

능이 균사체의 액체배양을 위한 배양 인자

이위영^{1*} · 이재순¹ · 가강현² · 안진권¹

¹국립산림과학원 생물공학과, ²국립산림과학원 화학미생물과

Liquid Culturing Factors of *Sarcodon aspratus* Mycelia

Wi Young Lee^{1*}, Jae Soon Lee¹, Kang Hyeon Ka² and Jin Kwon Ahn¹

¹Div. of Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

²Div. of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

요 약: 능이 균사체의 액체배양 조건을 구명하고자 배지별 및 배양조건을 규명하고자 하였다. 능이 균사체 배양에 적합한 기존의 배지로는 GYS배지였고, 적절한 온도는 25°C인 것으로 나타났다. 능이 균사체 배양에 적합한 탄소원은 전분, 말토오스 및 포도당인 것으로, 질소원으로는 유기복합 질소원으로 소이톤(soytone)이, 무기 질소원으로는 암모니아태 질소가 균사체 생장에 유리한 것으로 나타났다. 무기인산염은 제일인산암모늄이 적합한 것으로 나타났다. 비타민 종류로는 니코틴산 처리에서 생장이 우수한 것으로 나타났다. 이상의 적합한 조건으로 20일간 능이 균사체를 배양하여 5.7 g dw/L을 생산할 수 있었다.

Abstract: This study was carried out to obtain an optimal liquid culture condition for *Sarcodon aspratus* mycelia. Among various basal culture media the GYS (glucose-yeast extract-soytone) medium was the best for mycelial growth. The appropriate temperature was 25°C. Starch, maltose or glucose was excellent carbon sources for the mycelial culture, compared to others tested. As nitrogen nutrients, soytone and NH₄-N were the best organic and inorganic nitrogen sources, respectively. Moreover, the optimal concentration of soytone was 3 g per one-liter medium. In addition, we also found that alanine, (NH₄)H₂PO₄, and nicotinic acid were the best amino acid, phosphorus salt, and vitamin, respectively. When all optimal conditions described above were applied to culture medium, we were able to produce 5.7 g dry weight of *S. aspratus* mycelia per one-liter liquid medium within 20 days.

Key words : *Sarcodon aspratus*, mycelial liquid culture, mycelial culture condition, media composition

서 론

능이(*Sarcodon aspratus*)는 굴뚝버섯과(Thelephoraceae)에 속하는 담자균류로 참나무류 등의 뿌리와 공생하는 외생균근성 버섯이다(김삼순과 김양섭, 1990; 김홍은 등, 2002). 최근 능이버섯의 생리 생태적인 연구(김홍은 등, 2002; 이상희 등, 2005)가 일부 보고되었으나 대부분의 균근성 식용 버섯과 같이 아직 인공재배법은 개발되지 못하고 있다.

능이는 우리나라 및 일본에서 널리 식약용으로 사용되어 온 버섯으로서 그 향기가 높아 향버섯으로도 불리고 있다(김삼순과 김양섭, 1990). 약용으로서 한방에서는 육류 체증 치료에 사용되어 왔으며, 이는 근래의 연구를 통해

능이에는 단백질분해효소를 함유하고 있기 때문임이 밝혀졌다(박완희, 1986; 조희연 등, 2004; 조남석과 조희연, 2004). 특히 이 버섯에 함유된 protease는 다른 버섯들의 단백질분해활성 보다 높아 식의약품으로서의 이용에 대한 관심이 높아지고 있다(이태규, 1986; 은재순 등, 1988). 또한 버섯류에는 다양한 생리활성 기능이 보고되고 있는데 능이도 혈중콜레스테롤 저하효과, 항돌연변이 효과, 간손상 예방효과, polyphenol 등 항산화 물질에 의한 항산화 작용 등의 연구가 보고되고 있다(송재환 등, 2003; 김진우 등, 2005; 문영희 등 2005). 이와 같이 능이버섯은 식약용으로서 가치가 높아 인공재배법의 개발이 필요시 되는 버섯이다.

