DIS 공정에 의한 Polyethylene Glycol 함침 알로에 베라 겔의 제조 및 특성화

권혜미, 허원, 이신영*

Preparation and Characterization of PEG-impregnated Aloe Gel through DIS Processing of *Aloe vera* Leaf Slice

Hye Mi Kwon, Won Hur, and Shin Young Lee*

접수: 2013년 8월 12일 / 게재승인: 2013년 10월 23일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The novel Aloe gels were prepared with dewatering and impregnation by soaking (DIS) processing of *Aloe vera* leaf slice at four different temperatures (25, 35, 45 and 55°C), using dehydration solution of 40% (w/v) polyethylene glycol (PEG4000). The PEG-impregnation to *Aloe vera* leaf slice during DIS was observed depending on immersion temperature, and the PEG-impregnated *Aloe vera* gel (PEG-i-AVG) obtained was characterized using ¹H NMR, FT-IR, GPC, XRD and TGA. The PEG-i-AVG had the higher levels of Aloe bioactives (glucomannan and O-acetyl contents) and better quality indices by ¹H NMR and FT-IR spectroscopy than those of native Aloe gel. Also, the obtained Aloe gel maintained the bimodal patterns in higher molecular weight region by GPC indicating no degradation of polysaccharide from native Aloe gel. The result observed by SEM confirmed a surface modification by forming the porous structure, and TGA result exhibited better thermal stability than that of native Aloe gel. XRD result revealed that the crystalline structure in Aloe gel was led by incorporation of PEG. Significant decrease of %insolubility and high enhancement of water solubility index were observed, respectively, and highly ordered conformation such as a helix structure was also indicated by Congo red reaction. We concluded that the modification effect for enhancing func-

tion of native Aloe gel was successfully obtained by DIS process using PEG as a dehydrating agent. These results suggested that this DIS process had a high potential for developing a new minimally processed product from *Aloe vera* leaf.

Keywords: *Aloe vera* gel, DIS processing, Minimally processed product, PEG-impregnation, Physicochemical characterization

1. 서론

DIS (Dewatering and impregnation by soaking) 공정은 Raoult-Wack et al. [1]에 의해 정의된 삼투탈수 (osmotic dehydration)의 일반명이다. 이것은 비교적 높은 수분함량의 고체식품을 고농도 삼투용액에 침적하여 상의 변화없이 부분적으로 탈수시키고 동시에 용질을 침투시켜 제품의 보존 또는 품질향상을 부여하는 공정이다 [1,2]. 주로 채소, 과일 및 육류의 효율적 보존방법으로 건조나 동결, 살균 및 통조림 식품가공의 전 단계 공정으로 널리 사용되었는데 [1,3-5], 에너지를 절감할 수 있고, 또 품질 저하를 방지할 수 있는 장점 때문에 이 방법에 대한 관심이 증가되고 있다 [6-8].

최근 이 DIS 혹은 삼투탈수 방법은 Kim 등 [9,10], Yu 등 [11], Garcia-Segovia 등 [12], Pisalkar 등 [13] 및 Kwon 등 [14,15]에 의해 열에 민감한 알로에에도 적용되었다. 통상, 과일 슬라이스의 탈수는 두 단계 즉, 삼투제를 사용한 물의 제거 (삼투농축)와 제품에 저장안정성을 주기위해 건조기에서 수분함량을 더욱 감소시키는 연속적인 탈수인데 [5], Kim

강원대학교 생물공학과
Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Korea
Tel: +82-33-250-6273, Fax: +82-33-243-6350
e-mail: sylee@kangwon.ac.kr

등 [9] 및 Kwon 등 [14]은 전자의 유효성분을 최소화하면서 효율적으로 농축하기 위한 방법으로 DIS 공정을 검토한 반면 (DIS concentration), 나머지 다른 연구자들은 후자의 건조 전단계 공정으로 활용하였다 (DIS/drying). 또, DIS 공정이 기본적으로 시료내의 수분이 빠져나오는 탈수현상과 용액 속의 용질들이 시료 속으로 향류 확산되는 2개의 물질이동 흐름을 생성함에도 불구하고, 그동안 알로에의 삼투탈수 연구에서 용질의 향류 확산이 제품의 품질에 미치는 영향에 대한 보고는 거의 없었다.

Kwon 등 [14]의 보고에 의하면 40% (w/v) PEG4000용액에서 알로에 잎 슬라이스의 DIS 처리는 삼투농축의 수분소실과 고형분 획득이 온도에 가장 큰 영향 (전체의 약 50%)을 받으며, 낮은 고형분 획득에도 불구하고 삼투제인 PEG의 함침 (impregnation) 가능성이 제시되고 있다. 실제로, 그동안의 연구에 의하면 삼투농축 중 식품시료의 고-액 (수분) 이동은 식품조성을 바꾸고 이것이 다시 건조에 의해 최종제품의 품질에 영향을 준다 [16]. 하지만, PEG와 같은 고분자 용질의 함침이 미치는 영향에 대해서는 보고된 바 없어 검토의 필요성이 충분하다.

특히, PEG (polyethylene glycol)는 식품, 제약 및 바이오 의약 응용에 널리 적용되는 중성, 수용성 및 비독성의 고분자로, 그동안 다양한 식품, 화장품은 물론, 의약 및 약제전달계에서 내복 및 주사제로서 사용되어 왔으며, FDA에 의해 GRAS로 등재되어 있다 [17]. 또, PEG의 화학적 첨가에 의해 친수성이 향상되므로 이러한 특성에 기인하여 생물공학적인 응용을 위한 막 및 피복재료의 주요 고분자 첨가제로 사용되어 왔으며, 화장품에서는 주로 보습제, 결합제, 용매제, 유화안정제, 점도조절제 등으로 배합되며 3~90%까지 사용된다 [18].

따라서 알로에 DIS 중 PEG의 함침이 이루어진다면 알로에 겔의 개량 효과가 기대되며, 이에 의해 생잎 알로에 겔과는 다른 PEG 함침 알로에 겔의 개발이 가능할 것으로 예측된다. 이는 PEG 함침이 낮다하더라도 생잎 알로에 겔의 고형분 함량이 0.5~1%에 불과하므로 함침의 상대적 영향이 커질 수 있기 때문이다.

