

## 팽나무버섯 수확후의 톱밥배지로부터 단백다당류의 분리 및 정제

하효철 · \*박 신 · 박경숙 · 이춘우 · 정인창 · 김선희 · 권용일 · †이재성

영남대학교 식품가공학과 · \*대구대학교 농화학과

### Isolation and Purification of Protein-bound Polysaccharides from Mycelia of *Flammulina velutipes* Grown on Sawdust Medium

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

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

\*Dept. of Agricultural Chemistry, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea

#### ABSTRACT

Protein-bound polysaccharides(PBP) were isolated, purified, and characterized from the sawdust media after harvesting the fruit body of *Flammulina velutipes*. The yield of the crude PBP(Fr.CA) extracted from the sawdust media, was 0.367% relative to the original sawdust media. The total sugar and protein contents of Fr.CA were 19.8% and 23.8% respectively. Using the membrane filtration, the fraction of which the molecular weight is over 300 kDa(Fr.A) was isolated from the Fr.CA and the yield was 44.6% relative to the Fr.CA. This result indicates that high molecular PBP is the dominant components of the Fr.CA. The Fr.A was separated into three fractions(Fr.A-1, Fr.A-2 and Fr.A-3) whose yields are 5.8%, 8.5% and 13.2% respectively. These fractions were further purified using gel filtration, obtaining a single peak in each fraction that considered as pure PBP. Among them, the yield of Fr.A-1- $\alpha$  was 20.9% relative to the Fr.A-1, and the molecular weight was 800 kDa. Monosaccharide components such as glucose, galactose, mannose, xylose and fucose could be detected all fractions by a HPLC analysis. Especially in the Fr.A-1- $\alpha$  fraction, the content of glucose and galactose appeared to be high.

#### 서 론

항암성분을 가지는 다당류는 식물(1), lichen(2), 해조류(3), 곤충(4), 균류(5-6) 등 다양한 천연자원으로부터 분리되었다. 항암작용이 있는 버섯은 미국에서 98과 1000종, 일본에서 28속 153종, 한국에서 35과 82속 162종이 자생한다고 보고되어(7) 이에 관한 활발한 연구가 현재 진행되고 있다(8-

14). 한국산 담자균류의 항암작용에 관한 연구는 Kim 등(15)이 *C. versicolor*, *P. ostreatus*, *L. edodes* 자실체의 sarcoma-180에 대한 항암작용을 보고한 이래 *S. commune* 및 *A. auricula-judae*(16), *T. sanguinea*(17), *C. versicolor*(18, 19), *G. lucidum*(20), *P. atrotomentosus*(21), *F. velutipes*(22), *P. pulmonarius*(23), *P. squarrosa*(24) 등에서 항암작용이 보고되었다. 본연구에 사용된 팽나무버섯의 항

† Corresponding Author

암성분에 관한 연구로 Yoshioka 등(25)은 팽나무버섯의 자실체로부터 추출한 neutral polysaccharide fraction이 sarcoma-180에 대해 82%의 억제율을 나타내며, 그 구성당류는 glucose, galactose, mannose, xylose, arabinose라고 보고하였고, Ohkuma 등(26)도 팽나무버섯 자실체로부터 분리된 단백당류가 sarcoma-180에 대한 억제효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 Woo 등(22)은 팽나무버섯의 자실체를 열수추출하여 얻은 조단백당류가 암세포의 성장을 억제했으며 그 구성당류는 glucose(45.4%), galactose (24.3%), mannose (20.3%), xylose(4.3%), fucose(5.7%)라고 보고하였다. 담자균류에서 항암효과를 가진 단백당류는 자실체, 액체배양 균사체 및 고체배양 균사체로부터 얻어질 수 있는데 본 연구에서는 농가에서 팽나무버섯을 수확한 후 퇴비로 사용하고 있는 폐자원인 톱밥배지로부터 항암성분인 단백당류를 추출하였으며 이를 분리 정제하여 그 특성을 조사하였기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본연구에 사용한 균주는 경북균이연구소에 보관중인 *Flammulina velutipes* (Curt. ex. Fr.) Sing을 분양받아 사용하였으며 보존용배지는 MYG배지(27)를 사용하였는데 그 조성은 malt extract 1.0%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%이다. 톱밥배양을 위한 톱밥배지조성은 oregon pine sawdust 80%, rice bran 20%이다.

### 조단백당류의 추출

단백당류 추출을 위한 재료로는 팽나무버섯을 톱밥배지로 병재배하여 버섯을 수확한 후의 톱밥균사체를 사용하였다. 톱밥균사체로부터 단백당류의 추출은 Fig. 1과 같은 방법으로 실시하였으며, 이때 30, 50, 70 및 95% ethanol을 사용하여 ethanol의 농도별 침전물 수율을 비교하였다.

