

표고 균사 배양체내 에르고스테롤 함량의 변이^{*1}
구창덕^{*2} · 조남석^{*2} · 김재수^{*2} · 박재인^{*2} · 최태호^{*2} · 민두식^{*2}

Variation of Ergosterol Content in *Lentinula edodes* Culture^{*1}

Chang-Duck Koo^{*2} · Nam-Seok Cho^{*2} · Je-Su Kim^{*2} · Jae-In Park^{*2}
Tae-Ho Choi^{*2} · Du-Sik Min^{*2}

ABSTRACT

Ergosterol is an indicator chemical of fungi and involves in fungal cell growth as a major component in fungal cell membranes. Thus, this chemical can be used to estimate live fungal biomass within various solid substrates. Ergosterol content in liquid culture of *Lentinula edodes* had a linear relationship ($r=0.98$) with the hyphal mass of the fungus. This chemical content differed depending on the fungal strains, age of culture and water content levels of sawdust substrate. Ergosterol content was 0.13% in the 10 weeks old liquid culture while it was 0.10% in 20 weeks old one. The chemical content in the sawdust cultures of the fungus varied 0.015% to 0.042% depending upon strains and water content levels within sawdust substrate. Ergosterol content in the culture of a *L. edodes* strain, Sanrim 4, was higher by 20 μ g to 140 μ g/g dry substrate than those of strains, Mok-H and Sanrim 6. And the chemical contents in the sawdust cultures with 125% or 175% water, 297 to 425 μ g/g dry substrate, were higher than those with 75% or 225% water, 148 to 286 μ g/g dry substrate. We conclude that ergosterol analysis can estimate the fungal biomass within solid substrate such as logs and sawdust.

Keywords: Ergosterol, fungal biomass, *Lentinus edodes*, sawdust substrate

- 요약 -

에르고스테롤(ergosterol)은 고등균류 균사세포막의 중요한 구성 성분으로 이들의 특징 물질이고, 균의 생장에 중요한 기능을 한다. 그러므로 균사 배양체에서 이 물질의 함량을 분석함으로써 고체상 배지 속에 있는 곰팡이의 생체량을 추정할 수 있다. 표고균사의 액체 배양체와 톱밥 배양체를 가지고 에르고스테롤을 분석한 결과, 이 물질의 함량은 균사체의 종량과 직선적 상관관계가 있으면서($r=0.98$), 배양기간, 균주, 배지내 수분함량에 따라 달라졌다. 액체배양체에서 에르고스테롤 농도는 10주간 배양된 것이 0.13%로 20주간 배양된 것의 0.10% 보다 높았다. 톱밥배양체에서 이 물질의 농도는 균주와 수분 함량에 따라 0.015~0.042% 범위였다. 표고균주 산림 4호 배양체에서 에르고스테롤 함량은 균주 목 하나 산림 6호의 것보다 건조배지 g당 20~140 μ g 정도 높았다. 이 화학물질의 함량은 표고균사를 수분율이 125%나 175%인 배지에서 배양하였을 때 건조배지 g당 297~425 μ g였다. 이 양은 수분율이 75%나 225%인 배지에서의 함량, 148~286 μ g/g 건조배지, 보다 높은 것이다. 에르고스테롤을 분석함으로써 톱밥이나 원목과 같은 고체배지내에 있는 표고 균사량의 추정이 가능하리라 생각한다.

*1 접수 1999년 10월 28일, Received Oct., 28, 1999

*2 충북대학교 농과대학 산림과학부충북 청주시 흥덕구 개신동 48번지 School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

1. 서 론

에르고스테롤(ergosterol)은 고등균류 (자낭균이나 담자균류)의 세포막에 있는 주요한 스테롤로서 식물이나 다른 미생물에는 거의 없고, 살아있는 균류의 세포에만 있는 특징물질이다 (Weete & Gandhi, 1996; Ekblad *et al.*, 1998). 이 물질은 균사와 포자의 원형질막 구성성분으로서, 세포벽구성 물질인 키틴(chitin)보다 곰팡이(균류)의 건중량과 상관관계가 높기 때문에 여러 가지 물질내에 있는 곰팡이의 균사량을 추정하는데 이용되고 있다 (Pasanen *et al.*, 1999; Hart & Brokes, 1996; Seitz *et al.*, 1979; Pennanen *et al.*, 1998).

