

국내 아까시나무 숲에서 수집한 감자덩이버섯 (*Mattirolomyces terfezioides*)의 균사 생장 특성과 효소 활성

전성민 · 왕은진 · 기강현*

국립산림과학원 화학미생물과

Characteristics of Mycelial Growth and Enzyme Activities of *Mattirolomyces terfezioides* Collected from *Robinia pseudoacacia* Forest in Korea

Sung-Min Jeon, Eun-Jin Wang and Kang-Hyeon Ka*

Division of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 02455, Korea

ABSTRACT: *Mattirolomyces terfezioides* is a type of sweet truffles that predominantly form ectomycorrhizae with *Robinia pseudoacacia*. It is also worthy of artificial cultivation. This is the first report on characteristics of mycelial growth and enzyme activities of *M. terfezioides* collected from *R. pseudoacacia* forest in Korea. *M. terfezioides* showed the highest mycelial growth when cultured on potato dextrose agar (PDA) at 30°C or in modified Melin-Norkran's liquid medium (pH 8.0). The biomass of *M. terfezioides* was higher in liquid medium containing nitrate-nitrogen than ammonium-nitrogen by 1.8 fold. The mycelia of *M. terfezioides* showed both carboxymethylcellulase and laccase activities on solid media for enzyme screening.

KEYWORDS : Cellulase, Laccase, *Mattirolomyces terfezioides*, Mycelial growth, *Robinia pseudoacacia*

서 론

트러플(truffles)은 수목의 뿌리와 공생하며 살아가고 있는 자낭균류가 땅 속에 만드는 지하생 자실체이다[1]. 담자균류의 전형적인 자실체 형태가 진화 과정을 통해 트러플과 같은 형태로 변한 'false truffle'과 구별하기 어려운 경우도 간혹 있지만, 트러플은 진정한 버섯 즉 담자균류가 아닌 자낭균류, 특히 주발버섯목(Pezizales)에 속하는 균류가 여기에 속한다[2]. 주발버섯목 중 지하생 트러플을 만드

는 균류들은 주로 6개의 과(Glaziellaceae, Discinaceae-Morchellaceae, Helvellaceae, Tuberaceae, Pezizaceae, Pyronemataceae)의 범위에 걸쳐 분포하고 있는데 [3], 덩이버섯과(Tuberaceae)에 속하는 몇몇 트러플들을 제외한 나머지 트러플들에 대해서는 과학적인 연구가 잘 이루어지지 않았다[2]. 주발버섯목 중 가장 높은 가격으로 취급되는 산림 내 트러플은 덩이버섯과이며 [3], 여기에는 덩이버섯속(*Tuber* spp.)의 균들이 포함된다[4]. 한편, 주발버섯과(Pezizaceae)에 속하는 지하생 균류로는 *Eremiomyces*, *Hydnotryopsis*, *Kalaharituber*, *Mattirolomyces*, *Pachyphloeus*, *Peziza*, *Ruhlandiella*, *Stephensia*, *Terfezia*, *Tirmania*속이 있는데, 이 중 *Terfezia*가 식용으로 가장 좋고, *Kalaharituber*, *Tirmania*, *Mattirolomyces* 순으로 식용 가치가 있는 것으로 보고 있다 [3]. *Mattirolomyces*속 중 특히 감자덩이버섯(*M. terfezioides*)은 과거 형태학적인 특성에 기인하여 *Terfezia terfezioides*로 명명되었으나 최근 분자계통학적 연구를 통해 *M. terfezioides*로 학명이 개정되었으며 [1, 3], 독특한 향과 맛이 있어 헝가리에서는 상업적으로 재배하기에 적합한 종으로 고려되고 있다[5]. 감자덩이버섯은 달콤한 향이 강하기 때문에 셔벗(sorbet)이나 케이크(cake)와 같은 디저트를 만드는 데에 이용하고 있다[6]. 또한 Pázmány는 이 버섯이 멜론 과

Kor. J. Mycol. 2015 September, 43(3): 165-173
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.3.165>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: kasybio@korea.kr

Received July 19, 2015
 Revised September 10, 2015
 Accepted September 16, 2015

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

일과 비슷한 향이 나기는 하지만 이 버섯의 자실체는 익혀 먹어야 한다고 언급하기도 하였다[6].

