

액체배양 버들송이 균사체의 칼슘흡수 및 생육특성

박신* · 공지원 · 이경석

대구대학교 생명환경학부

Calcium Absorption and Growth Characteristics of *Agrocybe cylindracea* Mycelia in Submerged Culture

Shin Park*, Ji-Won Gong, and Kyoung-Seok Lee

Division of Life and Environmental Science, Daegu University

Abstract The present study examined the effects of different calcium (Ca) sources and concentrations on the growth and Ca absorption of *Agrocybe cylindracea* mycelia grown in submerged cultures. The dry weights of the mycelia were not significantly different (significance level of 5%) according to the type of Ca added, and increased with increasing Ca concentration until 500 mg/L, and then decreased at concentrations of 1000 mg/L or greater. The Ca contents of groups were significantly different according to the various concentrations of the Ca source, in which the Ca content of the control group cultured without added Ca was 198.3 mg/kg, and in the treatment groups, Ca content increased to a minimum of 273.7 mg/kg (1.4 times) and a maximum of 67246.0 mg/kg (339.1 times) the Ca contents of the groups generally increased with increasing Ca concentration. According to the number of culture days, growth rates were highest during days 8 through 12, and remained relatively high until day 16. In addition, Ca contents per unit dry weight were higher in young mycelia with a shorter culture period than in mature mycelia with a longer culture period. According to pH, the most active growth and highest Ca content occurred in MCM liquid medium at pH 7.0. In conclusion, in order to produce *Agrocybe cylindracea* mycelia with high Ca content, it is considered most efficient to culture them in MCM liquid medium without a pH adjustment and containing 1,000 mg/L of Ca-lactate, which is commonly used as a Ca additive in food, as well as to use mycelia between 12-16 days of culturing.

Key words: *Agrocybe cylindracea*, calcium, mineral

서 론

버섯은 예로부터 동양에서 주요 한약재로 취급되어 왔으나, 약리작용에 대한 체계적인 연구는 1970년대 일본, 한국, 중국을 중심으로 버섯의 항균, 항진균, 항암, 항산화 작용에 관한 연구보고가 발표되면서 활성화되었다(1-3). 이러한 연구를 기반으로 액체배양 균사체로부터 유용물질을 대량 생산하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(4,5). 액체배양은 단시간 내 균사체를 대량으로 생산할 수 있으며, 특정 유용성분을 저비용으로 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다. 버들송이는 주름버섯목 소똥버섯과에 속하는 단실담자균으로서 자실체는 맛과 향미가 좋을 뿐 아니라 뛰어난 조직감을 가지고 있어, 식용버섯으로서 우수한 특성을 가지고 있다. 버들송이에 관한 연구로는 배양조건 최적화 및 인공재배시험(6,7), 액체배양 및 액체중균배양(8,9), 항산화작용(10-14), 단백질 당체 분리정제(15), 면역강화작용(16) 등이 있다. 칼슘은 인체내 가장 많이 존재하는 필수 무기질이며 성인의 경우 몸에 칼슘을

약 1.2kg 정도 가지고 있는데 이 미네랄 칼슘의 99%가 뼈에 있고 나머지 1%는 신경계에 중요한 역할을 한다. 칼슘은 또한 식물 세포벽의 구성성분으로 펙틴과 결합하여 펙틴산 칼슘을 형성함으로써 세포벽을 강화시킨다(17,18). 인간에게 칼슘과 관련된 대사반응으로는 근육의 수축과 이완, 혈액응고 작용, 효소의 활성화, 막을 통한 물질이동, 신경흥분의 조절작용 등이 있다(19,20). 최근 칼슘의 부족으로 인한 골다공증을 비롯한 각종 결핍증으로 인해 칼슘의 섭취가 강조되고 있으며 칼슘의 유용성과 영양효과를 높이기 위해 칼슘 함량이 높은 식용작물의 재배와 기호식품들이 만들어 지고 있다(21). 식용버섯의 경우도 고기능화/고급화/브랜드화를 위한 기술 개발이 이루어지고 있으며, 일부 버섯에서는 고칼슘화가 시도되고 있으나 아직까지 이에 관한 체계적인 연구는 보고된 적이 없다. 본 연구는 칼슘 함량이 높은 버들송이를 생산하려는 시도로서 버들송이 균사체의 생육에 미치는 칼슘의 영향을 조사하였으며, 버들송이 균사체의 칼슘 흡수에 관한 연구를 수행하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 버들송이 균주는 영남대학교 생물공학실험실에 보관 중인 *Agrocybe cylindracea*(일본 야생 균주로부터 분리)를 분양받아 사용하였다. 보존용 배지는 potato dextrose agar(PDA)