### 당 및 단백질의 정량분석

당의 정량분석은 phenol-sulfuric acid법(28)으로 실시하였다. 즉 5%(w/v) phenol 0.2ml와 sulfuric acid 1ml를 시료와 반응시킨 후 UV-visible spectrophotometer (Pharmacia LKB, Ultrospec

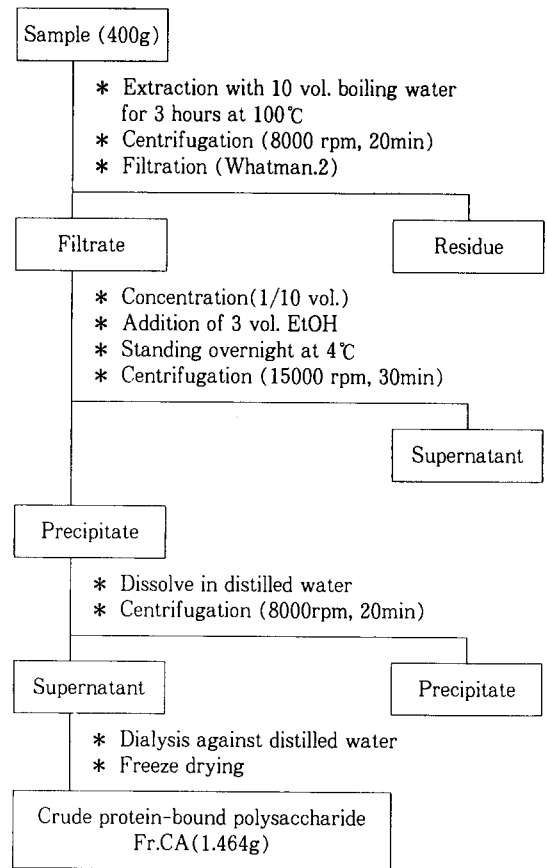


Fig. 1. The extraction procedure of crude protein-bound polysaccharides.

Plus)를 사용하여 485nm에서 흡광도를 측정하고 glucose 표준곡선을 기준으로 시료중 당의 함량을 정량하였다. 총단백질의 정량분석은 Bradford의 방법(29)에 따라 실시하였다. 즉 Bradford reagent 1ml를 시료와 반응시킨 후 UV-visible spectrophotometer를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma Co.) 표준곡선을 기준으로 시료중 단백질의 함량을 정량하였다.

### 박막여과에 의한 분획

단백당류의 정제를 위하여 분자크기에 따라 분리가 가능한 박막여과에 의한 분획을 시도하였다. *F. velutipes*로부터 추출한 조단백당류 시료 1g을 100ml의 증류수에 녹인 다음 Fig. 2와 같이 Diaflo XM300(MW cut-off: 300,000), YM100(MW cut

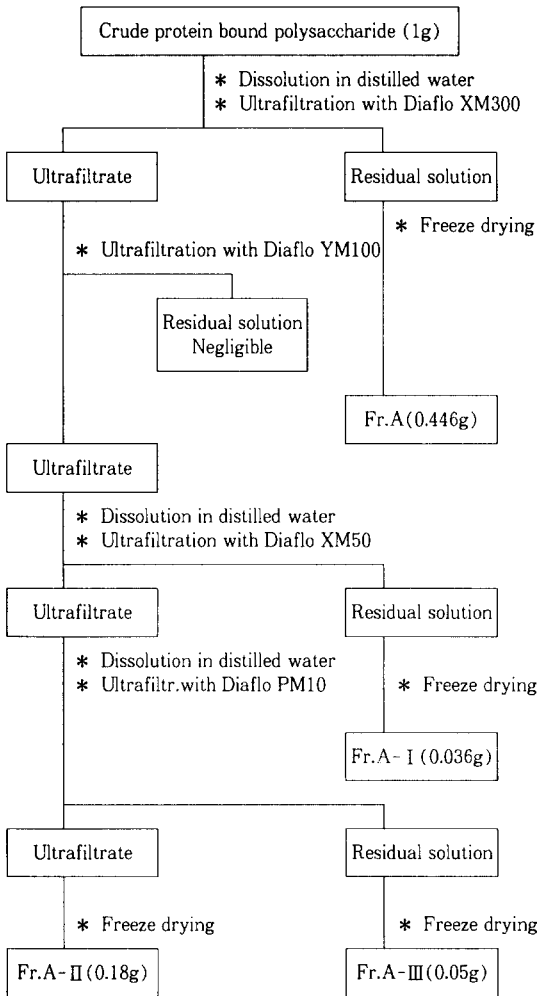


Fig. 2. Fractionation procedure of protein-bound polysaccharides from *Flammulina velutipes* by the membrane filtration.

-off : 100,000), XM50(MW cut-off : 50,000), PM10(MW cut-off : 10,000)의 박막을 차례대로 사용하여 분획하였다. 이때 박막여과를 위하여 Amicon Diaflo system에 질소가스를 사용하였으며 각 단계의 박막여과에서 원래 용량의 5분의 1가량이 되도록 농축하였다. 농축된 각 분획은 동결건조시켜 수율을 확인하였다.