트러플은 그 서식처에 따라 산림 트러플(forest truffles), 사막 트러플(desert truffles), 반건조 트러플(semi-arid truffles)의 3종류로 구분하기도 하나[7], tuber truffle과 desert truffle의 2종류로 구분하는 경우도 있다[1]. *Terfezia* spp.나 *Mattiroloomyces* spp.을 포함한 desert truffle의 여러 속들은 지중해와 중동 국가, 아시아(중국, 일본), 미국, 멕시코, 호주, 남아프리카 등지에 분포하는 것으로 보고 되었다[8]. 이 중 *Mattiroloomyces* spp.은 특이하게도 사막이 아닌 곳에서 식하는 주발버섯과 트러플인데, desert truffle의 일종으로 취급되는 감자덩이버섯 또한 프랑스, 이탈리아, 헝가리, 세르비아 북부, 그리스, 파키스탄, 인도, 중국 등 실제 사막이 아닌 온대 기후대에서 발생하는 것으로 알려져 있다[9]. 감자덩이버섯은 아까시나무(*Robinia pseudoacacia*)와 주로 균근을 형성하는데[3], 특히 헝가리에서는 이 버섯이 Danube 강에서 Carpathian 분지에 이르는 아까시나무 숲내 석회가 없는 알칼리성 모래땅에서 8월에서 11월 사이에 발생하는 것으로 보고 되었다[5].

Desert truffles은 3,000년 이상 동안 식용 가능한 것으로 알려져 왔으며, 특별한 맛을 가진 우수한 영양원으로 취급되고 있다[10]. 몇몇 desert truffles의 성분을 조사한 결과, 건중량의 20~27%는 단백질이고, 나머지는 지방, 불포화 및 포화지방산, 섬유소, 탄수화물, 아스코르빈산, 칼륨과 인, 상당량의 철분을 함유하고 있는 것으로 나타났다[3]. 또한 유도결합플라즈마 분광분석법(inductively coupled plasma spectroscopy, ICP)을 이용한 지하생 균류의 미량원소 분석 결과, *M. terfezioides*는 그와 동일한 부류에 속하는 지하생 식용 자낭균류인 *Tuber*속보다 인(P)의 함량이 높고, 나트륨(Na) 함량은 낮으며, 칼륨(K) 함량은 비슷한 것으로 보고 되었다[11].

감자덩이버섯은 desert truffle의 한 종류이고, 균핵(sclerotia)을 형성하는 균류로 알려져 있기 때문에 식재료 뿐만 아니라 생리활성물질의 의학적 이용도 고려해 볼 만하다. 일부 균류들의 균핵에는 생리활성을 가진 이차대사산물들이 포함되어 있고, 균핵을 형성하는 균류들은 항세균, 항진균, 항초식동물 화합물을 발굴하는 데에 있어서도 우수한 표적이 되고 있기 때문이다[12]. 지하생 버섯들은 전세계적으로 1,000종 이상이 있으나, 12종만이 경제적 또는 별미의 가치가 있고, 이들 대부분은 유럽에서 생산되는 *Tuber*속의 버섯들이다[5]. 심지어 트러플로 알려진 종들은 많지만, 실질적으로 재배에 성공한 버섯 또한 대부분 *Tuber*속(*T. melanosporum*, *T. uncinatum* Chatin, *T. borchii* Vitt)이다[5, 10]. 이와 같이 *Tuber*속 트러플에 대한 연구는 많이 이루어졌으나, 감자덩이버섯과 같이 잠재적으로 상업적 가치가 있는 Desert truffle의 다른 속 또는 종에 대해서는 연구가 미진한 상태이다.

과거 우리나라에서 발견된 트러플 역시 *Tuber*속으로, 검

은덩이버섯(*Tuber indicum* Cooke et Masee), 여름갈고리덩이버섯(*Tuber aestivum* subsp. *uncinatum*), 대리석덩이버섯(*T. borchii* Vittad.) 등이 있다[4]. 그러나 이들의 생리학적 특성에 대한 지속적인 연구나 인공재배에 대한 시도는 보고된 바 없다. 최근 Ka 등[13]은 국내 아까시나무 숲에서 반지중형 트러플인 감자덩이버섯을 수집하여 한국산 미기록종으로 보고하였다. 본 연구는 이 균의 생리학적 특성에 관한 최초의 보고로, 상업적 잠재 가치가 있는 이 버섯의 인공재배기술 개발 시 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

감자덩이버섯 균주의 수집과 균분리

감자덩이버섯은 2014년 9월 초순 충남 태안군 원북면 아까시나무 숲내 모래땅에서 수집하였다. 감자덩이버섯 균주(KFRI 2830)는 자실체의 조직으로부터 순수분리한 것으로, 국립산림과학원의 균주보존실에 보관되어 있던 균주를 potato dextrose agar (PDA) 배지에 계대배양하여 본 연구에 사용하였다.

