

## 차가버섯의 균사체 및 세포외다당체의 생산조건과 면역활성

박희성 · 신동일 · 정일경 · 양병근\*

대구카톨릭대학교 자연대학 생명공학과

Received August 27, 2009 / Accepted September 17, 2009

**Optimum Conditions for Production of Mycelia and Extracellular Polysaccharide from *Inonotus obliquus* and Their Immunomodulating Activities.** Hee-Sung Park, Dong-Il Shin, Il-Kyung Chung and Byung-Keun Yang\*. *Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Gyungbuk 712-702, Korea* - Optimum conditions for the production of mycelia and extracellular polysaccharide (EXPS) from submerged mycelial culture of *Inonotus obliquus* and their immunomodulating activities were investigated. The optimum production of mycelia and EXPS from *I. obliquus* was observed in mushroom complete medium (MCM). The optimum pH, temperature, and agitation speed for the production of mycelia and EXPS were 5.5, 25°C, and 150 rpm, respectively. The culture period for maximum production of mycelia (10.89 g/l) and EXPS (1.25 g/l) in shake flask cultivation was 11 days. The anticomplementary activity of intracellular polysaccharide (INPS) and EXPS from *I. obliquus* increased in a dose-dependent manner. Lysosomal enzyme activity of EXPS and INPS increased by 2.0- and 2.2-fold at 100 µg/ml concentration, respectively, compared to the control group.

**Key words :** *Inonotus obliquus*, extracellular polysaccharide, intracellular polysaccharide, anti-complementary activity, lysosomal enzyme activity

### 서 론

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae)에 속하는 버섯으로써 주로 약용으로 사용되어 왔으며, 한랭지역의 자작나무 줄기에 기생하는 균핵으로 표면은 검고 내부는 황갈색을 띠고 있고, 주요 자생지역은 시베리아, 캐나다 및 일본 홋카이도 지역으로 알려져 있다[10]. 이 버섯은 다른 약용버섯과 마찬가지로 항종양 활성을 나타내는 다당체를 많이 함유하고 있는 것으로 보고되었을[6,9] 뿐만 아니라, 항산화[14], 항당뇨[24] 및 항돌연변이[5] 등의 효과를 가지고 있어 최근에 건강식품 및 기능성 식품의 소재로 각광 받고 있다.

면역계 중에서 보체계는 fungi, bacteria, virus 등의 미생물 감염으로부터 숙주를 보호하는 자기 방어(host defense)기능을 가지며 암세포를 사멸시키는 식작용(phagocytosis)을 원활히 돕고 염증(inflammation) 또는 알레르기 반응 등 여러 가지 면역 조절에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다[23]. 이러한 면역계를 자극하여 숙주의 생물학적 반응의 변화를 유도함으로써 여러 가지 치료효과를 나타내는 물질인 biological response modifier (BRM)는 식물 및 버섯유래의 다당[4], 세균류의 세포벽 성분[8]등에서 발견되고 있다. 특히, 버섯류에서 유래된 면역조절물질들은 그 잠재적인 가치에 비하여 밝혀진 바는 아직 일부밖에 지나지 않는다. 특히 진균류에 속하는 담

자균류에서 분리된 단백다당체 또는 다당체가 생체 면역기능을 증강시키거나 억제된 면역기능을 정상적으로 회복시켜 줌으로써 효과를 발휘한다는 것이 그간의 연구 결과에 의해 밝혀지고 있다[26,27].

따라서 본 연구는 차가버섯의 균사체 액체배양을 통한 균사체 생장과 세포외 다당체 생산을 위한 배양조건을 최적화를 조사하고 세포내·외 다당체의 항보체 활성과 대식세포 lysosomal enzyme 활성을 비교 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 종균

본 실험에 사용된 차가버섯은 한국농업미생물자원센터로부터 분양 받아 사용하였다. 보관용 배지로는 potato dextrose agar (Difco, Co.)를 사용하였고, 종균은 차가버섯 균사체를 potato dextrose broth 배지 100 ml을 포함한 250 ml flask를 진탕배양기(125 rpm)에서 25°C로 7일간 배양하여 사용하였다. 배양 후 균사체를 포함한 배지 100 ml을 ice bath에서 3분간 Sorvall omi-mixer를 이용하여 무균적으로 균질화 한 후, 균사체 현탁액을 종균으로 사용하였다.

