

털목이 버섯으로부터 혈중 콜레스테롤 저하물질 생산

양병근 · 정상철 · 박준보 · 조성필 · 허남정 · 송치현

(대구대학교 생물공학과)

Production of hypocholesterolemic substance from *Auricularia polytricha*

Byung-Keun Yang · Sang-Chul Jeong · Jun-Bo Park
· Sung-Pill Cho · Nam-Jung Hur · Chi-Hyun Song

Dept. of Biotechnology, Taegu University

적 요

Auricularia polytricha(털목이버섯) 균사체 액체 배양에 의해 생산된 세포외 다당체를 이용하여 흰쥐에서의 지질저하 효과를 조사하였다. 세포외 다당체의 농도별 실험에서 세포외 다당체를 50~100mg/kg body weight(B.W.) 농도로 실험동물에 매일 경구투여한 결과 세포외 다당체의 농도를 증가시킬수록 동물에서 혈중 총 cholesterol, 중성지방 및 LDL-cholesterol의 농도가 비례적으로 감소하였고, LDL- cholesterol 농도는 대조군에 비해 세포외 다당체를 100mg/kg B.W.를 투여한 흰쥐에서 81.3% 감소하였다. HDL-cholesterol과 총 cholesterol 농도는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았지만, 총 cholesterol에 대한 HDL-cholesterol의 농도비는 세포외 다당체 농도에 따라 유의적으로 증가하였다. 세포외 다당체는 당(48.9%)과 단백질(19.1%)을 포함하는 것으로 나타났으며, glutamic acid를 포함한 17종의 아미노산과 glucose가 포함된 7종의 당으로 구성되어 있었다.

1. 서론

동맥경화를 방지하는데 있어서 혈청 cholesterol 농도 저하가 중요한 역할을 한다고 널리 알려져 있다(Stalmer 등, 1986). 버섯류는 그 구성성분에 있어서 식이 섬유, 단백질 및 미량원소의 함량은 높은 반면 지방 함량은 낮기 때문에 혈중 지질 저하 및 동맥경화를 방지할 수 있는 이상적인 식품으로 보고되고 있다(Crisan과 Sands, 1978; Kurasawa 등, 1982). 몇몇 버섯류 자실체의 cholesterol 저하 효과(Bobek 등, 1991; Cheung, 1996a; Cheung, 1996b)에 대해서는 이미 연구되었으나, 버섯류의 균사체 액체배양에 의해

생산되는 세포외 다당체의 지질 및 cholesterol 저하 효과에 관한 연구는 극소수에 지나지 않고 있다. 각종 생리활성물질은 자실체와 균사체에서 뿐만 아니라 균사체 액체 배양액에 의해서도 얻어지는데, 배양액으로부터의 세포외 다당체 회수는 상대적으로 간단한 단계를 필요로 하고 그로 인해 회수과정에 필요한 비용이 절감된다. 이러한 이유로 최근에는 세포외 다당체의 기능성에 대한 연구가 폭넓게 진행되고 있다(Cavazzoni와 Adami, 1992; Jong과 Birmingham, 1992; Tseng, 1984), 표고버섯(Tochikura 등, 1988; Mizoguchi 등, 1987; Sugano 등, 1985; Suzuki 등, 1988)과 영지버섯(Lee 등, 1996)의 배양액 추출물로부터의 다양한 생리활성물질 추출에 관해서는 이미