*Corresponding author: Shin Park, Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-714, Korea

Tel: 82-53-850-6751

Fax: 82-53-850-6759

E-mail: spark@daegu.ac.kr

Received July 28, 2008; revised August 1, 2008;

accepted August 4, 2008

를 사용하였으며, 배양용 배지로는 mushroom complete medium (MCM)을 사용하였다. MCM의 조성은 glucose 20.0, peptone 2.0, yeast extract 2.0, KH_2PO_4 0.46, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L이며, 배지의 pH는 6.0으로 조정하였다. 칼슘원으로 CaCO_3 , CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaHPO_4 , Ca-acetate, Ca-lactate, Ca-citrate는 Samchun Pure Chemical Co.(Pyeongtaek, Korea), Ca-EDTA는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다.

중균 접종

평판배지에서 7일간 배양된 균사체의 가장자리를 5 mm cork borer로 3개 취하여, MCM 액체배지 100 mL에 접종하였으며, 28°C에서 150 rpm으로 7일간 진탕배양 후 균질화하여 중균으로 사용하였다. 균사체 배양을 위해 1%의 중균을 접종하였다.

칼슘원의 용해도

각 칼슘원의 용해도를 증류수와 MCM 배지에서 각각 측정하였다(22). 증류수 및 MCM 배지 15 mL가 담긴 원심분리관에 칼슘원 시료를 침전이 생길 정도로 충분히 넣고 25°C에서 30분 동안 용해시킨 후 원심분리(2,000×g, 15 min)하였다. 이때 불용성의 잔사를 건조시켜 무게를 측정하고, 이것을 시료 무게로부터 뺀 값으로 용해도를 구하여 백분율로 나타내었다.

균사체 배양

버들송이 균사체의 생육과 칼슘 흡수에 미치는 칼슘원의 영향을 조사하기 위해 칼슘원으로 CaCO_3 , CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaHPO_4 , Ca-acetate, Ca-citrate, Ca-lactate, Ca-EDTA를 사용하였으며, 칼슘원의 농도는 화합물 기준으로 각각 0, 100, 500, 1,000, 10,000 mg/L 첨가하였다. 배양을 위해 MCM 액체배지 200 mL에 각 칼슘원을 농도별로 첨가하여 배지를 조제하였으며, 28°C에서 150 rpm으로 3주간 진탕배양한 후 균사체의 건물량과 Ca 함량을 측정하였다. 배양일수에 따른 균사체의 배양 시험은 MCM 액체배지 200 mL에 칼슘원으로 Ca-lactate를 1,000 mg/L 첨가하였으며, 배양일수 4, 8, 12, 16, 20일째 균사체를 회수하여 건물량과 Ca 함량을 측정하였다. 배지의 pH에 따른 균사체 배양 시험도 MCM 액체배지 200 mL에 칼슘원으로 Ca-lactate를 1,000 mg/L 첨가하였으며, 배지의 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 조정하여 배양 3주 후 균사체의 건물량과 Ca 함량을 측정하였다.

건물량 측정

균사체의 생육 정도를 확인하기 위해 건물량을 측정하였다. 건물량은 일정기간 배양한 버들송이 균사체의 배양액을 여지(Whatman No. 4)를 사용하여 증류수로 3회 세척하면서 감압여과하고, 80°C에서 향량이 될 때까지 건조하여 측정하였다.

Ca 분석

버들송이 균사체의 Ca 함량은 Kim 등(23)과 Lee 등(24)의 방법을 응용하여 분석하였다. 시료 1-2 g에 혼합분해액 ($\text{HNO}_3\text{:HClO}_4\text{:H}_2\text{SO}_4=10\text{:4:1}$) 25 mL를 가한 후 1일간 방치하고 hot plate에서 분해하였다. Hot plate는 최초 100°C에서 2시간을 두고 서서히 200°C까지 열을 가하고 산화가 완전히 끝나면 온도를 300°C까지 올린 후 30분간 가열하였다. 분해액은 여지(Whatman No. 2)로 여과한 후 50 mL로 정용하였다. 다량원소 분석은 10배 및 100배 희석한 여과액을 사용하고 미량원소는 여과된 원액을 그대로 사용하여 ICP-ASE(Varian Inc., Mulgrave, Victoria, Australia)로 Ca를 정량하였다.

