

공기부양식 생물반응기의 형태별 송이균사의 생장특성 비교

이위영* · 안진권 · 가강현¹ · 권영진

임업연구원 생물공학과, ¹임업연구원 화학미생물과

Comparison of Growth Characteristics of *Tricholoma matsutake* Mycelium Among the Types of Air Bubble Bioreactor

Wi Young Lee*, Jin Kwon Ahn, Kang Hyeon Ka¹ and Young Jin Kwon

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

¹Div. of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

(Received May 20, 2003)

ABSTRACT: In order to select suitable bioreactor type inhibiting cell stress during submerged culture of *Tricholoma matsutake* mycelium, the growth characteristics and ergosterol contents were investigated using the external-loop type of air-lift bioreactor (ETAB), balloon type of air bubble bioreactor (BTBB) and column type of air bubble bioreactor (CTBB). Dry weights of the *T. matsutake* in the BTBB, ETAB and CTBB were 12 g, 11.4 g, and 9.5 g per 1 liter, respectively. BTBB, ETAB and CTBB reached stagnant phases 16, 20, and 24 days after cultivation, respectively. The BTBB was more suitable for liquid culture of *T. matsutake* mycelium compared to other bioreactors owing to much mycelia product and short culture period. The ergosterol contents produced by the mycelium in the bioreactors were in sequence of BTBB, CTBB, and ETAB at every growth phase. BTBB might affect the mycelium on producing the smallest size of pellets. BTBB and CTBB got the mycelium precipitated and coagulated under operation of bioreactor sparger, whereas ETAB shown no effect of above phenomenon. A renovated bioreactor combined between a balloon shape of BTBB and an external-loop of ETAB was developed to enhance the efficiency of culture technique.

KEYWORDS: Air bubble bioreactor, Balloon type air bubble bioreactor, Ergosterol, Mycelial culture, *Tricholoma matsutake*

송이 균사체의 생산연구는 송이버섯의 생산성 증진을 위한 연구의 일환으로 주로 진행되어 왔으나, 담자균류의 자실체 및 균사체는 다양한 생리활성 물질은 함유하고 있음이 알려져 있으며(이 등, 1996; 박·이, 1998; 이 등, 1999), 송이 균사체에서도 항종양기능 등이 보고되어(Liu *et al.*, 2001), 최근에는 송이 균사체 자체를 이용하기 위한 대량생산 연구가 진행되고 있다.

생물반응기를 이용한 담자균류의 균사체 생산은 기포통기식의 생물반응기가 보편적으로 많이 이용되고 있다(Kawagoe, 1996; Lee *et al.*, 1998). 이는 낮은 전단력으로 균사체 배양에 적합하다는 것과 이러한 형태의 생물반응기는 형태가 단순하여 제작이 용이하며, 오염율이 적고 경제성이 높다는 장점도 갖고 있기 때문이다.

송이 균사체 배양은 Kawagoe 등(1999)에 의하면 표준 칼럼형 공기부양식 생물반응기와 기포통기식 생물반응기를 이용하여 송이 균사체를 배양한 바 이러한 공기부양식이 송이균사체 배양에 적합함을 보고하였으며, 이 등

(2002)은 풍선형 공기부양식 생물반응기에서 송이균사체의 생산효율이 $0.6 \text{ g(d.w. day}^{-1} \cdot \text{l}^{-1})$ 으로 우수함을 보고하였다.

공기부양식 생물반응기는 균사체의 벽면 부착 생장이 적고, 배양액의 유동 및 산소공급이 비교적 용이하여 세포가 파괴되기 쉬운 배양체에 적합한 것으로 보고되어 있으며(Paek *et al.*, 2001; van't Riet and Tramper, 1991), 형태에 따라 칼럼형 및 풍선형의 air bubble 형태와 internal-loop 형 및 external-loop 형의 기포통기식 등으로 구분하고 있는 바 특정 균사체 배양을 위해서는 최적 배양환경 조건을 만족하는 배양기를 선택해야 한다.

특히 송이 균사체는 낮은 공기 공급을 조건에서 생장이 양호하며 공기 공급율이 높아지면 생장이 저조해지는데(이 등, 2002) 이는 배양액의 점도가 낮아 과도한 공기공급에 의한 유체의 흐름 및 기포에 의해 세포가 손상을 입게 되는 것도 한 원인인 것으로 추정할 수 있다. 따라서 유체의 흐름을 유지하여 공기의 고른 분산과 영겨 자라는 현상을 방지하고, 세포에 손상을 입히지 않는 최소의 공기공급을 유지하는 적절한 생물반응기 형태가 요구된다.