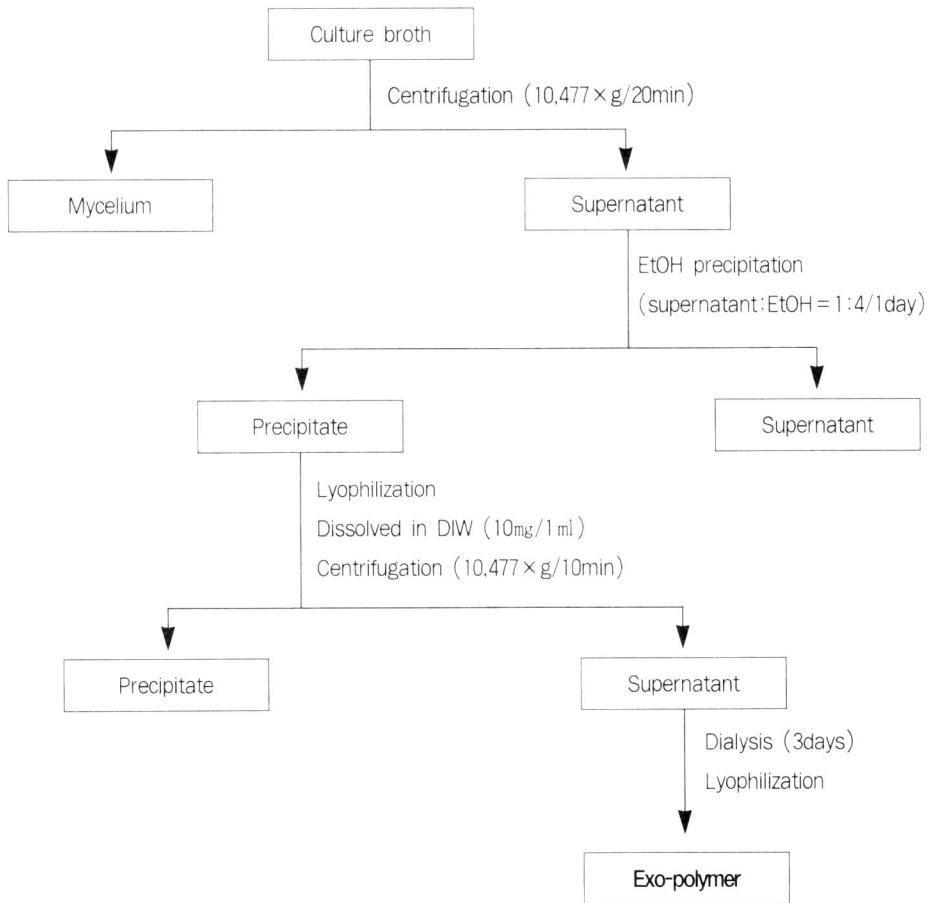


Fig. 1. Schematic diagram for the purification of exo-polymer from *Auricularia polytricha* submerged mycelial culture broth

보고된 바 있다.

따라서 본 연구는 *A. polytricha*의 균사체 액체 배양으로 생산된 세포의 다당체의 지질 저하 효과를 조사하기 위하여 1) 배양액으로부터의 수용성 다당체의 분리, 2) 지질 유발 흰쥐에 세포의 다당체의 농도별 경구투여, 3) 세포의 다당체의 당과 단백질 함량과 구성 성분 분석 등으로 시행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 균주, 배지 및 종균

*A. polytricha*의 균주는 농촌 진흥청으로부터 분양 받았다. 세포의 다당체를 생산하기 위해 PMP 배지를 *A. polytricha* 균사체 액체 배양에 사용하였다. PMP 배지의 구성은 potato dextrose broth (Difco) 24g/l, malt extract (Merck) 10g/l, peptone (Merck) 1g/l 이며, pH는 멸균 전에 5.0으로 조절하였다. 종균제조는 배지 200ml을 포함한 500ml flask를

진탕 배양기 (120rpm)에서 25C로 배양하였다. 배양 7일 후 균사체를 포함한 배지 100ml를 ice bath에서 3분간 Sorvall omni-mixer를 이용하여 무균적으로 균질화 한후, 균사체 현탁액의 2%를 5 l jar fermenter에서의 액체 배양을 위한 종균으로 사용하였다(Song 등, 1987).

2. 세포의 다당체 생산을 위한 균사체 액체 배양

균사체 액체 배양은 5 l jar fermenter(working volume 3 l, 교반 100 rpm, pH 5, 25C, 통기 1vvm)에서 25일간 배양하였으며, 배양액을 원심분리(10,447×g/20분)하여 세포의 다당체 회수를 위해 상등액에 4배의 ethanol을 가하였다. 배양액으로부터의 세포의 다당체의 추출단계는 Fig. 1에 나타내었다.

