

Ganoderma lucidum WK-003 균사체 액체배양으로부터 균체외 고분자물질의 생산조건과 간 보호 효과

†송 치 현 · 양 병 근 · 전 용 재 · ¹나 경 수 · ²손 동 환 · ³김 혁 일 · ⁴김 영 환
대구대학교 생물공학과, ¹대구공업전문대학 식품영양학과
²원광대학교 약학과, ³계명대학교 식품가공학과, ⁴중의제약(주)
(접수 : 1998. 3. 3., 게재승인 : 1998. 6. 3.)

The Optimum Conditions for the Production of Exo-polymer from Submerged Mycelial Culture of *Ganoderma lucidum* WK-003 and It's Hepatoprotective Effect

Chi Hyun Song†, Byung Keun Yang, Yong Jae Jeon, Kyung Soo Ra¹, Dong Hwan Shon²,
Hyuk Il Kim³, and Young Hwonan Kim⁴

Dept. of Biotechnology, Taegu Univ., Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Korea

¹Dept. of Food and Nutrition, Technical Junior College, Taegu 704-350, Korea

²Medicinal Resources Center, Wonkwang Univ., Iksan, Chnubuk 570-749, Korea

³Dept. of Food Technology, Keimyung Univ. Taegu 704-701, Korea

⁴Choongwae Pharma Co., Taeaneup, Hwasungkun, Kyungkido 445-970, Korea

(Received : 1998. 3. 3., Accepted : 1998. 6. 3.)

The optimum conditions for the production of exo-polymer by *Ganoderma lucidum* WK-003 and its hepatoprotective effect was studied. Optimum conditions for the production of exo-polymer (3.18 g/l) by using shaken flask culture of *G. lucidum* WK-003 were pH 4.5, 30°C, 120 rpm for 18 days cultivation. Also exo-polymer production (7.15 g/l) was optimized by 5 l jar fermenter cultivation with condition of pH 4.5, 30°C, 200 rpm, 1.0 vvm for 6 days cultivation. Glutamic pyruvic transaminase(GPT) activities in serum of intoxicated Sprague-Dawley rat were decreased from 704 IU/L to 330 IU/L by oral administration of the exo-polymer (20mg/kg · day) for 4 consecutive days.

Key Words : Hepatoprotective effect, Exo-polymer, Glutamic pyruvic transaminase(GPT)

서 론

Ganoderma lucidum(영지버섯)은 polyporaceae(구멍장이버섯)과에 속하는 고등균류로 예로부터 한국, 일본 및 중국에서 강장, 강심, 해열, 진정, 이뇨, 건위, 성장, 간염, 고혈압, 뇌졸중 및 심장병과 같은 질병을 치료하기 위한 전통 약제로 중요시되어 왔었다(1). 최근에는 암 등의 난치병에도 효과가 있음이 밝혀지고 있으며, 자실체나 균사체 추출물이 체질 개선 및 각종 질병의 예방효과 등으로 건강 식품이나 의약품의 소재로서 그 용도가 증가하고 있다(2). 인공재배에 의한 자실체의 양산과 더불어 1980년을 전후하여 약효에 관한 연구가 많이 진전되었는데, 약효물질은 triterpenoid 등의 저분자 물질과 단백질이 결합된 다당류인 고분자 물질로 대별된다. 이들 중 저분자 물질은 항염증 작용(3), 간 암세포 성장억제작용(4), 혈압강하작용(5), 콜레스

테롤 합성억제작용(6), 고지혈증 개선작용(7), 과산화지질 생성억제작용(8), 혈소판 응집 저해작용(9) 등이 있으며, 고분자 물질은 혈압강하작용(10), 혈당강하작용(11), 항암 작용(12) 및 간질환 보호작용(13) 등이 있는 것으로 알려지고 있다. 영지로부터 분리한 다당류에 의한 간장질환 치료는 간독성 유발물질에 대한 보호능(14), 초대배양 간세포 보호능(15) 및 간섬유화 억제능(16) 등이 보고되었으나, 이들에 대한 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았다.