그동안 DIS에서 삼투탈수제로서 PEG 사용은 당이나 염류에 비하여 매우 제한되어 일부 연구자들 [1,4,10,11,14,15,19-21]에 의해 사용된 것으로 보고되었다.

Mayor 등 [20]은 삼투탈수의 중요인자는 삼투제의 분자량이며, 고분자량 삼투제 (corn syrup, PEG)는 서로 다른 저분자량 삼투제와 비교하여 현저하게 더 높은 WL (수분소실)/SG (고형분 획득)를 주며, 이는 고분자물질의 낮은 확산에 기인할 수 있다고 보고하였다. 또, WL/SG는 삼투제의 품질 평가 혹은 물 제거효율에 사용되며, 이의 높은 비는 양호한 탈수제와 관련되는 반면, 낮은 비는 양호한 침지 혹은 주입제 특성을 나타낸다고 하였다. 대체로 분자량이 큰 PEG는 WL이 큰 반면, SG가 매우 낮으므로 탈수효과에만 치중하여서 PEG의 함침이나 이것이 최종 품질에 미치는 영향에 대해서는 별로 알려진 바가 없었다.

이상의 관점에 따라, 본 연구에서는 알로에의 DIS 농축 최적화 연구로 얻은 자료에 근거하여 PEG4000을 삼투제로 한 알로에 베라 잎 슬라이스의 DIS를 서로 다른 온도하에서 실시하였다. 이로부터 얻은 4종 시료의 성분 및 품질특성과 몇몇 물리화학적 특징을 생잎 알로에와 비교하면서 조사하였으며, 이로부터 DIS 처리에 따른 알로에 겔의 함침 효과를 규명하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 연구에 사용한 알로에는 (주) KJM 알로에의 제주농장으로부터 제공받은 알로에 베라 (*Aloe vera* Linne)로, 4°C의 저온실에 보존하면서 사용하였다.

완전히 성숙된 신선한 알로에를 사용하였으며, 부착 토양 및 기타 부스러기를 제거하기 위해 물로 철저히 세척하였고, 알로인을 제거 후 껍질을 포함한 두께 0.5 cm의 슬라이스로 절단하여 사용하였다.

한편, 삼투탈수시 사용한 삼투제는 분자량 4000 Da의 poly (ethylene glycol) (Daejung Co. Ltd, Shiheung, Korea)을 사용하였다.

2.2. PEG impregnated *Aloe vera* gel의 조제

PEG impregnated *Aloe vera* gel은 다음과 같이 삼투탈수하여 조제하였다. 두께 0.5 cm의 알로에 잎의 슬라이스를 40% (w/w)의 PEG 용액이 담긴 밀폐된 유리제 용기에 슬라이스:PEG 용액의 무게비가 1:5가 되도록 넣었다. 이 용기를 알로에 DIS의 물질전달 동역학 및 미세구조에 영향을 주었던 일정 온도 (25, 35, 45 및 55°C)의 순환수조에 넣어 2시간 동안 삼투처리하여 탈수시켰다 [15]. 얻어진 삼투탈수 슬라이스는 껍질을 제거한 후 유조직 (parenchyma tissue)을 얻었으며, 이를 균질기 (T25, IKA Labortechnik, Staufen, Germany)에서 균질화 (24,000 rpm, 3 min)한 다음, 원심분리 (8000 rpm, 30 min)하고 상정액을 취하여 침유질을 제거한 알로에 겔을 PEG함침 알로에 베라겔 시료 (DAVG 25, 35, 45 및 55)로 하였다. 이 때, DIS 처리하지 않고 균질화 및 원심분리하여 얻은 생잎 겔 (AVG)은 대조비교군으로 사용하였다.

2.3. Glucomannan 함량의 측정

Glucomannan 함량은 Congo-red[sodium 4,4'-diphenyl-2,2'-diazobis-1-naphthalamino-4-sulfonate] 시약 (Sigma C6767, St. Louis, MO, USA)을 이용한 비색법 [22]에 의해 정량하였다. 알로에 겔 원료 0.25 g을 취하여 증류수 50 mL에 녹여 1시간 동안 충분히 교반한 후, 4000 rpm으로 20분간 원심분리하여 불용성 성분을 제거하였다. 상정액을 취하여 투석한 후, 400 μ L을 취하여 Congo-red 시약 4 mL와 반응시켰다. 온화하게 교반한 후 20분간 반응시키고 UV-Vis 분광광도계 (Spectronic Genesis-5, Rochester, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서의 흡광도

를 측정하였다. 이때, 표준용액은 알로에 표준다당을 조제하여 사용하였으며, glucomannan 함량은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Glucomannan (mg/Kg)} = \frac{a \times V \times 1000}{S}$$

- a : 시험 용액에서의 농도 측정치 (mg/mL)
V : 최종 시험 용액의 부피 (mL)
S : 시료 량 (g)

2.4. O-acetyl 함량의 측정

Hestrin 법 [23]에 따라 10 mL의 시료를 취하여 50 mL 삼각플라스크에 취하고 적당량의 온수를 가하여 20분간 초음파 추출 (Barnson5210, Danbury, USA)하였다. 실온에서 냉각 후 50 mL로 정용하고 원심분리 (4000 rpm, 20 min)한 다음 상정액을 시험용액으로 하였다. 시험용액 1 mL에 알칼리성 hydroxylamine 시약 (2 M hydroxylamine-hydrochloride과 3.5 N NaOH의 1:1 혼합용액) 2 mL를 가하고 4분간 방치한 후 4 M HCl 1 mL를 첨가하여 pH를 1.2(±0.2)로 조정하였다. 이 때, 공시험은 산과 알칼리용액의 반응순서를 바꾸어, 4 M HCl 1 mL를 먼저 가한 후 2 mL의 알칼리 시약을 넣어 실시하였다. 1 mL의 FeCl₃ 용액 (FeCl₃·6H₂O 10 g을 0.1 N HCl에 녹인 용액)을 가한 후 수 초간 교반하였고, 2분 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때, 표준용액은 acetylcholine 용액을 이용하였으며, O-acetyl기의 함량은 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{O-acetyl (mg/Kg)} = \frac{(a - b) \times V \times 1000}{S}$$