감자덩이버섯의 생장 특성 조사

감자덩이버섯균의 생장 특성을 알기 위해 고체 배지의 종류, 배양 온도, 액체 배지의 pH, 무기질소원의 종류 등 배양 조건을 달리하여 균사 생장력을 조사하였다. 고체배지는 PDA, malt extract agar (MEA), Sabouraud dextrose agar (SDA) 등 상용배지 3종을 선택하여 제조사(Difco, Detroit, MI, USA)의 권장 방법에 따라 각각의 배지(pH 6.0)를 제조하였다. 또한 Melin-Norkran's medium [14]에 agar를 첨가한 modified Melin-Norkran's medium (MMN; glucose 10 g, malt extract 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g, CaCl_2 0.05 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, NaCl 0.025 g, 1% FeCl_3 1.2 mL, thiamine-HCl 0.1 mg, agar 15 g per 1 L, pH 5.5)를 제조하였다. 고압증기멸균(121°C, 20 min)한 배지를 petri dish (bottom 85 mm × height 15 mm)에 25 mL씩 분주하여 균한 후, 각 배지의 중앙에 접종원(직경 6 mm)을 1개씩 접종하고, 25°C 항온배양기에서 암배양하였다. 배지의 종류와 배양 기간에 따른 균의 생장력을 비교하기 위해 디지털 버어니어캘리퍼스를 이용하여 주(week) 단위로 누적배양 7일, 14일, 21일째 균총의 크기(접종원의 직경 제외)를 측정하였다. 배양 21일째에는 균총의 형태, 색, 배지 착색력, 균사 밀도, 질감, 균총 표면의 형태적 특성을 조사한 후, 사진으로 기록하였다.

배양 온도 변화에 따른 감자덩이버섯의 균사 생장 특성을 조사하기 위해 PDA 배지(pH 6.0)에 균(접종원의 직경 6 mm)을 1개씩 접종하였다. 5종류(10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C)의 각기 다른 온도에서 21일간 암배양한 후, 균총의 형태적 특성과 크기(접종원의 직경 제외)를 측정하여 온도 별로 비교하였다.

액체배지의 pH 변화에 따른 균 생장력을 조사하기 위해 NaOH(0.1 M, 1 M) 또는 HCl(0.1 M, 1 M)을 이용하여 5 종류의 서로 다른 pH 값을 갖는 Melin-Norkran's medium (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)를 제조하였다. 배지(20 mL/flask) 당 시험균(직경 6 mm 접종원)은 1개씩 접종하였으며, 정치 상태로 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 60일간 암배양하였다. 균배양체를 여과지에 여과하여 배양 후 배지의 pH를 측정하였다. 또한 여과한 균체를 건조(70°C , 2일)하여 건조량(mg/flask)을 측정하고, 액체배지의 pH별로 균 성장량을 비교하였다.

감자덩이버섯의 질소원 이용 능력을 조사하기 위해 Jeon 등[15]이 제시한 방법에 따라 질소원 조성이 다른 3종류의 액체배지(M, M1, M2)를 제조하였다. 질소원 시험배지 M (1 L 기준)은 glucose 10 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, CaCl₂ 0.05 g, NaCl 0.025 g, thiamin-HCl 0.1 mg, FeCl₃ (1% sol.) 1.2 mL에 유기질소원(malt extract 3 g)과 무기질소원($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g)이 모두 포함되도록 제조하였다. 또한 M 배지에서 thiamin-HCl과 malt extract를 제외하고 무기질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g 대신 $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ 을 동량 첨가한 암모늄염 배지(M1), 그리고 M 배지에서 역시 thiamin-HCl과 malt extract를 제외하고 무기질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g 대신 KNO_3 를 동량 첨가한 질산염 배지(M2)를 각각 제조하였다. 질소원 시험배지(pH 5.5, 20 mL/flask) 당 시험균(직경 6 mm 접종원)을 1개씩 접종한 후, 정치 상태로 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 56일 간 암배양하였다. 균 배양체를 여과하여 배양 후 배지의 pH를 측정하였으며, 균체는 건조(70°C , 2일)하여 건조량(mg/flask)을 측정 후 질소원 시험배지 별로 균 성장량을 비교하였다.