3. 동물 실험

Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐는 한국 화학 연구소로부터 분양 받았으며, 약 120g 되는 흰쥐들은 온도 (22±0.5C), 습도 (55±5%) 그리고 명암이 12시간 주기로 조절되는 방에서 stainless steel cage에 개별적으로 나누어 사육하였다. 흰쥐들은 4주간 AIN-76(The American Institute of Nutrition, 1977) 식이를 먹었다. 식이조성은 탄수화물 55.5%(sucrose 40.5% 포함), fat 14.5%(총열량의 30%), casein 20% 이었으며, 각 식이

군의 흰쥐들은 2주 동안 매일 경구투여용 zonde를 이용하여 생리식염수 (대조군)와 50mg, 75mg, 100mg/kg 체중(B. W.)의 농도로 세포의 다당체를 투여하였다. 식이 섭취량과 몸무게 변화를 매일 기록하였으며, 마지막 경구 투여 후 실험 동물들을 9시간 동안 절식시킨 후 희생시켰다.

4. 혈장과 간장 지질 분석

혈액 sample은 heparine이 처리된 시험관에 담아 원심분리(1,110×g/10분)하여 혈청을 분리하였다. 간장은 냉각(5C) 생리 식염수로 세척한 뒤 -20C에서 냉동 보관하였다. 간장 지질은 Folch 등(1957)에 의한 방법으로 추출하였다. 혈중 총 cholesterol, 중성지방 그리고 HDL-cholesterol 농도는 효소 kit (Sigma Chemical Company)를 이용하여 측정하였다. LDL-cholesterol은 [총 cholesterol-HDL cholesterol-(중성지방/5)]의 등식을 이용하여 계산하였고 (Raunet 등, 1993), 간장 cholesterol은 Triton X-100 처리 후 혈장 cholesterol 측정과 같은 방법으로 측정하였다(Sale 등, 1984).

5. 당 함량과 조성 분석

A. *polytricha*로부터 생산된 세포의 다당체의 총 당 함량은 glucose와 galactose(1:1)를 표준물질로 사용하여 phenol sulfuric acid 방법으로 측정하였다(Dubois 등,

Table 1. Conditions for the analysis of sugars by gas chromatography

Apparatus	Varian Co., Gas chromatography 3600
Detector	Flame ionization detector (FID) 5
Column	Supelco inc, Fused silica capillary column ID : 30m×0.25mm, film thickness : 0.20µm
Column temperature	260C
Injector type	Isothermal
Detector temperature	260C
Carrier gas	N ₂ (15psi)
Hydrogen	15psi
Retention time	30min

1956). 시료는 121°C에서 1시간 동안 2M trifluoroacetic acid로 가수분해하였고, 가수분해된 시료는 ethyl acetate-pyridine-acetic acid-water(5:5:1:3)를 전개용매로 하여 cellulose-coated plastic sheet (Merck)를 이용한 TLC로 분석하였다. 환원된 당은 alkaline silver nitrate로 검출하였다(Trevelyan 등, 1950). 세포외 다당체는 Jones와 Albersheim(1972)의 방법으로 가수분해하고, acetylation시켰다. 당 조성은 gas chromatography로 분석하였고 분석 조건은 Table 1에 나타내었다. 세포외 다당체 내에 있는 uronic acid의 조성은 galacturonic acid를 표준물질로 사용하여 *m*-hydroxy-diphenyl 방법으로 결정하였다.

6. 총 단백질과 아미노산 조성 분석

총 단백질은 표준물질로 bovine serum albumin을 이용하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 분석하였다. 아미노산 조성은 Na form column이 장착된 아미노산 분석기(Pharmacia Biotech Ltd, Model : Biochrom 20)에 의해 분석되었고, 분석 조건은 Table 2와 같다.