- a : 시험 용액에서의 농도 측정치 (mg/mL)
b : 공시험에서의 농도 측정치 (mg/mL)
V : 최종 시험 용액의 부피 (mL)
S : 시료 량 (g)

2.5. % Insolubility

증류수 2 mL에 알로에 건조시료 0.05 g을 녹인 후 2000 rpm으로 5분간 교반하였고, 3000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤, 침전물의 건조 무게를 측정하였다. % Insolubility는 다음 식에 의해 계산하였다 [24].

$$\% \text{Insolubility} = \frac{\text{Weight of precipitable}}{\text{Original gel powder weight}} \times 100$$

2.6. 수분흡수지표 및 수분용해도지표값

시료의 수분흡수지표 (water absorption index, WAI) 및 수분용해도지표 (water solubility index, WSI)는 시료의 팽윤되었을 때의 무게 및 건조 후의 시료 무게비로 구하였다. 즉, 0.05 g의 시료 (W_g)를 25 mL의 메스실린더에 넣고 2시간 방치해 두었다. 2시간 후에 팽윤된 겔로부터 상정액을 제거한 다음

팽윤 겔의 무게 (W_g)를 측정하여 다음 식으로 WAI를 계산하였다 [25,26].

또, 수분 용해도지표값 (water solubility index, WSI)은 겔을 건조시켜 측정된 무게 (W_{ss})를 사용하여 다음 식에 의해 계산하였다 [27].

$$\text{WAI (g/g)} = \frac{W_g}{W_{ds}} \quad \text{WSI (g/g)} = \frac{W_{ss}}{W_{ds}}$$

2.7. ¹H NMR

시료의 ¹H NMR (600 MHz) 스펙트럼은 실온에서 Bruker Model Advance 600 spectrometer (Karlsruhe, Germany)를 사용하여 얻었다. 이 때 시료는 내부표준 없이 10 mg을 0.7 mL D₂O로 용해하여 사용하였다.

2.8. 분자량 분포 측정

분자량 분포는 HPGPC system (Waters Breeze, Milford, MA, USA)을 사용하여 수행하였다. Column은 Waters Ultrahydrogel linear 500, 250 및 120을 사용하였고, 온도는 30°C, flow rate는 0.8 mL/min이었으며, 용매는 0.02 N NaNO₃ (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. Detection은 25°C에서 RI detector를 사용하였다. Column calibration은 고분자량 측정시는 pullulan (Shodex standard P-82, Tokyo, Japan), 저분량 측정시는 PEG (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)를 사용하여 수행하였다.

2.9. FT-IR 분석

FT-IR (Fourier transformed infra red) spectra는 동결건조한 DIS 전후 시료 2 mg을 함유한 KBr disc를 조제하고 4 cm⁻¹의 해상도로 400~4000 cm⁻¹에서의 투광도를 Bio-Rad Model Excaliber (Cambridge, USA) 기기를 사용하여 얻었다.

2.10. 표면구조 분석

표면구조는 주사형 전자현미경 (Hitachi SEM model S-4300, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 즉, 시료를 양면접착테이프에 얇게 분산시킨 후 Au로 진공증착 (100 Å 두께)하여 전압 5 kV, 시료경사 30°의 조건에서 20,000배로 촬영하여 관찰하였다.

2.11. 열안정 특성 분석

열안정 특성은 TGA로 분석하였다. 시료를 동결건조한 후, 200 mesh 체를 통과시켜 얻은 분말시료 3~8 mg을 백금 팬을 이용하여 N₂ (100 mL/min.) purge gas로 하고, 25~600°C의 범위에서 ramp rate 20°C/min의 조건으로 Model SDT Q60 (TA Instruments, Delaware, USA) 기기를 사용하여 분석하였다.

2.12. 분자사슬형태 (conformation)

수용액에서 각 알로에 시료의 분자사슬형태의 구조는 Ogawa 등 [28]의 방법에 따라 조사하였다. 즉, 시료 2 mL (1 mg/mL)

를 2 mL Congo red (50 $\mu\text{mol/L}$) 및 1 mL의 NaOH와 혼합하였으며, 이 때, NaOH의 농도는 최종농도로 0.05~1 mol/L의 일정농도 범위가 되도록 하였다. 실온에서 10분간 유지한 후 UV-Vis 분광광도계로 400~700 nm에서 주사하였고, 최대흡광도 λ_{max} 값을 구하였다. 이 때, 대조군으로는 2 mL Congo red (50 $\mu\text{mol/L}$)와 1 mL NaOH 용액을 혼합한 것을 사용하였고, 음성 비교군으로는 dextran (Sigma Chemical Co.; 평균분자량 100~200 kDa)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. PEG 함침 알로에 베라 겔의 성분 및 품질 특성

알로에 베라의 DIS 최적화로 얻은 자료에 근거하여 40% PEG4000 용액에 알로에 베라 잎 슬라이스 (0.5 cm)를 침적하고 서로 다른 온도 (25, 35, 45 및 55°C)에서 2시간 동안 DIS 처리함으로써 4종의 시료 (DAVG25, DAVG35, DAVG45 및 DAVG55)를 조제하였다.

4종 시료의 DIS 성능지표인 수분소실 (WL%) 및 고형분 획득 (SG%)을 조사한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이, WL은 25°C처리구에서 51.24 ± 3.31 이었으나 온도증가로 서서히 증가하여 55°C처리구에서 $75.12 \pm 1.67\%$ 로 가장 높았다. SG도 WL과 마찬가지로 온도증가에 따라 증가하는 경향을 보였으나 그 값은 $1.87 \pm 0.42 \sim 4.15 \pm 0.08\%$ 로 매우 낮은 값 범위이었다. 특히, 삼투탈수제의 품질평가 혹은 물의 제거효율에 사용되는 WL/SG비 값은 $18.55 \pm 0.64 \sim 32.10 \pm 1.27$ 로 현저하게 높았으며, 특히 45°C에서 가장 높았다. 이는 PEG4000의 매우 양호한 삼투탈수제로서의 역할을 의미하며 PEG4000의 낮은 확산에 기인하는 것으로 볼 수 있다 [20].

