

신령버섯(*Agaricus blazei*)으로부터 면역증강활성 다당류의 분리 및 화학적 특성

조수묵* · 박정식 · 김광포 · 차동열 · 김환묵¹ · 유익동¹

농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과
¹한국과학기술연구원 생명공학연구소

Chemical Features and Purification of Immunostimulating Polysaccharides from the Fruit Bodies of *Agaricus blazei*

Soo-Muk Cho*, Jeong-Sik Park, Kwang-Po Kim, Dong-Yeol Cha,
Hwan-Mook Kim¹ and Ick-Dong Yoo¹

Applied Microbiology Division, Nat'l Inst. of Agri. Sci. & Tech., RDA, Suwon 441-707, Korea

¹Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, P.O. Box 115,

Yusong, Taejon 305-600, Korea

ABSTRACT: Water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill were extracted with 0.9% sodium chloride and hot water, successively. The purified polysaccharides showed a potent immunostimulating activity. Eight major polysaccharides, which were named from AG-1 to AG-8, were fractionated and purified by ethanol precipitation, ion exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration on Toyopearl HW 65F. These polysaccharides were identified to be homogeneous by analysis of HPLC. Three major active polysaccharides (AG-2, -3, and -6) showed relatively strong immunostimulating activity. AG-2 and -3 were composed of glucose, galactose and mannose in the molar ratios of 74.0:15.3:10.7 and 63.6:17.6:12.7, respectively. AG-6 was composed of glucose and ribose in the molar ratios of 81.4:12.6.

KEYWORDS: *Agaricus blazei*, Polysaccharides, Immunostimulating activity

신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 들버섯속에 속하는 식용버섯류로서 1965년 브라질에서 처음 수집 보고되었으며, 1978년 일본의 Iwada Mushroom Institute에서 인공 재배 방법이 보고되었다(Mizuno 등, 1990a). 이 버섯은 고온기에 생육하는 버섯으로 양송이와 유형적으로 비슷하나 대가 굵고 강한 향을 지니고 있는 특징을 갖고 있으며 최근 자실체의 열수와 약알칼리 수용액 추출물로부터 얻은 다당류(1→6)-; (1→3)-β-D-glucan과 (1→6)-; (1→4)-α-D-glucan이 sarcoma 180/mice에 대한 90% 이상의 높은 저해활성이 보고되면서 새로운 생물반응 조절제(Biological Response Modifier, BRM)로 대두되고 있다(Mizuno 등, 1990a & 1990b).

담자균의 세포벽을 구성하는 성분중 다당류 β-glucan이 sarcoma-180과 같은 allogenic 및 syngenic tumor에 효과가 높은 것으로 보고되면서(Franz, 1989), 많은 연구자에 의해 담자균을 대상으로 다당류에 관한 연구가 이루어지고 있다. 특히 담자균류의 다당류 추출은 주로 중성염, 열수 및 알칼리 추출법등이 사용되어 왔으며(Misaki, 1981; Jong and Donovick, 1989; 조 등, 1995a), 다당류의 종류는 사용되는 균주, 추출용매, 추출온도 등의 요인에 의하여 좌우된다(松田, 1989). Mizuno 등(1990a & 1990b)과 Kawagishi 등(1989)은 신령버섯의 자실체, 균사체 그리고 균사 배양액으

로부터 열수 및 알칼리 용액으로 추출하여 (1→6)-; (1→3)-β-D-glucan, (1→6)-; (1→4)-α-D-glucan, xyloglucan-protein complex, RNA-protein complex 등의 다당류를 분리 보고하였다.

본 연구에서는 신령버섯 자실체로부터 0.9% sodium chloride와 열수 추출 후 이온 및 겔 여과 크로마토그래피로 분리 정제하여 얻은 다당류의 화학적 특성을 조사하여 일부 보고와 다른 종류의 다당류를 얻었으며 이들의 임파구의 항체형성능 촉진효과를 조사하였다.