7. 통계적 분석

본 실험 결과는 실험군 별로 평균(mean)±표준오차(S. E.)로 나타내었으며, 각 실험군의 평균은 one-way analysis of variance와 Duncan's multiple-range test로 p(0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 체중, 간장 무게, 식이 섭취량

체중, 간장 무게와 식이 섭취량에 대한 *A. polytricha* 세포외 다당체의 효과는 Table 3에 나타내었다. 세포외 다당체의 투여가 체중증가, 식이 섭취량 및 간장 무게에 있어서 유의성이 나타나지 않았으므로, *A. polytricha* 세포외 다당체의 경구 투여에 의한 유해적인 효과는 흰쥐에서 나타나지 않은 것으로 판단하였다.

Table 2. Conditions for the analysis of amino acid by amino acid analyzer

Apparatus	Pharmacia Biochrom 20 amino acid analyzer
Column	High performance Na form with ID : 4.6mm ×L : 200mm (Pharmacia Biotech)
Ion exchange resin	Pharmacia Biotech, No. 3906
Flow rate	i) Sodium Citrate Buffer pH 3.20 : 35ml/h ii) Sodium Citrate Buffer pH 4.25 : 35ml/h iii) Sodium Citrate Buffer pH 6.45 : 53ml/h iv) Sodium Hydroxide solution: 35ml/h v) Ninhydrin : 25ml/h
Analysis cycle time	45min
Column pressure	56.1kg/cm ²
Ninhydrine pressure	12.24kg/cm ²
Column temperature	48-89°C gradient
Reaction coil temperature	135°C
Wave length	440nm, 570nm

2. 혈청과 간장에서 지질의 농도

혈중 총 cholesterol, 중성지방, LDL과 HDL-cholesterol 농도와 간장 cholesterol 농도에 대한 세포의 다당체의 효과는 Table 4에 나타내었다.

혈중 총 cholesterol, 중성지방과 LDL cholesterol 농도는 대조군과 비교해서 세포의 다당체를 투여한 흰쥐에서 유의하게 감소하였으며, 세포의 다당체의 농도가 증가함에 따라 비례적으로 감소하였다. 가장 많이 감소한 군은 100mg/kg B. W. 투여군으로 나타났다. 세포의 다당체 투여량은 100mg/kg B. W. 이상을 실험하지 못하였는데, 그 이유는 세포의 다당체의 점도가 높고 경구투여할 수 있는 부피가 한정되어 있기

때문이었다. 혈장 중성지방과 총 cholesterol은 각각 26.4 %와 25.4% 감소하였다.

세포의 다당체를 50mg/kg B. W.로 투여한 군에서 LDL-cholesterol 농도가 대조군에 비해 49.4% 감소한 것으로 나타났으며, 100mg/kg B. W.로 투여한 군에서는 대조군과 비교해 81.3% 감소하였다. 그러나 각기 다른 식이군에서 혈청 HDL-cholesterol 농도는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았으며, HDL-cholesterol/총 cholesterol 농도비는 세포의 다당체의 농도가 증가할수록 유의적으로 증가하였다. 간에서의 cholesterol 농도는 유의성 있는 변화를 보여주지 않았다.

A. *polytricha*의 세포의 다당체의 지질저하 효과는 세포의 다당체의 높은 점성 때문인 것으로 사료되며,

Table 3. Effect of exo-polymer of *Auricularia polytricha* on body weight, liver weight and food intake in dietary induced hyperlipidemic rats

Group	Body Weight (g/wk)	Food Intake (g/day)	Liver Weight (g)
Control	41,60 ± 2,96 ^{NS}	13,45 ± 0,31 ^{NS}	5,73 ± 0,21 ^{NS}
50mg/kg	38,83 ± 2,47	12,85 ± 0,30	5,81 ± 0,12
75mg/kg	40,45 ± 1,98	13,19 ± 0,20	5,32 ± 0,11
100mg/kg	40,83 ± 2,01	13,57 ± 0,18	5,20 ± 0,29

Mean ± S.E. (n = 6 ~ 8)

^{NS} Not significant

Table 4. Hypolipidemic effect of *Auricularia polytricha* exo-polymer on dietary induced hyperlipidemic rats

