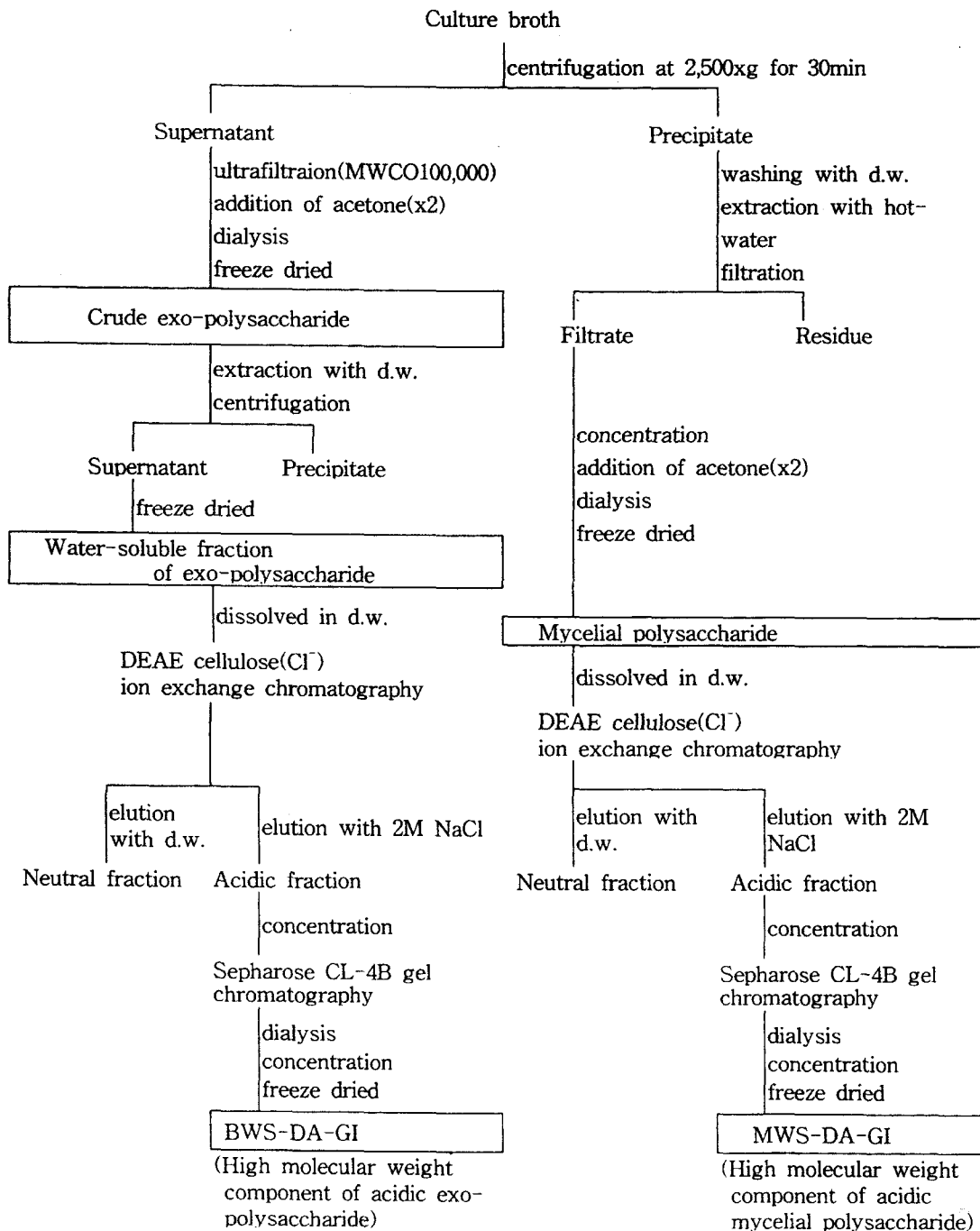


Fig. 1. Purification of acidic-polysaccharide fractions from the culture broth of *Ganoderma lucidum*.

였다.

균사체 유래 산성다당 분획(MWS-DA-GI)의 경우도 세포 외 다당과 동일한 방법으로 정제하였다. 이때 각 chromatography는 전보(이 등, 1996)에서와 동일한 방법으로 실시하였다.