#### 균사체 및 세포 내·외다당체 회수

배양된 차가버섯 균사체 배양액을 10,000× g에서 20분간 원심분리하고, 침전된 균사체는 증류수로 3회에 걸쳐 세척하여 냉동건조기에서 중량이 일정하게 될 때까지 냉동건조하여 무게를 측정하였다. 세포외 다당체(extracellular polysaccharide)

\*Corresponding author

Tel : +82-53-850-3245, Fax : +82-53-850-3245

E-mail : yangbk@cu.ac.kr

는 분리된 상등액에 4배의 에탄올을 첨가한 다음 24시간 동안 침전하고, 원심분리(10,000× g/20 min)한 후 침전물을 동결건조하였으며, 세포내 다당체(intracellular polysaccharide)는 냉동건조된 균사체를 열수추출 후 원심분리(10,000× g/20 min)하여 상등액에 4배의 에탄올을 첨가하고 4°C에서 24시간 방치한 후 다시 원심분리하여 침전물을 동결건조하여 시료로 사용하였다[25].

### 배양 배지

적정 기본 배지를 선별하기 위하여 PDB (potato dextrose brothe), YM (yeast malt), MCM (mushroom complete medium), PMP (potato malt peptone), 및 MY (malt yeast) 등의 배지를 이용하였다. 각 배지의 조성 (g/l)은 다음과 같다. PDB: potato dextrose broth 24; YM: yeast extract 3, malt extract 3, peptone 5, dextrose 10; MCM: glucose 20, yeast extract 2, peptone 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46, MgSO<sub>4</sub> 0.5; PMP: potato dextrose broth 24, malt extract 10, peptone 1; MY: malt extract 20, yeast extract 2이며, pH는 멸균전 4.5로 조절하였다.

### pH 및 온도에 따른 배양

상기에 선택된 배지를 사용하여 온도는 5°C 간격으로 15~35°C로, pH는 0.5 간격으로 4.0~9.0으로 조절하여 125 rpm으로 10일간 진탕배양하였다. 배양 후 원심분리하여 균사체를 회수하고 냉동건조하여 균사체의 건조중량을 측정하였고, 배양액은 에탄올 침전하여 다당체를 회수하고 냉동건조하여 다당체의 건조중량을 구하였다.

### 교반속도 및 배양기간 따른 배양

상기에 선택된 배지를 사용하여 25 rpm 간격으로 100~175 rpm로 조절하여 25°C와 pH 5.5에서 10일간 배양하였으며, 배양기간별 실험은 1일 간격으로 15일간 배양하였다. 배양 후 균사체는 냉동건조하여 건조중량을 구하였고, 배양액은 에탄올 침전하여 다당체를 회수하고 냉동건조 후 다당체의 회수율을 구하였다.

### 항보체 활성의 측정

항보체 활성은 Mayer 법[7] 으로 측정하였다. NHS (normal human serum), GVB<sup>2+</sup> (gelatine veronal buffered saline, pH 7.2)와 세포내·외 다당체(100, 500 및 1,000 µg/ml)를 각각 50 µl씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 반응액에 GVB<sup>2+</sup>를 350 µl씩 첨가하고, 이를 10배에서 160배까지 연속 희석하여 750 µl의 GVB<sup>2+</sup>와 양의 감작혈구(1×10<sup>8</sup> cells/ml)를 250 µl씩 첨가하여 1 시간동안 반응시킨 다음 PBS를 2.5 ml씩 가하여 원심분리 후 상등액을 흡광도 412 nm에서 측정하였다. 한편 대조구는 동일조건에서 시료를 함유하지 않은채 측정하

였으며 항보체 활성은 대조구 대비 총보체 용혈(50% of total complement hemolysis, TCH<sub>50</sub>)의 저지율(inhibition of TCH<sub>50</sub>, ITCH<sub>50</sub>)로 나타내었다. Positive 물질은 LPS (lipopolysaccharide)를 사용하였다.

$$ITCH_{50} (\%) = \frac{TCH_{50} \text{ of control} - TCH_{50} \text{ treated with sample}}{TCH_{50} \text{ of control}} \times 100$$

### 실험 동물

BALB/c 마우스(6주령, male)를 (주)대한바이오링크로부터 분양 받아 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 22±2°C, 습도 55±5% 정도를 유지하고 12시간 간격으로 명암을 구분하였다. 사육기간 동안 사료((주)삼양)와 음료(1차 증류수)는 충분히 공급하였다.