에르고스테롤은 주로 균사세포막의 인지질 2중막 내에 유리 알콜 에스테로이드 글라이코시드로 존재하기 때문에 세포막의 미세 점성도(microviscosity)를 높이면서, 세포핵 합성, 키틴 합성효소의 조절, 사이토크롬 C의 과산화수소효소와 ATP효소와 같은 세포막에 있는 효소들의 활성에도 영향을 주는 것으로 생각되고 있다 (Hart & Brokes, 1996). 에르고스테롤은 28개의 탄소와 3개의 2중결합을 지니며, 분자량은 386, [22E, 24R]-24-methyl-cholesta-5,7,22-trien-3 β -ol이며, 2중결합의 위치와 메틸기를 가지고 있는 점에서 콜레스테롤과는 다르다 (Weete & Gandhi, 1996). 이런 특징으로 에르고스테롤은 UV흡수에서 고유한 패턴을 보여 282nm에서 최대가 되고, 비타민 D2의 전구물질로서 자외선을 쬐이면 비타민 D2로 되며, 이것으로써 동물이나 식물 그리고 곰팡이 이외의 다른 미생물에 있는 스테롤과는 쉽게 구분된다 (Weete & Gandhi, 1996). 일반적으로 균류 조직내 에르고스테롤의 함량은 0.1~5.0 % 정도이며(Nylund & Wallander, 1992), 이 양은 균의 종류와 배양된 기간, 균의 생장발달단계, 그리고 배양조건(배지, pH, 온도) 등에 따라 다르다 (Schnurer, 1993).

이러한 특성을 이용하여 에르고스테롤은 곰팡이로 감염된 곡식 (Seitz *et al.*, 1979), 식물체 (Gessner & Chauvet, 1993), 토양 (Stahl & Parkin, 1996), 건축재료 ((Pasanen *et al.*, 1999), 주거지내 분진 (Saraf *et al.*, 1997) 등에서 균체의 바이오매스를 추정하는데 이용되었다. 표고버섯에서 에르고스테롤 함량은 버섯의 부위나 생산지 환경에 따라 다르지만 0.15% ~ 0.43%에 이른다 (민 등, 1995). 결국 에르고스테롤은 살아있는 곰팡이 조직의 바이오매스와 관련이 깊으면서 균류의 고유 화합물이기 때문에, 버섯

재배 원목이나 톱밥 등 고체상 배지 속에 자라서 균체만을 분리할 수 없는 표고균사의 바이오매스를 추정하는 데에도 이용될 수 있을 것이다.

이 연구의 목적은 1) 표고 균사 배양체의 에르고스테롤의 함량 분석시 추출액에 따른 차이를 검정하고, 2) 표고균사 배양체의 중량과 에르고스테롤의 함량과의 관계, 3) 톱밥배지내 수분함량과 균주에 따른 에르고스테롤의 함량 변이를 알기 위한 것이었다.