인공재배법 개발을 위해서는 자실체 발생의 근간이 되는 균사체에 대한 생리 생태 연구가 선행되어야 할 것이다. 그러나 능이버섯 균사체 배양과 관련한 보고는 매우

*Corresponding author
E-mail: lwy20@forest.go.kr

여 배양하였다. 배지의 초기 pH는 0.1M-HCl과 NaOH로 5.2로 조절하였다. 배양배지 조성은 glucose 15 g/L, starch 10 g/L, soytone 0.3 g/L, KH₂PO₄ 0.1 g/L, MgSO₄ 0.05 g/L로 하였다. 처리된 배지에 상기의 액체배양 방법으로 배양하여 균사체의 건중량을 측정, 비교하였다.

5. 탄소원, 질소원, 인산염, 비타민 영향

능이 균사생장에 미치는 탄소원, 질소원, 인산염 종류의 영향을 조사하기위하여 기본배지의 조성은 yeast extract 2 g/L, soytone 1 g/L, KH₂PO₄ 0.1 g/L, MgSO₄ 0.05 g/L로 하였고, pH는 5.2로 조절하였다. 상기의 액체배양 방법으로 배양하여 균사체의 건중량을 측정, 비교하였다. 탄소원 종류는 glucose, fructose, sucrose, maltose, galactose, xylose, starch을 사용하였고, 기본배지에 각 20 g/L로 첨가하였다.

질소원 종류는 복합 질소원으로서 soytone, yeast extract, malt extract, 및 peptone을 각 0.3 g/L로 처리하였고, 무기 질소원으로서 (NH₄)₂HPO₄, ammonium tartrate, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, 및 KNO₃를 각 0.02M로 처리하였으며, 아미노산으로 glutamic acid, alanine, serine, glycine을 각 0.02M로 처리 하였다. 이때 기본배지의 조성은 glucose 15 g/L, starch 10 g/L, KH₂PO₄ 0.1 g/L, MgSO₄ 0.05 g/L로 하였고, pH는 5.2로 조절하였다.

인산염 종류는 기본배지에 KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, (NH₄)₂HPO₄, 및 (NH₄)H₂PO₄을 각 1 mM로 처리하였다. 기본배지 조성은 glucose 15 g/L, starch 10 g/L, soytone 0.3 g/L, MgSO₄ 0.05 g/L로 하였고, pH는 5.2로 조절하였다.

비타민 종류는 ascorbic acid, nicotinic acid, riboflavin, pyridoxine, folic acid, biotin, thiamine을 각 10 µg/L로 배양배지에 처리하였다. 배양배지 조성은 glucose 15 g/L, starch 10 g/L, soytone 0.3 g/L, KH₂PO₄ 0.1 g/L, MgSO₄ 0.05 g/L로 하였고, pH는 5.2로 조절하였다.

결과 및 고찰

1. 능이 균 등정 및 배지 종류별 균사체 성장

본 시험에 앞서 능이 균임을 동정하기위해 ribosomal DNA의 ITS영역의 PCR 산물(MK56/MK57)의 DNA 염기서열 및 NCBI blast 분석하였고(Lee *et al.*, 2004), 그 결과 능이 균(KFRI 698)은 696 bp의 염기서열을 가졌으며 AF335110(*Sarcodon aspratus*)와 97% 이상의 상동성을 확인하였다.

액체배양 중의 능이균사체 형태는 송이균사체 액체배양과 같이 색깔은 백색을 나타내었으며 조직이 다소 치밀해 보였으며, 가시적으로 표면이 침상인 펠렛형태 보다 및

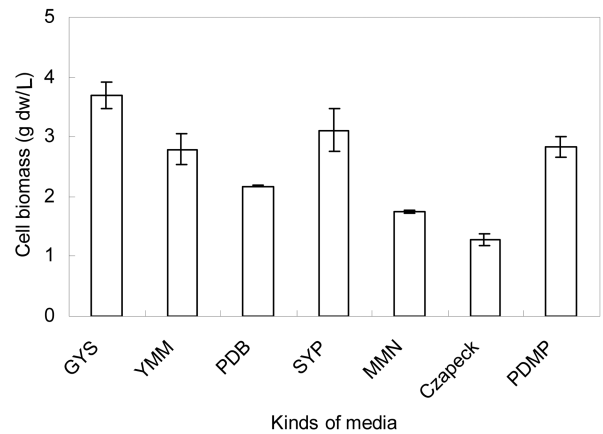


Figure 1. Mycelial growth (g dry weight/L) from liquid culture of *Sarcodon aspratus* in different culture media. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 20 days. Error bar indicates standard deviation of means.