Group	Blood Plasma					Liver Total Cholesterol
	Triglyceride	Total Cholesterol	LDL Cholesterol	HDL Cholesterol	HDL/Total Cholesterol	
Control	40,85 ± 0,85 ^{ab}	63,92 ± 1,51 ^a	27,61 ± 0,94 ^a	27,40 ± 0,89 ^{NS}	0,42 ± 0,02 ^a	16,10 ± 0,87 ^{NS}
50mg/kg	38,27 ± 2,26 ^{bc}	56,51 ± 3,25 ^{ab}	13,97 ± 1,21 ^{ab}	28,01 ± 0,96	0,55 ± 0,03 ^{ab}	13,86 ± 1,27
75mg/kg	34,96 ± 0,08 ^{cd}	49,50 ± 2,05 ^{bc}	12,53 ± 1,21 ^{bc}	29,88 ± 0,45	0,60 ± 0,03 ^b	12,83 ± 0,62
100mg/kg	30,49 ± 2,87 ^{cd}	47,23 ± 3,52 ^c	5,17 ± 1,15 ^c	32,05 ± 1,03	0,73 ± 0,03 ^c	12,55 ± 0,55

Mean ± S.E. (n = 6 ~ 8)

^{NS} Not significant

Means in the same column with different superscript are significantly different (p<0,05)

세포의 다당체의 농도가 증가할수록 지질저하 효과는 비례적으로 증가하였다. 이것은 세포의 다당체의 농도가 증가할수록 점도가 증가하는 것과 일치한다. 아마도 이러한 것은 흰쥐에서 소장에서의 micelles 형성 억제와 소장 점막의 물리적 성질 변화에 의한 중성지방과 cholesterol 수치의 저하로 인한 것이라 사료된다(Chen과 Anderson, 1986; Ebigara과 Schneeman, 1989). *Volvariella volvacea*(폴버섯)의 세포의 다당체의 cholesterol 저하 효과에서 유사한 사실이 보고된 바 있다(Cheung 1996b). 그러나 이러한 사실은 세포의 다당체들이 지질저하 효과를 나타내는데 관계되는 생화학적 규명으로는 충분하지 않으며 차후 세밀한 연구가 진행되어야 할것으로 사료된다.

세포의 다당체는 HMG Co-A 환원효소 활성을 억제하고 동시에 다양한 조직의 LDL 수용체를 활성화시켜, 결과적으로 혈장 LDL과 총 cholesterol를 감소시킬 수 있는데(Ganong, 1987). *A. polytricha*의 세포의 다당체도 역시 같은 역할을 함으로써 혈중 총

cholesterol과 LDL 수치를 감소시키는 것으로 여겨진다. 또한 이러한 효과들은 동맥경화의 위험을 줄이는데 도움을 줄 수 있다(Miller와 Miller, 1975). 비록 cholesterol 저하효과를 나타내는 *A. polytricha* 세포의 다당체의 기작은 분명하지 않지만, cholesterol 저하효과를 나타내는 데에 있어서 세포의 다당체의 역할로 1) cholesterol 흡수나 생합성의 억제, 2) VLDL과 LDL 전구체의 생합성과 LDL의 부분적인 전환 촉진의 억제(Tokuda 등, 1974), 그리고 3) 담즙산 분비의 증가(Vahouny 등, 1987) 등의 복합적인 효과에 대한 가능성이 제시될 수 있을 것이다.

3. 세포의 다당체의 화학적 분석

A. polytricha 세포의 다당체의 화학적 분석은 Table 5에 나타내었고, 당 48.9%와 단백질 19.1%를 포함하는 것으로 나타났다.

세포의 다당체의 당 성분은 7종류의 단당류로 구

Table 5. Sugars and amino acid composition of exo-polymer from *Auricularia polytricha*

Amino acid	Composition(%)	Sugar	Composition(%)
Aspartic acid	7.6	Ramnose	0.1
Threonine	1.5	Fucose	0.4
Serine	3.5	Ribose	19.1
Glutamic acid	50.0	Xylose	0.4
Proline	0.5	Mannose	11.0
Glycine	12.0	Galactose	9.4
Alanine	2.6	Glucose	29.5
Cysteine	1.1		
Valine	2.2		
Methionine	0.6		
Isoleucine	1.4		
Leucine	2.8		
Tyrosine	0.9		
Phenylalanine	1.9		
Histidine	1.9		
Lysine	2.8		
Arginine	6.6		