### 대식세포의 분리

대식세포(macrophage)는 5-8주령 우성 BALB/c 마우스의 복강내에 10% thioglycollate medium 3 ml를 복강에 주입한 후 3일 이내에 회수하였다. 세포 농도는 10% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 HBBS (Hank's balanced salt solution) buffer를 이용하여 1×10<sup>6</sup> cells/ml로 조정하였고, 그 후, 96-well microplate의 각 well에 세포현탁액(2×10<sup>5</sup> cells/well) 200 µl씩 분주하였다. 상기 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2 시간동안 배양한 후 plate를 강하게 털어서 비부착성세포를 제거하고 부착성 대식세포를 분리하였다. 세포내·외 다당체와 LPS를 10, 50 및 100 µg/ml 농도로 첨가하거나 또는 첨가하지 않고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 48시간 동안 배양하였다.

### 대식세포의 lysosomal enzyme 활성 측정

Lysosomal enzyme 활성은 96-well flat-bottomed tissue culture plates를 이용하여 분석하였다[21]. 0.1% Triton X-100 25 µl를 첨가하여 microplate (2×10<sup>5</sup> cells/well) 내에서 대식세포 단층을 용해시켰다. 10 mM PNPP (*p*-nitrophenyl phosphate) 용액 150 µl를 대식세포의 lysosomal enzyme (acid phosphatase)의 반응기질로서 첨가하였다. 그 후, 50 µl citrate buffer를 각 well에 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 배양한 다음, 0.2 M borate buffer (pH 9.8) 25 µl를 반응 혼합물에 첨가하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계 처리

실험결과들은 SPSS (statistical package of social science) program을 이용하여 분석, 비교하였고, AVOVA (analysis of variance) 분석을 통해 나타내었으며, 각 실험군 간의 평균치의 통계적 유의성 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test [3]에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

배양조건 확립

차가버섯의 균사체 성장과 세포외 다당체 생산을 위한 기본적인 배지를 선발하기 위하여 PDB를 비롯한 4가지 배지를 이용한 실험 결과, MCM에서 가장 높았고, YM, PMP, MY, PDB 배지 순으로 나타났다(Table 1). 이는 Lee 등[15]의 차가버섯 균의 성장 배지에서 MCM이 우수하게 나타났다는 것과 같은 결과이며, 소량의 무기염류가 포함된 배지에서 버섯 균사체의 성장률이 높다는 보고[12]와 같은 결과를 나타내었다. 상기와 같은 결과로 차가버섯 균사체는 탄소원과 질소원뿐만 아니라 무기염류 등의 각종 영양원이 고르게 포함된 배지에서 균사체 생장이 양호하다는 일반 버섯의 배양 특성과 비슷한 양상을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

Flask 진탕배양에서 pH에 따른 균사체 생육과 세포외 다당체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 1) pH 5.5에서 균사체 생장은 9.41 g/l, 세포외 다당체 생산은 1.16 g/l로 가장 높았으나, pH가 8.0이상에서는 균사체 성장과 세포외 다당체 생산이 감소하였다. 이는 Choi[2]와 Lee 등[15]의 최적 pH 6.0과 7.0는 다소 차이가 있으나, pH 8.0 이상에서는 균사체 생육

Table 1. Effects of medium on the mycelial mass and extracellular polysaccharide from submerged culture of *Inonotus obliquus* in shake flask

Media <sup>1)</sup>	Mycelial mass (g/l)	Extracellular polysaccharide (g/l)
YM	8.29±0.36	0.86±0.04
PDB	5.34±0.32	0.47±0.05
MCM	8.93±0.47	0.94±0.08
PMP	8.05±0.29	0.65±0.04
MY	7.34±0.31	0.61±0.03

<sup>1)</sup>Described in Materials and Methods.

Culture conditions: 125 rpm, 1% inoculum, pH 5, 25°C, and 10 days.