Table 1. Solubility of calcium compounds in distilled water and MCM broth

Calcium compound	Solubility (g/100 mL)	
	Distilled water	MCM broth
CaCO_3	0.60	0.40
CaCl_2	72.10	71.60
CaHPO_4	0.04	0.04
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	126.10	120.70
Ca-acetate	36.10	30.90
Ca-citrate	0.40	0.30
Ca-lactate	6.20	7.70
Ca-EDTA	112.40	119.30

결과 및 고찰

칼슘원의 용해도 비교

칼슘 용해도는 칼슘의 체내 흡수율에 영향을 미치는 중요한 요소이다. 따라서 버들송이 균사체의 생육과 칼슘 흡수에 미치는 칼슘원의 영향을 조사하기 위해 증류수 및 MCM 배지에서의 칼슘화합물의 용해도를 측정하였다. 그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 와 Ca-EDTA의 용해도가 각각 126.10, 112.40 g/100 mL로 가장 높았다. CaCO_3 , Ca-citrate, CaHPO_4 의 용해도는 낮은 수준으로서 각각 0.60, 0.40, 0.04 g/100 mL를 나타내었다. 증류수와 MCM 배지에서의 용해도 차이는 크지 않았으나 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 와 Ca-acetate는 증류수에서, Ca-lactate와 Ca-EDTA는 MCM 배지에서 용해도가 높았는데, 각각의 칼슘화합물과 배지 성분의 화학 반응의 차에 의한 것으로 추측된다.

칼슘원에 따른 균사체의 생육 특성

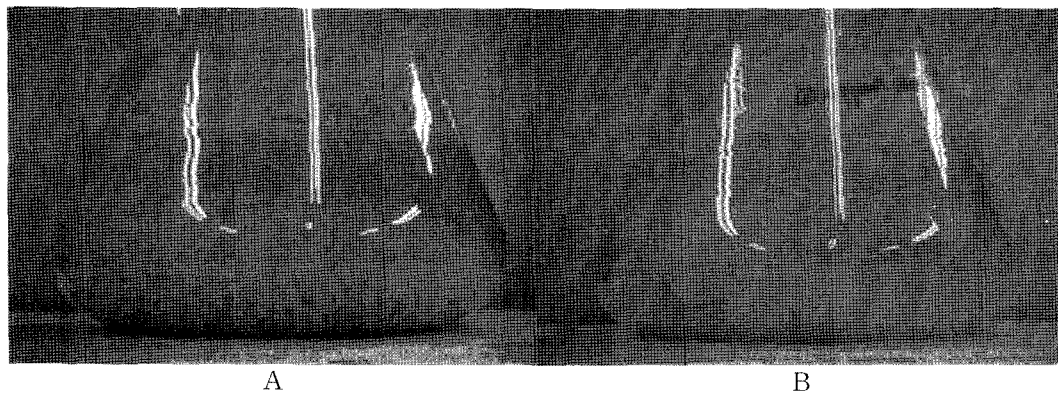
칼슘원의 종류 및 농도에 따른 액체배양 버들송이 균사체의 생육 특성을 조사하기 위해 균사체의 건물량과 pellet 형태를 조사하였다. Table 2는 칼슘원의 종류 및 농도별 균사체의 생육 정도를 건물량으로 나타낸 것인데 칼슘원의 종류에 따른 버들송이 균사체의 건물량은 유의수준 5%에서 유의한 결과를 보이지 않았다. 하지만 균사체의 pellet 형태는 칼슘화합물의 용해도에 따라 다른 양상을 보였는데, CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Ca-acetate, Ca-lactate, Ca-EDTA 등 용해도가 높은 칼슘원의 경우 3주간의 배양기간 동안 pellet의 크기가 균일하게 2 mm 정도의 크기로 자랐으나, CaCO_3 , CaHPO_4 , Ca-citrate를 처리한 경우에는 균사체의 pellet 크기가 2-10 mm로 다양하고 불균일하였다(Fig. 1). 이는 이들 화합물의 경우 용해도가 낮아 칼슘화합물이 배지 내에서 침전 형태로 존재함으로써 균사체와 불균일한 혼합체를 이룬 결과에서 기인한 것으로 판단된다. 칼슘원의 농도에 따른 균사체 생육을 보면 농도 500 mg/L까지는 건물량이 대체로 증가하는 경향이었으나 1,000 mg/L 이상에서는 건물량이 감소하는 경향을 보였다. Ca-lactate의 경우 1,000 mg/L까지 건물량이 증가하는 결과가 나왔지만 Ca-lactate를 제외하고는 균사체 생육에 있어서 칼슘화합물의 최적 농도는 500 mg/L 미만이며 오히려 1,000 mg/L 이상의 고농도 칼슘은 MCM 배지 상에서 균사체 생육을 저해하는 요인으로 나타났다. 특히 10,000 mg/L에서는 균사체 생육이 저조하였는데, Ca-acetate와 Ca-EDTA의 경우 거의 생육하지 않았다. 칼슘원의 농도에 따른 균사체의 pellet 형태를 조사하기 위해 3주간 배양된 균사체의 pellet을 절반으로 잘라 pellet 내부의 상태를 확인해 본 결과, 1,000 mg/L 이하에서 자란 pellet의 내부는 대부분 빈 공간