### 구성당 분석

구성당의 분석은 다당시료를 가수분해하고, TMS(trimethylsilylation)화(Brobst와 Lott, 1966) 한 다음, gas liquid chromatograph(Varian Star 3400 CX)로 분석하였다. 분석은 3% OV-101 packed column을 사용하였으며, column 및 detector의 온도를 각각 150~175°C 및 200°C로 조절하였다. 또 He, H<sub>2</sub> 및 air의 유속은 각각 30, 50 및 50 ml/min으로 하였고, FID detector를 사용하였으며, chart speed는 분당 0.2 cm로 하였다.

### 과요오드 산화 및 Smith 분해

정제시료 20 mg을 0.05M NaIO<sub>4</sub> 20 ml에 용해하고, 4~5°C의 암소에서 7일간 산화시켰다. 이때 경시적으로 소비된 periodate 및 생성된 formic acid의 양은 각각 분광분석법 및 알칼리 적정법으로 구하였다(Hay 등, 1985). 한편, 산화 완료액은 BaCO<sub>3</sub>로 중화하고, 여과후 여액에 NaBH<sub>4</sub> 20 mg을 가하여 1일간 실온에서 환원시켰다. 10%(v/v)의 초산을 가하여 과량의 NaBH<sub>4</sub>를 분해하고 2일간 투석한 다음, 농축하여 동결건조하였다. 얻어진 polyol 다당을 0.1N HCl용액에서 6~8시간 가수 분해하였고, 이를 중화하여 얻은 시료의 일부는 TMS화하여 구성당 분석에서와 같은 조건으로 GC 분석하였다.

### 친화 크로마토그래피

Concanavalin A-sepharose 4B를 column(1.2×25 cm)에 충전하고 sodium phosphate buffer(pH 7.0 in 1M NaCl)로 평형시킨 다음, 24 ml/hr의 유속으로 용출시키면서 4 ml씩 분획하였다. 비흡착부의 다당을 β형의 다당 분획으로 하였으며, 흡착부는 0.05M methyl-α-D-glucoside(pH 7.0 in 1M NaCl)로 용출하여 α형의 분획으로 하였다.

### 메틸화 분석

정제시료 10 mg을 2.0 ml의 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 넣고 sonicator(Fisher Co. model 150)에서 용해한 후, 미리 제조된 methylsulfinyl methylsodium용액 0.5 ml를 가해 25°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 여기에 CH<sub>3</sub>I 1.5 ml를 가하고 25°C에서 15분간 sonicator로 용해한 다음, 실온에서 4~5시간 방치하였다. 그 후 소량의 물을 가하여 중화하고 chloroform으로 수회에 걸쳐 추출한 다음, 농축하여 메틸화 다당시료를 얻었다. 이 메틸화 다당시료에 90%(v/v)의 formic acid 1~2 ml를 가하고 실온에서 15분간 용해한 후, 질소 gas를 충전하여 105°C에서 1.5시간 가열하였다. 잔존 formic acid를 제거하고, 다시 질소 gas를 충전한 다음,

105°C에서 12~18시간 동안 반응시키고 BaCO<sub>3</sub>로 중화하였다. 시료액 10 ml당 NaBH<sub>4</sub> 10~15 mg를 가해 실온에서 12시간 동안 환원시킨 다음, methanol로 시료액을 녹이고, acetic anhydride와 pyridine(1:1) 0.5 ml를 가하여 105°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 ether를 가해 잔존 용매를 제거한 다음, 시료를 소량의 chloroform에 녹여 Table 1의 조건으로 GC분석하였다(Bjorndal 등, 1970).

### 분자량

0.4M NaCl용액으로 평형시킨 Sepharose CL-4B를 column(2.5×95 cm)에 충전하고, 시료 및 표준당(Blue dextran의 2종)시료액을 0.4M NaCl용액을 이용하여 40 ml/hr의 유속으로 용출시키면서 4.0 ml씩 분획하였다. 각 시료분획의 용출부피(Ve)와 void volume(Vo) 및 gel bead volume(Vx)을 각각 구한 후, 분배계수(Kav)와 분자량의 대수값을 도시하여 얻은 표준곡선으로부터 각 다당 시료들의 분자량을 산출하였다. 이때 각 분획의 당정량은 페놀황산법으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 구성당 및 조성

세포의 산성다당(BWS-DA-GI) 및 균사체 유래의 산성다당분획(MWS-DA-GI)에 대한 구성당과 그 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다.