이들 각 시료의 성분특성을 확인하기 위해 알로에의 bioactive 성분인 glucomannan과 o-acetyl 함량을 DIS 처리하지 않은 생잎 알로에 베라겔 (AVG)과 비교하면서 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

생잎 알로에 베라 겔의 glucomannan 함량은 453 ± 22 mg/L이었으나 DIS 시료의 glucomannan 함량은 처리 온도에 따라 $528 \pm 30 \sim 1293 \pm 140$ mg/L 범위로 생잎 알로에 겔보다 높았다. Glucomannan은 알로에 베라 겔이 불량하거나 부적절하게 조제될 경우에 분해되므로 [29,30], DIS 겔의 더 높은 함량수준은 DIS 처리에 의해 알로에 겔의 생물학적 성질을 잘 유지하고 있음을 보여주는 결과이다. 대체로 glucomannan의 함량은 35°C에서 가장 높았고 45°C 이상에서 다시 감소하였는데, 이는 DIS의 처리온도가 증가할수록 탈수율이 증가하므로 (Fig. 1) DIS에 의한 탈수율의 증가와 관련되는 것으로 보인다. 반면, 45°C 이상에서 다시 감소경향을 보인 것은 이들 온도에서 세포유연조직의 파괴로 glucomannan이 분해되었기 때문이라 생각된다 [15].

또, o-acetyl 함량도 DIS 처리로 증가하였으며, glucomannan과 비슷한 온도의존성을 보여, 탈수율의 증가 및 고온에서의 파괴 또는 분해를 보였다.

Fig. 1. Water loss, solid gain and WL/SG of four Aloe gels prepared by DIS of *Aloe vera* leaf slice at different immersion temperatures of 25, 35, 45 and 55°C. DAVG 25, 35, 45, 55 represent the products prepared at four temperatures of 25, 35, 45 and 55°C, respectively.

Fig. 2. Effect of temperature on glucomannan and o-acetyl contents of native Aloe gel (AVG) and four Aloe gels (DAVG 25, 35, 45, 55) from DIS process.

따라서 45°C에서 탈수효율이 가장 높았으나 유효성분의 파괴가 적은 35°C에서 DIS 처리함으로써 알로에 유효성분의 소실없이 생잎 알로에 겔보다 더 우수한 액상제품화를 달성할 수 있을 것으로 판단하였다.

한편, 그동안의 연구에 의하면 ^1H NMR은 알로에 베라 겔 제조의 동질성과 품질을 평가하는 필수도구이며, 제품 중 알로에 다당을 검증하고 시간경과에 따른 어떤 화합물의 분해를 추적하는데 사용할 수 있다 [31,32]. 따라서 DIS 알로에 베라겔의 품질특성을 조사하기 위해 ^1H NMR (600 MHz) 스펙트럼을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다.

생잎 알로에 베라 겔은 fingerprint로서 고려될 수 있는 아세틸화된 β -1,4 결합 mannan의 특성적 시그널 (2.00~2.26 ppm)을 나타내었다. 또, 알로에의 천연 성분인 glucose (5.2 ppm, d; 4.6 ppm, d)와 malic acid (4.35 ppm, m; 2.4~2.8 ppm, m)의 피크도 잘 관찰되었다. 그러나 알로에 원료의 부정적 품질특성으로 알려진 젖산균 발효의 최종산물인 1.33 ppm에서의

Fig. 3. ^1H NMR spectra of native aloe (AVG), PEG 4000 and DIS aloes (DAVG 25, 35, 45 and 55).

젖산 시그널이나, 부적절한 가공 혹은 부적합한 저장을 통해 시작될 수 있는 화학적 분해로서 Acemannan의 탈아세틸화로 생성되는 1.92 ppm에서의 아세트산의 피크는 관찰되지 않았다. 따라서 원료 알로에는 알로에의 생물활성성분 성분을 잘 유지함을 보였다.

DIS 처리 시료의 경우도 생잎 알로에 겔과 마찬가지로 발효 또는 효소 및 화학적 분해산물의 피크없이 3개의 주요 천연성분 즉, Acemannan, glucose 및 malic acid의 피크들만이 검지되었다. 특히, 다당 영역 (3.0~4.0 ppm)의 혼합물 피크수 및 강도의 감소를 보여 다당의 정제도가 향상됨을 보였다. 또 glucose에 대한 Acemannan의 피크강도 비가 높아져 그 함량이 향상됨을 보였는데, 그 경향은 생물활성성분 성분의 온도에 따른 경향과 비교적 잘 일치하였다.

그러나 DIS 시료에서는 삼투탈수제로 사용한 PEG4000의 특성적 시그널인 $d = 3.65$ ppm에서의 강한 피크를 보여 주어 PEG4000의 함침이 예측되었다. 이의 확인을 위해 PEG 함량을 측정된 결과, 자료로 나타내지 않았으나 DIS 처리 온도의 증가로 PEG 함량도 증가하여 온도의존적 PEG의 함침을 보였으며, 실험 온도범위에서 PEG 함량은 대략 2~8% 범위이었다.

3.2. GPC에 의한 분자량 분포특성

생잎 알로에 베라 겔 및 DIS 처리 알로에 베라 겔의 분자량 분포특성을 알아보기 위하여 이의 분자량 분포를 HPGPC 시스템에 의해 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다.

생잎 알로에 겔의 분자량분포는 크로마토그램 상에 2그룹의 서로 다른 영역의 존재를 보였다. 하나는 용출시간=26.94분에서의 광범위한 고분자 영역이었고, 다른 하나는 용출시간=42~47분대에서의 저분자 영역이었다.

고분자 영역은 다시 Fig. 4의 삽입도 (insert)에서 보는 바와

같이 2분획으로 용출되었고, 중량평균 분자량은 각각 약 489 및 21 kDa이었다. 반면, 저분자영역의 경우는 단당으로부터 올리고당 범위 (231~1191 Da)이었으며, 보고된 사실과 비교적 잘 일치하였다 [13,33,34]. 특히, Nejatizadeh-Barandozi & Enferadi [34]는 알로에 겔 다당으로부터의 GPC 크로마토그램이 GN1 및 GN2의 두 중성 다당분획을 나타냈으며, GN1의 분자량 분포는 230~3340 kDa으로 690 kDa에서 피크를 나타낸 반면, GN2는 115~207 kDa으로 171 kDa에서 피크를 나타내었다고 하여, 시료 차이에 의한 분자량의 차이를 보였으나 본 실험의 결과와 비교적 잘 일치하는 경향을 보였다.