Table 2. Dry weight of *Agrocybe cylindracea* mycelia grown in MCM broth with various concentrations of calcium compounds (Unit: mg/mL)

Calcium compounds	Dry weight (g/200 mL)				
	0	100	500	1000	10000
CaCO ₃	1.60±0.13	1.88±0.16	1.67±0.15	1.26±0.17	1.10±0.66
CaCl ₂	1.60±0.13	1.89±0.11	2.01±0.05	1.19±0.27	1.16±0.13
Ca(NO ₃) ₂	1.60±0.13	2.01±0.04	1.96±0.30	1.54±0.23	0.82±0.10
CaHPO ₄	1.60±0.13	2.01±0.09	1.98±0.02	1.59±0.15	1.09±0.06
Ca-acetate	1.60±0.13	1.74±0.35	2.01±0.03	1.76±0.12	nd ¹⁾
Ca-citrate	1.60±0.13	1.98±0.11	2.23±0.07	1.80±0.09	1.27±0.27
Ca-lactate	1.60±0.13	1.82±0.16	1.99±0.23	2.22±0.15	1.50±0.21
Ca-EDTA	1.60±0.13	1.75±0.10	2.17±0.09	1.41±0.01	0.18±0.02

Values represent mean±standard error of double replications.

¹⁾Not determined.

**Fig. 1. Comparison of two pellet types.** A, CaCl₂, Ca(NO₃)₂, Ca-acetate, Ca-lactate, and Ca-EDTA; B, CaCO₃, CaHPO₄, and Ca-citrate.

이 없이 탄력적이며 완전한 형태를 나타내었으나, 10,000 mg/L의 고농도 칼슘화합물에서 자란 pellet의 내부는 빈 공간으로 탄력이 없었으며 얇은 막의 형태로 크기만 비대한 비정상적인 형태를 나타내었다.

칼슘원에 따른 균사체의 Ca 함량

칼슘원의 종류 및 농도에 따른 균사체의 Ca 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 칼슘원을 첨가하지 않고 배양한 대조구 균

사체의 Ca 함량은 198.3 mg/kg이었는데 비해 칼슘을 첨가하고 배양한 경우 최소 273.7 mg/kg(1.4배)에서 최대 67,246.0 mg/kg(339.1 배)까지 증가하였다. 또한 칼슘원의 종류와 농도에 따라 균사체의 Ca 함량은 큰 차이를 보였는데 대체적으로 칼슘원의 농도가 높아짐에 따라 균사체의 Ca 함량도 높아지는 결과가 나왔다. 다만 Ca-acetate의 경우 1,000 mg/L 이상에서는 오히려 감소하였다. Ca(NO₃)₂와 Ca-EDTA의 경우 10,000 mg/L에서 Ca 함량이 급격히 증가하였는데 특이적이라고 할 수 있었다. 이는 앞서 실험에서

Table 3. Ca content of *Agrocybe cylindracea* mycelia grown in MCM broth with various concentrations of calcium compounds (Unit: mg/mL)