*Corresponding author <E-mail: lwy20@foa.go.kr>

본 시험은 공기부양식 형태의 생물반응기로서 풍선형 (Son and Lee, 1997) 및 칼럼형과 external-loop 기포통기식의 생물반응기에서 송이 균사체를 심부배양하여, 반응기 형태별 송이 균사체의 성장특성을 비교하고, 각 반응기에서 배양과정 중의 세포에 주는 스트레스 정도를 유추하기 위하여 활력이 있는 균사체에서 다량 존재하는 에르고스테롤의 함량 변화를 측정하여 균사체 활성도를 비교함으로써 송이 균사체 배양에 적합한 생물반응기를 선발하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 균주 조제

시험에 사용된 송이 균주는 산림청 임업연구원에서 송이 자실체로부터 균사를 분리하여 고체배지에서 배양하고 있는 KFRI 438을 사용하였다.

송이균사는 고체배지에 배양중인 균사체를 500 ml 삼각 플라스크에 잘게 썰어 넣어 진탕기에서 120 rpm으로 1개월간 액체배양을 실시하였다. 액체배양된 균사체를 호모게나이저(Ingenieurburo, X1030 D)로 13,000 rpm에서 8초간 분쇄, 균질화하여 생물반응기 접종용 시료로 사용하였다.

생물반응기 형태 및 균사배양 방법

생물반응기를 이용하여 송이균사를 배양하기 위해 사용한 생물반응기는 모두 전체 용량이 3 l인 용기를 사용하였다. 풍선형 공기부양식 생물반응기는 자체 제작한 풍선형의 공기부양식 생물반응기(Son and Lee, 1997)를 사용하였고, 칼럼형 공기부양식 생물반응기는 원통형으로서 지름 75 mm, 높이 350 mm인 것을, external-loop형의 기포통기식 생물반응기는 상승 및 하강관의 지름이 40 mm이고, 높이가 300 mm인 것을 사용하였다(Fig. 1).

배지조성은 starch 15 g/l, glucose 5 g/l, yeast extract 3 g/l, peptone 1 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, MgSO_4 0.5 g/l로 하였다. 배양액은 각 생물반응기에 2 l를 넣고, 접종량은 3% (v/v)로 하였다. 배양 온도는 24°C, 초기 배양액의 pH는 5.4, 공기 공급량은 배양 균사체의 성장에 따른 침강 억제 및 스파자 부근에서 부착생장을 줄이기 위해 배양 초기에 0.08 vvm으로 하고 배양 4일 이후부터 0.1 vvm으로, 수확기에 0.12 vvm으로 조절하였고, 접종 후 24일간 균사를 회분배양하였다.

균사 성장량 및 배지 분석

송이균사의 성장량은 생물반응기에 균사 접종 후 4일마다 충전 세포용량(packed cell volume)으로 측정하였고, 최종 수확된 균사체는 흐르는 물로 세척하고 70°C 건조기에서 3일간 건조 후 건조량을 측정하였다.

송이균사 배양중의 기질 소비량을 측정하기 위해 배양

액을 4일 간격으로 분취하여 즉시 0.45 μm filter로 여과 후 여액을 -40°C에 냉동보관하여 당 분석용 시료로 사용하였다.

환원당은 배양액내의 환원당을 분석하였으며, 총 환원당은 배양액을 산가수분해하여 Modified DNS 방법에 의해 함량을 분석하였다(Miller, 1959).

송이균사체내의 에르고스테롤 함량 분석

각 생물반응기에서 배양중인 균사체를 4일 간격으로 분취하여 흐르는 물로 세척 후 탈수하고 즉시 -40°C에 냉동보관하여 에르고스테롤의 함량 분석용 균사체로 사용하였다.

균사체의 에르고스테롤 함량은 Mottonen 등(1998)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 즉 균사체 3 g(생중)을 MeOH 100 ml에 넣어 3분간 sonication(Branson, 8210)하고 EtOH 20 ml와 KOH 10 g을 넣고 80°C 환류냉각장치에서 1시간 사포닌화한 후 여과하여 일정 여액을 분취하여 Hexane으로 3회 분획, 건조 후 메탄올에 녹여 에르고스테롤 함량 측정용 시료로 사용하였다.

