J. Korean Soc. Food Nutr.
24(1), 147 ~ 153(1995)

영지버섯에서 분리한 항암성 다당체에 관한 연구

김성환† · 김을상* · 김영식**
중부대학교 식품영양학과
*단국대학교 식품영양학과
**서울대학교 천연물과학연구소

Studies on the Polysaccharide Extracted from *Ganoderma lucidum*

Sung-Whan Kim†, Eul-Sang Kim* and Yeong-Shic Kim**
Dept. of Food Science and Nutrition, Joongbu University, Choongnam 312-940, Korea
**Dept. of Food Science and Nutrition, Dankook University, Seoul 140-714, Korea*
***Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea*

Abstract

The cultured mycelial cells of *Ganoderma lucidum* was extracted by alkali, and then neutralized by acid. The extract was passed through the column of DEAE cellulose for more purification. The neutral fraction was concentrated and precipitated with 95% ethanol. The precipitate was lyophilized and then PSG (polysaccharides) was obtained. PSG was composed of 82.2% polysaccharide, 0.7% protein and 17.1% uronic acid. Sugar conjugates of its hydrolysates were produced using with fluorescent compound (7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid : 7-AGA), and then fluorescent labeled sugar conjugates were separated by reverse phase high perfomance liquid chromatography. Hydrolysates of PSG were composed of sixteen amino acids and 95.7% glucose, 2.7% xylose, 1.6% fucose and trace amount of galactose and mannose. The immunomodulating effects of PSG on macrophage were perfomed using murine macrophage cell line ATCC TIB 71 cells. PSG augumented the phagocytic activity of TIB 71 cells against fluorescent latex beads.

Key words : *Ganoderma lucidum* polysaccharide, 7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid (7-AGA), phagocytic activity

서 론

버섯은 오래 전 부터 맛과 영양이 풍부한 식품으로 그리고 약용 등의 목적으로 사용해 왔다[1-13]. 버섯 중의 당, 유기산, 지방산, 아미노산, 핵산 등은 영양성분 및 단백질 자원으로서 뿐만 아니라 식품의 텍스쳐 및 향미를 높이는 성분으로서, 일부 스테롤, 지방산, 단백질, 핵산, 비타민, 효소류, 무기염류 등은 생체의 생리조절 물질로서 연구[2-5,7-13]되고 있으며 최근에는 버섯 중에 함유되어 있는 다당체들의 항암 및 면역조절 작용 등과 관련하여 많은 연구가 진행되고 있다[9-26].

본 연구에 사용된 영지버섯 *Ganoderma lucidium* (Leyss. ex Fr.) Karst.은 일명 만년버섯, 신이, 적지, 단지 등으로 불리우는 고등균류로 분류학상 균계 (Mycota) 진핵균아계 (Eukaryomycota) 진균문 (Eumycota) 담자균아문 (Basidio-mycotina) 동담자균아강 (Hymenobasidiomycetidae) 민주름목 (Aphyllohorales) 불로초과 (Ganodermataceae) 불로초족 (*Ganoderma* ITO) 불로초속 (*Ganoderma* KARST. em MURR)에 속한다[1-3,7,8,23].

이로 부터 추출분리한 약리성분은 30여종에 달하는 트리테르펜류의 저분자 물질과 단백질이 결합하여 형성된 다당체인 고분자 물질로 대별된다[2-4,9-14,16-24,26].

영지버섯으로 부터 분리한 저분자의 트리테르펜류는 대부분 쓴맛을 갖고 있으며 이들은 동물실험에서 급성 또는 아급성 독성이 낮고 따라서 안전성이 매우 높은 물질[2-4,13,14]로서 각종 생리활성을 나타내고[2-4,9,11-13], 영지버섯 중의 고분자 물질은 고지혈증 개선, 혈당강하작용 등을 갖고 있고[2-4,11,12], 이로 부터 분리한 다당류는 항

†To whom all correspondence should be addressed

암기능이 있어 항종양 다당체라고 불리운다[12~24,26].