및한 불형태로 성장을 하였다. 공기부양식 생물반응기에서 배양시 능이 균사체는 송이균사체 등 다른 균사체보다 무거워 배양이 진행됨에 따라 생물반응기 기저부분으로 쉽게 침강되어 공기공급량을 높혀 주어야만 하는 특징이 있었다.

능이 균사체의 적절한 액체배양배지의 조성을 구명하기위하여 기존의 여러 종류별 균사체 배양 배지에서 배양하였다. Figure 1과 같이 GYS와 SYP배지에서 능이 균사체의 생산량이 3.5 g/L 전후로 생산되어 사용한 다른 배지들에 비해 높았다. 이는 탄소원이 글루코오스나 전분을, 질소원은 소이톤(soytone)이나 효모추출(yeast extracts)을 사용하고 있는 배지에서 능이 균사체 생산량이 높게 생산됨을 제시하였다. 송이 균사체 배양에 적합한 배지는 탄소원은 전분, 질소원은 효모추출물 및 펩톤이 첨가된 배지(Lee *et al.*, 1997; 이위영 등, 2002)에서 균사체 생장이 비교적 높게 나타나 능이도 송이와 같이 균근균인 관계로 배양에 필요한 배지의 기질이 유사한 것으로 추정되었다.

2. 온도 영향

능이 균사체의 적절한 액체배양조건을 구명하기위하여 배양온도를 10~35°C까지 처리하여 배양하였다. Figure 2에서와 같이 적절한 배양온도는 25°C 전후인 것으로 나타났다. 이러한 배양온도는 일반적인 버섯 균사체의 배양온도와 유사하였다. 능이 균사체는 10°C이상부터 배양온도가 증가 할수록 균사체 성장량은 증가하는 것으로 나타났으나 25°C에서는 4.3 g dw/L으로 최고의 성장량을 나타냈고 이후부터는 급격히 성장량이 감소하여 30°C에서는 1.3 g dw/L로 낮아졌다. 능이 생산 임지에서의 평균 지중온도는 16.8°C이라고 하였는데(이상희 등, 2005) 본 실험에서 이 온도 조건에서는 균사체의 성장량이 2.8 g dw/L 전후

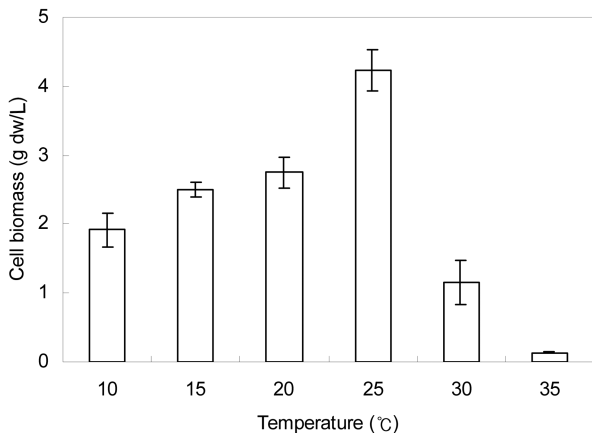


Figure 2. Effect of temperature on the mycelial growth (g dry weight/L) in liquid culture of *Sarcodon aspratus*. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 20 days. Error bar indicates standard deviation of means.

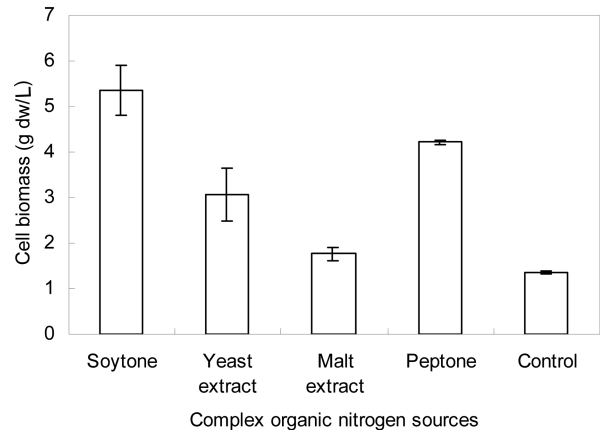


Figure 4. Effect of complex organic nitrogen sources on the mycelial growth (g dry weight/L) in liquid culture of *Sarcodon aspratus*. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 20 days. Error bar indicates standard deviation of means.