에르고스테롤 함량은 HPLC(TSP operating system)를, 칼럼은 LiChrospher 100RP-18S(5 μm , 4.6×250 mm)를, 이동상으로는 MeOH : H₂O = 98 : 2의 혼합용액을, 유속은 2 ml/min로 하여, UV검출기(TSP 3000HR)를 사용하여 282 nm에서 측정, 정량하였다.

결과 및 고찰

생물반응기 형태별 송이균사의 성장 특성

생물반응기 형태별(Fig. 1) 송이 균사체 성장량을 비교 분석하기 위하여 2 l의 배양액을 넣은 3 l급 생물반응기에

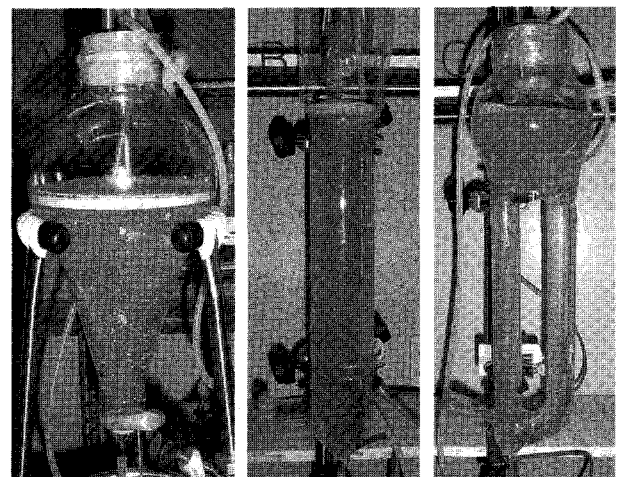


Fig. 1. Culture of *Tricholoma matsutake* mycelium in the balloon type of air bubble bioreactor (A), column type of air bubble bioreactor (B) and external-loop type of air-lift bioreactor (C).

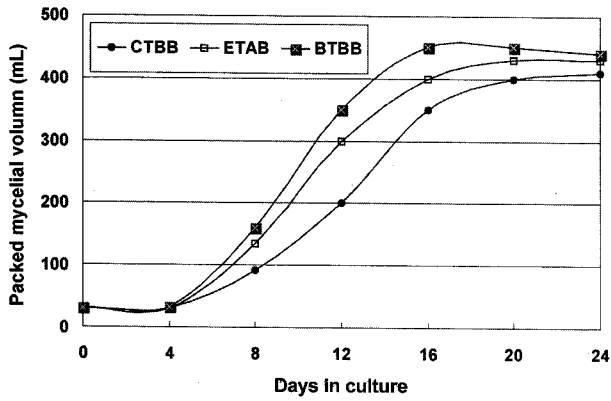


Fig. 2. Changes of packed mycelial volume during the submerged culture of *Tricholoma matsutake* among the BTBB (balloon type of air bubble bioreactor), CTBB (column type of air bubble bioreactor) and ETAB (external-loop type of air-lift bioreactor). The mycelia were cultured in 3 l bioreactor at 24°C for 24 days.

송이 균사체를 접종하여 24일간 배양하면서 접종 후 4일 간격으로 세포충진용량을 측정된 결과 Fig. 2와 같다.

송이 균사체는 공기부양식 생물반응기에서 대개 접종 후 4~6일 이후부터 생장이 시작되어 증식 정체기는 배양 20일 전후가 된다(이 등, 2002). 본 시험에서는 풍선형 공기부양식 생물반응기(풍선형)에서의 송이 균사체의 성장 정체기가 접종 후 16일 이후부터 시작되었으며, external-loop형의 기포통기식 생물반응기(기포통기형)에서는 20일 이후, 칼럼형 공기부양식 생물반응기(칼럼형)에서는 24일 이후부터 증식 정체기에 이르는 것으로 나타나, 풍선형 에서 송이 균사체의 성장 속도가 가장 빠른 것으로 나타났다.