DEAE-sephadex column chromatography  
박막여과에 의해 분리한 분자량 30만 이상의 분획

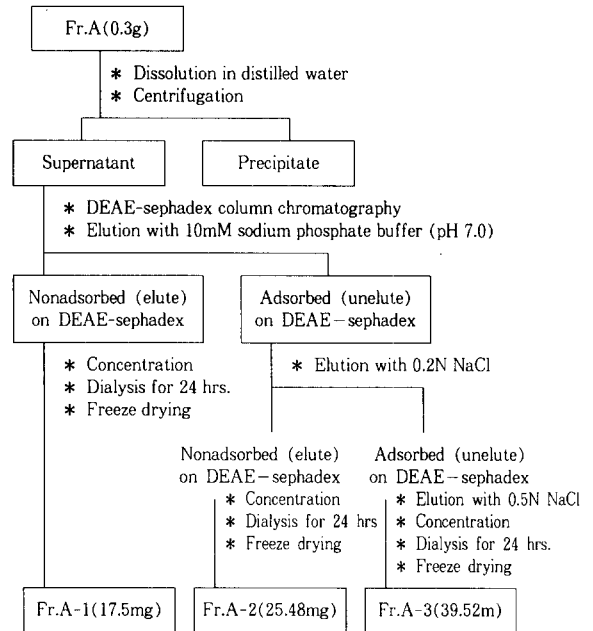


Fig. 3. Isolation procedure of protein-bound polysaccharides by DEAE-sephadex column chromatography.

을 DEAE-sephadex로 Fig. 3과 같이 정제하였다. DEAE-sephadex A-50(Pharmacia Co.)은 Cooper의 방법(30)으로 처리하였으며, 전처리된 수지를 유리관(2.5×30cm)에 충전한 후 시료의 농도를 100mg/10ml로 하여 column에 적용하였다. 시료는 stepwise방법으로 전개하였으며 280nm에서 흡광도 측정으로 단백질의 용출을 확인한 다음 phenol-sulfuric acid법으로 당류검정을 실시함으로써 단백질 당류를 확인하였다.

Sepharose 2B gel filtration chromatography

DEAE-sephadex column에서 분리된 분획을 농축한 후 sepharose 2B(Pharmacia Co.) gel column(2.5×40cm)에 농축시료 10ml를 적용하여 0.01M sodium phosphate buffer(PH 7.0)로 전개하였다. 흡광도 측정(280nm)으로 단백질의 용출을 확인한 후 phenol-sulfuric acid법으로 당류검정을 실시함으로써 단백질당류를 확인하였다

분자량 측정  
0.01M sodium phosphate buffer(PH 7.0)로 평

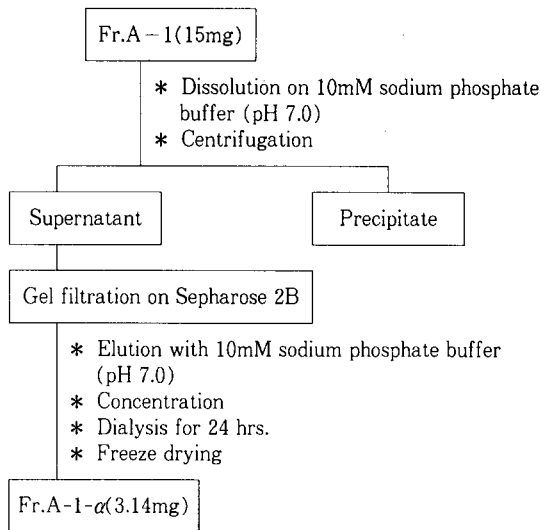


Fig. 4. Purification procedure of protein-bound polysaccharides by gel filtration chromatography.

형시킨 sepharose 2B column ( $2 \times 95$ cm)의 void volumn( $V_0$ )을 구한 후 column을 완전히 수세하고 표준단백질과 단백다당류를 혼합해서 column에 적용하여 각각의 elution volumn( $V_e$ )을 구한다. 표준단백질의 분자량에 대하여  $V_e/V_0$ 값을 plot한 검량선과 대비하여 단백다당류의 분자량을 추정하였다. 이때 표준단백질은 blue dextran(MW 2,000,000), thyroglobulin bovine(MW 669,000), alcohol dehydrogenase (MW 150,000)를 사용하였다.

#### 단당류 분석

단백다당류로 확인된 분획을 2M HCl 0.25ml로 용해시켜 tube를 봉하고  $100^\circ\text{C}$ 에서 5시간 동안 가열분해한 후 T. L. C.로 분석하였다. Silica gel plate (Merck Co.  $20 \times 20$ cm)에 시료액을 찍은 다음 2-propanol/acetone/0.1M lactic acid의 용매를 사용하여 전개하고 발색제 (diphenyl amine/aniline/phosphoric acid)로 분무 건조한 후 10분 동안  $100^\circ\text{C}$ 에서 가열하여 발색시켰다. HPLC에 의한 단당류 분석은 단백다당류로 확인된 분획을 2N HCl용액으로  $100^\circ\text{C}$ 에서 8시간 가수분해시켜 여과한 후, 여액을 감압농축기로 농축시키고 16mM MeOH  $50 \mu\text{l}$ 와 함께 섞어 시료로 사용하였다. 각 표준당(농도 0.2%)에 대해서도 같은 방법으로 행하였다. 이때 col-

umn은 cabopac PA<sub>1</sub>( $4 \times 250$ nm)을 사용했으며 flow rate는 1ml/min, detector는 RI, injection volumn은  $20 \mu\text{l}$ 였다.