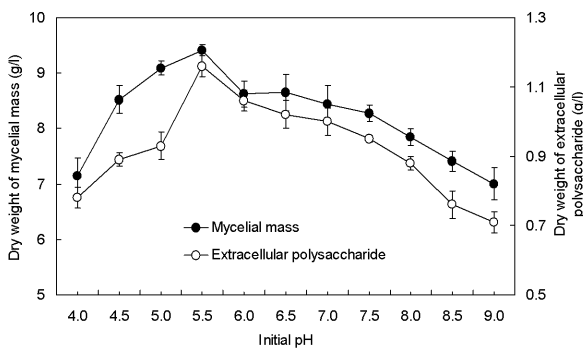


Fig. 1. Effect of initial pH on the mycelial mass and production of extracellular polysaccharides from submerged culture of *Inonotus obliquus*. Culture conditions: 25°C, 125 rpm, 1% inoculum, and 10 days.

이 급격히 감소한다는 보고와는 일치하였다. 일반적으로 버섯의 종류에 따라 차이는 있으나, 성장 최적 pH는 약산성 또는 중성으로 알려져 있다.

배양 온도는 25~30°C의 범위에서 균사체 성장 및 세포외 다당체 생산이 비교적 양호하였고, 25°C에서 균사체 성장 및 세포외 다당체 생산이 최대가 되었다(Fig. 2). 그러나 35°C에서는 균사체 성장과 세포외 다당체 생산이 급격히 감소하는 결과를 보였다. 이는 대부분의 버섯류에서 균사체 성장을 위한 최적 온도는 25~30°C이고, 35°C 이상에서는 균사체 생장이 저해를 받는다는 보고들[2,15,19]과 같은 결과를 나타내었다.

교반속도는 150 rpm에서 가장 높은 균사체 수율과 세포외 다당체 생산이 되었고, 125와 175 rpm에서는 비교적 양호한 편이었으나, 100 rpm 이하의 교반 속도에서는 급격히 감소하였다(Fig. 3). 낮은 교반속도에서는 균사체의 pellet 크기가 증가함에 따라 균사체 내로의 산소 전달 및 배지 영양성분의 흡수나 이용이 곤란하여 균사체의 생장이 저하되기 때문이라 생각된다[19]. Natarajan과 Raman [16]이 *Lentinus cladopus*의 액체배양시 camp connection에 의한 균사체의 성장 정도가 정지배양에서는 95%나 되지만 회전 진탕배양 시에는 51%로

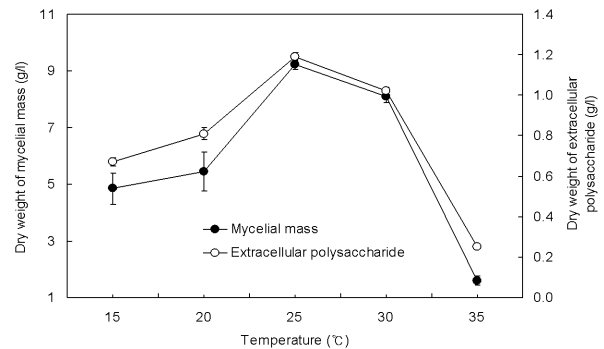


Fig. 2. Effect of temperature on the mycelial mass and production of extracellular polysaccharides from submerged culture of *Inonotus obliquus*. Culture conditions: pH 5.5, 125 rpm, 1% inoculum, and 10 days.

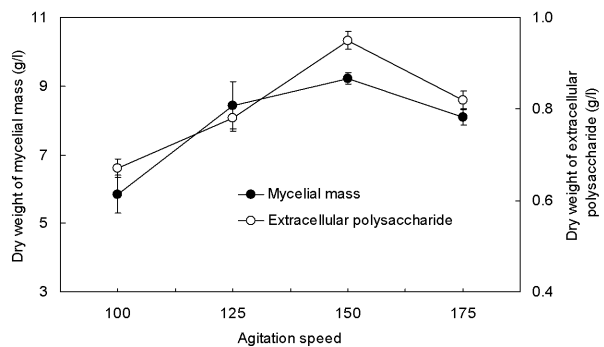


Fig. 3. Effect of agitation speed on the mycelial mass and production of extracellular polysaccharides from submerged culture of *Inonotus obliquus*. Culture conditions: pH 5.5, 25°C, 1% inoculum, and 10 days.