송이 균사체 생산량은 생물반응기에서 24일간 배양 후 수확하여 건중량을 생물반응기 형태별로 비교한 결과 풍선형에서 평균 12 g, 기포통기식에서는 평균 11.4 g, 칼럼

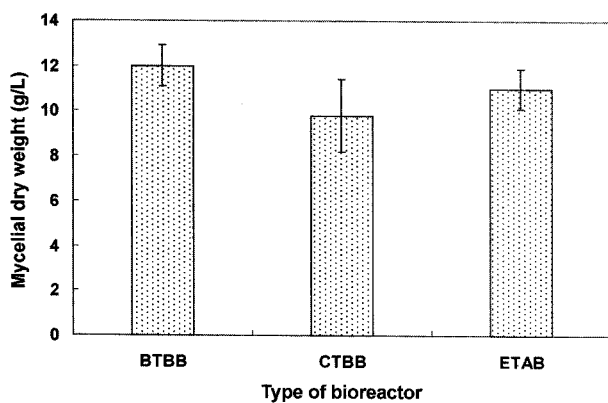


Fig. 3. Comparisons of mycelial growth of *Tricholoma matsutake* among the BTBB (balloon type of air bubble bioreactor), CTBB (column type of air bubble bioreactor) and ETAB (external-loop type of air-lift bioreactor). The mycelia were cultured in 3 l bioreactor at 24°C for 24 days.

형에서는 평균 9.5 g을 생산하여 송이 균사체 배양에 풍선형이 가장 우수한 것으로 나타났다(Fig. 3).

칼럼형에서는 송이 균사체가 뭉쳐 자라는 현상이 다른 형태의 생물반응기 보다 크게 나타났다. Kawagoe 등 (1999)도 기포통기형과 칼럼형에서 송이 생산량을 비교한 바 기포통기형보다 칼럼형에서 균사의 침강과 뭉침작용이 큰 것으로 보고하였는데 본 시험에서도 유사하게 나타났다. 칼럼형에서 균사체의 생산량이 가장 적게 생산된 이유로, 풍선형에 비해 단위 수면적당 기포 발생량이 많고 또한 공기방울 부양 시 국부적인 밀도 차이가 다른 반응기보다 크게 나타남으로 균사체의 응집현상이 많아 균사체의 뭉침 현상이 높게 나타났기 때문인 것으로 추정되었다.

생물반응기 형태별, 배양시기별 송이균사 배양액의 전체 환원당 및 환원당의 함량변화는 Fig. 4와 같다. 전체 환원당은 송이 배양액의 탄소원으로 전분 및 포도당을 사용하였기 때문에 배양액을 산가수분해한 후 배양액의 포도당 함량으로 전체 환원당을 나타내었고, 환원당은 배양액내의 포도당 함량과 송이 균사체에 의하여 전환된 환원당의 양을 표시한 것이다. 배양액의 전체 환원당 함량은 풍선형이 가장 높았고, 기포통기형이 중간 정도, 칼럼형이 가장 적은 순으로 결과를 얻었으며, 24일째에는 모든 종류의 반응기에서 거의 유사한 양으로 감소하는 경향이였다. 환원당의 함량은 초기 22 g/l에서 4~5일의 잠복기에는 이용량이 거의 없었으나, 대수성장기에는 서서히 환원당의 감소가 있었고, 정체기에 이르는 16일 이후 다소 증가하다가 급격히 낮아져 수확기인 24일째에는 생물반응기 대부분이 3 g/l 이하로 감소하였다.

감소된 환원당 1 g당 균사생산량(Y_x/s)을 보면 풍선형에서 0.62으로 가장 높았으면, 이것은 균사생산량이 가장 높은 것과 일치하는 경향이였다. 균사생산속도는 총 균사

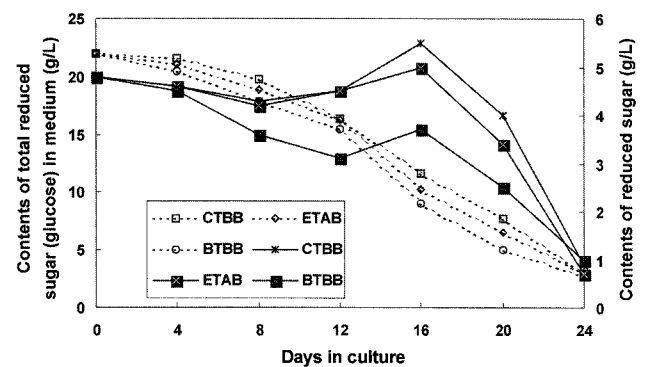


Fig. 4. Changes of reducing sugar (—) and total reducing sugar (■) contents in media during the submerged culture of *Tricholoma matsutake* among the BTBB (balloon type of air bubble bioreactor), CTBB (column type of air bubble bioreactor) and ETAB (external-loop type of air-lift bioreactor). The mycelia were cultured in 3 l bioreactor at 24°C for 24 days.