그동안의 보고에 의하면 생잎겔의 HPGPC 분포에서 고분자 영역의 존재는 겔로부터 가공중 주요 화학적 변화가 일어나지 않았음을 의미하며, 만약 이 영역이 존재하지 않는 경우는 신선한 생잎 알로에 겔에서 나타내는 것과 같은 생물학적 성질을 보장할 수 없음을 의미한다.

Fig. 4. Gel permeation chromatogram of native (AVG) and DIS aloes (DAVG 25, 35, 45 and 55).

그러므로 본 실험의 알로에 베라 겔 시료는 생물학적 성질을 보장하는 이들 고분자 영역의 성분을 함유함을 확인할 수 있는데, Fig. 4의 PEG에 의한 DIS 처리시료의 분자량 분포는 DIS 처리하지 않은 대조구에 비해 RT = 38.8분대에서의 새로운 피크 (분자량=4104~4172 Da)를 보였다. 이는 사용한 PEG의 분자량과 일치하여 역시 본 시료에 PEG가 함침된 것을 보여준다. 이 PEG 함입은 온도의 증가에 따라 증가하였으나 저분자량 분획의 용출 peak 강도는 온도가 증가함에 따라 감소함을 보였다. 반면, 고분자 영역의 경우는 역시 Fig. 4의 삽입도에서 보는 바와 같이, 생잎 알로에 겔과 마찬가지로 A, B 두 분획의 쌍봉 (bimodal) 분포를 보였다. A분획의 분자량 분포는 시료에 상관없이 570~1300 kDa 범위이었고, B분획은 12~48 kDa 범위이었다. A 및 B분획의 피크 분자량 (Mw)은 시료에 따라 각각 402~774 kDa 및 21~24 kDa이었고, 대체로 B분획에서는 시료에 따른 피크 분자량의 증가가 있었으나 그 수준은 미미하였다. 그러나 A 분획의 피크 분자량은 25 및 35°C에서는 DIS 처리로 용출시간이 짧아져 생잎 알로에의 분자량보다 1.5배나 더 높았다. 반면, 45°C에서는 다소 높은 값 수준이었고, 55°C에서는 생잎 알로에의 80% 수준으로 감소하였다. 또, DIS 처리 온도의 증가로 고분자 영역 A분획의 피크강도도 증가하여 고분자의 농도 수준이 증가함을 보였으며, 이는 glucomannan 함량의 변화 경향과 잘 일치하였다.

3.3. FT-IR 스펙트럼 특성

DIS 처리 시료들의 FT-IR 스펙트럼을 생잎 알로에 베라겔과 비교하면서 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다.

생잎 알로에는 4000~400 cm^{-1} 로 주사되었을 때, FT-IR 스펙

Fig. 5. FT-IR spectra of Aloe polysaccharide, native (AVG) and DIS aloes (DAVG 25, 35, 45 and 55).

트럼으로부터 수소결합의 O-H 신장진동수에 기인한 3600~3200 cm^{-1} 및 관련 굽힘진동의 1100~1050 cm^{-1} , 2950~2800 cm^{-1} 에서의 신장진동 및 대응하는 굽힘진동수 1470~1460 cm^{-1} 등 C-H기의 기능기가 발견되어 전형적인 다당의 특성을 나타내었으며, carbonyl 관능기 및 아세틸화 시료의 C-O-C stretch가 각각 1748~1735 및 1246~1235 cm^{-1} 에서 관찰되어 아세틸화 특성이 잘 관찰되었다. 또, PEG4000도 PEO methylene 기의 특성인 2868 cm^{-1} 및 polyether의 C-O 신장 1110 cm^{-1} 에서 밴드를 보여 전형적인 PEG 특성이 관찰되었다.

반면, DIS 처리한 경우는 아마도 수소결합 등에 기인하여 3500 cm^{-1} 주변의 O-H 신장 밴드는 상당히 더 작게 되었고, 대칭 C-H 진동을 나타내는 2950 cm^{-1} 주변의 밴드는 증가하

Fig. 6. Scanning electron micrographs of PEG 4000, native (AVG) and DIS aloes (DAVG 25, 35, 45 and 55). (x20,000).

였다. 그러나 DIS 처리 시료에서는 1752 cm^{-1} 주변의 carbonyl 신장 밴드, 1238 cm^{-1} 주변의 carboxyl 신장밴드가 유지되어 *o*-아세틸화의 존재를 보였다. 따라서 DIS 시료는 삼투제로 사용한 PEG4000의 함침을 보여주었으며, ^1H NMR의 결과와 잘 일치하였다.

그러므로 DIS 처리 알로에 겔은 *o*-아세틸화된 다당의 특성을 잘 유지하는 생물활성성분 acemannan을 보유함을 보여주는데, 이러한 알로에 겔 다당의 *o*-아세틸화는 생물학적 활성화에 필요하며 세포에서 소수성 장벽의 통과를 쉽게 하는 것으로 알려지고 있다 [35].

3.4. 표면 및 결정구조 특성

DIS 처리 및 생잎 알로에 겔을 동결건조한 각 시료의 표면구조를 SEM에 의해 20,000배로 조사하였고, 그 결과는 Fig. 6과 같다.

그림에서 볼 수 있는 바와 같이, 알로에 fiber free gel은 일부 다공성과 주름이 있는 부드러운 표면의 펼쳐진 겔 유사구조를 나타내었다. 반면, DIS 구조는 표면에 구형의 구멍을 형성하였고, 그 크기는 다양한 분포를 보였으나 대체로 온도가 높을수록 커지는 경향이였다. 이러한 현상은 PEG의 다공형성제로서의 역할에 기인하는 것으로 보인다. PEG를 다공형성제로 사용한 PCL (poly(ϵ -caprolactone) 필름에서도 관찰되었는데, 이는 두 시료의 극성이 매우 달라서 혼합시 PCL-PEG 계면에서 표면에너지가 감소시키기 위해 PEG 상이 PCL 상에 자발적으로, 그리고 구형으로 분산되기 때문이라 하였다 [36]. 다공성의 정도는 대체로 PEG 함량의 증가에 따라 증가되었으므로 PEG를 사용한 알로에 DIS 겔은 DIS 처리온도의 조절에 따라 다공성이 높은 표면구조의 개량이 가능함을 알 수 있었다.