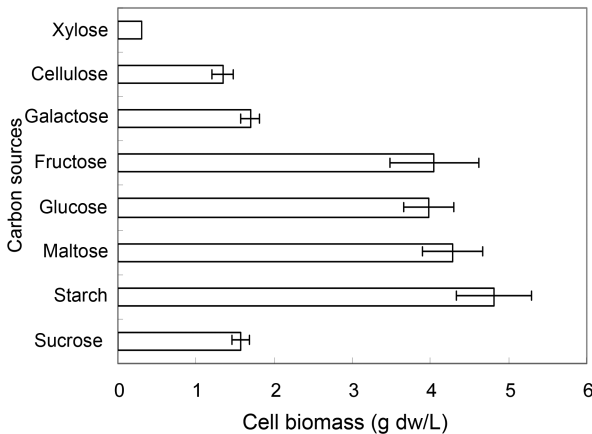


Figure 3. Effect of carbone sources on the mycelial growth (g dry weight/L) in liquid culture of *Sarcodon aspratus*. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 20 days. Error bar indicates standard deviation of means.

로 다소 더디게 성장하는 것으로 나타났다.

3. 탄소원 종류별 능이 균사체 성장

목재 부후균과 비교해 균근균인 능이는 탄소원을 반드시 기주식물로부터 공급받게 됨으로 탄소원 이용 범위가 제한 적일 것으로 추정된다. 능이 균사체 배양에 적합한 탄소원을 알기위하여 전분 등 8종의 탄소원을 대상으로 배양하였다(Figure 3). 전분 및 말토오스와 같이 글루코오스가 α 결합을 하고 있는 탄소원에서 가장 높은 성장을 하였고, 또한 과당(fructose)과 글루코오스에서도 성장량이 높았다. 그러나 자당(sucrose), 갈락토오스(galactose) 및 자일로즈(xylose)에서는 생장이 저조하였다. 송이 균사체는 탄소원 중 전분에서 생장이 우수하였는데 이는 송이 균사체의 체외로 분비되는 α-amylase의 효소활성이 매우 높기 때문이라 하였는데(이창윤 등, 1998), 능이도 이와 유사할 것으로 추정된다.

4. 질소원 종류별 능이 균사체 성장

질소원은 세포질을 구성하고 있는 주요성분으로 필수적인 영양원이다. 일반적으로 버섯 균사체 배양에 적합한 질소원은 무기형태의 질소원보다 유기형태의 복합질소원이 적합한 것으로 보고되고 있으며, 균주 종류에 따라 적합한 질소원이 다르게 나타난다(김한경 등, 1987; 김한경 등, 1994; 우관희 등, 2003). 능이 균사체 배양에 적합한 복합질소원을 알기위하여 Figure 4와 같이 4종의 질소원을 처리하여 배양하였다. 그 결과 소이톤(5.3 g dw/L) > 펩톤(4.5 g dw/L) > 효모추출물(3.1 g dw/L) > 맥아추출물(1.8 g dw/L)의 순서로 나타났고, 능이 균사체 배양에 가장효과가 있는 복합질소원은 소이톤 이었다. 송이의 경우 적합한 질소원은 효모추출물인 것과(Min et al., 1998) 다르게 나타났다.

한편 Table 2는 4가지 아미노산 종류에 따른 능이 균사체의 배양 결과이다. 이숙희 등 (2003)은 능이버섯의 가수산화물로부터 아미노산 성분을 분석한 결과 알라닌(alanine), 글리이신(glycine) 및 글루탐산(glutamic acid)이

Table 2. Effect of amino acids on the mycelial growth in liquid culture of *Sarcodon aspratus*. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 15 days.