Calcium compounds	Ca content (mg/kg)				
	0	100	500	1000	10000
CaCO ₃	198.3	2808.7	9245.7	18716.1	20330.2
CaCl ₂	198.3	2681.9	6890.3	9468.4	12162.3
Ca(NO ₃) ₂	198.3	1112.4	1454.0	4127.6	67246.0
CaHPO ₄	198.3	1366.6	5885.3	12175.4	21961.8
Ca-acetate	198.3	845.5	8203.3	5872.3	nd ¹⁾
Ca-citrate	198.3	273.7	1511.0	2564.7	7820.3
Ca-lactate	198.3	455.2	3703.8	8580.5	7272.8
Ca-EDTA	198.3	618.6	728.7	5470.7	47221.9

Agrocybe cylindracea was cultured at 28°C for 3 weeks.

¹⁾Not determined.

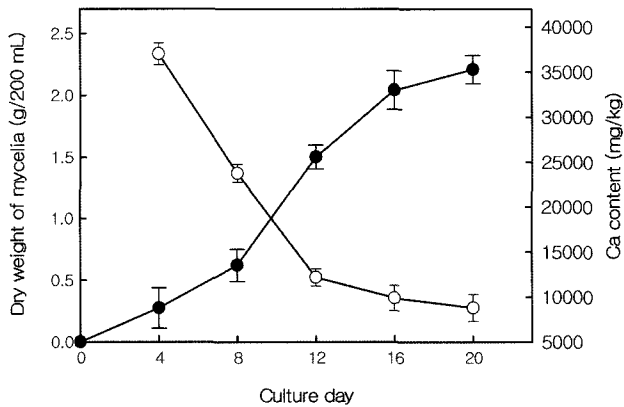


Fig. 2. Effect of culture days on dry weight and Ca content of *Agrocybe cylindracea* mycelia grown in MCM broth with Ca-lactate. ●, Dry weight of mycelia; ○, Ca content. Values are mean \pm standard error (n=3).

Ca(NO₃)₂와 Ca-EDTA의 경우 용해도가 다른 칼슘화합물에 비해 훨씬 높았으며(Table 1), 균사체의 건물량은 10,000 mg/L에서 고농도의 칼슘화합물이 용해되어 있음으로 인해 오히려 감소하였는데(Table 2), 이와 관련이 있을 것으로 추측된다. 특히 Ca-EDTA의 경우 칼슘이 EDTA와 착염을 형성함으로써 높은 용해도와 높은 흡수율을 보인 것으로 사료되며 향후 이에 대한 좀더 깊이있는 연구가 요구된다.

배양일수에 따른 균사체의 생육 및 Ca 함량

체내에서의 높은 흡수율로 인해 칼슘보충제로 많이 쓰이는 Ca-lactate는 인체에 무해하며 수용성의 유기칼슘으로 최근에 들면서 오렌지쥬스, 요구르트, 빵 등 각종 기호식품에 첨가되고 있다. 또한 앞에서의 실험에서 살펴본 바, Ca-lactate는 잘 용해되며 균사체의 생육이 1,000 mg/L의 농도까지 잘 자라는 면을 보였다. 따라서 칼슘원으로 Ca-lactate를 1,000 mg/L 첨가한 MCM 배지에서 액체배양하면서 배양일수 4, 8, 12, 16, 20일째 균사체를 회수하여 균사체의 건물량과 Ca 함량을 측정하였다. 균사체의 건물량은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 배양 4, 8, 12, 16, 20일째 각각 0.2755, 0.6231, 1.5018, 2.0433, 2.2114 g/200 mL로 나타났다. 이것을 그래프의 기울기인 생육속도로 환산한 결과 0-4일 사이의 생육속도는 0.069 g/day, 4-8일은 0.087 g/day, 8-12일은 0.220 g/day, 12-16일은 0.135 g/day, 16-20일은 0.042 g/day로 각각 나타나 배양 8-12일 사이 균사체의 생육속도가 가장 높았으며 16일차까지도 비교적 높은 증가율을 보였다. 16일 이후로는 증가율이 급속히 감소하였다. 따라서 고칼슘의 버들송이 균사체 생산에 초점을 맞추어 본다면 12-16일 사이의 균사체를 이용하는 것이 가장 효율적이라고 사료된다. 배양일수별 균사체의 Ca 함량은 37005.4, 23757.0, 12175.0, 9891.6, 8798.8 mg/kg으로 배양기간이 짧은 어린균사체의 경우 배양기간이 긴 성숙된 균사체에 비해 단위 건물량 당 Ca 함량이 높았다. 이 결과를 균사체의 총 Ca 흡수량으로 환산해 보면 10.2, 14.8, 18.3, 20.2, 19.5 mg으로 16일차까지는 증가추세를 보이다가 이후에는 큰 변화가 없었다.