한편, Fig. 7의 XRD 양상에서 보는 바와 같이, 생잎 알로에 겔은 무정형이었다. 그러나 DIS 알로에 겔은 $2\theta=19.09$ 및 23.17° 에서의 가장 높은 강도를 보여 PEG의 함침으로 결정성이 형성됨을 보였다. 이는 PEG가 무정형 물질에 결정특성을 전이하는 결정 운반체로 작용함을 보이는 것으로 [37], 알로에 다당의 불용성을 개선하여 용해도를 향상시키는데 기여할 것으로 기대되었다. 실제로 Fig. 8에서 보는 바와 같이, DIS 처리로 물흡수지표값의 변화없이 % 불용성 (insolubility)이 현저하게 감소하였고, 물용해도 지표값도 크게 향상되었다.

3.5. 열안정성 특성

TGA는 프로그램된 가열형태 하의 온도증가에 따라 시료 무게를 연속적으로 측정하여 얻어지며, 열분해 거동의 정보를 제공한다. 따라서 생잎 알로에 겔과 DIS 알로에 겔의 열안정성과 열분해를 TGA를 사용하여 비교, 조사하였고, 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다.

생잎 알로에 겔의 TGA에 의한 회합된 무게손실은 $200\sim 630^\circ\text{C}$ 에서 대체로 3단계로 분해됨이 관찰되었다. 즉, 미분서모그램 (thermogram)에서 온도범위 $30\sim 109.90^\circ\text{C}$ (DTG 피크

Fig. 7. X-ray diffraction diagram of PEG 4000, native aloe (AVG) and DIS aloes (DAVG 25, 35, 45, 55).

Fig. 8. %Insolubility, WAI and WSI of native (AVG) and DIS aloes (DAVG 25, 35, 45 and 55).

크= 73.8°C), $109.9\sim 219.0^\circ\text{C}$ (DTG 피크= 169.7°C) 및 $219\sim 372.1^\circ\text{C}$ (DTG 피크= 314.1°C)에서 3개의 주요 DTG 피크를 나타내었는데, 첫 번째 피크는 수분증발에 기인하며, 가장 큰 세 번째 피크는 알로에 표준다당의 분해온도구간과 일치하여 acemannan인 것으로 볼 수 있다. 정제 다당에서 관찰되지 않는 두 번째 피크는 acemannan 이외의 알로에 성분으로 보이며, 이밖에 $450\sim 500$ 및 $600\sim 630^\circ\text{C}$ 에서의 작은 피크는 각각 Ca-oxalate 및 산화 C 골격에 해당하는 것으로 보인다. 이들 결과는 알로에 다당인 Carrysin에 대한 보고와 비교적 잘 일치한다 [38].

한편, DIS 처리한 경우는 생잎 알로에 겔과 비슷하게 3단계의 분해를 보였으나 $408.5\sim 415.1^\circ\text{C}$ 부근에서 새로운 주 피크가 관찰되었는데, 이는 PEG의 분해온도 범위 ($239.9\sim 452.1^\circ\text{C}$) 및 DTG 피크온도 (418.3°C)와 비교적 잘 일치하여 PEG의 함침에 기인한 것으로 볼 수 있다. 또, 생잎 겔의 50% 질량감소 온도는 335.1°C 이었으나 DIS 시료는 대체로 처리온도가 증

Fig. 9. TGA (left) and DTG (right) curves of PEG 4000, native (AVG) and DIS Aloes (DAVG 25, 35, 45 and 55).

가할수록 400.2°C로부터 408.2°C까지 증가하여 생잎 겔보다 훨씬 더 열안정성이 향상됨을 알 수 있었다. 아울러, 최종 온도에서 분해되지 않은 질량도 생잎의 경우는 31.3%인 반면, DIS 시료는 뚜렷한 온도 의존성은 보이지 않았으나 6.8~20.9% 범위까지 감소하였으므로 다당의 정제 및 함량의 증가가 관찰되었다.

3.6. 분자사슬 형태의 특성

수용액에서 나선사슬 (single-helix, triple-helix)과 같은 다당의 형태는 기능성 혹은 생물활성과 밀접한 관련을 가진다 [39,40]. 따라서 각 알로에 시료의 나선구조 함유여부를 Congo red와 다당류의 착합체 형성 및 최대흡수파장의 이동에 의해 검증하는 Ogawa 등 [28] 방법에 따라 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 10과 같다.

Negative control로 사용한 랜덤코일 구조의 α -dextran은 0~1 M NaOH 농도의 증가에 따라 최대 흡수파장이 496 nm로부터 점차 감소하여 0.4 M NaOH 첨가에서 최소값 (478 nm)을 나타내었으며 이후 다소 증가 후 서서히 감소하여 1 M NaOH 첨가농도에서 480 nm 수준을 유지하였으며, PEG도 비슷한 경향이였다. 반면, 알로에 표준다당의 경우는 NaOH 농도가 증가함에 따라 $\lambda_{\max}$ 값이 장파장이동하고 0.25~0.4 M NaOH 농도에서 최대값 (514 nm)을 보였으며, 이후 감소를 보였으나 1 M NaOH 농도에서도 510 nm 수준을 유지하였다. 이는 Congo red와의 복합체 최대흡수파장이 0.1 M NaOH 용액에서 약 505 nm 이상으로 이동하면 나선구조의 존재를 지적함으로써 [41-43], 알로에 표준다당이 수용액에서 나선구조를 지

님을 보이는 결과이다. 또, 이러한 나선구조는 NaOH 첨가에 의해 파괴되어 다당과 Congo red의 결합의 상호작용 소실을 빠르게 일으킴을 고려할 때, 강알칼리 하에서도 비교적 질서화된 상태를 유지함을 알 수 있었다.