영지 다당체의 개체에 대한 면역기능은 생체내의 항상성 (homeostasis)과 밀접한 관계를 갖고 있으며 영지버섯으로 부터 분리한 다당류의 면역작용과 관련하여 그 화학적 성분 및 구조에 대한 연구가 활발하고 이들의 면역계에 대한 보고는 다양하다[12~24,26].

그러나 많은 보고에도 불구하고 연구에 가장 기본이 되는 다당체를 구성하고 있는 단당류의 종류와 함량 등이 추출방법과 분석법에 따라 각기 다르고 일정치 않아서 이에 대해 보다 정확하고 객관성있는 시험방법이 요구되는 상황이다[12,16~24,26].

따라서 본 연구에서는 영지버섯의 균사체 배양물로 부터 고분자 물질인 다당체를 추출 · 분리 · 정제하여, 그 성분 조성을 밝히고 다당체와 결합된 단백질 부분의 아미노산 조성 등을 분석한 후, 영지버섯 다당체가 마우스 대식세포의 탐식능에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

영지버섯

본 실험에서 사용한 연구 재료는 전남 해남 두륜산에서 자생하는 영지버섯 (*Ganoderma lucidum*)을 채집하여 자실체로 부터 분리한 균사를 종균으로 하여 액체배양한 균사체로서 동위효소 패턴에 의하여 동정 · 확인하였다.

배지

종균은 potato dextrose agar (PDA : Difco Co.) 사면배지를 사용하였으며 배양용 액체배지는 glucose 50g, peptone 20g, KH_2PO_4 0.87g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g과 0.5% $FeCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.36% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.3% $ZnCl_2$, 0.05% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$로된 basal medium 20ml를 넣고 물을 가해 전량 1리터로 한 합성배지 (pH 4.5)를 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

배양조건

사면 배지로 부터 분리한 균사체를 종균으로 하여 액체 배양 배지에 10 : 1의 비율 (=종균 : 배지, v/v%)로 첨가하고 이를 균질화하여 25°C에서 120rpm으로 6일간 진탕배양하여 얻은 배양액을 2회 반복하여 액체 배양용 배지에 10 : 1의 비율 (v/v%)로 첨가 후 동일 조건으로 각각 6일간씩 진탕배양하였다.

영지버섯 다당체

분리 및 정제

영지버섯 배양균사체로 부터 항암성 다당체의 추출은 이[24]와 Kusunose 등[25]의 실험결과에 따라 항암성분의 추출효율이 높은 알카리 추출방법을 응용도입하였다. 액체 배양한 최종배양물 10리터를 6,000×g에서 15분간 원심분리하여 균사체를 분리하고, 10% 수산화나트륨용액을 가해 최종 농도가 2N되게 조정한 다음 실온에서 24시간 방치 후 10분간 원심분리하여 상징액을 얻었다. 이 상징액을 1N 초산용액으로 중화시켜 Visking tube에 넣고 흐르는 물에 3일간 투석한 후 6,000×g에서 15분간 원심분리한 상징액을 감압농축한 후 3배량의 95% 냉에탄올을 가해 4°C에서 24시간 방치한 다음 원심분리하여 얻은 침전물을 증류수에 용해시킨 후 진공 동결 건조하여 갈색의 조다당 분획 약 8.7g을 얻었다.

조다당 분획을 탈이온수 (Deionized distilled water)에 용해시켜 원심분리한 상징액을 DEAE Cellulose (OH^- form)으로 충진시킨 컬럼 (size : 20mm D×600mm L)에 적용하여 탈이온수 및 NaCl를 사용하여 0~4N로 만든 용액으로 농도구배에 의해 분당 0.5ml의 유속으로 용출시켜 얻은 액을 흐르는 물에 3일간 투석하고 감압농축한 후 3배량의 95% 냉에탄올을 가해 4°C에서 24시간 방치한 후 원심분리하여 얻은 침전물을 증류수에 녹인 후 여과한 여액을 동결건조하여 미백색의 건조분말 (이하 PSG로 표기함) 약 0.82g을 얻었다.