배지의 pH에 따른 균사체의 생육 및 Ca 함량

배지의 pH에 따른 액체배양 버들송이 균사체의 건물량 및 Ca 함량을 조사하기 위해 칼슘원으로 Ca-lactate 1000 mg/L를 첨가한 MCM 배지에 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 조정하여 3주간 액체배

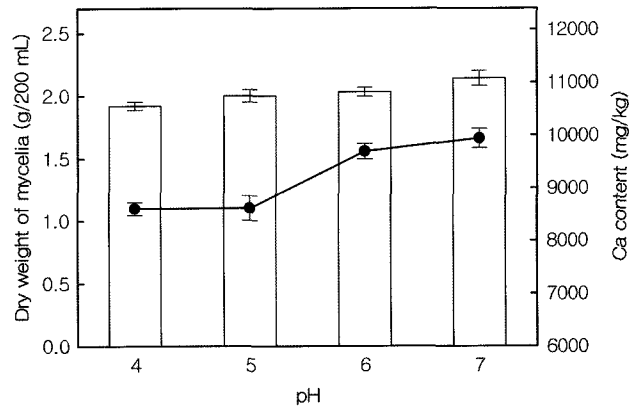


Fig. 3. Effect of pH on dry weight and Ca content of *Agrocybe cylindracea* mycelia grown in MCM broth with Ca-lactate. ●, Ca content. Values are mean \pm standard error (n=3).

양한 후 균사체의 건물량과 Ca 함량을 측정하였다. pH에 따른 건물량은 pH가 4.0, 5.0, 6.0, 7.0일때 각각 1.895 \pm 0.033, 2.045 \pm 0.050, 2.040 \pm 0.035, 2.124 \pm 0.061였으며, 분산분석 결과 p 값이 0.057로 나타났다. 따라서 유의수준 5%에서는 pH에 따른 건물량이 유의하다고 할 수 없었으나, 유의수준 10%에서는 유의하다고 할 수 있었다. pH에 따른 Ca 함량은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH가 7.0일때 가장 높았는데 MCM 액체 배지 자체의 pH가 7.0-7.2 이므로 MCM 배지 자체의 pH를 조정하지 않고 그대로 배양하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

요 약

액체배양 버들송이 균사체의 생육과 칼슘 흡수에 미치는 칼슘원의 영향을 조사하였다. 칼슘원의 종류에 따른 균사체의 건물량은 유의수준 5%에서 유의하지 않았으며, 칼슘원의 농도에 따른 균사체의 건물량은 농도가 500 mg/L까지는 대체로 증가하는 경향이었으나 1,000 mg/L 이상에서는 감소하는 경향을 보였다. 균사체의 칼슘 함량은 칼슘원의 종류와 농도에 따라 큰 차이를 보였으며, 칼슘원을 첨가하지 않고 배양한 대조구의 Ca 함량은 198.3 mg/kg이었는데 비해 칼슘을 첨가하고 배양한 경우 최소 273.7 mg/kg(1.4배)에서 최대 67,246.0 mg/kg(339.1배)까지 증가하였다. 칼슘원의 농도에 따른 균사체의 Ca 함량은 칼슘원의 농도가 증가함에 따라 균사체의 Ca 함량도 증가하였다. 배양일수에 따른 균사체의 생육은 배양 8-12일 사이 균사체의 생육속도가 가장 높았으며 16일차까지도 비교적 높은 증가율을 보였다. 배양일수에 따른 균사체의 Ca 함량은 배양기간이 짧은 어린 균사체의 경우 배양기간이 긴 성숙된 균사체에 비해 단위 건물량 당 Ca 함량이 높았다. pH에 따라서는 pH 7.0의 MCM 액체배지에서 생육이 가장 활발하였으며 Ca 함량도 가장 높았다. 결론적으로 칼슘 함량이 높은 버들송이 균사체를 생산하기 위해서 체내 흡수율이 좋고 최근 식품의 칼슘첨가제로 많이 이용되는 Ca-lactate 1,000 mg/L를 첨가한 MCM 액체배지에서 pH 조정없이 배양하여 12-16일 차의 균사체를 이용하는 것이 가장 효율적이라고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의한 논문이며, 이에 감사드립니다.