Table 1. Comparison of submerged cultures of *Tricholoma matsutake* mycelium using three types of air bubble bioreactors under the same culture condition

Bioreactor ^a	Cell concentration (g/l) ^b	Stagnant time (day)	Residual reducing sugar (g/l)	Overall cell yield, Y _{x/s} ^c	Overall growth rate Rx (g/d/l) ^d
BTBB	12	16	2.7	0.62	0.50
ETAB	11.4	20	3	0.60	0.48
CTBB	9.5	24	2.9	0.50	0.40

^aBTBB (balloon type of air bubble bioreactor) : ETAB (external-loop type of air-lift bioreactor) : CTBB (column type of air bubble bioreactor).

^bMycelial dry weight at 24 days after cultivation.

^cThe initial reducing sugar concentration was 22 g/l. The value of Y_{x/s} was defined as the cell mass obtained per one gram of reducing sugar consumed.

^dThe value of Rx was defined as the cell concentration at the end of the culture divided by the total cultivation time.

량을 총 배양기간으로 나눈 값(Rx)으로 풍선형은 0.5, 기포통기형은 0.48, 칼럼형에서는 0.4로 나타났다. 이러한 수치는 Kawogoe 등(1999)이 보고한 최대 0.46의 수치보다 높은 값으로 풍선형과 기포통기형에서 얻을 수 있었다 (Table 1).

생물반응기에서 성장기간별 송이균사체의 에르고스테롤 함량 변화

에르고스테롤은 고등균류나 자낭균류에 주로 존재하는 것으로서 세포막의 주요한 성분을 이루고 있으며 살아있는 세포에 존재하여 세포가 활력을 잃었을 때 그 함량은 급격히 감소하게 된다(Weete and Gandi, 1996; Ekblad *et al.*, 1998). 일반적으로 에르고스테롤 함량은 균체량을 추정하는데 이용되고 있으나(Stahl and Parkin, 1996; Pasanen *et al.*, 1999; 구 등, 2000; Imberger and Chiu, 2001), Charcosset와 Chauvet(2001)는 균체의 에르고스테롤 함량이 균체의 생육단계나 배양환경의 조건에 따라 서로 다르게 나타난다고 보고하였다.

본 시험에서는 반응기의 형태별 단위 균사체의 에르고스테롤 함량을 정량하여 반응기 형태별에 의한 환경 스트

레스 정도를 추정하는데 이용하고자 하였다.

성장시기별 송이 균사체의 에르고스테롤 함량(Fig. 5)은 대수성장기에 증가를 시작하여 정체기에 최대에 이르고, 그 이후부터는 점차 감소하는 경향이였다. 특히 풍선형에서 가장 높은 함량을 보여주었으며, 이어서 칼럼형, 기포통기형 순이였다. 이러한 결과로 풍선형이 다른 반응기에 비해 배양기간별로 전반적으로 균사체의 에르고스테롤 함량이 높게 나타나 배양 중 스트레스를 가장 적게 받는 것으로 유추할 수 있었다.

공기부양식 생물반응기의 단점은 다량의 공기공급에 따른 기포발생에 의한 균사의 벽면 부착 성장 외에 배양액 표면에서 공기방울이 터지면서 세포에 스트레스를 주거나 과도한 유체 흐름에 의한 전단력 증가로 세포에 스트레스를 주는 경우가 있다(van't Rite and Tramper, 1991). 풍선형 공기부양식 생물반응기에서 송이 균사체의 에르고스테롤 함량이 높게 나타난 것은 풍선형이 구조 특성상 칼럼형 보다 배양기 상부의 표면적이 넓은 형태이므로 공기의 산포율을 높여 산소의 용존율을 높여주었고, 직접적으로 공기방울이 터지면서 주는 세포의 스트레스를 감소시켜 주었으며, 또한 배양체의 순환율을 높여 고르게 성장하도록 하기 때문인 것으로 추정할 수 있었다. 한편 Charcosset와 Chauvet(2001)는 배양액내 용존 산소량이 높을수록 균체의 에르고스테롤 함량도 높아지는 경향이였다고 한 것과도 일치한다. 반면 기포통기식 생물반응기가 칼럼형보다 에르고스테롤 함량이 낮은 이유는 공기방울의 영향과 더불어 과도한 유체의 흐름에 의한 전단력 증가로 세포가 받는 스트레스가 컸기 때문인 것으로 추정되었다. 한편 칼럼형이 기포통기형보다 균사체 생산량이 낮은 이유는 앞서 밝힌 바와 같이 균사체의 뭉침 현상이 높았기 때문인 것으로 추정되었다. 따라서 송이균사체 배양에 스트레스를 가장 적게 주는 반응기의 형태는 풍선형의 공기부양식 생물반응기인 것으로 추정되었다.