2. 재료 및 방법

2.1 표고 균사배양체

표고균을 배양한 액체 배지는 증류수 1리터 당 글루코스 20g, 이스트엑스트랙트 2g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, CaCl₂·2H₂O 0.5g, 펩톤 2g을 넣어 121℃에서 고압살균하였다. 액체 배양체는 여과지에 걸러서 모은 후 압지 사이에 넣고 눌러서 수분을 제거한 후 무게를 달고 막자사발에 갈아서 분석시료로 사용하였고 일부 시료는 105℃에서 말린 후 생중량:건중량 비를 구하였다. 표고 톱밥배양체는 2cm×15cm 시험관에서 미강 10%를 함유한 상수리 톱밥에서 20주 동안 기른 것으로 배지내 수분율은 건중량 기준으로 75%, 125%, 175%, 225%로 조정하였다. 이 톱밥배지에 충북대, 임업연구원, 임업협동조합 미생물 연구소에서 분양 받은 4개의 표고 균주(목-H, 산림4호, 산림 6호, 임협 1호)의 액체 배양 균사체를 접종하였다. 후자 3균주는 유전적 특성이 다른 것으로 구분되었기에 (이 등, 1997) 사용하였다. 이 톱밥배지 배양체의 생중량 0.5g을 분석에 사용하였다.

2.2 에르고스테롤 분석

Pasanen *et al.* (1999)과 Nylund & Wallander (1992)의 방법들을 변형하여 액체배양 또는 톱밥배양된 표고 균사체의 에르고스테롤 함량을 다음 과정으로 분석하였다. 1) 사포닌화: 시료를 2cm×15cm 시험관에 넣고 95% 메탄올에 녹인 10% KOH 8ml를 넣은 후, 80℃에서 60분 정도 증탕한 후에 용액이 마르지 않도록 10% KOH용액 2ml 더 첨가하고 30분간 더 증탕하였다. 2) hexane 추출: 사포닌화한 시료를 실온으로 식히고 각 시험관에 3ml의 물을 첨가하여 보르텍스로 교란하여 섞은 후 hexane 2ml를 첨가하고 섞어서 무색 투명한 hexane분획이 상등액으로 분리되면 파스퇴르 피펫으로 모았다. 그리고

hexane 2ml를 한번 더 넣어 섞은 후 상등액을 모았다. 모아진 hexane 분획을 증발기에 넣어서 hexane을 휘산시킨 후 남은 백색의 옅은 결정을 99.5% 에탄올 2ml에 녹인 후 0.2 μ m 필터에 여과하였다. 3) HPLC 분석: 여과된 시료 10 μ l를 취하여 Waters 510 HPLC 펌프에 주입하였다. HPLC 조건을 UV Detector로 파장 282nm, mobile phase는 HPLC용 메탄올, reverse-phase 컬럼은 Waters Nova-Pak C18, 펌프 유입속도 1.4 ml/min로 하였을 때, 에르고스테롤의 피크는 4.6분 후에 나타났다. Waters 746 Integrator에 나타난 수치를 에르고스테롤 표준곡선에 대입하여 함량을 구하였다. 표준곡선은 Nylund & Wallander (1992)의 방법에 따라 Sigma 제품 에르고스테롤을 끓는 에탄올에 녹인 후 재결정, 정제 후 100 ppm 표준용액을 만들어서 같은 HPLC에서 구하였다.

2.3 시험 설계

톱밥 배양체내에 있는 에르고스테롤을 사포닌화하기 위한 용액으로서 메탄올이나 메탄올+에탄올 혼합체의 효과를 알기 위하여 95% 메탄올과 95% 에탄올을 사용하였으며, 이들의 혼합비는 4:1 이었다. 추출은 각 용액별로 상기한 4개의 수분수준으로 톱밥배양체에 대하여 2반복하였으며, 표고 균사체 중량: 에르고스테롤의 함량관계를 알기 위한 분석은 액체배양체 무게 30, 70, 140, 210mg별로 2반복하였다. 톱밥배양

체내의 에르고스테롤 분석은 4개 균주에 대하여 4수준의 배지내 수분 함량별로 3반복하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 추출용액에 의한 에르고스테롤 함량분석의 차이