영지버섯의 액체 배양은 80년대 이후 시도가 되기 시작하여 Sone 등(17), Tseng 등(18) 및 강 등(19)에 의한 연구가 보고가 있으나 이들 대부분의 연구는 자실체나 균사체 추출물에 대한 성분조사 및 생리활성 탐색에 국한하였다. 따라서 본 연구에서는 균사체 액체 배양시 균체외로 분리되는 고분자물질(exo-polymer)의 간 보호 효과와 최대 생산을 위한 배양조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

자연계로부터 분리한 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균주 7종의 액체 배양액으로부터 다당체를 추출하여 간 보호 효과 및

† Corresponding Author : Department of Biotechnology,
Taegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Korea
Tel : 053-850-6555, Fax : 053-850-6509
e-mail : chsong@biho.taegu.ac.kr

항보체 활성이 강한 균주 *Ganoderma lucidum* WK-003을 선발하여 실험 균주로 사용하였으며, 보관용 배지로는 PDA (potato dextrose agar)를 사용하였고, 다당체 생산용 합성배지의 조성(g/ℓ)은 Glucose 9.0, Sucrose 9.0, Galactose 1.0, Xylose 1.0, Yeast extract 0.5, Bacto peptone 2.0, Potato dextrose 2.0, NH₄H₂PO₄ 0.5, DL-serine 0.5, KH₂PO₄ 1.0, CaCl₂ 0.6, MgSO₄ · 7H₂O 2.0, FeSO₄ · 7H₂O 0.02, ZnSO₄ · 7H₂O 0.02, MnSO₄ · 5H₂O 0.02, Thiamine-HCl 1×10⁻⁴, Biotin 1×10⁻³이었다.

접종원

G. lucidum WK-003 균사체를 상기배지로 준비한 plate에서 30℃로 7 일간 배양후 직경 8 mm cork borer로 punching하여 사용하거나, 250ml baffled flask에서 30℃로 7 일간 배양한 다음 균사체를 균질화하여 접종원으로 사용하였다.

Polymer의 회수

상기 배양물을 10447×g/20min으로 원심분리하고 상등액을 취하여 4배의 ethanol을 가한 다음 5℃에서 24시간 침전하고, 침전물을 원심분리하여 crude한 exo-polymer를 회수하였다. 회수한 polymer를 냉동건조 한 후 증류수에 녹여 72시간 투석하였다. 투석된 시료를 원심분리(1090×g/20min)하고 냉동 건조하여 다당체를 얻어 이를 시료로 사용하였다. 다당체의 회수 공정은 다음의 Figure 1에 나타내었다.

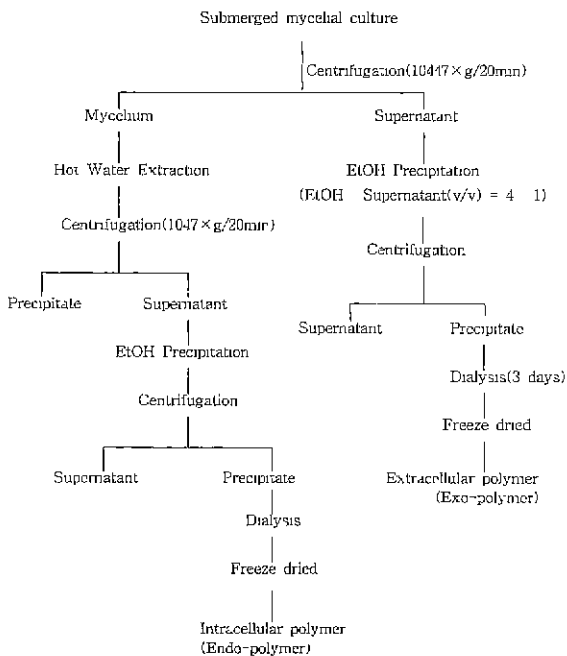


Figure 1. Recovery process of exo- and endo-polymer from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003.

pH 및 온도 조건에 따른 균사체 성장 및 Exo-polymer 생산

상기배지를 사용하여 온도 및 초기 pH를 각각 25℃, 30℃, 35℃와 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0으로 조절하여 120 rpm으로 18일간 배양하였다. 배양후 균사체는 냉동 건조하여 건조 중량을 구하고, 배양액은 EtOH 침전하여 다당체를 회수하고 냉동 건조하여 다당체의 건조 중량을 구하였다.