한편, 생잎 알로에 겔은 negative control보다 더 높은 수준의 $\lambda_{\max}$ 값을 보였으나 장파장 이동을 보이지 않아 나선구조의 부재를 보였다. 반면, DIS 처리 알로에 겔은 알로에 표준 다당과 마찬가지로 $\lambda_{\max}$ 값의 장파장 이동을 보여 나선구조의 존재를 보였다. 하지만 $\lambda_{\max}$ 값의 이동폭은 작아서 나선구조 함

Fig. 10. Helix-coil transition of PEG 4000, dextran, native aloe, DIS aloe and aloe polysaccharide by changes in the absorption maximum of Congo red-polysaccharide complex at different concentrations of NaOH.

량은 낮은 것으로 생각되었다 [41]. 주로, 나선형 구조의 파괴는 알칼리에 의한 분자간 및 분자내 수소결합의 절단에 기인한다고 알려져 있음을 고려할 때 [43], DIS 시료가 생잎 알로에 겔과 달리 나선구조를 유지하는 것은 알로에 겔의 PEG와의 수소결합 형성에 기인하는 것으로 생각된다.

4. 결론

본 연구에서는 PEG4000을 삼투제로 한 알로에 베라 잎 슬라이스의 DIS (dewatering and impregnation by soaking)를 서로 다른 온도 (25~55°C) 하에서 2시간 동안 실시하고 4종의 시료를 조제하였다. 이들 시료의 성분 및 품질특성과 몇몇 물리화학적 특성을 ¹H NMR, FT-IR, GPC, SEM, XRD 등을 사용하여 생잎 알로에와 비교하면서 조사하였으며, 이로부터 DIS 처리에 따른 함침 (impregnation) 효과를 규명하였다.

DIS 처리로 농축한 겔은 생잎 알로에 겔보다 더 증가된 알로에의 생물활성성분 성분함량 (glucomannan, o-acetyl)을 함유하였고, ¹H NMR 및 FT-IR에 의해 생잎 알로에 겔의 품질특성을 잘 유지함을 확인하였다. 또, 온도 의존성의 PEG 함침이 확인되었고, 적정 온도 (35°C)의 조절로 이들 성분 및 품질특성을 최대화 할 수 있었다. 알로에 겔 시료의 HPGPC 분포는 모두 고분자 영역에서의 더 높은 분자량의 쌍봉분포를 보여 생잎 알로에 다당의 분해가 없음을 보였다. 또, DIS 알로에 겔은 PEG의 함침에 기인하여 SEM에 의한 표면구조 관찰에서 다공성 형성에 따른 표면구조의 개량이 관찰되었고, XRD에 의한 결정구조에서는 PEG가 무정형의 알로에 겔 물질에 결정특성을 전이하는 결정 운반체로 작용하여 결정성을 부여하였으며, 이에 따라 % 불용성의 현저한 감소 및 물용해도 지표값의 큰 향상을 보였다. 아울러, TGA 분석결과, DIS 처리온도가 증가할수록 중량감소 온도가 높아져 열안정성이 향상됨을 알 수 있었고, 최종온도에서 분해되지 않은 질량도 크게 감소하여 다당의 정제효과 및 이에 의한 함량의 증가가 관찰되었다. 특히, DIS 알로에 겔은 생잎 알로에 겔과는 달리, 표준 알로에 다당과 마찬가지로 수용액에서 나선구조 형태를 유지함을 보여 알로에의 기능성 혹은 생물활성을 잘 유지할 것으로 추론되었다.

따라서 알로에 베라 잎의 DIS에 의한 농축은 적정온도를 유지함으로써 알로에 베라의 생물활성을 유지하는 성분을 극대화시킬 뿐 아니라 각종 물성 기능성을 향상시키는 양호한 함침효과를 갖는 것을 알 수 있었으며, 궁극적으로 최소화 공정으로서 알로에 신규 제품화への 응용이 기대되었다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부의 광역연계협력사업비 (과제번호: R000451) 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Raoult-Wack, A. L., S. Guilbert, M. Le Maguer, and G. Rios (1991) Simultaneous water and solute transport in shrinking media-Part I: Application to dewatering and impregnation soaking process analysis (osmotic dehydration). *Drying Technol.* 9: 589-612.
2. Raoult-Wack, A. L. (1994) Recent advances in the osmotic dehydration of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 5: 255-260.
3. Themelin, A., A. L. Raoult-Wack, A. Lebert, and M. Danzart (1997) Multicriteria optimization of food processing combining soaking prior air drying. *Drying Technol.* 15: 2263-2279.
4. Saurel, R., A. L. Raoult-Wack, G. Rios, and S. Guilbert (1994) Mass transfer phenomena during osmotic dehydration of apple I. Fresh plant tissue. *Int. J. Food Sci. & Technol.* 29: 531-542.
5. Chavan, U. D. (2012) Osmotic dehydration process for preservation of fruits and vegetables. *J. Food Res.* 1: 202-209.
6. Rahman, M. S. (2007) *Osmotic dehydration of foods*. pp. 433-446. In: *Handbook of Food Preservation*. 2nd ed., M.S. Rahman (ed.), CRC Press, Boca Raton, USA.
7. Tortoe, C. (2010). A review of osmodehydration for food industry. *Afr. J. Food Sci.* 4: 303-324.
8. Khan, M. R. (2012) Osmotic dehydration technique for fruits preservation- A review. *Pak. J. Food Sci.* 22: 71-85.
9. Kim, S. A., J. H. Baek, and S. Y. Lee (2008) Concentration of Aloe vera gel by DIS (Dewatering & Impregnation Soaking) process and process kinetics of DIS concentration. *Food Eng. Prog.* 12: 198-208.
10. Kim, S. A., J. H. Baek, C. W. Lee, and S. Y. Lee (2008) Effects of osmotic agents, operating pressure and agitation processings on osmotic dehydration process of Aloe vera gel. *Food Eng. Prog.* 12: 275-283.
11. Yu, D. J., S. M. Wang, and K. B. Song (2010) Dehydration of *Opuntia ficusindica* and *Aloe vera* slices using polyethylene glycol and comparison with other drying methods. *J. Korean Food Sci. Nutr.* 39: 1024-1029.
12. Garcia-Segovia, P., C. Moggetti, A. Andrs-Bello, and J. Martinez-Monz (2010) Osmotic dehydration of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller). *J. Food Eng.* 97: 154-160.
13. Pisalkar, P. S., N. K. Jain, and S. K. Jain (2011) Osmo-air drying of aloe vera gel cubes. *J. Food Sci. Technol.* 48: 183-189.
14. Kwon, H. M., J. M. Cha, W. Hur, and S. Y. Lee (2013) Optimization of DIS (dewatering & impregnation soaking) process for concentration of *Aloe vera* gel. *Food Eng. Prog.* 17: 8-18.
15. Kwon, H. M., J. M. Cha, W. Hur, and S. Y. Lee (2013) Influence of temperature on mass transfer kinetics and microscopic structure during DIS process of *Aloe vera* Leaf. *Food Eng. Prog.* 17: 112-120.
16. Lewicki, P. P. and R. Porzecka-Pawlak (2005) Effects of osmotic dewatering on apple tissue structure. *J. Food Eng.* 66: 43-50.
17. Cavalla, D. (2001) Adaptations and innovations in drug delivery. *Drug News and Perspectives* 14: 495-499.
18. Claudia, F. P. (2005). Safety assessment on polyethylene glycol (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicol.* 214: 1-38.
19. Choi, D. W., H. H. Shin, and J. G. Kim (2006) A study of dewatering phenomenon of a potato slice cytorrhysed by high molecules.