톱밥배양된 표고 균사체내에 있는 에르고스테롤을 추출할 때 메탄올이나 에탄올+메탄올의 혼합용액을 사용하여도 분석한 결과에는 차이가 없었다 (Table 1). 에르고스테롤 분석에 위 두 가지의 추출용액을 톱밥배지내 수분 함량별로 대응하여 사용하였을 때 추출용액에 의한 차이는 $2.6 \pm 13.5 \mu\text{g/g}$ 톱밥배양체, $t=1.60$ 으로써 10% 유의수준($t_{df=6,10\%}=1.89$)에서 차이가 없었다. 그러나 이 오차에는 톱밥배지내 수분 함량과 증탕 수조내의 온도 분포에 따른 분석과정 자체에서 오는 인위적인 영향도 포함된 것이라고 생각한다. Pasanen *et al.* (1999)에 따르면, 실제로 여러 가지 종류의 곰팡이에 대한 에르고스테롤 함량 분석치의 표준 편차는 5~16% 정도인데, 이 변이는 주로 분석법 자체에 기인한다고 한다. 이 실험에서 각 시료에 대해서 추출용액별로 반복한 분석치의 오차범위는 에르고스테롤 함량의 1~9% 였다.

에르고스테롤 분석방법은 추출 용액과 온도, 시간에 있어서 논문에 따라 약간의 차이가 있다. 예를 들면 질섭보-드 같은 건축재료에서는 80 $^{\circ}$ C에서 90분간

Table 1. The effect of extraction solutions of methanol or methanol-ethanol mixture on the analysis of ergosterol content in *Leninula edodes* sawdust culture.

Water content in sawdust substrate-rep.	Ergosterol ($\mu\text{g/g}$ culture fresh weight)		
	Methanol	Methanol + Ethanol	Difference
75(%)-1	110	124	-14
75(%)-2	105	124	-19
125(%)-1	138	125	+13
125(%)-2	165	149	+16
175(%)-1	101	100	+1
175(%)-2	102	121	-19
225(%)-1	154	162	-8
Mean \pm SD			2.6 ± 13.5

$t=1.60 < t_{df=6,10\%}= 1.89$; rep.=replication

(Pasanen *et al.*, 1999), 외생균근에서는 100℃에서 15-20분간 (Nylund & Wallander, 1992), 그리고 토양에서는 에탄올 + 메탄올의 4:1혼합액에서 70℃로 90분간 (Zelles & Alef, 1995) 또는 메탄올에서 90℃로 1시간 (Hart & Brokes, 1996) 등이다. 표고균사에 대한 에르고스테롤 분석에서도 추출온도와 시간이 같지는 않는데, 톱밥배지인 경우 40℃에서 90분간 (Ohga, 개인적 접촉), 토양배지인 경우는 75℃에서 45분간 (Okeke *et al.*, 1997) 추출과 동시에 사포닌 화시켰다.

한편 추출 온도가 높고 시간이 길수록 추출용액으로 사용한 메탄올이 휘발하여 날아갈 확률이 커지므로 분석치의 인위적인 오차 또한 커지리라 생각한다. 실제로 이번 추출에서, 메탄올 용액이 다 휘산한 경우에는 최종 에르고스테롤 분석치가 무의미할 정도로 낮았다 (자료 제시하지 않았음). 이번 추출에서는 60분 정도 증탕한 후에 남아있는 추출용액을 확인하고 같은 추출용액 2ml를 더 첨가하는 것이 분석 오차를 줄이는데 효과가 있었다.

3.2 균사 배양체의 중량과 에르고스테롤 함량

액체배지에서 10주간 배양된 균사체와 20주간 배양된 것의 균체량을 달리하여 에르고스테롤을 분석하였을 때, 이 물질의 함량은 두 균사체에서 모두 균사체 중량에 비례하였으며 (Figure 1), 상관계수는 10주 배양체에서 $r=0.99$ 그리고 20주 배양체에서 $r=0.98$ 이었다. 이러한 직선적인 상관관계는 이미 여러 연구에서 언급되고 있다 (Newell, 1994; Stahl & Parkin, 1996). 양송이 균사체의 경우 배양 56일 동안 균사중량 증가와 에르고스테롤 함량간에 상관계수 (r)가 0.997 (Matcham *et al.*, 1985), 토양내 존재하는 곰팡이 균사의 표면적과 에르고스테롤 함량의 직선적 상관계수는 0.86 (Nylund & Wallander, 1992), 집안내 먼지속에 살아 있는 곰팡이의 수와 에르고스테롤 함량의 상관계수(r)는 0.65 정도였다 (Saraf *et al.*, 1997).