성되어 있고, glucose, ribose, mannose가 각각 29.5%, 19.1%, 11.0%로 우세적이었다. 단백질 성분은 17종류의 아미노산으로 구성되어 있으며, 주된 아미노산으로 glutamic acid(50.0%), glycine(12.0%), aspartic acid(7.6%), arginine(6.6%)을 함유하고 있다.

다른 종류의 버섯으로부터 추출되는 다당류들의 대부분은 결사슬로 β -1, 6-glucose를 갖는 β -1, 3-glucans(Franz, 1989) 또는 당단백질 복합체(Mizuno 등, 1990)이다. Hamster에서 *Pleurotus ostreatus*(느타리 버섯)의 cholesterol 저하 효과는 그에 존재하는 β -glucans 때문인 것으로 보고되었다(Ebigara와 Schneeman, 1989). Kiho 등(1995)은 *Tremella aurantia*(흰목이버섯)로부터 생산된 세포외 다당체들이 galactomannan으로 구성되어 있으며, galactose와 mannan의 molar ratio가 1:9로 되어 있다고 보고하였고 Cheung(1996b)은 그것이 β -glucan 형태라고 보고하였다. Sugiyama 등(1995)은 표고버섯의 cholesterol 저하 작용을 하는 화합물이 eritadenine이라고 밝히고 있다. 따라서 *A. polytricha*의 세포외 다당체는 당단백질 또는 galactomannan, β -glucan 또는 eritadenine과 같은 화합물일 것으로 추측된다.

참고문헌

1. Bobek, P., Ginter, E., Jurcovicova, M., and Kuniak, L.(1991), Cholesterol lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats, *Ann Nutr Metab.*, 35: 191~195.
2. Cavazzoni, V., and Adami, A.(1992), Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms, *Ital. J. Food Sci.*, 1: 9~15.
3. Chen, W. L. and Anderson, J. W.(1986), Hypocholesterolemic effect of soluble fiber, In *Dietary Fiber: Basic and Clinical Aspects*, eds. Vahouny, G. V. and Kritchevsky, D., Plenum Press, New York, NY, p. 275~286.
4. Cheung, P. C. K.(1996a), The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from

the submerged fermentation of mushroom, *Nutr. Res.*, 16: 1953~1957.

5. Cheung, P. C. K.(1996b), The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats, *Nutr Res.*, 16: 1721~1725.
6. Crisan, E. V., and Sands, A.(1978), Nutritional value, In *The biology and cultivation of edible mushroom*, Academic Press, New York, NY, p. 137~168.
7. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F.(1956), Colorimetric method for determination of sugar and related substance, *Analytical Chemistry.*, 28: 350~356.
8. Ebihara, K., and Schneeman, B. O.(1989), Interaction of bile acid, phospholipids, cholesterol and triglyceride with dietary fiber in the small intestine of rats, *J. Nutr.*, 119: 1100~1106.
9. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. H. (1957), A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue, *Journal of Biological Chemistry.*, 226: 497~509.
10. Franz, G.(1989), Polysaccharides in pharmacy: Current applications and future concepts, *Planta.*, 55: 493~497.
11. Ganong, W. F.(1987), *Endocrinology & Metabolism: Energy Balance, Metabolism & Nutrition*, In *Review of Medical Physiology*, 17th ed, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut /San Mateo, California, p. 229~261.
12. Jones, T. M., and Albersheim, P.(1972), A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide, *Plant Physiology.*, 49: 926~936.
13. Jong, S. C., and Birmingham, J. M.(1992), Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*, *Advances in Appl. Microbiol.*, 37: 101~134.