#### 아미노산 분석

단백다당류 분획을 6N HCl용액으로  $105^\circ\text{C}$ 에서 24시간 가수분해시켜 여과한 후 여액을 감압농축기로 농축시키고 ethanol : water : triethylamine(2 : 2 : 1, v/v/v)  $20 \mu\text{l}$ 와 함께 섞어 감압하에서 완전히 건조한다. 여기에 ethanol : water : triethylamine : phenylisothiocyanate(7 : 1 : 1 : 1, v/v/v/v)  $30 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 실온에서 20분간 방치하고 감압하에서 완전히 건조한다. 이것을 pico.tag용액(Eluent A)  $250 \mu\text{l}$ 로 희석해서 분석기(Waters 996)에 주입하였으며, 각 표준아미노산( $250 \text{pmol}$ )에 대해서도 같은 방법으로 행하였다. 이때 분석조건은 Column : pico.tag ( $3.9 \text{mm} \times 15 \text{cm}$ ), eluent A : pico.tag용액, eluent B : 60%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , flow rate : 1ml/min, detector : UV( $254 \text{nm}$ ), column temp. :  $35^\circ\text{C}$ , injection volumn :  $10 \mu\text{l}$ 이다.

#### 결과 및 고찰

##### 조단백다당류의 추출 및 성분분석

*F. velutipes*의 톱밥균사체 400g을 열수추출한 후 ethanol침전을 거쳐 동결건조한 조단백다당류를 Fr. CA라 명명하였으며, Fr. CA의 추출수율은 0.032g-1.464g이었다. Table 1은 ethanol 농도별 Fr.CA의 추출수율을 나타낸 결과로서 ethanol의 농도가 30%일때 0.032g(0.008%)이었으며 ethanol 농도가 증가할수록 조단백다당류의 추출수율이 증가하여 ethanol의 농도가 95%일때 1.464g(0.367%)의 조단백다당류를 얻었다. 이는 단백다당류의 회수에서 보편적으로 95% ethanol침전을 이용하고 있는 사실과 일치하는 결과이다. 박 등(34)은 구름버섯의 액체배양 균사체 및 자실체로부터 단백다당류를 추출한 수율이 액체배양 균사체의 경우 0.15%-0.51%, 자실체의 경우 12.25%-19.25%라고 보고하였는데, 본연구의 톱밥균사체에서의 수율 0.367%는 액체배양 균사체에서의 수율과는 큰 차이가 없으나 자실체에서의 수율보다는 훨씬 낮았다. 그러나 버섯 수확후 폐기될 톱밥배지로부터 회수율이 이 만큼 된다고 하면 적절한 공정을 고안하여 회수할 경우 엄청난 다당류의 재활용 가능성을 제시한다고 볼 수 있다. 한편 Table 2는 침전에 사용한 ethanol 농도

**Table 1. Yield of crude protein-bound polysaccharides extracted with different ethanol concentration.**

Ethanol concentration(%)	Yield	
	wt.(g)	%
30	0.032	0.008
50	0.112	0.028
70	0.468	0.117
95	1.464	0.366

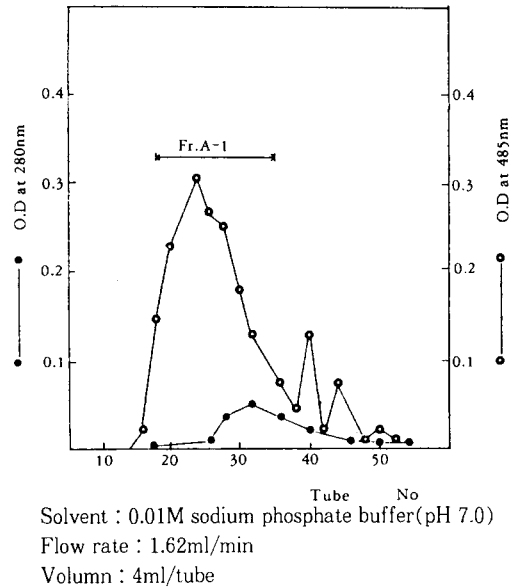
**Table 2. Total sugar and protein contents of each fraction from *F. velutipes*. (Unit : %)**

Fraction	Ethanol concentration for extraction(%)	Contents	
		total sugar	total protein
Fr. CA	30	33	19
Fr. CA	50	25	30.5
Fr. CA	70	31	21.3
Fr. CA	95	19.8	23.8
Fr. A	95	29.1	25.2
Fr. A-1	95	33.6	7.3
Fr. A-1- $\alpha$	95	37.9	1.2

에 따른 Fr.CA의 당 및 단백질 함량을 정량분석한 결과인데, ethanol의 농도가 30% 일때 총당의 비율이 가장 높았고 ethanol 농도가 95% 일때 총당의 비율이 가장 낮은 현상을 보여주고 있다. 단백질다당류의 성분을 분석한 연구(14, 25, 31-33)에 의하면 항암성분이 뛰어난 고도로 정제된 분획의 성분은 주로  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,6 분지를 갖는 D-glucan 이라고 보고한 바, 조단백다당류 추출시 수율면에서는 95%의 ethanol이 유리하지만 항암성이 뛰어난 다당류를 다량 함유하고 있는 단백질다당류를 얻기 위해서는 저농도 ethanol에 의한 단백질다당류의 추출도 검토되어야 할 것으로 사료된다. 이는 분획별로 항암 실험을 실시하여야 하며 동물실험을 위해서는 다량의 시료가 필요하므로 추후 별도의 실험계획으로 추진되어야 할 것이다.