감자덩이버섯의 효소 활성 조사

감자덩이버섯균(KFRI 2830)의 섬유소 분해효소(cellulase)와 라카아제(laccase) 활성을 조사하였다. 섬유소 분해효소 활성을 조사하기 위해 Jeon 등[16]의 방법에 따라 carboxymethylcellulose(CMC)를 기질로 하는 고체평판배지(CMC agar plate; NaNO_3 2 g, K_2HPO_4 1 g, MgSO_4 0.5g, KCl 0.5 g, carboxymethylcellulose sodium salt 2 g, peptone 0.2 g, agar 15 g per 1 L)를 제조하였다. CMC agar plate의 pH 변화에 따른 CM-cellulase 활성을 조사하기 위해 최종 pH를 6, 7, 8로 조정하여 고압증기멸균(121°C , 20 min)한 후, 소형 petri dish (bottom 55 mm × height 15 mm)에 배지를 10 mL씩 분주하였다. CMC agar plate 중앙에 접종원(직경 6 mm)을 1개씩 접종하고 25°C 에서 8일간 암배양하였다. 배지 중앙에 Gram's iodine solution(KI 2 g, I₂ 1g, 증류수 300 mL)을 1~2 mL씩 떨어뜨려 염색한 후, 차광한 상태로 약 2시간 동안 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에 방치하였다. 배지 내 cellulase 활성 영역 즉 투명대의 크기(접종원의 직경 제외)만을 mm 단위로 측정하였다.

리그닌 분해효소 중 하나인 laccase의 활성을 조사하기 위

해 Jeon 등[17]의 방법에 따라 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)를 기질로 하는 고체평판배지(ABTS agar plate)를 다음과 같이 제조하였다. 증류수에 무기물 혼합 농축액(K_2HPO_4 2 g, KCl 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, D.W. 1 L, pH 5.0) 50 mL와 ABTS 0.5487 g을 첨가하여 혼합액의 최종 부피가 1 L가 되도록 하였다. 혼합액에 Bacto agar (Difco) 15 g을 첨가하여 고압증기멸균하고, petri dish (85 × 15 mm)에 20 mL씩 분주하였다. ABTS agar plate 중앙에 접종원(직경 6 mm)을 1개씩 접종한 후, 25°C 에서 5일간 암배양하였다. 접종원을 중심으로 청록색의 원형 발색대가 형성된 경우 laccase 활성이 있는 것으로 판정하여 접종원의 크기를 포함한 발색대의 크기를 mm 단위로 측정하였다. 또한 감자덩이버섯의 CM-cellulase와 laccase 활성도를 목재부후성 균류의 대표적인 균으로 알려진 구름버섯 균주(*Trametes versicolor* KCCM 11502)의 효소 활성과 비교하였다.

결과 및 고찰

고체배지의 종류에 따른 감자덩이버섯의 배양 특성

Desert truffles은 pH 7.0의 PDA 또는 MMN 고체배지에서 균사생장이 우수하며, 이러한 고체 배양체는 실험실 내 균근 합성을 위한 접종원으로 직접 사용되기도 한다[18]. 또한 통상적인 straw-technique으로 냉동보존했던 감자덩이버섯의 균체를 되살리는 데에도 MMN 고체배지가 효과적이라는 보고가 있다[19]. 이와 같이 국외의 desert truffle 균주들을 대상으로 한 연구 결과에서는 PDA나 MMN 고체배지에서 그들의 균사 생장이 우수한 것을 알 수 있다. 우리나라 아까시나무 숲에서 수집한 감자덩이버섯(KFRI 2830)의 경우에도 산림미생물자원의 지속적인 보존과 잠재적 활용가치를 지닌 새로운 임산물로서의 재배 가능성을 고려해 보았을 때, 수집한 균주의 생장과 증식에 유리한 기본 배지를 조사할 필요가 있다고 판단되어 PDA와 MMN 고체배지를 포함한 총 4종류의 배지에서 균의 생장 특성을 조사하였다.