그러나 에르고스테롤 함량과 실제 균사량의 상관관계 정도는 균의 종류와 균이 이용하고 있는 물질에 따라 차이가 난다. 예를 들면 포자를 쉽게 형성하는 균과 균사를 주로 형성하는 균과도 차이가 있으며, 건축재료의 수분 상태에 따라 그 속에 적용한 균이 달라서 그 상관관계 값은 0.18 - 0.77의 변이를 보였다 (Pasanen *et al.*, 1999).

액체 배양된 표고균사체내의 에르고스테롤 농도는

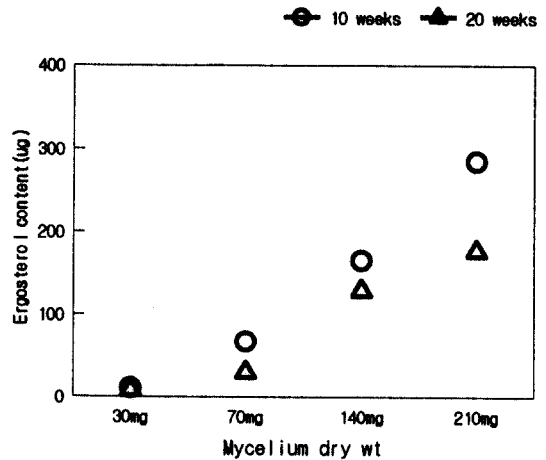


Fig. 1. Ergosterol content in 10- and 20-week-old mycelial cultures of *Lentinula edodes* grown in a liquid medium.

10주간 배양된 것이 20주간 배양된 것보다 높았다 (Figure 1). 어린 것의 에르고스테롤 농도는 건조균사 중량의 0.13%였고, 오래된 것은 약 0.10%였다. 외생균근에서도 나이가 많아질수록 균근내 에르고스테롤 농도가 낮아지는 것이 알려졌는데 1개월 된 균근에서는 0.2%, 7개월 된 것은 0.05%였다 (Ekblad *et al.*, 1998). 이것은 균체가 오래될수록 활성을 잃은 세포의 양이 증가하기 때문으로 생각한다. 그 결과 분해가 잘 되지 않는 균사세포벽의 구성성분인 키틴의 함량은 같은 시료에서도 에르고스테롤 농도보다 70% 더 높은 경우가 있다 (Nylund & Wallander, 1992).

한편 Figure 1에서 균사세포내 에르고스테롤의 농도를 계산하여 보면 사용된 시료의 양이 증가할수록 높아지는데 (0.03%에서 0.1% 정도로), 이는 미량의 시료를 취급하면서 생긴 인위적인 흠(여과지 등의 분석 용기에 흡수 또는 흡착)이라고 생각할 수 있다. 즉 100ppm짜리 에르고스테롤 표준용액을 HPLC에 2.5 - 20 μ l 주입하였을 때 분석치는 주입량과 정비례하였고 기계분석의 오차는 거의 없었기 때문이다 (자료제시 없음).

3.3 톱밥배지의 수분함량과 표고 균주별 균사 배양체내 에르고스테롤 함량

4개의 표고균주를 4개 수분수준의 상수리나무 톱밥배지에서 20주간 배양한 결과, 톱밥 배양체내 에르고

다. 이것은 에르고스테롤이 표고버섯의 원기형성에도 관계있음을 나타내는 것이다. 그러므로 에르고스테롤 분석은 톱밥배양체의 버섯생산 능력을 추정하는데도 이용될 수 있을 것이라고 생각한다.