생물활성이 우수한 세포의 다당 유래의 산성분획인 BWS-DA-GI는 glucose, mannose 및 galactose가 다량 함유되어 있었으며, 미량의 xylose 및 fucose가 함유되어 있었는데, 이때 glucose, galactose 및 mannose의 몰비는 2.5:2.1:2.5이었다. 이 결과는 영지 배양여액의 당성분이 glucose, mannose 및 소량의 galactose라고 한 Sone 등(1985)의 보고 사실과 비슷하였다. 그러나 균사체 유래의 산성 다당분획인 MWS-DA-GI는 다량의 galactose, fucose, mannose 및 glu-

**Table 1.** Conditions of GC for the analysis of methylated polysaccharides

Instrument	Hewlett Packard 5890 Series II Gas chromatography
Detector	Flame Ionization Detector (F.I.D.)
Column	Ultra 2 capillary column, cross-linked 5% phenyl-methyl silicone, 25 m(L)×0.25 mm(ID) ×0.17 μm film-thickness
Temperature	Column oven; 200°C Injection port; 200°C Detector block; 250°C
Flow rate	Carrier gas(N <sub>2</sub> ); 1 ml/min Hydrogen(H <sub>2</sub> ); 30 ml/min Air; 400 ml/min
Split	100:1
Injection volume	1 μl

cose와 미량의 xylose가 함유되어 있어서 세포의 다당의 구성당은 역시 균사체 유래 다당의 구성당과 거의 차이가 없었으나 그 조성에서는 차이를 보였다.

**다당의 결합분석**

세포의 산성다당(BWS-DA-GI) 분획 및 균사체 산성다당 분획(MWS-DA-GI)의 당결합 양상을 조사하기 위하여 과요오드 산화를 검토하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

그림에서 보는 바와 같이 두 시료 모두 IO<sub>4</sub><sup>-</sup>를 소모함과 동시에 formic acid를 생성하였으며, 반응 2일 이후에 일정 값에 도달하였다. 그림의 기울기로부터 외삽(extrapolation)하여 IO<sub>4</sub><sup>-</sup> 소모량과 formic acid의 생성량을 몰비로 환산한 결과, 세 시료의 몰비는 모두 약 2:1이었다.

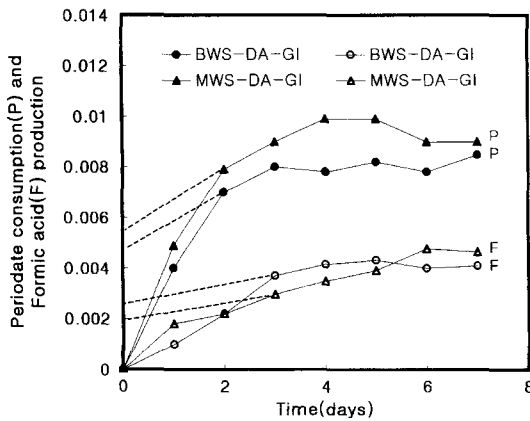
일반적으로 1,3-glucan이 잔기가 없을 경우에는 과요오드 산화시 비환원 말단과 환원말단은 산화하여 IO<sub>4</sub><sup>-</sup> 소모량과

formic acid를 5:3의 몰비로 생성하고 결합중에 있는 주쇄는 산화되지 않는다. 또 1,6잔기를 보유한 1,4 glucan의 경우도 산화되어 IO<sub>4</sub><sup>-</sup>는 소모되나 formic acid는 생성되지 않는다(水野와 西疫, 1971). 결국 BWS-DA-GI 및 MWS-DA-GI는 모두 1,3-glucan으로 존재하며, 1,6분지를 보유하고 있음을 알 수 있었다. 아울러 Smith 분해 후 생성물을 GC분석한 결과를 보면(Fig. 3), 역시 BWS-DA-GI 및 MWS-DA-GI는 모두 산화되지 않은 1,3-glucan의 가수분해로 나타나는 glucose와, 환원말단과 비환원 말단 및 1,6분지로부터 생성된 glycerol의 생성이 확인되었으며, 특히 MWS-DA-GI에서는 erythritol도 확인되어 1,4결합의 분지도 보유하고 있는 것으로 판단되었다.