떨어진다고 보고한 것으로 보아 교반속도가 높다고 해서 균사체 수율 및 세포외 다당체 생산이 많은 것이 아니라 적절한 교반속도에서 최대의 균사체 성장과 세포외 다당체 생산이 되는 것으로 사료된다. 따라서 상기와 같은 결과로 차가버섯 균사체 성장과 세포외 다당체 생산을 위한 최적 배양 pH, 온도, 및 교반속도는 각각 5.5, 25°C 및 150 rpm으로 결정하였다.

**배양기간에 따른 균사체 수율과 다당체 생산**

배양 완료 시기를 결정하기 위해 상기 조건으로 15일 동안 배양한 결과, 배양 11일째 균사체 수율은 10.89 g/l로 최대였으며, 이때 세포외 다당체 생산도 1.25 g/l로 최대치를 나타내었다(Fig. 4). 정지기(stationary phase) 이후에 균사체의 생장이 감소하는 현상은 영양분의 고갈로 인한 균사체의 lysis때문이고, 세포외 다당체 생산이 감소하는 것은 영양분 고갈 때문에 이를 재이용하기 위한 효소의 분해 현상으로 추측된다[12]. 따라서 Flask 진탕배양 시에는 11일 후 배양을 끝내고 균사체와 세포외 다당체를 회수하는 것이 가장 효과적으로 나타났다.

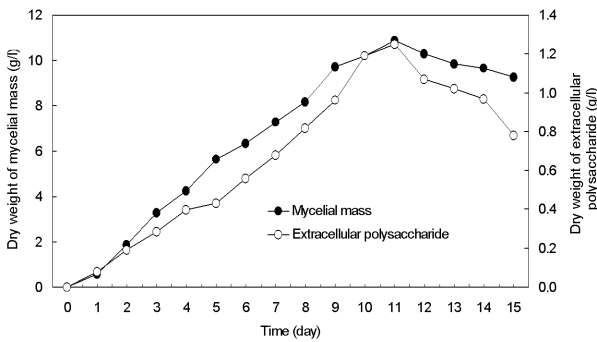


Fig. 4. Time course of the mycelial mass and production of extracellular polysaccharides from submerged culture of *Inonotus obliquus* in a Erlenmeyer flask. Culture conditions: pH 5.5, 25°C, 150 rpm, and 1% inoculum.

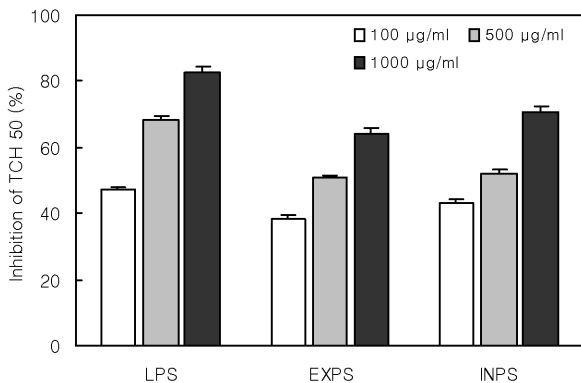


Fig. 5. Anticomplementary activities of the extracellular (EXPS) and intracellular polysaccharides (INPS) obtained from submerged culture of *Inonotus obliquus*. LPS was used for the positive control. Each value is the mean±SD of triplicates.

**항보체 활성**

차가버섯 균사체의 액체배양에 의해 생산된 세포내·외 다당체들의 다양한 농도에 따른 항보체 활성에 대한 실험 결과는 Fig. 5와 같다. LPS (양성 대조군)보다는 항보체 활성이 낮게 나타났지만, 차가버섯 유래 다당체들의 처리 농도가 높을수록 항보체 활성이 높게 나타났으며, 1,000 µg/ml 농도에서 세포내 다당체는 64.1%, 세포외 다당체는 70.4%의 가장 높은 항보체 활성을 보였다. 이는 버섯류의 다당체들이 높은 항보체 활성을 가지고 있다고 보고한 Song 등[20]과 Okuda 등[17]의 결과들과 유사하다. 또한 Lee 등[13]은 보체 시스템이 면역 시스템의 숙주 방어 메커니즘에 의해 항종양 효과와 밀접한 관련이 있다고 보고하였다. 따라서 차가버섯 유래 세포내·외 다당체들은 항종양 물질로써 가능성을 가지고 있을 수 있다고 예상할 수 있다.