재료 및 방법

공시 재료

농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과에 보관중인 신령버섯(*Agaricus blazei*) ASI 1174 균주를 농진청에서 개발된 재배법(박 등, 1996)에 준하여 자실체를 얻은 후 60±2°C에서 1~2일간 열풍 건조한 다음 본 실험에 사용하였다.

다당류의 분리 및 정제

건조된 자실체 2 kg을 blender로 마쇄한 다음 80% ethanol에 침지하여 상온에서 48시간 동안 추출한 후 남은 잔여물을 0.9% sodium chloride와 열수 추출을 순차적으로 실시하고 이들 두 분획은 에탄올 침전, 투석 그리고 동결건

*Corresponding author

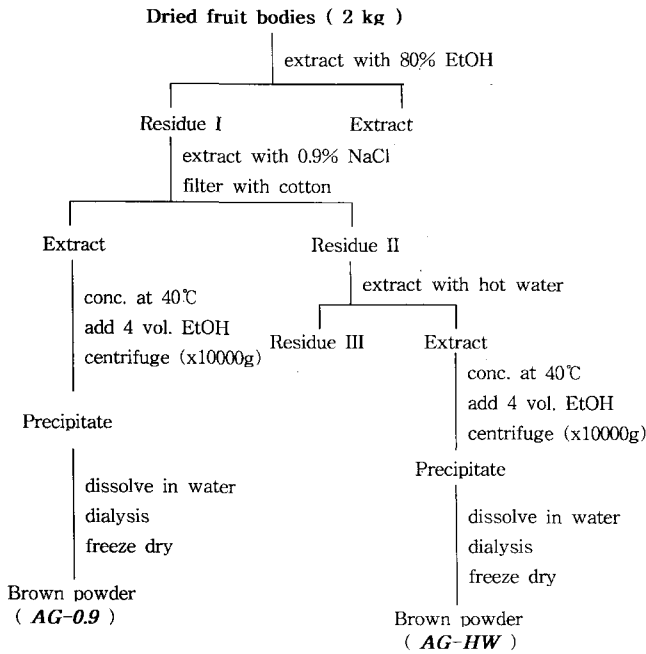


Fig. 1. Preparation scheme of crude polysaccharides extracted with 0.9% sodium chloride and hot water from the fruit bodies of *Agaricus blazei*.

조 과정을 실시하여 갈색 분말의 조 다당류를 얻었다(Fig. 1). 각각의 조다당류는 5 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.7)에 녹여 동일한 완충액으로 평형화 시킨 DEAE-cellulose(Merck co.) 이온 교환 칼럼에 적절한 다음 동 완충액에 0 M, 0.1 M, 0.2 M과 0.5 M sodium chloride의 농도로 제조된 용액을 단계적으로 용출하였다. 이때 각 분획은 20 ml씩 모았으며, 용출 양상은 당의 경우 phenol-sulfuric acid 방법(Dubois 등, 1956)으로, 단백질의 경우 Bradford법(Bradford, 1976)으로 각각 490 nm와 595 nm에서 흡광도를 spectrophotometer(Beckman DU-650, Beckman co., USA)로 측정 후 당의 용출 양상에 따라 분획별로 모았다. 이온 교환 크로마토그래피를 통하여 얻어진 분획들은 투석 그리고 동결 건조하여 분말로 얻은 다음 물에 200 mg/ml의 농도로 조절한 후 Toyopearl HW 65F gel(Tosho Co., Japan)을 사용하여 겔 여과 크로마토그래피로 행하였다. 이때 유속은 1 ml/min으로 하였으며 용매는 물을 사용하였다. 각 분획은 시험관당 5 ml씩 모았고, 당과 단백질 측정 곡선은 위와 동일한 방법으로 수행하여 각기 평균 분자량별로 분획하였다. 겔을 통하여 얻어진 각 분획들은 고속 액체 크로마토그래피로 조 등(1995a)의 방법에 준하여 다당류의 균질성을 확인하였다.