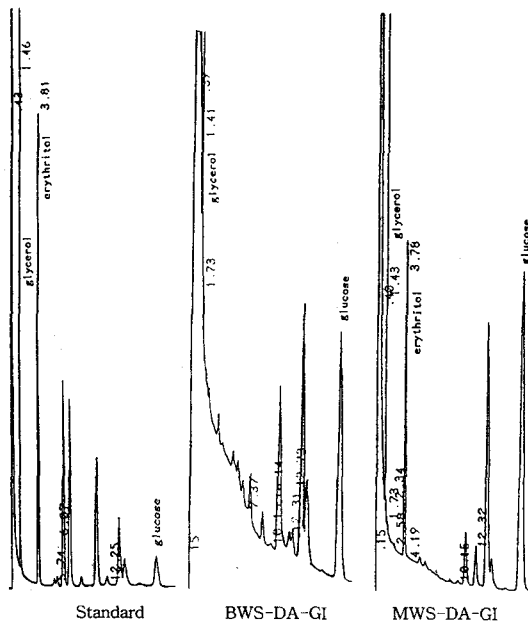
또, 이들 다당분획에 대한 glucoside 결합의 입체배위( $\alpha$ -또는  $\beta$ -형)를 알아보기 위한 affinity chromatography의 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 BWS-DA-GI 및 MWS-DA-GI가 모두 비흡착구에서 당성분이 검출된 반면, 흡착구에서는 거의 검출되지 않았다. 그러므로 이들 산성의 두 다당시료는  $\beta$ -형의 입체배위를 갖는 다당임을 확인할 수 있었다.

한편, 2종의 시료(BWS-DA-GI, MWS-DA-GI)에 대한 미세구조를 확인하기 위하여 각각 methylation 후 GC분석을 행한 결과는 Table 2와 같다.

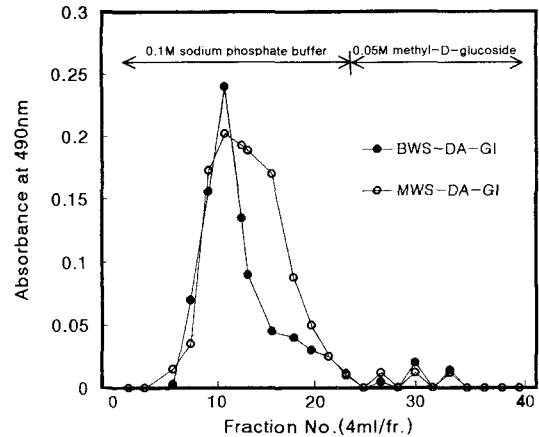
산성 다당시료인 BWS-DA-GI와 MWS-DA-GI는 둘 다 가장 많은 2,4,6-tri-o-methyl-glucose의 함량을 나타내어서  $\beta$ -1,3 결합이 주쇄인 것으로 생각되었다. BWS-DA-GI의 경



**Fig. 2.** The results of periodate oxidation of the polysaccharide fractions.



**Fig. 3.** Gas chromatograms of smith degradation of the polysaccharide fractions.



**Fig. 4.** Affinity chromatography of the polysaccharide fractions on Concanavalin A-sepharose 4B.

**Table 2.** Contents of monosaccharide of the polysaccharide fractions obtained from *Ganoderma lucidum*

Fraction <sup>1</sup>	Monosaccharide component (Molar ratio)				
	Glucose	Galactose	Xylose	Mannose	Fucose
BWS-DA-GI	2.5	2.1	trace	2.5	trace
MWS-DA-GI	0.9	2.3	trace	1.3	2.3

<sup>1</sup>BWS-DA-GI; High molecular weight component of acidic exo-polysaccharide by gel chromatography

MWS-DA-GI; High molecular weight component of acidic mycelial polysaccharide by gel chromatography