다당체의 일반성분 분석

중성당의 분석은 phenol-H_2SO_4를 이용한 Pauzer의 방법[27]에 의해 측정하였고, 우론산 분석은 gluconolactone을 표준품으로 carbazole을 이용[28]하였으며, 헥소사민 분석은 glucosamine을 표준품으로 하여 Elson-morgan법을 개량하였다[29]. 단백질의 정량은 BSA (bovine serum albumin)을 표준품으로 dye시약을 사용하여 실시[30]하였고 아미노산의 분석은 Moore와 Stein 실험계에 의한 산성 비산화 가수분해법[31]을 개량 실시하였다.

당의 조성 분석

환원성 아민화반응에 의한 형광기가 결합된 당의 제조

시료를 trifluoro acetic acid 40μl와 혼합하여 질소가스를 충진한 다음 밀봉하여 100±5°C에서 3시간 동안 가수분해하였다. 가수분해물에 증류수를 가하여 동결

건조시킨 검체와 각 단당류 표준품(glucose, mannose, galactose, fucose, rhamnose, xylose, arabinose, N-acetylgulcosamine, glucuronic acid, N-acetylgalactosamine, galacturonic acid)에 각각 methanol-pyridine-water(35 : 15 : 10) 55μl와 2μl의 acetic anhydride을 가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응액과 단당류 표준품의 반응액 30μl씩을 채취하여 coupling 시약을 가하고 마개한 후 90°C에서 15분간 반응시킨 후 질소기류하에서 과잉의 시약을 제거하고 각각 30μl의 1M $NaCNBH_3$와 0.2M 7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid(7-AGA) 15μl를 가해 37°C에서 15시간 반응시켜 형광기가 결합된 당을 제조하였다. 반응의 정도는 전기영동을 실시한 후 UV lamp(UV-Retrachter, Camag)를 사용하여 366nm에서 확인하였다.

전기영동에 의한 당의 분리

폴리아크릴아미드겔 전기영동(sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophorosis : SDS-PAGE)을 이용하여 위의 반응에 의해 얻어진 형광기가 결합된 당들의 분리를 시도하였고 이 때 반응조건으로는 stacking gel은 6% gel을, separating gel은 10~20% gel을 사용하였으며, spacer의 두께는 0.75mm의 것을 사용하였다. 위, 아래 챔버의 완충액은 0.1M-boric acid, 0.1M Tris-EDTA 2Na(pH 8.3)를 사용하였고, 시료 10μl를 50%의 sucrose에 섞어 적용시켰고, 300V에서 3시간 실시하였다. Marker로는 phenol red 및 methylene blue를 사용하였으며, 전기영동을 한 후에 주 밴드를 칼로 잘라내어 전기적인 방법으로 나일론막에 전이를 시켜서 이로 부터 1M NaCl을 이용하여 과잉의 7-AGA를 유리제거하였다[32].

액체크로마토그라프법에 의한 분석

검체 중 단당류의 종류와 구성 비율 등은 전기영동을 하여 얻어진 시료용액을 희석하여 Spheri C_{18}+Spheri phenyl 역상칼람(Applied Biosystem)을 연결 사용하여 Table 1의 조건으로 분리하였다(Spectra Phsics Co.). 형광기와 결합된 당의 머무름시간은 각각 galactose 12.3분대, glucose 13.6분대, xylose 15.2분대, fucose 21.5분대 이었다.

Table 1. HPLC condition for the analysis of monosaccharides

Column	Spheri C_{18}+Spheri phenyl(5×150mm)
Eluent	0.1M Triethylamine (adjust pH 4.0 acetic anhydride)
Flow rate	1.0ml/min.
Detector	UV 250nm
Injection volumn	5μl

영지버섯 다당체의 탐식능 증진효과 측정

TIB 71 대식세포주 배양

American Type Culture Collection(ATCC)의 마우스 대식세포주인 TIB 71 세포[33,34]는 중앙대 미생물학 교실에서 분양받았다. 세포배양은 10% FBS와 항생제(peniciline 100unit 및 streptomycin 100μg/ml, GIBCO)가 첨가된 DMEM에서 수행하였다. 다습한 5% CO_2 배양기에서 48시간 정도 증식시킨 세포를 FBS를 제외한 DMEM에 24시간 동안 연장배양 후에 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 세포는 trypan blue exclusion 검사로 생존율 95% 이상인 것만을 선택 사용하였다.