다당류의 물리화학적 특성 조사

정제된 다당류의 구성 성분 정량은 동결건조된 시료 2 mg을 증류수 2 ml에 녹인 후 당의 경우 phenol-sulfuric acid 방법으로, 단백질의 경우 Folin-phenol 방법(Alan 등, 1996)으로 반응시켜 흡광도를 측정한 다음 표준품 D-glucose(Sigma)와 bovine serum albumin(Sigma)를 각각 사

용하여 도식화한 정량 곡선에 대입하여 측정하였다. 다당류를 구성하는 중성당의 분석은 조 등(1995a)이 기술한 방법에 준하여 다당류 2 mg을 1 ml의 trifluoroacetic acid(TFA)에 녹여 121°C에서 1시간 동안 가수분해한 다음 sodium borohydride(NaBH₄)로 환원시키고 acetic anhydride로 acetylation하여 sugar alditol acetate를 얻었다. 생성된 sugar alditol acetate를 chloroform으로 추출하여 GC 분석을 행하였다. GC 분석은 fused silica capillary SP-2330(0.32 mm × 30 m, Supelco Co.) 칼럼을 사용하였고 carrier gas는 He, detector는 flame ionization detector를 사용하였다. 칼럼 온도는 초기에 200°C로 2분간 유지시키고 4°C/min의 속도로 250°C까지 서서히 증가시켜 4분간 유지하면서 분석하였다. 이때 injector와 detector의 온도는 각각 250과 260°C이었다.

면역증강활성 측정

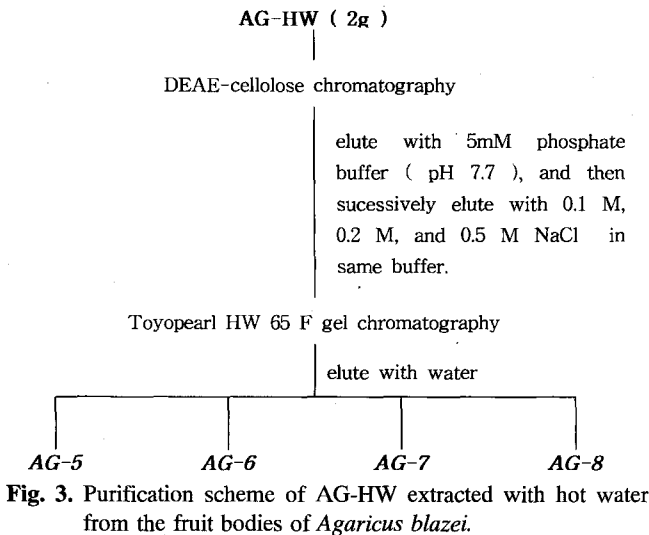
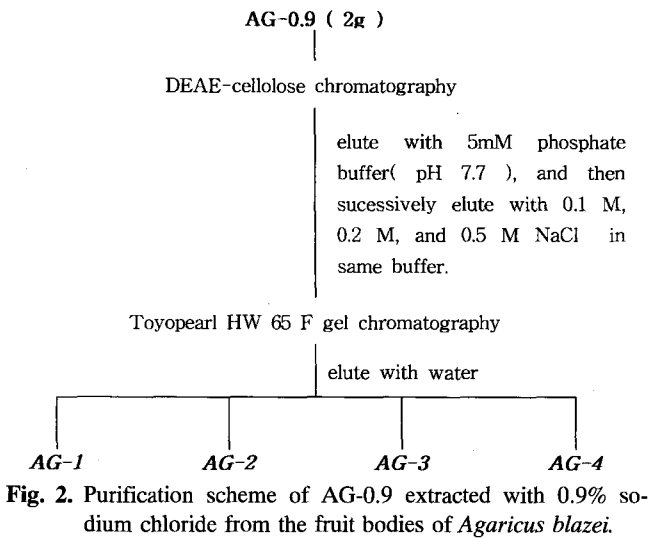
Mouse의 spleen cell을 적출, 정제하여 시료 다당류 또는 양성 대조구인 lipopolysaccharide(LPS)로 2일간 면역화 시킨 뒤, B 임파구의 antibody forming cell(AFC)의 형성 정도를 suspensiion hemolytic assay 방법(Han 등, 1996)으로 측정하여 활성의 지표로 사용하였다.