교반 속도 및 배양기간에 따른 균사체 성장 및 Exo-polymer 생산

상기배지를 사용하여 30℃, pH 4.5에서 100, 120, 150 rpm으로 18일간 배양하였으며, 배양기간별 실험은 3일 간격으로 21일간 배양하였다. 배양 후 균사체는 냉동 건조하여 건조중량을 구하고, 배양액은 EtOH 침전하여 다당체를 회수하고 냉동 건조후 다당체의 회수율을 구하였다.

Exo-polymer 생산을 위한 발효조 배양

배지가 들어 있는 발효조를 멸균(121℃/20min)하여 실온으로 식힌 후 상기 균주를 접종하여 30℃, pH 4.5, 200 rpm, 1.0 vvm으로 배양하면서 매일 200ml씩 sampling하여 균사체와 다당체를 정량하여 균사체 성장곡선과 다당체 생산량을 얻었다.

간 보호 효과

용량 200~250g의 Sprague-Dawley계열 rat(삼육실험동물, 경기도 오산)를 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 다음 실험군을 다음과 같이 분류하였다.

- 1군. 정상 rat에 saline을 처리함.
- 2군. 정상 rat에 세포의 다당(exo-polymer)을 처리함 (20mg/kg, p.o.).
- 3군. CCl₄(0.35ml/kg, i.p.)로 독성화된 rat에 saline을 처리함.
- 4군. CCl₄(0.35ml/kg, i.p.)로 독성화된 rat에 세포의 다당을 처리함.

실험기간 동안 사료와 물을 충분히 공급하고 rat의 몸무게는 매일 측정하였다. 실험을 수행하는 동안 12시간의 명암 사이클과 23±2℃를 유지했다. 2군과 4군의 rat들은 연속 4일 동안 sonde를 사용하여 경구로 다당체(saline에 녹임)를 공급하였다. 1군과 3군에서 rat들은 연속 4일동안 saline의 동등한 volum으로 공급하였다. 마지막으로 다당체나 saline을 처리한지 2시간 후에 CCl₄(0.35ml/kg, corn oil에 희석한 CCl₄를 사용) 3군과 4군에 복강으로 투여하였다. 1군과 2군의 rat에 동일 volum의 corn oil을 투여하였다. Rat는 CCl₄나 corn oil을 투여한지 24시간 후에 희생하여, 혈청을 일반적인 방법으로 얻은 후 -20℃에서 보관하였다. 혈청 GOT와 GPT는 Retiman-Frankel법(20)에 의해 serum transaminase diagnostic kit에 의해 측정하였다. 즉, 기질액 0.5ml을 37℃에 5분간 방치하여 활성화시킨 다음 혈청을 0.1ml 가하고 잘 혼합하여 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)는 60분, GPT(glutamic pyruvic transaminase)는 30분동안 37℃를 유지하였다. 여기에 정색 시액 0.5ml를 가하고 실온에서 20분간 방치한 다음 0.4N NaOH 5ml를 가하여 실온에서 10분간 방치한 후 60분 이내에 505nm에서 증류수를 대조로 하여 흡광도를 측정하였다. 실험에 사용된 혈청은 필요에 따라 생리식염수로 희석하여 사용하였다. 표준 곡선은 혈청대신 표준곡선용 시액을 사용하여 위와 같은 조작을 하여 작성하였다.

통계 처리는 Student's t test에 의해, p value가 최소 0.05이 하인 경우를 유의차로 판정하였다.

결과 및 고찰

배양조건 확립

pH 4.5에서 균사체와 exo-polymer의 생산이 가장 높았고,

pH 3.5~4.5에서는 균사체 생육이 비교적 양호하였으나, pH 5.0에서는 균사체 및 exo-polymer의 생산량이 모두 급격히 감소하였다(Table 1). 이는 강 등(19)의 최적 pH 5.0과는 차이가 있었으나, 신 등(21)은 영지는 균주에 따라 최적 pH가 약간의 차이가 있는 것으로 보고하고 있다. 일반적으로 fungi의 종류에 따라 차이는 있으나, 성장 최적 pH는 약산성 또는 중성으로 알려져 있다.