14. Kaneda, T., and Tokuda, S.(1966), Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats, *J. Nutr.*, 90: 371~376.
15. Kiho T., Morimoto H., Sakushima, M., Usui S., and Ukai S.(1995), Polysaccharide in fungi, XXXV. Anti-diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*, *Biol. Pharm. Bull.*, 18: 1627~1629.
16. Kurasawa, S. I., Sugahara, T., and Hayashi, J.(1982), Studies on dietary fibre of mushrooms and edible wild plants, *Nutrition Reports International*, 26: 167~173.
17. Lee, S. Y., Kang, T. S., Moon, S. O., Lew, I. D., and Lee, M. Y.(1996), Fractionation and antitumor activity of the watersoluble exopolysaccharide by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 459~464.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L., and Randall, R. J.(1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265~275.
19. Miller, G. J., and Miller, N. E.(1975), Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease, *Lancet*, 1: 16~19.
20. Mizoguchi, Y., Katoh, H., Kobayashi, K., Yamamoto, S., and Morisawa, S.(1987), Effects of extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen, *Gastroenterol. Jpn.*, 22: 627~32.
21. Mizuno, T. R., Inagaki, T., Kanao, T., Hagiwara, T., Nakamura, H., Ito, K., Shimura, T., Sumiya, T., and Asakura, A.(1990), Antitumor activity and some properties of water-insoluble heteroglycans from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill, *Agricultural Biological Chemistry*, 5: 2987.
22. Raunet, J. M., Laurent, C., and Besaugon, P.(1993), Rice bran and wheat bran: selective effect on plasma and liver cholesterol in high-cholesterol fed rats, *Food Chemistry*, 47: 67~71.
23. Sale, F. O., Marchesini, S., Fishman, P. H., and Berra, B.(1984), A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts, *Anal Biochem*, 142: 347~350.
24. Song, C. H., Cho, K. Y., and Nair, N. G.(1987), A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*, *Mycologia*, 76: 866~876.
25. Stalmer, J., Welthwoth, D., and Neaton, J. D.(1986), Is there a relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease and grade?, *Journal of American Medical Association*, 25: 2823~2829.
26. Sugano, N., Choji, Y., Hibino, Y., Yasumura, S., and Maeda, H.(1985), Anticarcinogenic action of an alcohol-insoluble fraction (LAP1) from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia, *Cancer Lett.*, 27: 1~6.
27. Sugiyama, K., Akachi, T., and Yamakawa, A.(1995), Hypocholesterolemic action of eritadenine is mediated by a modification of hepatic phospholipid metabolism in rats, *J. Nutr.*, 125: 2134~2144.
28. Suzuki, H., Okubo, A., Yamazaki, S., and Toda, S.(1988), Immunopotentiating substances in *Lentinus edodes* mycelial extract (LEM)-activation of macrophage and proliferation of bone marrow cell, *Med Microbiol Immunol (Berl)* 177: 235~244.
29. The American Institute of Nutrition(1977), Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies, *J. Nutr.*, 107: 1340~1348.
30. Tochikura, T. S., Nakashima, H., Ohashi, Y., and Yamamoto, N.(1988), Inhibition (*in vitro*) of

- replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, 177: 235 ~ 44.
31. Tokuda, S., Tagiri, A., Kano, E., Sugawara, Y., Suzuki, S., Sato, H., and Kaneda, T.(1974), Reducing mechanism of plasma cholesterol by shiitake, *Mushroom Sci.*, IX (part I): 445 ~ 462.
32. Trevelyan, W. E., Procter, D. P., and Harrison, J. S.(1950), Derection of sugar on paper chromatograms, *Nature. Lond.*, 166: 444 ~ 445.
33. Tseng, T. C.(1984), Studies on *Ganoderma lucidum* 1. Liquid culture and chemical composition of mycelium, *Bot. Bull. Axad. Sin. (Taipei)*, 25: 149 ~ 154.
34. Vahouny, G. V., Khalafi, R., Satchithanandam, S., Watkins, D. W., Story, J. A., Cassidy, M. E., and Kritchevsky, D.(1987), Dietary fiber supplementation and fecal bile acids, neutral steroids and divalent cations in rats, *J. Nutr.*, 117: 2009 ~ 2015.