**대식세포 활성**

Lysosomal enzyme과 식세포(phagocyte)의 활성은 대식세포의 기능을 평가하는 중요한 요소이며, 단핵 식세포에 의한 lysosomal enzyme의 생성은 수많은 외래 자극물질에 반응하여 일어난다고 알려져 있다[18]. 본 연구에서는 차가버섯 세포내·외 다당체의 마우스 복강내 대식세포 lysosomal enzyme 활성에 대한 효과를 조사하여 Fig. 6에 나타내었다. 대식세포의 lysosomal enzyme 활성은 세포내·외 다당체의 처리 농도가 높을수록 활성이 높게 나타났으며, 음성대조군(NC)과 비교했을 때, 10, 50, 및 100 µg/ml 농도에서 세포내 다당체는 142, 152, 및 217%로, 세포외 다당체는 138, 170, 및 204%로 각각 증가하였다. 이는 차가버섯 유래 다당체들이 lysosome 내 효소 활성 때문에, 식균작용(phagocytosis)에 의해 빨려 들어간

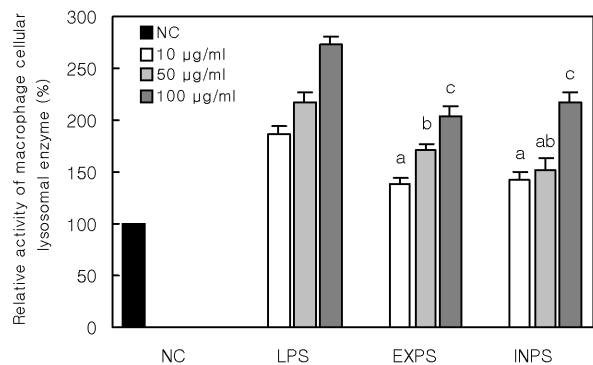


Fig. 6. Macrophage cellular lysosomal enzyme activities of the extracellular (EXPS) and intracellular polysaccharides (INPS) obtained from submerged culture of *Inonotus obliquus*. NC denotes normal saline, which was used for the negative control. LPS was used for the positive control. Concentration of macrophages was  $2.5 \times 10^6$  cells/ml. Each value is the mean±SD of triplicates. <sup>a, b, c</sup> Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

의부물질을 용해시키므로 대식세포를 활성화시킨다[1]고 사료된다. Kiho 등[11]과 Tsukagoshi와 Ohashi [22]는 뿔나무버섯붙이(*Armillariella tabescens*)의 자실체로부터 분리된 다당류들이 sarcoma 180에서 항암 활성을 가지는 것은 대식세포에서 lysosomal enzyme 활성과 관계있다고 보고하였다. 그러므로, 차가버섯 유래 세포내·외 다당체들은 선천성 면역 반응을 향상시켜주는 물질로 간주 될 수 있다.

## 요 약

차가버섯의 균사체 성장과 세포의 다당체 생산을 위한 최적의 배양조건을 조사하고, 세포내·외 다당체의 항보체 활성과 대식세포의 lysosomal enzyme 활성을 관찰하였다. 균사체 성장과 세포의 다당체 생산을 위한 최적 pH, 온도, 및 교반속도는 각각 5.5, 25°C, 150 rpm으로 나타났으며, 배양기간은 11일째 최대 균사체 성장(10.89 g/l)과 세포외다당체 생산(1.25 g/l)을 보였다. 항보체 활성은 세포내·외 다당체의 처리 농도가 높을수록 활성이 증가함을 보였고, 대식세포의 lysosomal enzyme 활성은 100 µg/ml 농도에서 음성대조군에 비해 세포내 다당체는 약 2.2배, 세포외 다당체는 약 2배 정도 증가하였다.