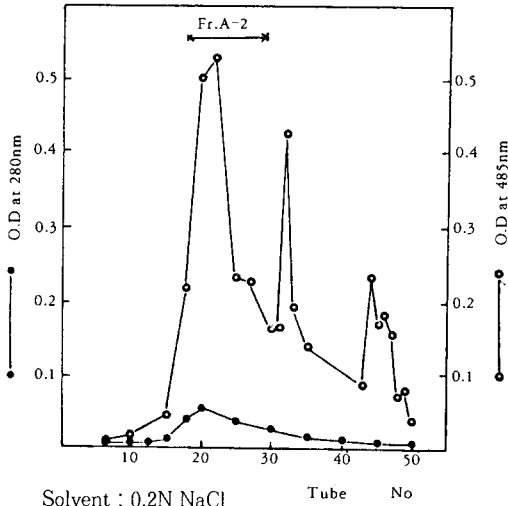
**단백다당류의 분리 및 정제**

조단백다당류(Fr.CA)를 박막여과, 이온교환 크로마토그래피 및 겔여과를 이용하여 분리 정제하였는데 조단백다당류를 박막여과하여 얻은 분자량이 30만 이상인 분획을 Fr.A라고 하였으며 DEAE-sephadex 이온교환 크로마토그래피를 통해 분리한 분획을 각각 Fr.A-1, Fr.A-2, Fr.A-3, 그리고 이



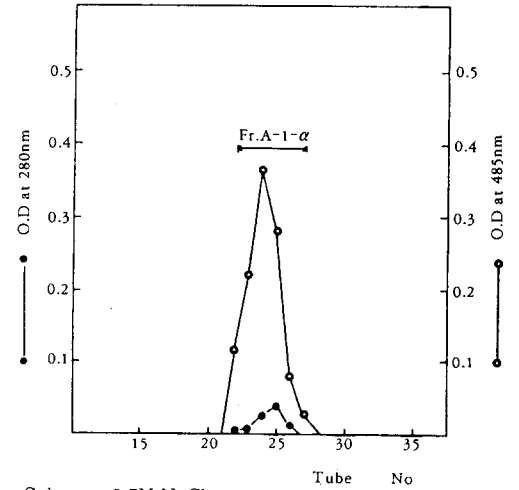
**Fig. 5. The DEAE-sephadex ion exchange chromatography of Fr.A eluted by 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0).**

들 분획을 다시 겔여과를 통해 분리한 분획을 각각 Fr.A-1- $\alpha$ , Fr.A-2- $\alpha$ , Fr.A-3- $\alpha$ 로 명명하였다 (Fig. 1-Fig. 4). Fr.CA 1g을 박막여과로 분획한 결과 분자량 30만 이상의 Fr.A분획이 44.6%로 거의 대부분을 차지하여 고분자 단백질다당류가 주요 성분임을 확인할 수 있었다. 이들 30만 이상의 고분자 분획 Fr.A를 DEAE-sephadex A-50 column에서 stepwise방법으로 분획한 결과 Fr.A 분획으로부터 당 반응과 단백질 반응을 동시에 나타내는 3개의 분획을 얻었으며(Fig.5-7) 이들 각 분획의 수율은 Fr.A를 기준으로 각각 5.8%(Fr.A-1), 8.5%(Fr.A-2), 13.2%(Fr.A-3)이었다. 이들 분획을 농축한 후 sepharose 2B column으로 겔여과를 실시한 결과 거의 순수한 단일 단백질다당류의 peak를 얻을 수 있었다(Fig.8-10). 이들 중 특히 Fr.A-1을 분획하여 얻은 Fr.A-1- $\alpha$ 의 수율은 Fr.A-1을 기준으로 20.9%였다. 박막여과, 이온교환 크로마토그래피 및 겔여과에 의해 정제된 각 분획의 당 및 단백질 함량을 정량분석한 결과(Table 2), 고도로 정제된 분획(Fr.A-1- $\alpha$ )일수록 당의 함량이 뚜렷이 증가하였는데 이는 항암성분이 뛰어난 고도로 정제된 분획의 성분은 주로  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,6 분지를 갖는 D-glucan이라는 단백질다당류의 성분을 분석한 연구



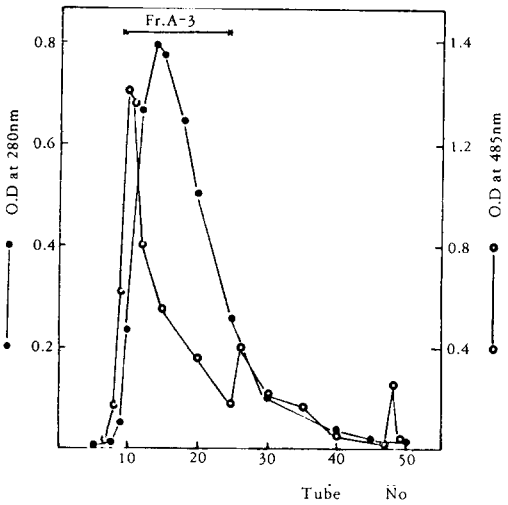
Solvent : 0.2N NaCl  
Flow rate : 2.29ml/min  
Volumn : 4ml/tube

Fig. 6. The DEAE-sephadex ion exchange chromatography of Fr.A eluted by 0.2N NaCl.