결과 및 고찰

항암면역활성 다당류의 추출, 분획 및 정제

건조된 신령버섯(*Agaricus blazei*) 자실체 2 kg을 80% 에탄올로 전처리하여 지질등의 저분자 물질을 제거한 다음 0.9% sodium chloride와 열수로 순차적으로 추출하였다. 각각의 추출물은 4배의 에탄올로 침전한 다음 원심분리하여 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물은 불로 현탁하고 투석막(Mwco. 3500, Supectrum사)을 사용하여 흐르는 물에 3일간 투석하고 투석 내액을 동결 건조하여 갈색 분말의 조다당류를 각각 28.4 g와 13.2 g을 얻었다(Fig. 1). 얻어진 각각의 조다당류 2 g을 10 ml의 5 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.7)에 용해시켜 DEAE-cellulose로 충전된 컬럼에 적절한 다음, 완충액으로 용출한 후 동 완충액에 NaCl 농도별로 조제된 용매로 용출시켰다. 완충액으로 용출된 분획들과 NaCl 농도별로 용출된 분획들중 당이 검출되는 부위만을 모았으며, 모아진 분획들은 투석 그리고 동결 건조하여 완충액 용출 부분에서 흰색 분말을, 각 농도별 NaCl 용출 부분에서 얻은 갈색 분말을 각각 얻었다. 이온 크로마토그래피를 통하여 얻어진 각각의 다당류들은 겔 여과 크로마토그래피를 실시하여 분자량이 일정한 수용성 다당류로 분획하였으며, 이들을 각각 AG-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8로 각각 명명하였다(Figs. 2와 3).

신령버섯의 0.9% NaCl과 열수 추출로 얻어진 다당류의 경우 모두 수용성 다당류이었으며, 이는 Misaki 등(1981), 松田(1989) 그리고 Harborne 등(1973)이 0.9% NaCl과 열수 추출후 얻은 다당류의 대부분이 수용성 다당류라는 보고와 일치하였다. 또한, Mizuno 등(1990a)이 신령버섯 자실체에



서 열수추출로 얻은 다당류를 수용성 다당류로 분리 보고한 결과와도 일치하였다.

다당류의 균질성 확인

신령버섯 자실체로부터 분리 정제된 다당류의 균질성(homogeneity)은 고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 당은 refractive index(RI)로, 단백질은 UV₂₈₀에서 고유 spectrum을 관찰하여 나타나는 peak의 양상, 즉 대칭성(symmetric peak)과 단일성(single peak)으로 확인하였다. 신령버섯의 0.9% sodium chloride 추출분획에서 얻어진 순수 분획 AG-1의 경우 단백질을 함유하지 않는 균질한 다당류이었으며, AG-2과 3의 경우 다당류와 단백질의 복합체임을 알 수 있었다. 그러나, AG-4의 경우 당이 검출되지 않았으며 UV₂₈₀에서만 peak가 검출됨으로 당이 함유되지 않은 순수한 단백질체이었다. 열수추출 다당류의 경우 모두 대칭적이고 단일 peak 양상을 지닌 균질한 다당류이었으며 AG-5를 제외하고 다른 다당류의 경우 단백질과 복합체를 이루고 있었다(Fig. 5).