문헌

1. Chihara G, Himuri J, Maeda YY, Arai Y, Fukuoka F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially, lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. *Cancer Res.* 30: 2776-2781 (1970)
2. Mizuno T. Bioactive biomolecules and mushrooms: Food function and medicinal effects of mushroom fungi. *Food Rev. Int.* 11: 7-21 (1995)
3. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulatory polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biot.* 60: 258-274 (2002)
4. Shiio T, Okunishi M, Okumura S. Fundamental studies on the large scale cultivation of edible fungi. *Mushroom Sci.* 9: 799-808 (1974)
5. Song CH, Jeon YJ, Yang BK, Ra KS, Sung JM. The anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *J. Microbiol.* 8: 536-539 (1988)
6. Kim HK, Park JS, Kim YS, Park YH. Studies on the artificial cultivation of *Agrocybe aegerita* (Brig.) using sawdust substrate. *Korean J. Mycol.* 17: 124-131 (1989)
7. Lee HD, Kim YG, Kim HG, Han GH, Moon CS, Hur IB. Bottle cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe aegerita* using artificial by-product. *Korean J. Mycol.* 26: 47-50 (1998)
8. Kim HO, Lim JM, Joo JH, Kim SW, Hwang HJ, Choi JW, Yun JW. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technol.* 96: 1175-1182 (2005)
9. Cheong JC, Hong IP, Jang KY, Park JS. Culture condition and inoculum volume of liquid spawn on the bottled cultivation of *Agrocybe cylindracea*. *Korean J. Mycol.* 31: 94-97 (2003)
10. Lee HW, Lee DW, Ha HC, Jung IC, Lee JS. Antioxidant activities of the mycelium and culture broth of *Phellinus igniarius* and *Agrocybe cylindracea*. *Korean J. Mycol.* 30: 37-43 (2002)
11. Tsai SY, Huang SJ, Mau JL. Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Food Chem.* 98: 670-677 (2006)
12. Tsai SY, Tsai HL, Mau JL. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 40: 1392-1402 (2007)
13. Huang SJ, Tsai SY, Mau JL. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 39: 378-386 (2006)
14. Lee IK, Yun BS, Yoo ID. A nucleoside with lipid peroxidation inhibitory activity from *Agrocybe cylindracea*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 558-561 (1998)
15. Ha HC, Park S, Park KS, Lee CW, Jung IC, Kim SH, Kwon YI, Lee JS. Isolation and purification of protein bound polysaccharides from the sawdust mycelia of *Agrocybe cylindracea*. *Korean J. Mycol.* 23: 121-128 (1995)
16. Yoshida I, Kiho T, Usai S, Sakushima M, Ukai S. Polysaccharides in fungi. Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (13)- α -D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 114-121 (1996)
17. Chardonnet CO, Sams CE, Conway WS. Calcium effect on the mycelial cell walls of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 52: 967-973 (1999)
18. Moon BW, Kang IK, Lee YC, Nam KW, Choi JS. Effect of tree-spray of liquid calcium compound on the change in cell wall components, cell wall hydrolase, and cell wall structure during cold storage of non-astringent persimmon fruits. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 43: 443-446 (2002)
19. Smith KT. Calcium and trace mineral interactions. *Cereal Food World* 33: 776-777 (1988)
20. Allen LH. Calcium bioavailability and absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 738-808 (1982)
21. Jeong YJ, Kim JN, Seo JH, Kim KY. Effect of liquefied calcium supplement in bone mineral density in middle-aged women. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 995-999 (2004)
22. Bae TJ, Kang DS. Processing of powdered seasoning material from sea tangle. *Korean J. Food Nutr.* 13: 521-528 (2000)
23. Kim ST, Lee JU, Choi BS, Lee BJ. Determination of germanium in ginseng radix by hydride generation-inductively coupled plasma spectrometry. *Anal. Sci.* 1: 203-209 (1988)
24. Lee ST, Lee YH, Lee HJ, Jo JS, Heo JS. Germanium contents of soil and crops in Gyeongnam province. *Korean J. Environ. Agric.* 24: 34-39 (2005)