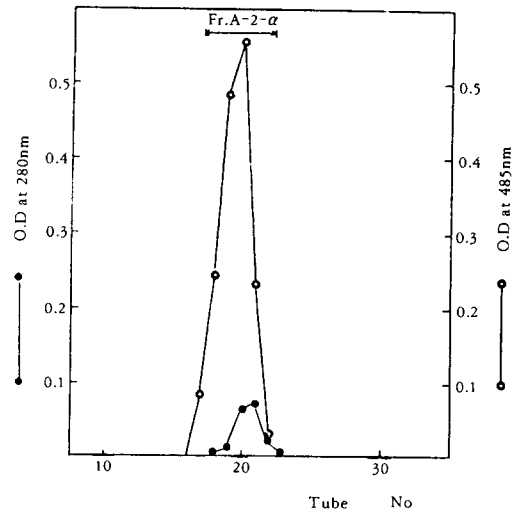
Solvent : 0.5N NaCl  
Flow rate : 2.2ml/min  
Volumn : 4ml/tube

Fig. 7. The DEAE-sephadex ion exchange chromatography of Fr.A eluted by 0.5N NaCl.



Solvent : 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0)  
Flow rate : 0.34m/min  
Volumn : 4ml/tube

Fig. 8. The Sepharose 2B gel filtration chromatography of Fr. A-1 eluted by 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0).



Solvent : 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0)  
Flow rate : 0.23m/min  
Volumn : 4ml/tube

Fig. 9. The Sepharose 2B gel filtration chromatography of Fr. A-2 eluted by 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0).

(14,25,31-33)와도 일치하는 결과로서 분리 정제되는 과정에서 항암작용의 가능성이 높은 단백당류

를 추출할 수 있었다.

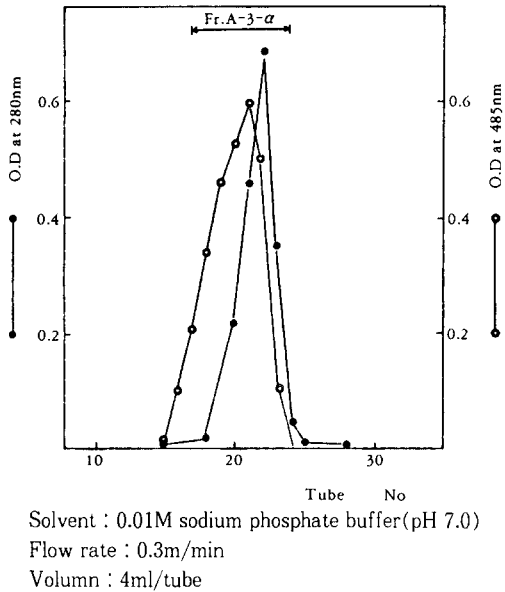


Fig. 10. The Sepharose 2B gel filtration chromatography of Fr. A-3 eluted by 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0).

단백다당류의 분자량

단백다당류의 분자량 측정은 항암작용이 있다고 보고된 neutral polysaccharide 분획인 Fr.A-1-α에 대해서 실시하였다. 표준단백질과 Fr.A-1-α를 Sepharose 2B column에 용출시키며 검정한 결과, Fr.A-1-α의 분자량은 800kDa 부근이었다(Fig. 11). Wang 등(35)은 *G. tsugae* 자실체로부터 얻은 단백질의 분획 중에서 FIII-1-a분획의 분자량이 70만 정도이며 sarcoma-180에 대한 억제율이 78.6%에 달한다고 보고하였는데 본연구의 Fr.A-1-α분획도 이와 유사한 분자량 크기였다.

단백다당류의 단당류 및 아미노산조성

먼저 단당류의 정성분석으로 T.L.C.를 실시한 결과 Fr.CA, Fr.A-2-α, Fr.A-3-α에서 glucose, galactose, mannose의 세가지 단당류가 검출되었으며, Fr.A-1-α에서는 glucose만 확인되었다. 그러나 HPLC를 이용하여 단당류를 분석한 결과는 Table 3. 에서 보는 바와 같이 모든 분획에서 glucose, galactose, mannose, xylose 및 fucose의 5가지 단당류가 검출되었으며 특히 neutral polysaccharide분획인 Fr.A-1-α에서는 glucose와 galactose의 함량이 상대적으로 높게 나타났다. Yoshioka 등(25)은