영지버섯 다당체의 처리 조건

PSG는 일반성분을 분석한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 필요한 농도로 현탁하여 멸균하였다. 배양액을 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 교환하고, 배양세포에의 PSG 처리는 투여 총용량이 100μl가 되게 각각의 농도실험군을 조정하였으며, 24시간 처리를 기본 배양시간으로 하였다.

탐식능 측정

PSG를 여러 농도로 24시간 처리 후 각각 1×10^5개의 TIB 71 세포와 1×10^6개의 green fluorescent polystyrene latex spheres(1.83μm 직경, Polyscience Co., USA)를 함유한 배지에 45분 동안 3°C의 다습 5% CO_2 배양기에서 혼합 배양한 후 PBS로 두번 원심세척하였다. 탐식능은 10^4세포 중 latex spheres를 탐식한 세포를 유식 세포분석기와 Consort 30의 histogram을 이용하여 전체 세포수에 대한 형광구탐식세포수의 백분율로 환산하였다[35,36].

통계처리

실험 결과는 평균±표준편차(Mean±S.D.)로 표시하였으며 실험에 사용한 각 실험군간의 유의성 검정은 student's t-test를 실시하였으며 상관계수를 이용하여 유의도를 판정하였다[37].

결과 및 고찰

영지버섯 다당체의 일반성분

영지버섯으로 부터 분리배양한 균사체를 알카리 추출하여 정제한 다당체 중 중성당, 우론산, 헥소사민,

단백질 및 그 아미노산 조성은 Table 2와 Table 3에서와 같이 중성당 82.2%, 우론산 17.1%, 단백질 0.7%이었으며 다당체를 구성하고 있는 아미노산은 16종으로 글루탐산, 글리신, 아스파르트산, 알라닌 등의 함량이 비교적 높고 메치오닌은 극히 소량이었다. 헥소사민의 함량은 확인만 될 뿐 정량할 수 없었고 HPLC크로마토그람상에서도 동일하였다.

영지버섯 다당체의 당 조성

Fig. 1은 영지버섯으로 부터 얻은 다당체를 가수분해하여 얻은 가수분해물을 표준단당류와 함께 환원성 아민화 반응에 의해 형광기(7-amino-1,3-naphthalene-disulfonic acid : 7-AGA)를 결합시킨 당을 제조하여 gradient gel electrophorosis에 의해 분리한 SDS-PAGE를 UV 366 nm에서 확인한 결과이다.

실험결과 Table 4 및 Fig. 2에서와 마찬가지로 영지버섯의 다당체는 glucose를 주요당으로하여 xylose, fucose, galactose, mannose 등으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Components of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*

Component	Content (w/w%)
Neutral sugar	82.2
Uronic acid	17.1
Hexosamine	trace
Protein	0.7

Table 3. Amino acid compositions of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*

Amino acid	Amino acid/PSG (μg/g)	Molar ratio
Lysine	184.3	2.3
Histidine	68.5	0.2
Arginine	322.3	3.3
Asx.[1]	710.1	9.5
Threonine	228.2	3.4
Serine	314.2	5.4
Glx.[2]	1012.0	12.2
Proline	586.3	9.0
Glycine	880.4	20.8
Alanine	604.9	12.1
Valine	475.6	7.2
Methionine	37.2	0.2
Isoleucine	290.9	4.0
Leucine	432.7	5.9
Tyrosine	126.1	1.3
Phenylalanine	290.6	3.2
Total	6564.3	100.0

[1] Asx. ; Asp. and Asn. [2] Glx. ; Glu. and Gln.