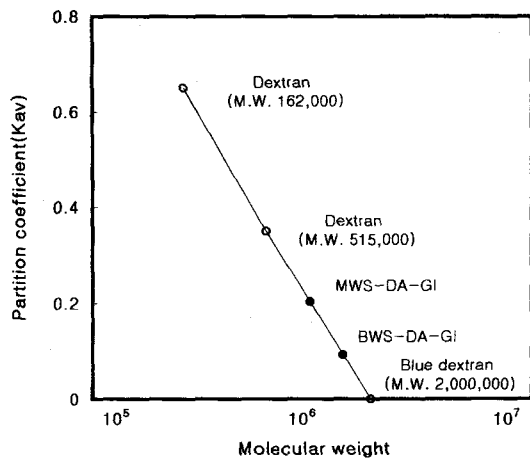


Fig. 5. Molecular weight determination of the polysaccharide fraction by Sepharose CL-4B gel chromatography.

Table 3. Methylation analysis of the polysaccharide fractions

Methylated sugar <sup>1</sup>	Polysaccharide fraction (Molar)		Linkage
	BWS-DA-GI	MWS-DA-GI	
2,3,4,6-M4-Glu	1.0	1.0	[Glu]1→
2,4,6-M3-Glu	2.9	2.9	→3[Glu]1→
2,3,6-M3-Glu	N.D. <sup>2</sup>	0.5	→4[Glu]1→
2,4-M2-Glu	0.9	1.2	→3 →6[Glu]1→
2,6-M2-Man	N.D.	1.5	→4 →3[Man]1→
2,3,4-M3-Man	1.5	0.8	→6[Man]1→
2,3,4-M3-Gal	0.9	1.2	→6[Gal]1→
2,3,4-M3-Fuc	N.D.	1.1	[Fuc]1→

<sup>1</sup>; Glu: glucose, Man: mannose, Gal: galactose, Fuc: fucose

<sup>2</sup>; Not detected

우, 2,4-di-o-methyl-glucose가 존재하여  $\beta$ -1,3결합으로 이루어진 주쇄중, 당의 6번 위치에 잔기가 결합되어 있음을 보여 주었으며, 2,3,4,6-tetra-o-methyl-glucose가 존재하므로 이는 주쇄나 분지의 비환원말단으로부터 생성되었음을 알 수 있었다. 그러나 2,3,6-tri-o-methyl-glucose는 존재하지 않아 1,4결합은 없음을 알 수 있었다.

한편, MWS-DA-GI의 경우는 2,4-di-o-methyl-glucose가 존재하여  $\beta$ -1,3결합으로 이루어진 주쇄중, 당의 6번 위치에 잔기가 존재하고 있으며, 특히, 2,3,6-tri-o-methyl-glucose가 존재하여 1,4결합도 존재하고 있음을 알 수 있었다. 또 두 고분자 다당시료는 모두 mannose와 galactose를 1,6분지로 가지고 있었다.

따라서 이상의 결과로부터 이들 2종의 산성 다당은 모두  $\beta$ -1,3-glucan으로, 세포의 산성 다당 분획인 BWS-DA-GI는 1,6분지를, 그리고 균사체 유래의 산성 다당 분획인 MWS-DA-GI는 1,4 및 1,6 분지를 갖는 다당인 것으로 추정하였다.

### 분자량

이상에서  $\beta$ -1,3-glucan으로 밝혀진 BWS-DA-GI 및 MWS-DA-GI의 분자량을 결정하기 위하여 gel chromatography하고, 분배계수(Kav)와 분자량의 대수 값을 도식한 결과는 Fig. 5와 같다.

표준곡선으로부터 산출한 BWS-DA-GI 및 MWS-DA-GI 다당분획의 분자량은 각각 1,200,000 및 1,000,000 dalton이었다. 이는 Misuno 등(1984)이 *Ganoderma applanatum*의 항암효능을 나타내는  $\beta$ -glucan의 분자량으로 보고한 1,050,000과는 비슷하였다. 그러나 Sone 등(1985)이 *Ganoderma lucidum* 균사체의 액체배양 여액으로부터 얻은 다당의 분자량으로 보고한 1,800,000 보다는 낮았다.