감자덩이버섯은 PDA와 MMN 고체배지에서 균 생장이 우수한 반면 MEA 배지에서는 균이 성장하지 않는 특성을 보였다(Fig. 1). 감자덩이버섯은 외국의 desert truffle 균주와 같이 PDA와 MMN 고체배지에서 균 생장력이 우수하였으며, 이는 국내 산림에 서식하는 외생균근성 담자균류의 균 생장 특성에도 비슷하다[16, 20]. 균 접종 후 배양 7 일째까지의 균 생장력은 PDA보다 MMN 고체배지에서 3 배 이상 더 높았으나, 그 이후에는 PDA에서의 균 생장력이 MMN 고체배지보다 높은 것으로 조사되었다(Fig. 1). 한편 SDA에서는 PDA나 MMN 고체배지보다 균 생장력이 낮았다. 동일 배지 상에서 배양 기간에 따른 감자덩이버섯의 균사 생장 속도를 살펴본 결과, PDA에서는 배양 2주째 급격하게 균이 성장하였다. SDA에서는 배양 초기 1주일 간 균

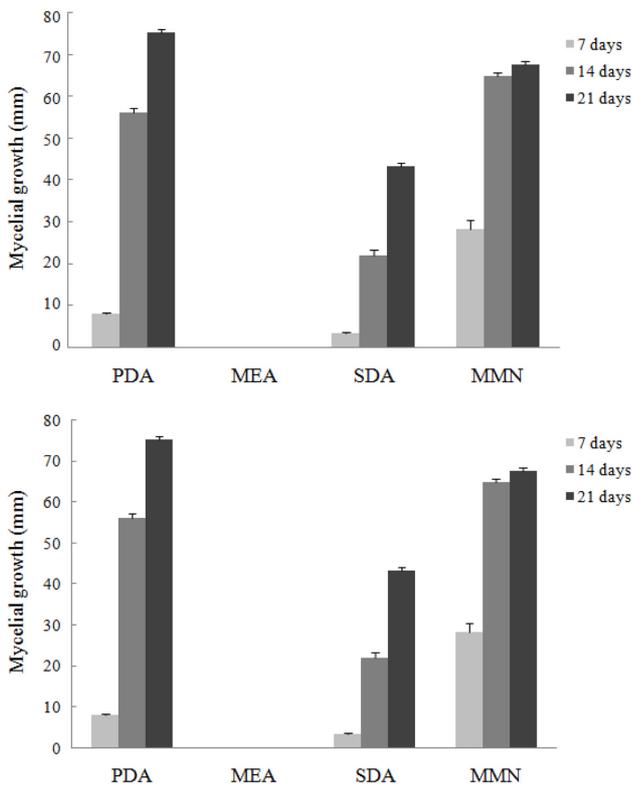


Fig. 1. Mycelial growth of *Mattirolomyces terfezioides* (KFRI 2830) on different culture media. PDA, potatodextrose agar; MEA, malt extract agar; SDA, Sabouraud dextrose agar; MMN, modified Melin-Norkran's medium including agar; N. G., No mycelial growth. The bottom size of agar plate containing the solid agar medium is 85 mm in diameter. Values (except for the size of inoculants, 6 mm in diameter) are mean ± SD of three replicates.

사 성장 속도가 가장 느렸으며, 배양 기간이 길어질수록 점차 균 성장 속도가 빨라졌다. MMN 고체배지에서는 배양 1주와 2주째보다 배양 3주째에 균의 생장이 매우 느리게 진행되었다. PDA나 MMN 고체배지에서 3주간 배양한 감자덩이버섯의 균사체는 배지의 약 85% 이상을 차지할 만큼 성장 속도가 빨라 국내에서 수집한 외생균근성 담자균류

보다는 부후균과 성장 속도가 더 비슷한 특성을 보였다. 25°C에서 21일 간 배양한 후, 균의 생장이 없었던 MEA를 제외하고 다른 3종류의 고체배지 상에서 감자덩이버섯의 성장 형태를 살펴본 결과, 균총은 선단부의 경계가 불분명한 사상형으로 성장하였으며, 흰색 또는 옅은 노랑색의 솜과 같은 질감을 나타냈다(Table 1). 또한 균총 주변의 배지 착색 현상은 관찰되지 않았다. SDA와 MMN 고체배지에서는 균총 표면이 비교적 고른 반면, PDA에서는 3차원 구조의 mycelial clump가 형성되는 특성을 볼 수 있었다. 균사 밀도는 PDA에서 가장 높았고, MMN 고체배지에서 가장 낮았다.