Amino acids	Cell biomass (g dw*/L) Mean ± SD**
Glutamic acid	0.23 ± 0.007
Alanine	3.15 ± 0.158
Serine	2.70 ± 0.122
Glycine	0.62 ± 0.045
Control***	1.35 ± 0.042

* : Dry weight; ** : Standard deviation of three replicates; *** : No addition of amino acid in basal medium for the *Sarcodon aspratus* liquid culture.

Table 3. Effect of inorganic nitrogen sources on the mycelial growth in liquid culture of *Sarcodon aspratus*. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 20 days.

Inorganic nitrogen source	Cell biomass (g dw*/L) Mean ± SD**
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.54 ± 0.230
Ammonium tartrate	2.74 ± 0.167
NaNO ₃	1.35 ± 0.045
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.33 ± 0.139
NH ₄ NO ₃	2.90 ± 0.121
KNO ₃	1.35 ± 0.012
Control***	1.35 ± 0.042

* : Dry weight; ** : Standard deviation of three replicates; *** : No addition of inorganic nitrogen in basal medium for the *Sarcodon aspratus* liquid culture.

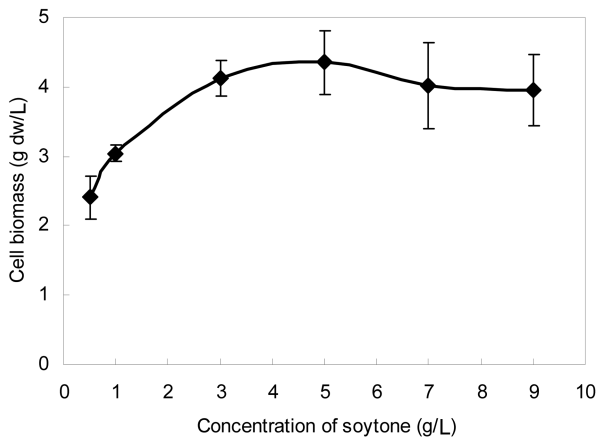


Figure 5. Effect of soytone concentration on the mycelial growth (g dry weight/L) in liquid culture of *Sarcodon aspratus*. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 15 days. Error bar indicates standard deviation of means.

다른 아미노산에 비해 높게 함유되었다고 하였다. 본 실험에서는 이들 아미노산을 대상으로 실시하였다. 능이 균사체 배양에 알라닌 및 세린(serine)은 균사체 성장에 도움을 주었으나 글루탐산 및 글라이신은 무처리보다 생장이 저조한 것으로 나타났다.

Table 3은 무기태 질소원의 종류에 따라 능이 균사체를 배양한 것이다. 질산암모늄(NH₄NO₃), 주석산암모늄(ammonium tartrate), 및 황산암모늄((NH₄)₂SO₄)에서 배양한 것이 질산칼륨(KNO₃) 및 질산나트륨(NaNO₃)에서 배양한 보다 균사체의 성장량이 높게 나타났다. 특히 질소 형태가 NO₃-N보다 NH₄-N에서 균사체 생장이 높았으며 NO₃-N에서는 무처리에 비해 차이가 없었다. 이러한 결과 능이 균사체는 NH₄-N 형태의 무기 질소원을 생장에 이용하는 것으로 판단된다.

능이 균사체 배양에 적합한 질소원은 소이톤인 것으로 나타나 능이 균사체 배양에 적절한 농도를 알아보고자 Figure 5에서와 같이 소이톤을 농도별로 처리하였다. 탄

Table 4. Effect of phosphate sources on the mycelial growth in liquid culture of *Sarcodon aspratus*. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 20 days.

Sources of PO ₄	Cell biomass (g dw*/L) Mean ± SD**
KH ₂ PO ₄	4.78 ± 0.324
K ₂ HPO ₄	4.78 ± 1.502
NaH ₂ PO ₄	4.74 ± 1.385
Na ₂ HPO ₄	4.55 ± 0.435
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.50 ± 0.021
(NH ₄)H ₂ PO ₄	5.29 ± 0.361
Control***	4.66 ± 0.534

* : Dry weight; ** : Standard deviation of three replicates; *** : No addition of inorganic phosphate in basal medium for the *Sarcodon aspratus* liquid culture.