4. 결 론

에르고스테롤 분석에는 현재 HPLC (Ekblad *et al.*, 1998; Pennanen *et al.*, 1998; Nylund & Wallander, 1992; Ohga, 1999; Zelles & Alef, 1995)나 GC-Mass Spectrometer Detector (Pasanen *et al.*, 1999) 와 같은 정교한 분석기기를 사용하고 있으면서도 추출방법은 논문에 따라 조금씩 다르다. 이 물질의 분석시 추출용액으로서 메탄올이나 메탄올+에탄올의 혼합용액이 사용되는데, 표고톱밥 배양체내 에르고스테롤을 분석한 우리의 시험에서는 두 용액간에 차이가 없었다. 그리고 표고균사의 액체 배양체와 톱밥 배양체를 가지고 에르고스테롤을 분석한 결과 표고균사내 이 물질의 함량은 배양균사체의 생체량과 직선적 상관관계가 매우 높고, 균주나 배양기간, 배양 조건에 따라서도 달라짐을 파악하였다.

에르고스테롤의 분석으로 원목이나 톱밥 속에 있는 균사의 생체량을 추정할 수 있으므로, 이것은 어떤 처리가 원목이나 톱밥배지내 표고균사의 생장에 미치는 효과를 검증하는데 이용될 수 있을 것이라고 생각한다.

앞으로 에르고스테롤 함량과 균사의 활력, 균사의 성숙도, 버섯원기의 형성이나 발달 등과의 관계가 정확히 밝혀지면, 이 물질의 분석을 통하여 보다 과학적인 표고버섯 생산 과정이 구상되리라 생각한다. 나아가 버섯재배 뿐만 아니라 곰팡이가 관련된 환경오염과 미생물 생태 연구 (Saraf *et al.*, 1997)에도 이 물질의 분석은 중요하게 적용될 수 있을 것이다.

사사 이 연구는 한국과학재단 Brain pool 프로그램과 농림기술연구 개발과제 298021-3의 일환으로 수행되었습니다. 이 연구를 위하여 에르고스테롤 분석에 도움을 주시고 실험기자재를 사용하게 해주신 충북대학교 농과대학 김영기, 차재순 교수님, 그리고 한국교원대학교의 이상선 교수님께 감사드립니다.

Fig. 2. Ergosterol concentrations in the oak sawdust cultures of *Leninula edodes* strains grown under four different water content levels. Each value is an average of three replications and the error bar is from standard deviation. d.w.=dry weight.

스테롤 함량은 배양체 건조량의 0.015 - 0.042% 범위에 있었다 (Figure 2). 배양체내 에르고스테롤의 함량은 일반적으로 배지의 수분을 75%나 225%에서보다 수분을 125%와 175%에서 높았다. 또한 산림 4호균주에서 건조배지 1g당 에르고스테롤의 함량은 다른 균주보다 적게는 20 μ g, 많게는 140 μ g이 더 많았다.

하지만 에르고스테롤의 농도는 균주와 배지의 수분을 따라서도 달랐다. 즉 목-H균주는 수분함량 변화에 민감하여 수분을 75%에서 건조배지 1g당 150 μ g 정도로 가장 낮았고, 수분을 125%에서는 400 μ g으로 가장 높았다. 이에 비하여 산림 6호는 수분에 덜 민감하여 75%수분에서 210 μ g, 175%에서 320 μ g 정도로 변이가 목-H 균주보다 적은 편이었다. 산림4호와 6호 그리고 임협1호 균주는 RAPD 유전자 분석에서도 서로 다른 그룹으로 분석되었다 (이 등, 1997). 위 결과들은, 표고균의 생장은 배지내 수분함량에 크게 좌우되고 균주별로도 환경변화에 따라 버섯생산이 다르다는 것 (Han *et al.*, 1981)을 뒷받침하고 있다.