### 적 요

영지 균사체의 액체 배양에 의하여 생산된 세포의 다당 시료 분획중 우수한 항암활성을 나타내었던 산성분획인 BWS-DA-GI의 구조를 균사체 유래의 산성 다당 분획(MWS-DA-GI)과 비교하면서 조사하였다. BWS-DA-GI의 구성성분을 검토한 결과, 다량의 glucose, mannose 및 galactose와 미량의 xylose 및 fucose를 함유하였으며, glucose, galactose 및 mannose의 몰비는 2.5:2.1:2.5이었다. 반면, 균사체 유래의 산성 다당 분획인 MWS-DA-GI는 다량의 galactose, fucose, mannose 및 glucose와 미량의 xylose를 함유하였다. 또 BWS-DA-GI의 구조를 균사체 유래의 다당 분획인 MWS-DA-GI와 비교하면서 과요오드 산화, Smith분해, affinity chromatography 및 메칠화 분석으로 조사한 결과, 두 시료 모두  $\beta$ -1,3-glucan이었고, BWS-DA-GI는 1,6분지를 보유하고 있는 반면, MWS-DA-GI는 1,4 및 1,6분지를 함께 보유하는 것으로 추정되었으며, 분자량은 각각 1,200,000 및 1,000,000 dalton이었다.

### 감 사

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 일부 연구비 지원(97-K3-0407-02-02-2)에 의거 수행된 연구결과입니다.

### 참고문헌

- 이신영, 강태수. 1996. 영지(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 액체배양에 의한 세포의 생물고분자의 생산과 특성. 한국산업미생물학회지 24: 111-118.
- 이신영, 강태수, 문순옥, 류인덕, 이명열. 1996. 영지(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 액체배양에 의한 세포의 수용성 다당류의 분획정제 및 항암활성. 한국산업미생물학회지 24: 459-464.
- 이신영, 강태수. 1997. *Ganoderma lucidum* 균사체의 심부배양에 의한 세포의 항암활성 다당 생산의 최적화. 한국생물공

- 학회지 **12**: 139-145.
- 水野 卓, 川合正允. 1992.キノコの 化學 生化學. Pp.289-295. 新日本印刷 株式會社, 東京.
- 水野 卓, 西疫一俊. 1971. 糖質化學便覽. Pp.360-372. 公立出版. 東京.
- Bjorndal, H., Hellerqvist, C. G., Lindberg, B. and Svensson, S. 1970 Gas Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Methylation Analysis of Polysaccharides. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **9**: 610-611.
- Brobst, K. M. and Lott, C. E. 1966, Determination of Some Component in Corn Syrup by Gas Liquid Chromatography of the Trimethylsilyl Derivatives. *Cereal Chem.* **43**: 35.
- Eyal, J. 1991. Mushroom Mycelium Grown in Submerged Culture-Potential Food Applications. Pp.31-42. In: Goldberg, I. and Williams, R. eds., *Biotechnology and Food Ingredients*. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Hay, G. W., Lewis, B. A. and Smith, F. 1985. Periodate Oxidation of Polysaccharides: General Procedures, Pp.357-360. In: Whistler, R. L. ed., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 5. Academic Press New York.
- Jong, S. C. and Birmingham, J. M. 1992. Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*. *Advances in Applied Microbiology* **37**: 101-134.
- Mizuno, T., Suzuki, E., Maki, K. and Tamaki, H. 1985. Fractionation, Chemical Modification and Antitumor Activity of Water-Insoluble Polysaccharides of the Fruiting Body of *Ganoderma lucidum*, *Nippon Nogekagaku Kaishi* **59**: 1143-1151.
- Mizuno, T., Kato, M., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K. and Shimizu, M. 1984. Fractionation, Structural Features and Antitumor Activity of Water-Soluble Polysaccharide from "Reishi", the Fruit Body of *Ganoderma lucidum*, *Nippon Nogekagaku Kaishi* **58**: 871-880.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, A., Kishida, A. and Misaki, A. 1985. Structures and Antitumor Activities of the Polysaccharides Isolated from Fruiting Body and the Growing Culture of Mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2642-2650.
- Tseng, T. C. 1984. Studies on *Ganoderma lucidum* 1. Liquid Culture and Chemical Composition of Mycelium. *Bot. Bull. Acad. Sin(Taipei)* **25**: 149.
- Usui, T., Iwasaki, Y., Hayashi, K., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M. 1981. Antitumor Activity of Water-Soluble  $\beta$ -D-Glucan Elaborated by *Ganoderma applanatum*, *Agric. Biol. Chem.* **45**: 323-326.