배양온도는 25~30°C의 범위에서 균사체 생장이 비슷하였으나, 30°C에서 균사체 및 exo-polymer 생산이 최대가 되었다. 그러나 35°C에서는 균사체 성장 및 exo-polymer 생산량이 급격히 감소하는 결과를 보여 최적 배양 온도를 30°C로 결정하였다(Table 2).

교반 속도는 120 rpm에서 가장 높은 균사체 수율과 exo-polymer 생산이 되었고, 그 이상에서는 다소 감소하였다(Table 3). 이는 120 rpm 이상의 교반속도 하에서는 전단력(shear force)의 증가로 인하여 정상적인 균사체 생육이 어렵기 때문이라 생각되었고, 반면 120 rpm 이하의 낮은 교반속도 하에서는 균사체의 pellet 크기가 증가함에 따라 균사체내로의 산소 전달 및 배지 영양성분의 흡수나 이용이 곤란하여 균사체의 생육이 저하되기 때문이라 생각된다. *Lentinus cladopus*의 액체 배양시 camp connection에 의한 균사체의 성장 정도가 정지배양에서는 95%나 되지만 회전 진탕배양시에는 51%로 떨어진다

Table 1. Effect of pH on the production of exo-polymer from the submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003.

pH	Dry Weight of Mycelium(g/ℓ)	Dry Weight of Exo-polymer(g/ℓ)
2.5	2.092 ± 0.2743	1.280 ± 0.0431
3.0	5.563 ± 0.0290	1.490 ± 0.0730
3.5	9.445 ± 0.1242	2.148 ± 0.0209
4.0	9.601 ± 0.0681	2.280 ± 0.0244
4.5	9.799 ± 0.0595	2.661 ± 0.0307
5.0	8.397 ± 0.6525	1.920 ± 0.0536
5.5	8.056 ± 0.7679	1.843 ± 0.0658
6.0	7.863 ± 0.6358	1.728 ± 0.0704
6.5	6.085 ± 0.6138	1.685 ± 0.0548
7.0	5.980 ± 0.5761	1.610 ± 0.0641
7.5	5.127 ± 0.5583	1.231 ± 0.0535
8.0	4.693 ± 0.5168	0.956 ± 0.0354

Condition : 30°C, 120 rpm, 18 days, 1% inoculum

Table 2. Effect of temperature on the production of exo-polymer from the submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003.

Temperature(°C)	Dry Weight of Mycelium(g/ℓ)	Dry Weight of Exo-polymer(g/ℓ)
25	8.370 ± 0.4320	1.771 ± 0.0134
30	8.742 ± 0.5328	2.605 ± 0.0734
35	4.966 ± 0.6425	1.419 ± 0.0271

Condition : pH 4.5, 120 rpm, 18 days, 1% inoculum

Table 3 Effect of agitation speed on the production of exo-polymer from the submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003.

Agitation speed (rpm)	Dry Weight of Mycelium(g/ℓ)	Dry Weight of Exo-polymer(g/ℓ)
100	5.575 ± 0.1500	2.205 ± 0.0900
120	8.215 ± 0.0950	2.643 ± 0.0175
150	6.997 ± 0.0675	2.090 ± 0.0850

Condition : 30°C, pH 4.5, 18 days, 1% inoculum

고 보고한 바 있다(22). 따라서, 이는 교반 속도가 높다고 해서 균사체 수율 및 다당체 생산이 많은 것이 아니라 적절한 교반속도에서 최대의 균사체 성장과 exo-polymer 생산이 되는 것으로 사료된다.

진탕 배양기간에 따른 균사체 수율 및 exo-polymer 생산

배양 완료 시기를 결정하기 위해 상기 조건으로 21일 동안 배양한 결과, 배양 18일째 균사체 수율이 7.98 g/ℓ로 최대였으며, 이때 exo-polymer 생산도 3.18 g/ℓ로 최대치를 나타내었다(Figure 2). Stationary phase 이후에 다당체가 감소하는 현상은 영양분의 고갈 때문에 이를 재이용하기 위한 효소의 분해 현상으로 추측된다. 따라서 shaken flask 배양 시에는 18일 후 배양을 끝내고 다당체를 회수하는 것이 가장 효과적으로 나타났다.