아직도 원목과 톱밥 속에서 자란 표고균사의 실제 균사량을 측정하는 방법은 개발되지 않았고, 에르고스테롤로써 배지내 표고 균사량을 추정할 연구도 적다. 최근 Ohga (1999)에 의하면 표고 톱밥배양체내 에르고스테롤 함량은 자실체가 형성되지 않은 배지에서는 0.04%로 배양기간 중에 변화가 없으나, 자실체가 형성되는 배지에서는 0.08%에서 0.2%까지 급격히 증가하다가 자실체가 성숙함에 따라 급격히 감소하였

참 고 문 헌

1. Ekblad, A., H. Wallander and T. Nasholm 1998. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytol.* 138: 143-149.
2. Gessner, M.O. and E. Chauvet 1993. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 502-507.
3. Han, Y.H., W.T. Ueng, L.X. Chen and S. Cheng. 1981. Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Mushroom Science XI*: 623-658.
4. Hart, M.R. and P.C. Brokes. 1996. Effects of two ergosterol inhibiting fungicides on soil ergosterol and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 28: 885-892.
5. Matcham, S.E., B.R. Jordan, and D.A. Wood 1985. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl. Microbiol. Technol.* 21: 108-122.
6. Newell, S.Y. 1994. Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3479-3482.
7. Nylund, J.-E. and H. Wallander 1992. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. *In Methods in Microbiology Vol 24, Techniques for the Study of Mycorrhiza*, Ed J.R. Norris, D.J. Rad, and A.K. Varma. Academic Press, London. pp 77-88.
8. Ohga, S., D.S. Min, C.D. Koo, T.H. Choi, A. Leonowicz. and Nam-Seok Cho. 2000. Culture maturity of *Lentinula edodes* sawdust-based substrate in relation to fruiting potential. *Mokchae Konghak* 28: 55-64
9. Okeke, B.C., A. Paterson, J.E. Smith and I.A. Watson-Craik 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 563-569.
10. Pasanen, A.-L., K. Yli-Pietila, P. Pasanen, P. Kalliokoski, and J. Tarhanen 1999. Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 138-142.
11. Pennanen, T., H. Fritze, P. Vanhala, O. Kiikkila, S. Neuvonen, and E. Baath 1998. Structure of a microbial community in soil after prolonged addition of low levels of simulated acid rain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2173-2180.
12. Saraf, A., L. Larsson, H. Burge and D. Milton 1997. Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: Comparison with fungal culture and determination of endotoxin by *Limulus* amoebocyte lysate assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2554-2559.
13. Schnurer, J. 1993. Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 552-555.
14. Seitz, L.M., D.B. Sauer, R. Burroughs, H.E. Moohr, and J.D. Hubbard 1979. Ergosterol as measure of fungal growth. *Phytopathology* 69: 1202-1203.
15. Staddon, W.J., L.C. Duchesne, and J.T. Trevors 1999. The role of microbial indicators of soil quality in ecological forest management. *The forestry Chronicle* 75: 81-86.
16. Stahl, P.D. and T.B. Parkin 1996. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biol. Biochem.* 28: 847-855.
17. Weete, J.D. and S.R. Gandhi 1996. Biochemistry and molecular biology of fungal sterols. *In The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research.* Ed. K. Esser and P.A. Lemke. III *Biochemistry and Molecular Biology*, edited by R. Brambl and G.A. Marzluf. Springer, Berlin, pp. 421-438.
18. Zelles, L. and K. Alef. 1995. Biomarkers: ergosterol. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry.* Ed. K. Alef and P. Nannipieri. AP. London. pp. 422-424.
19. 민두식, 조남석, 성재모, 조재명. 1995. 표고버섯, 새로운 재배와 경영. 농민신문사. 서울. p.320.
20. 이태수, 박원철, 강호덕, 김세권, 변병호, 이창근, 이원규, 민두식. 1997. RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 검정을 이용한 한국 표고균주