한편 영지버섯 중 다당체의 구성단당류에 대한 수 많은 실험보고는 주로 다당체를 가수분해 한 후 TMS화시켜 GLC에 의해 분석한 결과들로서 김 등[16]은 영지버섯 다당체의 구성단당류는 glucose, mannose, galactose, xylose (72.5 : 15.8 : 8.3 : 3.4)라고 보고하였으며, 강 등[17]은 영지버섯 균사체 배양물의 경우 galactose,

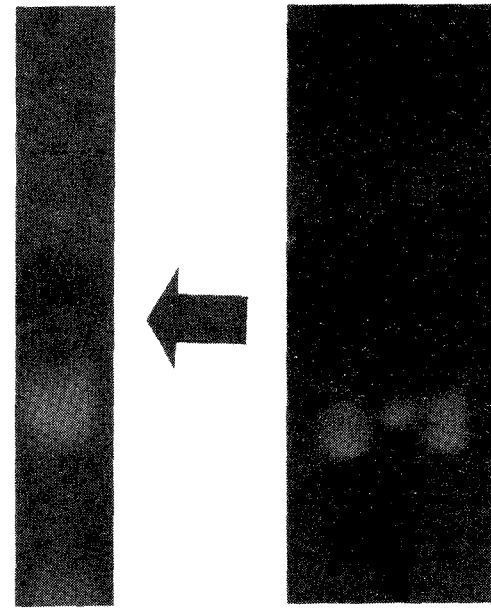

Fig. 1. 10~20% gradient SDS-PAGE analysis of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* (PSG).
The hydrolysate of PSG was conjugated with 7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid (AGA). These were electrophoresed by SDS-PAGE.
The main band indicated by arrow was analyzed with standardizated sugars which conjugated with AGA using UV lamp at 366nm. : Lane 1. *Ganoderma lucidum* ; Lane 2. Xylose-AGA ; Lane 3. Glucose-AGA ; Lane 4. Xylose-AGA +Glucose-AGA. **Ganoderma lucidum* : Neutral fraction separated from DEAE ion-exchange chromatography.

Table 4. Compositional sugar analysis of polysaccharide from *Ganoderma lucidum*

Sugar	*Content (%)
Glucose	95.7
Xylose	2.7
Fucose	1.6
Galactose	trace
Mannose	trace

* is area percent in HPLC chromatogram

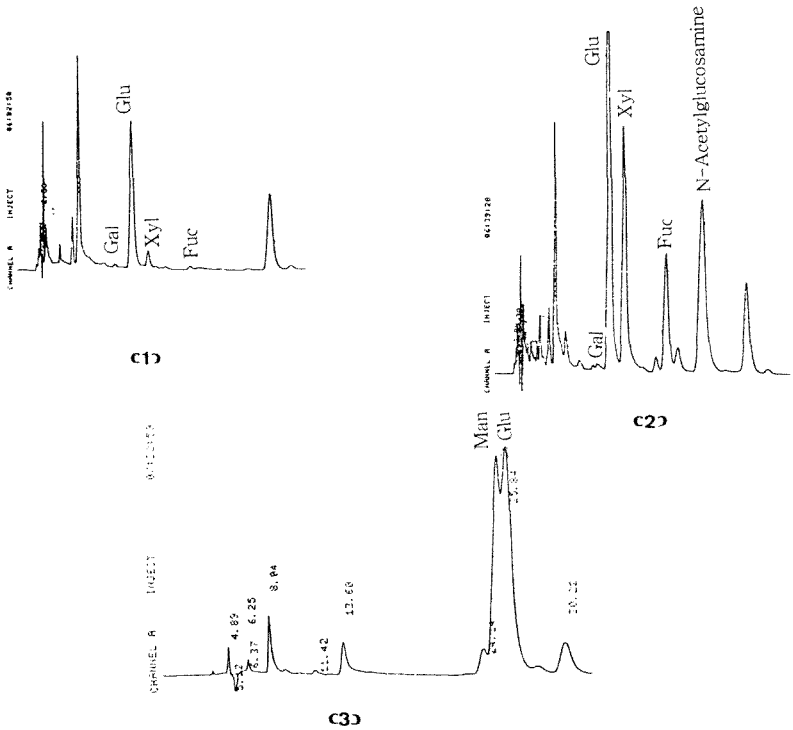

Fig. 2. Chromatograms of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* (PSG).
The hydrolysate of PSG was conjugated with 7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid(AGA). These were electrophoresed and were separated by SDS-PAGE. The main band was extracted and analyzed by HPLC at UV 250nm. (1) Chromatogram of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using C_{18} column. (2) Dopped chromatogram of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* with galactose-AGA, glucose-AGA, xylose-AGA, fucose-AGA and N-acetyl glucosamine-AGA using C_{18} column. (3) Dopped chromatogram of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* with mannose-AGA using C_{18}→Phenyl column.