Table 5. Effect of vitamin on the mycelial growth in liquid culture of *Sarcodon aspratus*. The mycelia were cultured in shake flask cultures at 25°C for 20 days.

Vitamin	Cell biomass (g dw*/L) Mean ± SD**
Ascorbic acid	4.51 ± 0.429
Nicotinic acid	5.71 ± 0.557
Riboflavin	4.00 ± 0.342
Pyridoxine	4.21 ± 0.053
Folic acid	4.58 ± 0.343
Biotin	4.66 ± 0.373
Thiamine	4.70 ± 0.701
Control***	4.50 ± 0.397

* : Dry weight; ** : Standard deviation of three replicates; *** : No addition of vitamin in basal medium for the *Sarcodon aspratus* liquid culture.

소원은 소이톤의 농도가 높아질수록 균사체 성장량도 증가하였으나 5 g/L 이상의 농도에서는 성장량이 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 배양액 리터당 탄소원을 글루코오스 15 g과 진분 10 g을 처리하였을 경우 적합한 소이톤 농도는 3~5 g/L인 것으로 추정되었다.

5. 무기인산염 및 비타민 영향

버섯 균사체 배양에 있어 무기인산염의 형태는 대표적인 것이 제일인산칼륨(KH₂PO₄)이다. 그러나 버섯 균주에 따라서는 적합한 무기인산염 형태는 다르게 나타나기도 한다. 따라서 능이 균사체 배양에 적합한 인산염의 형태를 알기위해 Table 4와 같이 6종류의 각 인산염을 1 mM로 처리하였다. 능이 균사체 배양에 첨가되는 인산염은 그 형태별에 따라 차이는 없는 것으로 나타났으나, 제일인산암모늄((NH₄)H₂PO₄)에서 다른 종류에 비해 다소 안정적으로 높게 생산되었다. 능이 균사체 배양에 적합한 인산염 형태는 제일인산암모늄인 것으로 추정된다.

Table 5는 능이 균사체 배양매지에 7종류의 비타민을 각 10 µg/L로 처리하여 성장량을 비교한 결과이다. 능이 균

사체는 니코틴산 처리에 의해 균사체량이 높게 증가하였고 다른 비타민에서는 생장에 영향을 주지 못하였다. 송이 균사체의 경우 피리독신 첨가가 성장량을 증가시켰다고 하였으나(Lee *et al.*, 1997), 능이의 경우는 니코틴산 처리에 의해 균사체량이 증가하여 균근균의 종류에 따라 생장에 필요한 비타민은 다른 것을 알 수 있다. 한편 비타민은 처리농도에 따라서도 영향이 있을 것으로 추정되어 이에 대한 연구도 필요할 것이다.

결론

능이 균사체의 액체배양 조건을 구명하고자 배지별 및 배양조건을 구명하고자 하였다. 능이 균사체 배양에 적합한 배양온도는 25°C, pH는 4인 것으로 나타났다. 능이 균사체는 외생근균류로서 적합한 액체배양조건은 송이 균사체 배양에서와 같이 유사한 배지조성을 나타내었다. 배양에 적합한 배지는 송이배양에 적합한 GYS배지로 탄소원은 전분, 말토오스 및 포도당이, 질소원은 유기복합 질소원으로 소이톤이 적합한 것으로 나타났다. 무기 질소원은 암모니아태 질소가, 무기인산염은 제일인산염이 적합한 것으로 나타났다. 비타민 종류로는 니코틴산처리가 좋은 것으로 나타났다. 배양기간도 송이균사체 액체배양에서와 같이 삼각플라스크에서 20일정도가 소요되었으며, 이상의 조건으로 능이 균사체를 배양하여 5.7 g dw/L을 생산할 수 있었다.