한편 칼럼형 및 풍선형 공기부양식 생물반응기는 스파자 부근에서 균사체가 착생하여 점차 크게 뭉쳐 성장하면서 공기공급을 차단하는 경향이 있었다. 그러나 기포통기식 생물반응기에서는 유체의 순환으로 이러한 경향은 적게 나타나 송이 균사체 배양에 적절한 배양기 형태는 풍

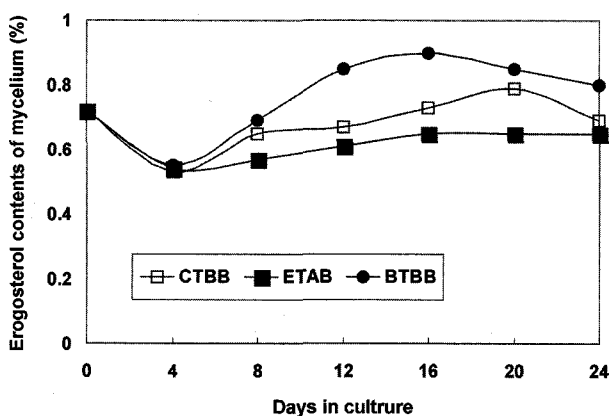


Fig. 5. Changes of ergosterol contents in mycelium of *Tricholoma matsutake*. The mycelia were cultured in the balloon type (BTBB), column type (CTBB) and external-loop type (ETAB) of air-lift bioreactor at 24°C for 24 days.

선형 생물반응기의 형태를 유지하면서 스파자 부분은 기포통기식 생물반응기의 유체 순환식 형태를 유지하도록 하는 혼합형의 형태가 좋을 것으로 추정되었다.

적 요

송이균사의 대량배양에 적합한 공기부양식 생물반응기 형태를 찾고자 풍선형 및 칼럼형의 공기부양식 생물반응기와 external-loop형의 기포통기식 생물반응기에서 송이 균사체를 심부배양하여, 반응기 형태별 송이균사체의 성장특성을 비교하였고, 반응기 형태가 세포에 주는 스트레스 정도를 비교하기 위하여 배양기 형태별 균사체의 에르고스테롤의 함량 변화를 비교하였다.

반응기 형태별 송이 균사체의 생산량은 풍선형 생물반응기에서 평균 12 g, external-loop형의 기포통기식 생물반응기에서 평균 11.4 g, 칼럼형 생물반응기는 평균 9.5 g을 생산하여, 풍선형 생물반응기가 가장 우수하였다. 성장기간도 풍선형 생물반응기에서 균사 접종 후 16일 이후부터 정체기에 이르는 것으로 20일 이후에 나타난 칼럼형 및 기포통기형 생물반응기 보다 빠르게 성장하는 것으로 나타났다.

균사체의 성장시기별 에르고스테롤의 함량은 풍선형 공기부양식 생물반응기에서 가장 높게 나타났으며 이어서 칼럼형, 기포통기식 순으로 나타나, 송이 균사체 배양시 반응기 형태에 의한 물리적 스트레스는 풍선형 공기부양식 생물반응기가 가장 적게 받는 것으로 추정되었다.