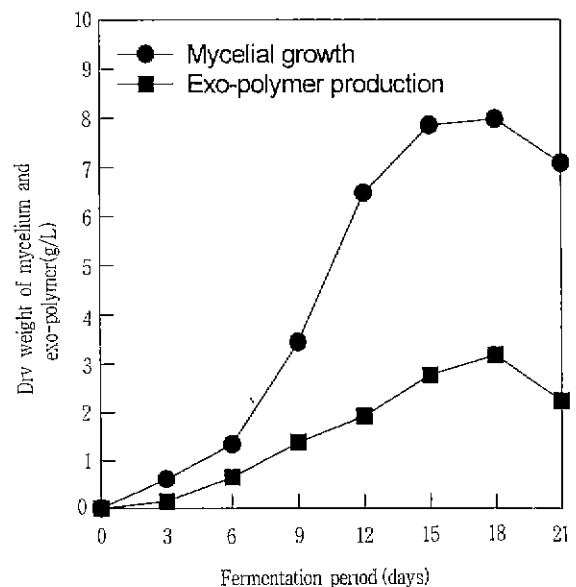


Figure 2. Time course of cell growth and exo-polymer production by shaken flask culture using synthetic medium of *Ganoderma lucidum* WK-003. (pH 4.5, 30°C, 120 rpm, 1% inoculum)

다당생산 배지를 사용한 5ℓ 발효조 배양

pH 조절이 가능한 발효조 배양에서 shaken flask 배양과 같은 pH조건인 pH 4.5, 30°C, 200 rpm, 1.0 vvm으로 배양한 결과 균사체 수율은 shaken flask 배양(7.98 g/ℓ)과 비슷한 8.07 g/ℓ로 나타났으나, exo-polymer 생산은 shaken flask 배양(3.18 g/ℓ)보다 224.7% 증가한 7.15 g/ℓ로 나타났었다(Figure 3).

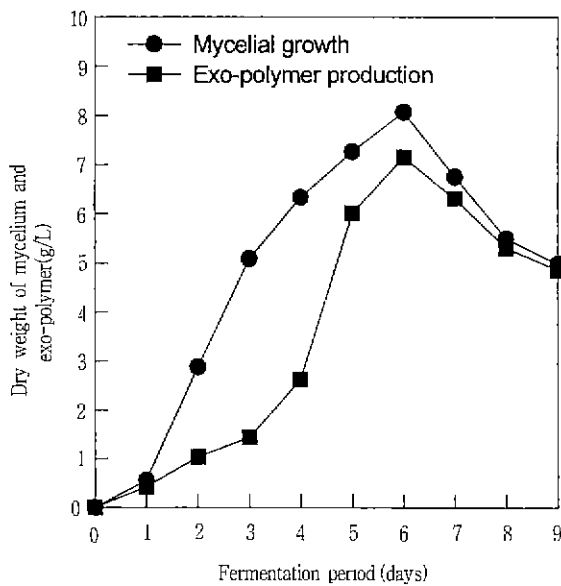


Figure 3. Time course of cell growth and exo-polymer production by jar fermenter culture using synthetic medium of *Ganoderma lucidum* WK-003. (pH 4.5, 30°C, 200 rpm, 1.0 vvm, 1% inoculum, 5 l)

또한, shaken flask 배양에서의 배양기간은 18일이 소요되었으나, 발효조 사용시에는 6일에 배양을 완료할 수 있어 배양기간을 약 3배 단축시킨 결과를 나타내었다. 이는 aeration과 agitation에 의한 산소 및 영양공급이 원활하게 이루어진 결과이거나 pH 조절의 영향인 것으로 사료된다. Exo-polymer의 정제 및 구조분석은 진행중에 있으며, 현재까지의 결과로는 분자량이 약 40만 정도인 아미노산과 당이 결합되어 있는 단백당체로 나타났다(23).