배양 온도에 따른 감자덩이버섯의 배양 특성

우리나라 인근의 중국과 일본에 desert truffle이 발생하며 [8], 특히 감자덩이버섯은 온대 기후대에서 발생하는 것으로 알려져 있어 [9] 실험실 내 인공배지에서 배양 시 균의 기본 생장온도 범위는 국내 산림에 분포하는 외생균근균과 비슷할 것이라 예상했다. 균사 성장력이 가장 우수했던 PDA 배지에서 감자덩이버섯의 온도별 균 성장력을 비교한 결과, 10°C 또는 15°C의 저온에서는 균 생장이 저조한 반면, 20°C 이상에서는 균 성장력이 활발하였다(Table 2). 균총의 크기는 25°C에서보다 30°C에서 배양했을 때에 더 큰 것으로 조사되어 고온의 배양 조건을 선호하거나 고온에 잘 적응하며 살아가는 균주임을 알 수 있었다(t-test, $p < 0.05$). 버섯균의 자실체 발생 온도와 균사체의 최적 생장 온도가 꼭 일치하는 것은 아니지만, 이와 같이 감자덩이버섯의 균사체가 30°C에서 가장 활발하게 성장한 것은 자실체의 발생 환경이 어느 정도 반영된 것으로 보인다. 감자덩이버섯의 자실체 발생 시기가 늦여름에서 초가을이었으며 아까시나무 아래에서 반지중형으로 발생한 점 등을 미루어보면, 그 균이 30°C의 고온 환경에도 잘 적응하며 성장할 수 있는 형질을 획득하게 되어 나타난 결과라 해석할 수도 있기 때문이다.

감자덩이버섯 균사체의 생장 형태를 살펴본 결과, 모든 배양 온도 범위에서 배지 착색 현상 없이 균총의 선단부 경계가 불분명한 사상형으로 성장하였다(Fig. 2). 균총의 주된

Table 1. Morphological characteristics of *Mattirolomyces terfezioides* (KFRI 2830) mycelial colony on different culture media

Morphological characteristics	Culture media		
	PDA	SDA	MMN
Colony shape	Filamentous form	Filamentous form	Filamentous form
Colony color	White	White to light yellow	White
Medium pigmentation	No	No	No
Mycelial density	High	Moderate	Low
Texture	Cottony	Cottony	Cottony
Surface morphology	Mycelial clump, Uneven	Even	Even

PDA, potato dextrose agar; SDA, Sabouraud dextrose agar; MMN, modified Melin-Norkran's medium.

Table 2. Growth characteristics of *Mattirolomyces terfezioides* (KFRI 2830) at different culture temperatures

Temperature (°C)	Mycelial growth (mm/21 days)	Morphological characteristics of mycelial colony on PDA					
		Colony shape	Color	Medium pigmentation	Mycelial density	Surface morphology	Texture
10	6.8 ± 0.6	Filamentous form	White	No	very low	Even	Cottony
15	27.3 ± 2.1	Filamentous form	White	No	Low	Even	Cottony
20	70.3 ± 1.4	Filamentous form	White	No	Moderate	Even	Cottony
25	76.9 ± 0.3	Filamentous form	White	No	High	Mycelial clump, Uneven	Cottony
30	79.0 ± 0.0	Filamentous form	White to light yellow	No	Very high	Uneven	Cottony

Values (except for the size of inoculants, 6 mm in diameter) are mean ± SD of three replicates. PDA, potato dextrose agar.