송이 균사체 배양에 가장 적합한 공기부양식 생물반응기의 형태는 풍선형인 것으로 추정 할 수 있었다. 그러나 칼럼형 및 풍선형 공기부양식 생물반응기는 스파자 부근에서 균사체가 침적, 착생하여 점차 크게 뭉쳐 성장하면서 공기공급을 차단하는 현상이 있었으나 external-loop형의 기포통기식 생물반응기에서는 유체의 순환으로 이러한 현상은 적게 나타나 대용량의 송이 균사체 배양에 적합한 반응기 형태로는 배양기의 상부가 풍선형 반응기의 형태를 유지하고, 스파자가 위치한 하부는 external-loop형의 기포통기식 생물반응기의 유체 순환식 형태를 유지하도록 하는 혼합형의 형태가 좋을 것으로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 농림기술개발연구과제 연구비로 수행된 연구결과의 일부로, 농림부의 연구비 지원에 감사한다.

참고문헌

구창덕, 조남석, 김재수, 박재인, 최태호, 민두식. 2000. 표고 균사 배양체내 에르고스테롤 함량의 변이. 목재공학 28(1): 65-70.
박기문, 이병우. 1998. 표고버섯 균사체로부터 항암 단백질의 추출 및 정제. 한국식품과학회지 30(5): 1236-1242.
이신영, 강태수, 문순옥, 류인덕, 이명열. 1996. 영지 균사체의 액

체배양에 의한 세포의 수용성 다당류의 분획 및 항암활성. 한국응용미생물학회지 24(4): 459-464.
이위영, 안진권, 권오용, 가강현, 권영진. 2002. 풍선형 공기부양식 생물반응기를 이용한 송이 (*Tricholoma matsutake*) 균사의 부유배양. 한국임학회지 91(3): 260-267.
이현진, 김종식, 허건영, 이경복, 이인구, 송경식. 1999. 담자균 추출물의 Prolyl Endopeptidase, Acetylcholine Esterase 저해 및 항혈전 응고활성. 한국농화학회지 42(4): 336-343.
Charcosset, J. Y. and Chauvet, E. 2001. Effect of culture conditions on ergosterol as an indicator of biomass in the aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 67(5): 2051-2055.
Ekblad, A., Wallande, H. and Nasholm, T. 1998. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytol.* 138: 143-149.
Imberger, K. T. and Chiu, C. Y. 2001. Spatial changes of soil fungal and bacterial biomass from a sub-alpine coniferous forest to grassland in a humid, sub-tropical region. *Biol. Fertil Soils.* 33: 105-110.
Kawagoe, M. 1996. Applications of the bubble column in biotechnology. Proceedings of the 4th Japan-Korea symposium on separation technology. pp. 623-626.
_____, Kawakami, K., Nakamura, Y., Naoe, K., Miki, K. and Noda, H. 1999. Submerged culture of *Tricholoma matsutake* mycelium in bubble column fermenters. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87(1): 116-118.
Lee, S. Y., Kang, T. S. and Lee, M. C. 1998. Condition of exopolysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13(5): 547-553.
Liu, P., Tao, W. Y., Sun, Z. H., Ao, Z. H. and Xu, Z. H. 2001. The antitumor effect and mechanism of active glycoprotein MTSGS1 from *Tricholoma matsutake* mycelium. *Pharma. Biotech.* 8(5): 284-287.
Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428.
Mottonen, M., Jarvinen, E., Hokkanen, T. J., Kuuluvainen, T. and Ohtonen, R. 1998. Spatial distribution of soil ergosterol in organic layer of a mature Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forest. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 503-516.
Paek, K. Y., Hahn, E. J. and Son, S. H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 149-157.
Pasanen, A. L., Yli-pietila, K., Pasanen, P., Kalliokoski, P. and Tarhanen, J. 1999. Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1): 138-142.
van't Riet, K. and Tramper, J. 1991. Shear. Pp. 136-179. In: van't Riet, K. Eds. Basic bioreactor design. Marcel Dekker, Inc. New York.
Son, S. H. and Lee, Y. H. 1997. Balloon type air-lift bioreactor for plant cell culture. Korea Patent Submission No. 357510.
Stahl, P. D. and Parkin, T. B. 1996. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biol. Biochem.* 28(7): 847-855.
Wang, Y., Hall, I. R. and Evans, L. A. 1997. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies; 1. *Tricholoma matsutake* and related. *Economic Botany* 51(3): 311-327.
Weete, J. D. and Gandhi, S. R. 1996. Biochemistry and molecular biology of fungal sterol. Pp. 421-438. In: Esser, K. and Lemke, P. A. Eds. The Mycota. Springer, Berlin.