간 보호 효과

간 질환에 유효한 물질의 검색을 위해서는 실험동물을 많이 이용해 왔는데, 본 연구에서는 Sprague-Dawley계열 rat를 사용하고 독성 유발 약물로는 CCl₄(0.35ml/kg)을 사용하였다(24). CCl₄에 간 독성이 유발된 rat에 *G. lucidum*의 액체 배양으로부터 생산된 세포의 다당(exo-polymer)을 4일간 경구 투여 했을 때 간 손상 정도를 나타내는 GPT(glutamic pyruvic transaminase) 및 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)의 활성이 저하되어 이 다당체는 간 보호 작용이 있는 것으로 나타났다. Exo-polymer는 경구 투여시, 용량의존성 실험에서 exo-polymer를 20mg/kg/day로 투여하였을 때 GPT, GOT 활성을 각각 704 IU/L, 1401 IU/L에서 330 IU/L, 968 IU/L로 낮추어 최적 용량을 나타내었다(Table 4).

Table 4. Hepatoprotective effect of exo-polymer on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats.

Group	GPT(IU/L)	GOT(IU/L)
Normal	37 ± 18 ^b	199 ± 20
CCl ₄ intoxicated rats	704 ± 379	1401 ± 590
Exo-polymer 10mg/kg ^a	634 ± 311	1325 ± 843
Exo-polymer 20mg/kg ^a	330 ± 134	968 ± 398 ^{**}
Exo-polymer 50mg/kg ^a	438 ± 240 [*]	902 ± 400 [*]

^a : Treated CCl₄ intoxicated rats

^b : Results represent as mean ± S.D.

^{*} : Significantly different from CCl₄-Ctrl (p<0.05)

^{**} : Significantly different from CCl₄-Ctrl (p<0.01)

minase) 및 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)의 활성이 저하되어 이 다당체는 간 보호 작용이 있는 것으로 나타났다. Exo-polymer는 경구 투여시, 용량의존성 실험에서 exo-polymer를 20mg/kg/day로 투여하였을 때 GPT, GOT 활성을 각각 704 IU/L, 1401 IU/L에서 330 IU/L, 968 IU/L로 낮추어 최적 용량을 나타내었다(Table 4).

요 약

세포외 다당체 생산을 위한 최적의 배양 조건은 shaken flask 배양에서 pH 4.5, 30°C, 120 rpm, 18 days이었으며, 3.18 g/l의 다당체가 생산되었다. 5 l jar fermenter 배양에서는 pH 4.5, 30°C, 200 rpm, 1.0 vvm, 6 days가 최적 조건이고, 7.15 g/l의 다당체가 생산 되었다. 생산된 다당의 간 보호 효과 측정에서 shaken flask 배양으로부터 생산된 exo-polymer 20mg/kg/day 투여시 GPT, GOT의 활성을 최대 낮추었다.

감 사

본 논문은 97 교육부 학술연구조성비(생물화학공학분야 : 97-H-7) 및 한국과학재단과 전라북도에서 지원하는 의약자원연구센터(원광대 RRC : 98-16-02-01-A-3)의 지원에 의한 연구로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 久保道徳 (1986), 靈芝, pp. 9-13, 김병각, 조필형 역, 명옥출판사.
2. Eyal, J. (1991), Mushroom mycelium grown in submerged culture - potential food applications, pp. 31-42, In I. Goldberg and R. Williams(ed.), *Biotechnology and Food Ingredients*, Van Nostand Reinhold, New York.
3. Kohda, H., W. Tokumoto, K. Sakamoto, S. Ishihara and M. Uchida (1985), The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum*(Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1367-1374.
4. Torev, A. (1968), Submerged culture of higher fungi mycelium on an industrial scale, *Mushroom Sci.*, **7**, 585-589
5. Mizuno, T., N. Kato, A. Totsuka, K. Takenaka, K. Shin-kai and M. Shimizu (1984), Fractionation structural features and antitumor activity of water soluble polysaccharide from Reish fruit body of *Ganoderma lucidum*, *Nippon Nogeigoku Kaishi*, **58**, 871-882
6. Komoda, Y., M. Shimizu, Y. Sonda and Y. Sato (1989), Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 531-533.
7. 久保 道徳, 松田 秀秋, 谿 忠人, 有地 滋 (1980), 靈芝(*Ganoderma lucidum*, 子實體)의 研究, マンネンタケ熱水抽出エキスの 實驗高脂血症 對作用 基礎と 臨床, **14**, 2455.
8. 木村 善行, 有地 滋, 高橋 猛 (1984), 靈芝(*Ganoderma lucidum*, 子實體)의 過酸化 脂 質形成 抑制作用, 基礎と