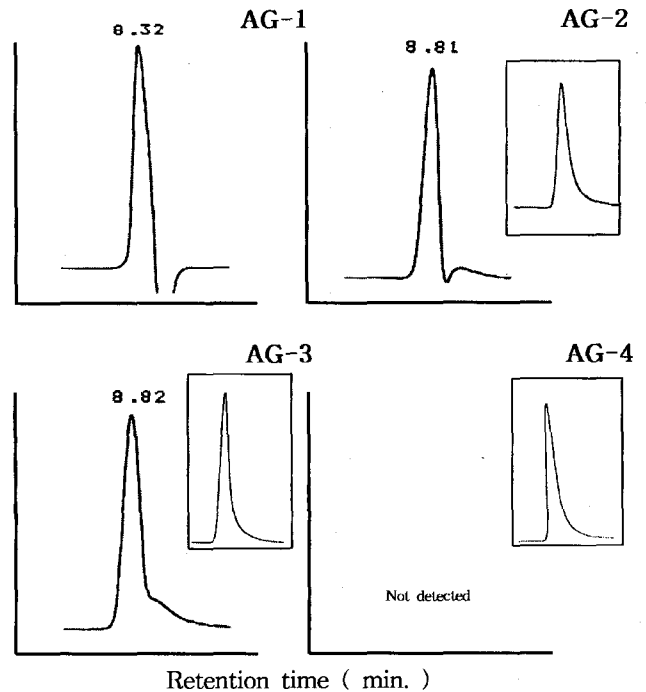


Fig. 4. Chromatograms of fractions isolated from 0.9% sodium chloride extract on a 30 cm×7.8 mm I.D. GMPW gel column. Each peaks were detected by refractive index (RI) and UV at 280 nm (Box), respectively. The column was eluted with 0.1 M sodium chloride flow rate of 1 ml/min.

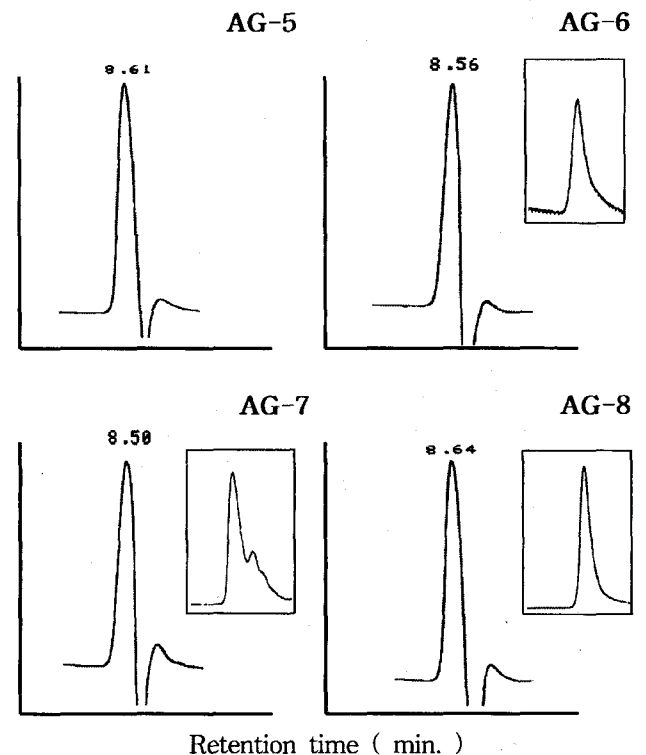


Fig. 5. Chromatograms of fractions isolated from hot-water extract on a 30 cm×7.8 mm I.D. GMPW gel column. Each peaks were detected by refractive index (RI) and UV at 280 nm (Box), respectively. The column was eluted with 0.1 M sodium chloride flow rate of 1 ml/min.