인용문헌

1. 김삼순, 김양섭. 1990. 한국산 버섯도감. 유품출판사. 391p.
2. 김진우, 문병식, 박영민, 유남희, 유인자, Nguyen Thi Chinh, 유익동, 김종평. 2005. 능이버섯으로부터 분리한 diketopiperazine계 화합물의 화학구조 및 항산화 활성. 한국응용생물 화학회지. 48: 93-97.
3. 김한경, 박용한, 차동렬, 정환채. 1987. 표고버섯 톱밥 인공재배에 관한 연구. 한국균학회지. 15(1): 42-47.
4. 김한경, 박정식, 차동렬, 김양섭, 문병주. 1994. 갯버섯 인공재배에 관한연구(1)-균사배양에 관하여-. 한국균학회지. 22(2): 145-152.
5. 김홍은, 구창덕, 김재수, 박재인, 신원섭, 신창섭. 2002. 참나무 임분 토양내 능이 외생균근 집단의 생태적 특징. 한국임학회지. 91: 457-464.
6. 문영희, 우은란, 박영준. 2005. 능이자실체의 생리활성. 생약학회지. 36: 305-310.
7. 박완희. 1986. 한국산 고등균류의 효소에 관한 연구(1). 한국균학회지. 14: 25-30.
8. 송재환, 이현숙, 황진국, 한정환, 노정근, 금동혁, 박기문. 2003. 능이버섯 추출물의 생리활성. 한국축산식품학회지. 23: 172-179.
9. 우관희. 2003. 화경버섯의 배양조건에 따른 균사생장 및

- 섬유질분해효소 활성에 관한 연구. 한국균학회지. 31: 14-21.
10. 은재순, 양재현, 조덕희, 이태규. 1988. 한국산 고등균류에 관한 연구 제1보: 능이버섯의 단백질 분해 효소활성. 한국약제학회지. 18(3): 125-131.
 11. 이상희, 김재수, 김홍은, 구창덕, 박재인, 신창섭, 신원섭. 2005. 토양수분과 기상인자가 참나무림내 능이의 발생에 미치는 영향. 한국임학회지. 94: 370-376.
 12. 이숙희, 김남우, 신승렬. 2003. 능이버섯 영양성분에 관한 연구. Korean Journal of Food Preservation. 10: 65-69.
 13. 이위영, 안진권, 권오웅, 가강현, 권영진. 2002. 풍선형 공기부양식 생물반응기를 이용한 송이(*Tricholoma matsutake*) 균사의 부유배양. 한국임학회지. 91: 260-267.
 14. 이창윤, 홍운표, 정면준, 한영환. 1998. 송이균사(*Tricholoma matsutake*) 배양액의 세포의 효소 활성. 한국균학회지. 26: 496-501.
 15. 이태규. 1986. 능이(*Sarcodon aspratus* (Berk.) S.Ito)중 단백질 가수분해 효소의 정제 및 성질에 관하여. 한국영양 식량 학회지. 15(3): 276-285.
 16. 조남석, 조희연. 2004. 능이 자실체의 Protease 활성. 목재공학. 32: 58-65.
 17. 조희연, 정선화, 조남석. 2004. 능이버섯 및 Protease효소의 첨가가 연육에 미치는 영향. 목재공학. 32: 39-44.
 18. Hwang, H.J., Kim S.W., Choi J.W. and Yun J.W. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. Enzyme and Microbial Technology. 33: 309-319.
 19. Kim, H.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, M.K., Mahmoud, Y.A.G., Choi, J.W. and Yun, J.W. 2006. Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. Journal of Microbial and Biotechnology. 16(8): 1240-1247.
 20. Lee, C.Y., Hong, O.P., Jung, M.J., and Han, Y.H. 1997. Effect of carbon sources and vitamins on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. The Korean Journal of Mycology. 25(3): 226-232.
 21. Lee, J.S., Noh, E.W., Choi, Y.I., Lee, W.Y., and Kah, K.H. 2004. Development of nuclear ribosomal ITS DNA maker for *Tricholoma matsutake*. Journal of Korean Forestry Society. 93: 121-127.
 22. Min, E.G., Chung, K.K., and Han, Y.H. 1998. Effect of complex nitrogen source on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. The Korean Journal of Mycology. 26(3): 361-364.
 23. Shiio, T., Okunishi, M. and Okumura, S. 1974. Fundamental studies on the large-scale cultivation of edible fungi. Mushroom Science. 9: 799-808.
 24. Sung, J.M., Moon, H.W., and Park, D.S. 1999. Growth condition of liquid culture by *Pleurotus ostreatus*. The Korean Journal of Mycology. 27: 1-9.