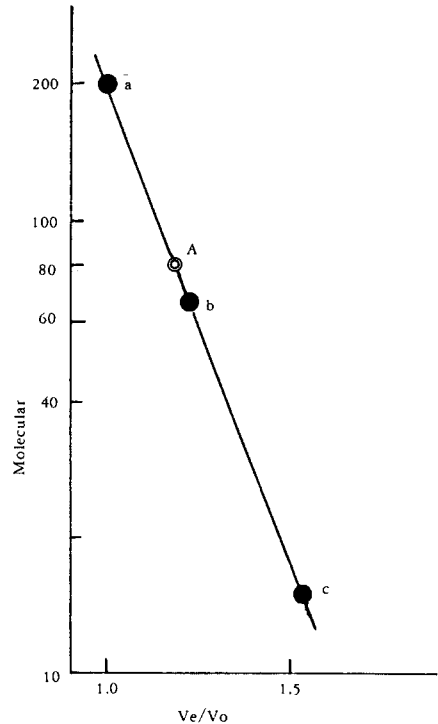


Fig. 11. Determination of molecular weight of Fr. A-1-α by Sephadex 2B gel filtration.

Vo : void volum

Ve : elution volumn of each protein

a : bule dextran(MW 2,000,000)

b : thyroglobulin bovine(MW 669,000)

c : alcohol dehydrogenase(MW 150,000)

A : Fr.A-1-α

*F. velutipes* 자실체에서 추출한 단백질의 구성단당류가 glucose, galactose, mannose, xylose, arabinose라고 보고하였으며, Woo 등(22)은 *F. velutipes* 자실체에서 추출한 단백질의 구성단당류가 glucose(45.4%), galactose(24.3%), mannose(20.3%), xylose(4.3%), fucose(5.7%)라고 보고한 바, 본연구에서 톱밥균사체로부터 추출한 단백질도 자실체에서 추출한 단백질과 거의 유사한 단당류 구성을 보인다는 것을 알 수 있다. *F. velutipes*의 단백질 각 분획에 대해 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 4와 같이 aspartic acid, glutamic acid, glycine, serine, alanine, proline 등이 주요 구성분이었으며, cysteine은 제외된 모든 분획(Fr.A-1-α, Fr.A-2-α, Fr.A-3-α)에서 검출되지 않았다.

Table 3. Monosaccharide composition of each fraction isolated from the sawdust mycelia of *Flammulina velutipes*. (Unit:%)

Fraction	Glucose	Galactose	Mannose	Xylose	Fucose
CA	21.69	30.57	35.12	4.58	8.04
A-1- $\alpha$	36.41	45.39	4.67	4.90	8.63
A-2- $\alpha$	11.49	39.52	36.04	5.23	7.72
A-3- $\alpha$	14.65	25.06	47.56	4.71	8.02

Table 4. Amino acid composition of each fraction isolated from the sawdust mycelia of *Flammulina velutipes*. (Unit:%)

Amino acids	Fr.CA	Fr.A-1- $\alpha$	Fr.A-2- $\alpha$	Fr.A-3- $\alpha$
Aspartic acid.	13.52	7.90	10.88	13.78
Glutamic acid	15.41	14.64	15.40	18.14
Serine	8.61	9.12	14.20	8.46
Glycine	15.6	7.19	15.11	15.05
Histidine	2.74	0.87	4.20	3.31
ArginineThreonine	7.68	6.46	7.20	5.70
Alanine	9.51	10.08	6.12	6.17
Proline	5.79	16.93	3.28	2.84
Tyrosine	1.33	2.78	2.21	2.19
Valine.	5.77	5.44	5.53	5.99
Methionine.	0.97	3.62	1.85	3.12
Cysteine	0.14	N.D*	N.D	N.D
Isoleucine	2.48	5.64	2.31	2.45
Leucine	2.81	5.26	5.17	4.81
Phenylalanine.	1.84	2.89	2.46	3.45
Lysine	5.8	1.19	4.06	4.56

\* N.D.:not detected

## 요 약

팽나무버섯을 수확한 후의 톱밥균사체에서 항암효과가 뛰어난 것으로 알려진 단백당류를 열수추출, 분리, 정제하였으며 그 특성을 조사하였다. *F. velutipes* 톱밥균사체로부터 추출한 조단백당류(Fr.CA)의 수율은 ethanol의 농도가 95%일때 1.464g으로서 원재료인 톱밥균사체를 기준으로 0.366%였다. Fr.CA의 당 및 단백질조성은 총당 19.8%, 총단백질 23.8%이었다. Fr.CA를 박막역과하여 분획한 결과 분자량 30만 이상의 Fr.A분획이 44.6%를 차지하여 고분자 단백당류가 주성분임을 알 수 있었다. Fr.A를 DEAE-sephadex column chromatogra-

phy로 분리한 결과 세개의 분획이 Fr.A를 기준으로 5.8%(Fr.A-1), 8.5%(Fr.A-2), 13.2%(Fr.A-3)의 수율로 얻어졌다. 이들 분획을 sepharose 2B gel filtration으로 정제한 결과 순수한 단일 단백당류의 peak를 얻을 수 있었는데 이들 중 Fr.A-1- $\alpha$ 의 수율은 Fr.A-1을 기준으로 20.9%이었으며 분자량은 800kDa정도였다. 단백당류의 당당류 조성은 모든 분획에서 glucose, galactose, mannose, xylose 및 fucose의 5종류가 검출되었으며 특히 neutral polysaccharide분획인 Fr.A-1- $\alpha$ 에서는 glucose와 galactose의 함량이 상대적으로 높게 나타났다.