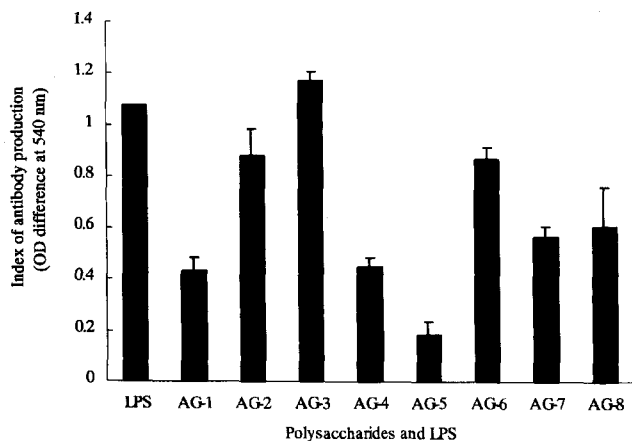


Fig. 6. Immunostimulating activity of polysaccharides from the fruiting body of *Agaricus blazei*. The hatched bars represented the results from the final concentration 0.01 mg/ml. The data were shown as the geometric mean of three replicates.

이러한 결과는 신령버섯 자실체로부터 분리 정제된 다당류 모두 균질한 다당류로 분리되었음을 알 수 있었고, 본 실험에서 사용된 이온 교환 크로마토그래피와 겔 여과 크로마토그래피가 분자량이 일정한 균질한 다당류의 정제에 효율적임을 증명하고 있다.

면역증강활성

신령버섯으로부터 분리된 다당류와 양성대조구인 LPS를 0.01 mg/ml의 농도로 처리하여 항암면역활성을 조사하였다 (Fig. 6). 그 결과 AG-2, 3 및 6에서 높은 면역증강활성을 보였으며 특히 0.9% sodium chloride 추출 분획에서 얻어진 AG-3이 양성대조구인 LPS의 활성 정도보다 높은 활성을 보였다. 즉 열수 추출하여 얻은 다당류보다 0.9% sodium chloride 추출에 의하여 얻어진 다당류가 B cell에 강한 활성을 보였다.

면역증강활성 다당류의 물리화학적 특성

Table 1. Some properties of polysaccharides from the fruit bodies of *Agaricus blazei*

Fraction	Total sugar ^{a)}	Total protein ^{a)}	Monosaccharide composition (%)					
			Glu	Gal	Man	Xyl	Fuc	Rib
AG-1	76.1	-	-	79.1	8.9	-	12.0	-
AG-2	33.9	33.5	74.0	15.3	10.7	+	+	+
AG-3	23.0	55.7	63.6	17.6	12.7	3.7	2.5	-
AG-4	-	100.0	-	-	-	-	-	-
AG-5	74.9	14.0	45.6	5.0	17.9	25.2	1.7	4.6
AG-6	63.9	20.8	81.4	1.6	4.4	-	-	12.6
AG-7	16.2	48.0	93.7	-	6.3	-	-	-
AG-8	9.5	57.9	14.3	6.3	-	1.5	-	76.2

^{a)}Presented as percent (%) and determined by the phenolic-sulfuric acid and Folin-phenol method, respectively. For the evaluation of content of total sugar and protein, see Materials and Methods.

신령버섯으로부터 분리한 항암면역활성 다당류들의 구성 성분의 함량과 구성당의 조성은 Table 1과 같다. 정제된 다당류의 단백질 함량은 완충액 추출 분획인 AG-1과 AG-5의 경우 각각 단백질이 없거나 14%의 낮은 함유량을 보여 이온교환수지에서 염을 사용하지 않은 분획은 이온성이 높은 단백질이 적음을 알 수 있었고 염을 사용하여 분획된 다른 다당류의 경우 대체적으로 20% 이상의 단백질을 함유하고 있는 단백 다당류이었다. 이는 조 등(1995a & 1995b)이 *Fomitella fraxinea*로부터 분리 보고한 중성 다당류와 유사한 결과를 보였으며, 다당류의 균질성 확인 실험 결과와 일치하였다. 구성 성분중 phenol-sulfuric acid 방법으로 당의 함량을 측정된 결과 AG-4를 제외한 7개의 분획에서 20% 이상의 함유량을 보였다. 특히, AG-1, 5, 6에서 60% 이상의 높은 함유량을 보였다.