## References

- Bernadete, P. S., B. F. T. Joao, and P. P. Jose. 2000. Immunologically active polysaccharides from *Centrosema pubescens*. *Fitoterapia* **70**, 513-518.
- Choi, K. H. 2005. Effect of medium compositions on the mycelial growth of *Inonotus obliquus*. *Kor. Chem. Eng. Res.* **43**, 419-424.
- Duncan, D. M. 1957. Multiple-range tests for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* **13**, 164-170.
- Franz, G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med.* **55**, 493-497.
- Ham, S. S., S. W. Oh, Y. K. Kim, K. S. Shin, H. Y. Chang, and G. H. Chung. 2003. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1088-1094.
- Hwang, Y. J., G. W. Noh, and S. H. Kim. 2003. Effect of *Inonotus obliquus* extracts on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *J. Kor. Nutr. Soc.* **36**, 18-23.
- Kabat, E. E. and M. M. Mayer. 1964. *Complement fixation*. In: *Experimental Immunology*. pp. 133, Charles C. Thomas Publisher, Illinois.
- Kagawa, K., T. Yamashita, E. Tsubura, and Y. Yamamura. 1984. Inhibition of pulmonary metastasis by *Nocardia rubra* cell wall skeleton with special reference to macrophage activation. *Cancer Res.* **44**, 665-670.
- Kahlos, K. and R. Hitunen. 1987. Antitumor activity of some compounds and fraction an n-hexane extract of *Inonotus obliquus*. *Acta. Pharm. Fenn.* **96**, 33-40.
- Kier, L. 1961. Triterpenes of *Poria obliquus*. *J. Pharm. Sci.* **50**, 471-474.
- Kiho, T., Y. Shiose, K. Nagai, and S. Ukai. 1992. Polysaccharides in Fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 2110-2114.
- Lee, B. W., G. H. Im, D. W. Kim, K. M. Park, S. H. Son, and T. H. Shon. 1993. Culture characteristic and pilot scale fermentation for the submerged mycelial culture of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 609-614.
- Lee, H. K., K. S. Shin, C. H. Song, H. J. Sung, and H. C. Yang. 1994. The effect of nutrients on the production of anti-complementary polysaccharide by *Flammulina velutipes*. *Kor. J. Apply. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 360-367.
- Lee, S. O., M. J. Kim, D. G. Kim, and H. J. Choi. 2005. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 139-147.
- Lee, W. H., Y. J. Park, H. K. Kim, J. Y. Cha, T. W. Kim, and J. M. Sung. 2005. Favorable condition of culture and sclerotial formation by *Inonotus obliquus*. *Kor. J. Mycol.* **33**, 59-63.
- Natarajan, K. and N. Raman. 1980. *In vitro* production of fruit bodies in *Lentinus cladopus* in liquid culture. *Indian J. Exp. Biol.* **18**, 545-549.
- Okuda, T., Y. Yoshioka, T. Ikekawa, G. Chihara, and K. Nishioka. 1972. Anti-complementary activity of anti-tumor polysaccharides. *Nature: Now Biol.* **238**, 59-60.
- Page, R. C., P. Davies, and A. C. Allison. 1978. The macrophage as a secretory cell. *Int. Rev. Cytol.* **52**, 119-123.
- Song, C. H., B. K. Yang, Y. J. Jeon, K. S. Ra, D. H. Shon, H. I. Kim, and Y. H. Kim. 1998. The optimum conditions for the production of exo-polymer from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003 and its hypato-protective effect. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 364-368.
- Song, C. H., Y. J. Jeon, B. K. Yang, K. S. Ra, and J. M. Sung. 1998. The anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 536-539.
- Suzuki, H., K. Hyama, O. Yoshida, S. Yamazaki, N. Yamamoto, and S. Toda. 1990. Structural characterization of the immunoreactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agric. Biol. Chem.* **54**, 479-487.
- Tsukagoshi, S. and F. Ohashi. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* **65**, 557-558.
- Yamada, H., H. Kiyohara, J. C. Cyong, and Y. Otsuka. 1986. Purification and characterization of complement activating-acidic polysaccharides from the roots of *Lithospermum eichromun* royale. *Int. J. Immunopharmacol.* **8**, 71-77.
- Yang, B. K., K. Y. Cho, M. A. Wilson, and C. H. Song. 2005. Effects of *Inonotus obliquus* mycelia on the level of plasma

- glucose and lipids in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. J. Mycol.* **33**, 64-68.
25. Yang, B. K., S. C. Jeong, and C. H. Song. 2002. Hypolipidemic effect of exo- and endo-biopolymers produced from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* in rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 872-877.
26. Yang, B. K., Y. A. Gu, Y. T. Jeong, H. Jeong, and C. H. Song. 2007. Chemical characteristics and immuno-modulating activities of exo-biopolymers produced by *Grifola frondosa* during submerged fermentation process. *Int. J. Bio. Macromol.* **41**, 227-233.
27. Wasser, S. P. and A. L. Weis. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. *Int. J. Med. Mushroom* **1**, 31-62.