glucose, xylose (62.4 : 33.1 : 4.5)라고 보고 하였고, 현 등[18]은 자실체 배양물의 경우 glucose, galactose, mannose, fucose, xylose (62.5 : 20.7 : 13.9 : 2.0 : 0.86)이라고 보고하였다. 이 등[19]은 glucose, mannose, xylose, galactose의 순으로 함량이 많았다고 보고하였으며, 水野 등[20]은 glucose, mannose, xylose, galactose (75.0 : 9.3 : 5.6 : 4.1) 등이라고 하였으며, Miyazaki와 Nishijma[21]은 glucose, xylose, arabinose (18.8 : 1.5 : 1.0)이라고 보고하였다.

본 연구와 관련하여 고속액체 크로마토그래프법에 의한 도표상의 단당류의 피크면적을 비교할 때 glucose 함량이 매우 높았으며 그 함유 비율은 95.7%이었다. 이는 영지버섯의 중성다당체가 주로 glucose임을 보여주고 있다.

기존의 연구보고는 주로 다당체를 가수분해 한 후 TMS화시켜 GLC에 의해 분석한 결과들로서 이 방법은 각 단당류들의 α, β 등 이성질체로 인하여 실험결과에 대한 데이타 해석이 어렵고 함량비율 등의 정확한 계산에 어려움 등이 따른다. 본 실험에서 행한 방법은 미량의 검체 (10^{-6}~10^{-12}mole 농도)에 대해서도 그 검출능이 우수하며 이성질체 등으로 인한 해석의 어려움 없이 함량비율 등을 정확히 계산할 수 있는 장점이 있다.

이상의 결과로 미루어 영지버섯 중 다당체는 D-glucose가 미량의 단백질과 함께 구성된 glucan으로, 함께 구성되어 있는 xylose, fucose, galactose, mannose 등과는 부분적으로 heteroglucan을 이루어 glucan의 용해성을 개선하고 다당류 용액의 안정화에 기여하는 것으로 사료된다.

영지버섯다당체의 탐식능 증진효과

대식세포의 탐식작용은 Fig. 3에서와 같이 대조군 5.8%에 비하여 영지버섯다당체 처리군의 경우 0.1mg 이상 처리군 모두에서 16% 이상으로 현저한 탐식작용의 증가 ($p<0.001$)를 보였다. 대식세포가 탐식가능한 항원을 탐식치사케하거나 또는 항원을 처리하여 T 및 B 세포에 전달하는 과정 (presentation)에 탐식이 선행되어야 하기 때문에 탐식능은 대식세포의 항미생물기능 및 항종양기능의 기본적인 지표의 하나이다[18,19]. 또

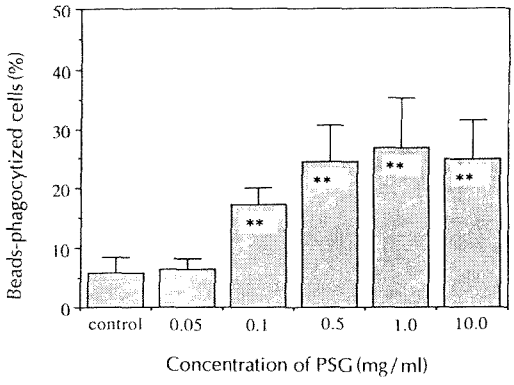

Fig. 3. Phagocytic activity of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* (PSG) on ATCC TIB 71 cells (Mouse monocyte-macrophage).
After incubation of cells with various concentrations of PSG, they were consequently cultured with fluorescent latexs beads. The beads phagocitized cells were determined by computer aided subtraction of histogram of stained cells from unstained cells. Each value is mean±S.D. of 5 samples. ** is significantly different from the control at 0.001 level.

한 탐식과정 중에 이물질이 대식세포 표면에 부착하는 동안 대식세포의 수 많은 수용성 면역인자들이 방출되어 탐식기능을 돕는다[39]. 대식세포의 탐식과정은 탄소제거 검사시 사용하는 탄소분자에 비교하여 훨씬 분자량이 크거나 유동적으로 저항하는 항원이 대부분으로 그 크기와 형태에 따라서 탐식과정에 막대한 에너지가 요구된다.