GC로 구성당을 분석한 결과, AG-4를 제외한 모든 분획들은 glucose를 비롯한 2~6종의 다당류를 갖고 있는 heteropolysaccharide이나 각 구성당의 비율에는 차이를 보였다 (Table 1). 즉, 정제된 다당류 AG-1은 galactose, mannose 및 fucose가 79.1:8.9:12.0의 몰비로 존재하였고, AG-2와 3의 경우 glucose, galactose 및 mannose가 각각 74.0:15.3:10.7과 63.6:17.6:12.7로 존재하였으며 그 외의 구성당은 소량으로 존재하였다. 따라서 AG-1은 manno-fucogalactan으로, AG-2와 3은 manno-galactoglucan으로 추정되었다. 열수 추출물에서 정제된 다당류의 경우 위의 다당류와는 다른 구성당 몰비로 존재하였는데, AG-5의 경우 glucose, mannose 및 xylose가 45.6:17.9:25.2의 몰비로 존재하고 그외의 구성당이 소량 존재하는 manno-xyloglucan으로 추정되었으며, AG-6과 7은 glucose의 몰비가 각각 81.4%와 93.7%로 존재하고 그외 다당류는 소량 존재하는 glucan으로 추정되었다. 특히, AG-8의 경우 주로 ribose(76.2%)로 구성되어 있었다.

이상의 결과로부터 항암면역활성이 가장 높은 AG-3은 단백질 함량이 높은 glycoprotein으로 당 부분은 heteroglucan으로 구성되었다. 이는 Mizuno 등(1990a)이 신령버섯 열수 추출물에서 얻어진 다당류와는 다른 구성 성분 조건을 지니고 있어 새로운 항암면역활성 당-단백질로 추정된다. Hirase 등(1976)과 박 등(1992)은 구름버섯 유래 단백질 다당류의 단백질 함량을 2~10%로 보고한 바 있고, 당-단백 복합체에 대한 많은 연구(Mizuno 등, 1995; Zhang 등, 1994)가 있으나 어느 부위가 활성에 직접적으로 관여하는지는 알려지지 않았다. 그러나, *Agaricus blazei* 유래 protein-polysaccharide complex에 있어서 protein은 활성에 필수적이나(Mizuno 등, 1989), Song 등(1995)은 *Phellinus linteus* 유래 단백질-다당체에서 단백질이 활성에 관여하지 않는다고 보고하였다. 따라서 AG-3의 명확한 구조 해석과 그들의 구조와 면역 활성과의 상관관계에 대한 연구가 진행 중이다. 또한, 열수 추출물의 경우 Mizuno 등(1990a)이 보고한 항암 활성물질인 glucan과 유사한 구성 성분을 지닌 AG-6과 7이 존재하였으며, 특히, AG-8의 경우 RNA-protein complex(항암활성 95%로 보고함)와 유사하였다. 이들 모두 비교적 높

은 항암면역활성을 보이고 있어 기존 보고들의 활성물질과 일치할 것으로 추정되며, 구조적 비교 연구에 관해서는 진행 중에 있다.