## 참 고 문 헌

1. T. Fujiwara et al. (1982), *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(11), 4025.
2. Y. Nishikawa, K. Ohki, K. Takahashi, G. Kurono, F. Fukuoka and M. Emori(1974), *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(11), 2692.
3. 류병호, 김동석, 조경자, 신동번(1989), 한국식품과학회지, **21**(5), 595.
4. K. Tadashi, I. Masahiko, N. Katsuyuki, H. Chihiro and U. Shigeo(1988), *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(8), 3032.
5. N. Ohno, I. Suzuki and T. Yadamae(1986), *Chem.Pharm.Bull.*, **34**(3), 1362.
6. O. Tashihoro, T. Kohji, W. Akinori, K. Gosei, T. Sumiaki, Y. Toshiro and N. Kikuo(1988), *Chem. Pharm.Bull.*, **36**(11), 4512.
7. 안덕균(1992), 한국균학회지, **20**(2), 154.
8. K. Fukuda, T. Uematsu, A. Hamada, S. Akiya, N. Komatsu and S. Okubo(1975), *Chem. Pharm. Bull.*, **23**(9), 1955.
9. T. Mizuno, K. Ohsawa, N. Hagiwara and R. Kuboyama(1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**(7), 1679.
10. I. Hishida, H. Nanba and H. Kuroda(1988), *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(5), 1819.
11. T. Kiho, M. Sakushima, S. Wang, K. Nagai and S. Ukai(1991), *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(3), 798.
12. C. Zhuang, T. Mizuno, A. Shimada, H. Ito, C. Suzuki, Y. Mayuzumi, H. Okamoto, Y. Ma and J. Li(1993), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(6), 901.



13. K. Saito, M. Nishijima and T. Miyazaki (1989), *Chem. Pharm. Bull.*, **37**(11), 3134.
14. Y. Yoshioka, T. Sano and T. Ikekawa(1973), *Chem. Pharm. Bull.*, **21**(8), 1772.
15. B. K. Kim, E. K. Park and M. J. Shim(1979), *Arch. Pharm. Res.*, **2**, 145.
16. S. A . Lee, K. S. Chung, M. J. Shim, E. C. Choi and B. K. Kim(1981), *한국군학회지*, **9** (1), 25.
17. W. B. Hong, K. S. Chung, M. S. Woo and B. K. Kim(1982), *한국군학회지*, **10**(4), 147.
18. H. J. Cho, M. J. Shim, E. C. Choi and B. K. Kim(1988), *한국군학회지*, **16**(3), 162.
19. 박경숙, 이재양, 이상직, 김선희, 이재성(1992), *한국군학회지*, **20**(1), 72.
20. J. W. Hyun, E. C. Choi and B. K. Kim(1990), *한국군학회지*, **18**(2), 58.
21. S. D. Kwag, J. W. Bok, J. W. Hyun, E. C. Choi and B. K. Kim(1992), *한국군학회지*, **20** (3), 240.
22. M. S. Woo(1983), *한국군학회지*, **11**(4), 147.
23. K. L. Lee, C. O. Lee, H. W. Kim, J. W. Kim, S. W. Kim, E. C. Choi and B. K. Kim (1985), *한국군학회지*, **13**(1), 11.
24. W. H. Park(1982), *약학회지*, **26**(3), 185.
25. Y. Yoshioka, R. Tabeta, H. Saito, N. Uehara and F. Fukuoka(1985), *Carbohydrate Res.*, **140**, 93.
26. T. Ohkuma, K. Otagiri, T. Ikekawa and S. Tanaka(1982), *J. Pharm. Dyn.*, **5**, 439.
27. S. O. Yanagi and I. Takebe(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 58.
28. M. F. Chaplin and J. F. Kennedy(1986), *Carbohydrate analysis, actical approach*, p.2, IRL Press, Oxford and Washington DC.
29. M. M. Bradford(1976), *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
30. T. G. Cooper(1977), *In the Tools of Biochemistry*, p.136, A wiley interscience publication, N. Y. and London.
31. S. Hirase, S. Nakai and T. Akatsu(1976), *Yakugaku Zasshi*, **96**(4), 413.
32. H. Shinohara, N. Ohno and T. Yadomae (1988), *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(2), 819.
33. N. Ohno, K. Kuracki and T. Yadomae(1988), *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(3), 1016.
34. Y. D. Park, Y. K. Hong, W. K. Whang, J. D. Huh and S. Park(1989), *한국군학회지*, **17**(4), 223.
35. G. Wang, J. Zhang, T. Mizuno, C. Zhuang, H. Ito, H. Mayuzumi, H. Okamoto and J. Li (1993), *Biotech. Biochem.*, **6**, 894.