기존의 탄소를 제거하는 검사방법은 항원 대용으로 사용되는 탄소의 분자량이 작고, 약 300개의 세포에 대한 현미경적 검사법[35,36]인데 비하여 본 연구에서 수행한 검사법은 실험에 사용하는 형광탐식구가 탄소보다는 실제 항원에 가깝기 때문에 생체반응조절물질의 대식세포 탐식기능검사에 더욱 적합한 방법이다.

탐식능에 미치는 영지버섯다당체의 효과는 대식세포의 탄소제거검사(carbon clearance test)에 의한 보고[18]와 화학 유주능(chemotaxis)에 관한 보고[40]가 있으며 이는 본 실험 결과와 일치한다.

요 약

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)으로 부터 분리 배양한 균사체를 알카리추출하여 얻은 다당체의 일반성분과 당을 분석하고, ATCC의 마우스 유래 탐식 세포주 TIB 71를 이용하여 영지버섯다당체가 면역계 전체의 기능을 조정하는 대식세포의 탐식능에 미치는 영향을 연구한 결과 배양균사체로 부터 얻은 영지버섯의 다당체는 82.2%의 중성당과 우론산, 단백질이 각각 17.1%, 0.7%를 함유하고 있었으며 이를 가수분해하여 아미노산과 당을 분석한 결과 글루탐산, 글리신, 아스파르트산 및 알라닌 등 16종의 아미노산과 95.7%의 글루코오스, 2.7%의 크실로오스, 1.6%의 퓨코오스와 미량의 갈락토오스와 만노오스를 확인하였다. 따라서 영지버섯으로 부터 분리한 수용성 중성 다당분획은 글루코오스를 주성분으로 한 글루칸에 미량의 단백질이 함께 구성된 단백다당체임을 알 수 있었으며 영지버섯다당체가 대식세포의 탐식능에 미치는 효과를 측정하기 위해 형광 탐식구를 이용하여 실험한 결과 대조군의 탐식율 5.8%에 비하여 영지버섯다당체 처리군의 경우 0.1mg 이상 실험군 모두에서 16% 이상으로 현저한 탐식능 증가($p<0.001$)를 보여 영지버섯다당체가 숙주의 탐식능을 증가시킴으로써 생체내 방어기능을 높여주는 것으로 나타났다.

문 헌

1. 李時珍著(木村康一譯) : 國譯本草綱目. 春陽堂藏版, 春陽堂書店, 東京, p.171 (1979)
2. 小學館 : 中藥大辭典 (第4卷). 上海科學技術出版社, 上海, p.2731 (1985)
3. 三橋博 : 原色牧野和漢藥草大圖鑑. 北隆館, p.699 (1988)
4. 難波恒雄 : 原色和漢藥圖鑑(下). 保育社, 大板, p.247 (1984)
5. 毛利威德 : キノコ類の呈味作用と藥理的效果. 缶詰時報, **55**, 26 (1976)
6. 문범수, 이갑상 : 식품재료학. 수학사, 서울, p.126 (1979)
7. 안덕균 : 한국산 약용균류. 한국균학회지, **20**, 154 (1992)
8. 한국균학회 : 한국말 버섯이름 통일안. 한국균학회지, **6**, 43 (1978)
9. Kubota, T., Asaka, Y., Miura, I. and Mori, H. : Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) KARST. *Heluetica Chemica Acta*, **62**, 611 (1982)
10. Murasugi, A., Tanaka, S., Komiyama, N., Iwata, N., Kino, K., Tsunoo, H. and Sakuma, S. : Molecular cloning of a cDNA and a gene encoding an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2486 (1991)
11. Lee, S. Y. and Rhee, H. M. : Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum* ; Inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1359 (1990)
12. Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T. : Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked (1→3)-β-D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 988 (1990)