적 요

인공 재배된 신령버섯(*Agaricus blazei*)의 자실체를 열풍 건조한 다음 다당류를 추출, 분리 정제하여 항암면역활성을 측정하고 그들의 물리화학적 특성의 일부를 조사하였다. 면역증강 다당류는 0.9% sodium chloride와 열수를 사용하여 순차적으로 추출하고 에탄올 침전, 투석 및 동결건조로 얻었으며, 이들 다당류는 이온 교환수지와 겔을 사용하여 균질한 다당류로 정제하였다. 정제된 다당류의 입파구의 항체 형성능 촉진 효과를 *in vitro*에서 조사한 결과, 0.9% sodium chloride 추출 분획에서 AG-2가, 열수 추출 분획에서 AG-6, -7 및 -8에서 비교적 높은 활성을 보였으며, 특히 AG-3이 양성 대조구(LPS) 보다 높은 활성을 보였다. 활성이 비교적 높은 다당류의 경우 주로 glucose로 구성되어 있으며 단백질과 결합된 단백질-다당체이었다. 정제된 다당류는 AG-4를 제외하고 모두 glucose를 비롯한 2-6종의 다당류를 갖고 있는 heteropolysaccharide이었으며, AG-1의 경우 galactose, mannose 및 fucose가 79.1:8.9:12.0의 몰비로, AG-5의 경우 glucose, mannose 및 xylose가 45.6:17.9:25.2의 몰비로 존재하였으며, 이들 두 분획은 약한 면역증강활성을 보였다.

참고문헌

- 박경숙, 이재양, 이상직, 김선희, 이재성. 1992. 구름버섯 배양액으로부터 단백질 다당류의 추출 및 정제 방법. *한국균학회지* **20**: 72-76.
- 박정식, 장갑열, 차동열, 전창선. 1996. 신령버섯 재배 생리 연구. 농촌진흥청 시험연구사업보고서 pp. 645-650
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995a. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I)-중성염 용액 추출 다당류의 특성. *한국균학회지* **23**: 332-339.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995b. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(II)-열수 추출 다당류의 분리 및 특성. *한국균학회지* **23**: 340-347.
- 松田和雄. 1989. 多糖の分離・精製法. 學會出版센타.
- Alan, J. and Robin, T. 1996. *Immunochemistry in practice*. Blackwell Science.
- 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.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Franz, G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med.* **55**: 493-497.
- Han, S. B., Oh, G. T., Yun, Y. P., Min, B. K., Hyun, B. H. and Kim, H. M. 1996. Rapid determination of *in vivo* and *in vitro* antibody responses by suspension hemolytic assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **36**: 33-40.
- Harborne, J. B. 1973. *Phytochemical methods-A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall LTD. p. 261.
- Hirase, S., Nakai, S. and Akatsu, T. 1976. Structure studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). I. Fractionation with barium hydroxide. *Yakugaku Zasshi* **96**: 413-418.
- Jung, S. C. and Donovick, R. 1989. Antitumor and antiviral substances produced from fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* **34**: 183-262.
- Kawagishi, H., Isagaki, R., Kanto, T. and Mizuno, T. 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* **186**: 267-273.
- Misaki, A., Kakuta, M., Sasaki, T., Tanaka, M. and Miyaji, M. 1981. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1-3)- β -D-glucan of *Auricularia auricular-judal*, and other polysaccharides containing (1-3)-glycosidic linkages. *Carbohydr. Res.* **92**: 115-129.
- Mizuno, T. 1989. Development and utilization of bioactive substances from medicinal and edible mushroom fungi (1). *The Chemical Times* **1**: 12-21.
- Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, A. 1990a. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* **54**(11):2889-2896.
- Mizuno, T., Inagaki, R., Kanto, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, A. 1990b. Antitumor activity and some properties of water-insoluble polysaccharides from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* **54**(11):2897-2905.
- Mizuno, T., Kinoshita, T. K., Zhuang, C., Ito, H. and Mayuzumi, Y. 1995. Antitumor-active heteroglycans from *Niohshimeji* Mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 568-571.
- Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S. and Yoo, I. D. 1995. B-lymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**: 2105-2108.
- Zhang, J., Wang, G., Li, H., Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Suzuki, C., Okamoto, H. and Li, J. 1994. Antitumor polysaccharides from a chinese mushroom, *Yuhuangmo*, the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1195-1201.