- Korean J. Food & Nutr.* 19: 358-365.
20. Mayor, L., R. Moreira, F. Chenlo, and A. M. Sereno (2006) Kinetics of osmotic dehydration of pumpkin with sodium chloride solution. *J. Food Eng.* 74: 253-252.
 21. Santchurn, S. J., A. Collignan, and G. Trystram (2007) Impact of solute molecular mass and molality, and solution viscosity on mass transfer during immersion of meat in a complex solution. *J. Food Eng.* 78: 1188-1201.
 22. Eberendu, A. R., G. Luta, J. A. Edwards, B. H. McAnalley, and B. Davis (2005) Quantitative colorimetric analysis of aloe polysaccharides as a measure of *Aloe vera* quality in commercial products. *J. AOAC Int.* 88: 684-691.
 23. Hestrin, S. (1949) The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J. Biol. Chem.* 180: 249-261.
 24. O'Brien, C. (2005) *Physical and Chemical Characteristics of Aloe gels*. Ph. D. Thesis, University of Johannesburg, Johannesburg, Republic of South Africa.
 25. Crosbie, G. B. (1991) The relationship between starch swelling properties, paste viscosity and boiled noodle quality in wheat flours. *J. Cereal Sci.* 13: 145-150.
 26. Seker, M. and M. A. Hanna (2006) Sodium hydroxide and trimeta-phosphate levels affect properties of starch extrudates. *Ind. Crop. Prod.* 23: 249-255.
 27. Anderson, R. A., H. F. Conway, V. F. Pfeife, and E. L. Griffin Jr. (1969) Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Sci. Today* 14: 4-7, 11-12.
 28. Ogawa, K., T. Watanabe, J. Tsurugi, and S. Ono (1972) Conformational behavior of a gel-forming (1→3)- β -D-glucan in alkaline solution. *Carbohydr. Res.* 23: 399-405.
 29. Yaron, A. (1993) Characterization of Aloe vera before and after autodegradation and stabilization of the natural fresh gel. *Phytother. Res.* 7: S11-S13.
 30. Femenia, A., P. Garcia-Pascual, S. Simal, and C. Rossello (2003) Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide alcamannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydr. Polym.* 51: 397-405.
 31. Diehl, B. and E. E. Teichmuller (1998) Aloe vera, quality inspection and identification. *Agro. Food Industry Hi-Tech* 9: 14-16.
 32. Davis, B., and W. J. Goux (2009) Single-laboratory validation of an NMR method for the determination of Aloe vera polysaccharide in pharmaceutical formulations. *J. AOAC Int.* 92: 1607-1616.
 33. Luta, G., C. Duncan, and R. Sinnott (2009) Chemical characterization of polysaccharide-rich ingredients from *Aloe vera*, *Larix laricina*, *Larix occidentalis*, and *Undaria pinnatifida*. *Integrative Medicine's 6th Annual Natural Supplements Conference*. Jan 22-25, San Diego, California, USA.
 34. Nejatizadeh-Barandozi, F., and S. T. Enferadi (2012) FT-IR study of the polysaccharides isolated from the skin juice, gel juice and flower of *Aloe vera* tissues affected by fertilizer treatment. *Organic and Medicinal Chemistry Letters* 2: 33-41.
 35. Chang, X., B. Y. Chen, Y. M. Peng (2011) Water-soluble polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of *Aloe vera* Miller. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 42: 197-203.
 36. Lin, W. J. and C. H. Lu (2002) Characterization and permeation of microporous poly(ϵ -caprolactone) films. *J. Membrane Sci.* 198: 109-118.
 37. Kumar, P., S. Kumar, A. Kumar, and M. Chander (2010) Physicochemical characterization of solid dispersions of cefdinir with PVPK-30 and PEG4000. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* 3: 948-956.
 38. McAnalley, B. H. (1989) Process for preparation of aloe products. *US Patent* 4,851,224.
 39. Wang, X., X. Xu, and L. Zhang (2008) Thermally induced conformation transition of triple-helical lentina in NaCl aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* 112: 10343-103.
 40. Wang, C., Y. Zhang, H. X. Huang, M. B. Chen, and D. S. Li (2011) Solution conformation of konjac glucomannan single helix. *Adv. Mater. Res.* 197-198: 96-104.
 41. Farina, J. I., F. Sineriz, O. E. Molina, and N. I. Pertti (2001) Isolation and physicochemical characterization of soluble scleroglucan from *Sclerotium rolfsii*. Rheological properties, molecular weight and conformational characteristics. *Carbohydr. Polym.* 44: 41-50.
 42. Bao, X. F., Y. Zhen, L. Ruan, and J. N. Fang (2002) Purification, characterization, and modification of T lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 623-629.
 43. Dong, Q., L. M. Jia, and J. N. Fang (2006) A β -D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* and its aqueous conformation. *Carbohydr. Res.* 341: 791-795.