13. 久保道德 : 靈芝. 明寶出版社, 서울, p.51 (1986)
14. 김명자, 김하원, 이영순, 심미자, 최응칠, 김병각 : 영지의 안전성에 관한 연구. 한국균학회지, **14**, 49 (1986)
15. 신혜원, 김하원, 최칠응, 도상학, 김병각 : 한국산 영지버섯의 무기성분 및 면역증강작용에 관한 연구. 한국생약학회지, **16**, 181 (1985)
16. 김병각, 정희수, 정경수, 양문식 : 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. 한국균학회지, **8**, 107 (1980)
17. 강창률, 심미자, 최응칠, 이영남, 김병각 : 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구 만년버섯의 균사배양 및 항암성분. 한국생화학회지, **14**, 101 (1981)
18. 현진원, 최응칠, 김병각 : 한국산 고등균류의 성분 연구(제67보) : 영지버섯 자실체의 항암성분. 한국균학회지, **18**, 58 (1990)
19. 이준우, 정훈, 정천희, 이권행 : 영지균사체의 알카리 추출물이 보체계와 망내계에 미치는 영향. 한국균학회지, **18**, 137 (1990)
20. 水野卓, 加藤尙美, 戶塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 淸水雅子 : マンネン夕ケ(靈芝)の水溶性多糖類の分畫, 構造, 抗腫瘍活性について. 日本農藝化學會誌, **58**, 871 (1984)
21. Miyazaki, T. and Nishijima, M. : Studies on fungal polysaccharides, XXVII : Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3611 (1981)
22. Maruyma, H., Yamazaki, K., Murofushi, S., Konda, C. and Ikekawa, T. : Antitumer activity of *Sarcodon aspratus* (BERK.)S. Ito and *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **12**, 118 (1989)
23. Usui, T., Iwasaki, Y., Hayashi, K., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M. : Antitumor activity of water-soluble β-D-glucan elaborated by *Ganoderma applanatum*. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 323 (1981)
24. 이권행 : *Ganoderma lucidum* IY 009에서 분리된 항암성 다당류의 약리, 독성 및 구조에 관한 연구. 연세대학교 박사학위논문(1992)
25. Kusunose, H., Matsumura, H. and Sawamura, M. : Studies on hot water-soluble and dilute alkali-soluble polysaccharides from the fruit body of mushroom [*Psalliota campestris* (Linn) Fr.]. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2743 (1980)
26. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. : Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2641 (1985)
27. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. : Carbohydrate analysis. IRL Press, Oxford, Washington, D. C., p.55 (1986)
28. Bitter, T. and Muir, H. M. : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem*, **4**, 330 (1962)
29. Dische, Z. : Color reactions of hexosamines. Methods in carbohydrate chemistry I. Academic Press, p.507 (1962)
30. Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
31. Moore, S., Spaekman, D. H. and Stein, W. H. : Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acid. *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958)
32. Kim, Y. S., Lee, K. B. and Linhardt, R. J. : Detection of chitinase activity using fluorescence-labeled substrate on polyacrylamide gel. *J. Korean Biochem.*, **24**, 466 (1991)
33. Ralph, P. and Nakoinz, I. : Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrorphage-related cell lines : enhancement by PPD and LPS. *J. Immunol.*, **119**, 950 (1977)
34. Hay, R., Macy, M., Chen, T. R., McClintock, P. and Reid, Y. : American type culture collection catalogue of cell lines and hybridomas. Six ed., American Type culture Collection Maryland, p.254 (1988)
35. 김철우 : 유세포 계측검색의 임상적 응용 I. Medical Postgraduates, **19**, 141 (1991)
36. Buschman, H. L. and Witer, B. T. : Accessment of phagocytic activity of granulocytes using flow cytometer. *J. Immunol. Method*, **1240**, 231 (1989)
37. 채서일, 김범종 : SPSS/PC+를 이용한 통계분석. 범문사, 서울, p.61 (1989)
38. 이연태역 : 최신면역학. 집문당, 서울, p.71 (1985)
39. Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R. R., Chapman, H. A. and Weinberg, J. B. : Macro-phage tumor killing. *Science*, **197**, 279 (1977)
40. 이미숙, 정규선 : 영지추출물및 *Escherichia coli* 배양액이 백혈구의 chemotaxis에 미치는 영향. 한국균학회지, **15**, 1 (1987)

(1994년 9월 24일 접수)