- 臨床につくて, **18**, 2071-2074.
9. Sanchez-Hernandez, E., Garcia-Mendoza, C. and Novaes-Ledieu, M. (1990), Chemical characterization of the hyphal wall of the basidiomycetes *Arimillaria mellea*, *Exp. Mycol*, **14**, 178-183
 10. 이권행, 정훈, 김영일, 김병각 (1983), 산업폐자원을 이용한 발효에 의한 영지의 항고혈압 성분의 생산, *한국균학회지*, **19**, 79-84.
 11. Hikono, H., M. Ishiyama, Y. Suzuki and C. Konno (1989), Mechanisms of hypoglycemic activity of Ganoderan B, a glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies, *Planta Medica*, **55**, 423-428.
 12. Lee, Kweon-Haeng, June-Woo Lee, Man-Deuk Han, Hoon Jeong, Young-Il Kim and Doo-Hwan Oh (1994), Correlation between anticomplementary and antitumor activity of the crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum*, *Appl. Microbiol. Bioeng*, **22**, 45-51.
 13. Lui, G.T., G.F. Wang, H.L. Wei, T.T. Bao and Z.Y. Sung (1979), Comparison of the protective actions of dimethylbiphenylcarboxylate, trans-stilbene, alcoholic extracts of *Polyporus japonicus* and *Ganoderma* towards experimental liver injury in mice, *Yao Hseueh Pao.*, **14**, 598.
 14. 이주영, 박기숙, 정진호, 조미정, 고평호, 이준우, 정훈, 이승룡 (1994), G009의 간 보호 작용에 관한 연구, *한국응용약물학회지*, **2**, 206-212.
 15. Lee, J.W., M.D. Han and K.H. Lee (1992), Screening of hepatoprotective substances from higher fungi by primary cultured rat hepatocytes intoxicated with carbone tetrachloride, *Kor. J. Mycology*, **20**, 10-17.
 16. 박은전, 김기영, 김재백, 김수웅, 이승룡, 손동환 (1994), 영지로부터 추출한 다당체의 실험적 간경화에 대한 섬유화 억제 효과, *Yakhak Hoeji*, **38**, 338-344.
 17. Sone, Y., R. Okuka, N. Wada, E. Kishida and A. Misaki (1985), Structure and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2641-2653.
 18. Tseng, T.C. et al. (1984), Studies on *Ganoderma lucidum* I, liquid culture and chemical composition of mycelium, *Bot. Bull. Acad. sin(Taipei)*, **25**, 149
 19. 강창울, 심미자, 최웅철, 이영남, 김병각 (1981), 한국산 담자균류의 핵산 성분에 관한 연구, *한국 균학회지*, **14**, 101-112.
 20. Reitman, S. and Frankel, S. (1957), A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63.
 21. 신관철, 서건식, 박종성 (1988), *Ganoderma lucidum*(Fr.) Kart의 배양적 특성에 관한 연구, *Res. Rep. Agri. Sci. Chungnam Nat'l Univ.*, **15**, 27-35.
 22. Natarajan, K. and N. Raman (1980), *In vitro* production of fruit bodies in *Lentinus cladopus* in liquid culture, *Indian Journal of Exp. Biology*, **18**, 545
 23. Song Chi Hyun, Yang Byung Keun, Ra Kyung Soo, Shon Dong Hwan, Park Eun Jeon, Go Geon il, and Kim Young Hwonan (1998), Hepatoprotective effect of extracellular polymer produced by submerged culture of *Ganoderma lucidum* WK-003. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **8** (3), 277-279.
 24. Kiso, Y., M. Kumasaka and M. Shinoda (1985), Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes, *Planta Med.*, **49**, 222-225.