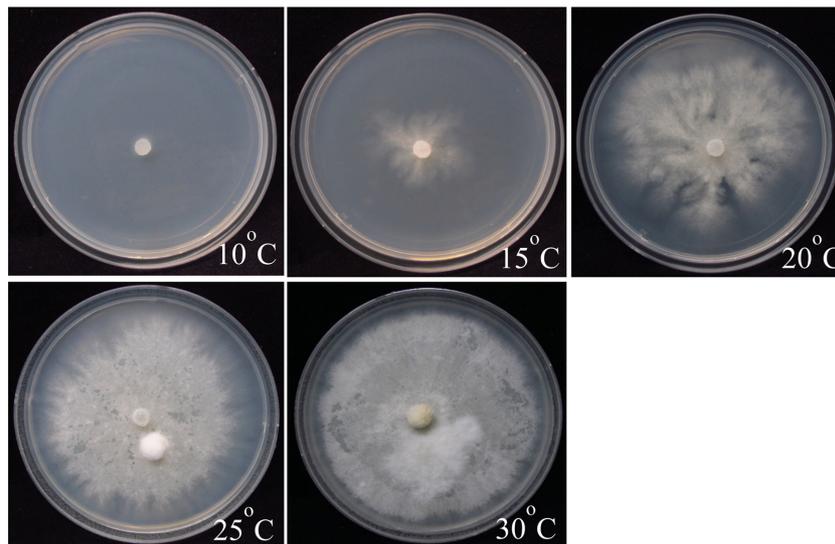


Fig. 2. Photographs of *Mattirolomyces terfezioides* (KFRI 2830) grown on potato dextrose agar (PDA) plate at different temperatures.

색상은 흰색이었으며, 30°C에서 배양한 경우에는 흰색에서 옅은 노랑색 범위의 균총을 형성하였다. 배양 온도가 높아 질수록 균사 밀도가 증가하여 30°C에서는 그 밀도가 최대를 이루었다. 균총 표면의 특성을 조사한 결과, 20°C 이하에서는 비교적 고른 표면의 균총이 형성된 반면, 25°C와 30°C에서는 mycelial clump의 형성 또는 균사의 불규칙한 분포로 인해 균총의 표면이 고르지 못한 것을 관찰할 수 있었다. 25°C에서 mycelial clump를 형성하는 이 균의 독특한 특성은 균사 성장에 가장 적합한 배양 조건이 아니라고 단순히 해석할 수 있다. 하지만, 일부 균류들이 추위, 미생물의 공격, 기주식물의 장기적인 부재와 같은 열악한 환경에 직면했을 때 균핵을 형성하는 것과 같이 [12], 감자덩이버섯

도 불리한 성장 환경에 대응하려 mycelial clump라는 구조물을 형성한 것일 수도 있다. 실제 감자덩이버섯은 균핵을 형성하는 균류로 알려져 있어 [12] 우리 산림에서 수집한 감자덩이버섯의 이러한 형태적 특성이 균핵을 형성하는 특성에서 비롯되었을 가능성도 배제할 수 없다.

액체배지의 pH에 따른 감자덩이버섯의 배양 특성

균근을 형성하는 버섯을 인공적으로 재배하기 위해서는 기주식물의 뿌리를 감염시켜 균근을 형성하기에 충분한 균체량을 확보해야한다. 감자덩이버섯의 경우 아카시나무 싹생묘와의 균근 합성을 위해 멸균 전 pH 8.0의 MMN 고체 배지에서 자란 배양체를 접종원으로 사용한 예 [21]도 있지

만, 균사 생장이 2차원 평면으로 제한되어 있는 고체배양보다는 3차원 공간으로 균사 성장 진행이 가능한 액체배양이 다량의 균체를 확보하는 데에 더 효율적일 수 있다. 이러한 가능성을 고려하여 액체배양 시 감자덩이버섯의 균체량이 최대가 되는 배지의 pH를 조사하였다.

배양 60일 후 MMN 액체배지의 pH별 균체량을 비교한 결과, 평균 전 pH 8.0인 배지에서 균체량(41.6 ± 1.4 mg/flask)이 가장 많았다(Table 3). pH 7.0에서 균체량은 39.1 ± 1.9 mg/flask로 pH 8.0에서보다 유의하게 낮았지만($p < 0.05$), pH 4, 5, 6보다는 유의하게 높았다($p < 0.05$). 여러 학자들은 외생균근성 균류를 호산성(acidophilic)이라 하였으나, 예외적으로 높은 pH값의 배지에서도 상당히 잘 자라는 균들도 있다고 보고하였다[22]. 감자덩이버섯의 경우에는 산성보다는 pH 8.0의 약알칼리성 배지에서 더 잘 성장하는 특성이 있어 외생균근성 균류이긴 하지만 호산성 균류에 속하지는 않는 것으로 보인다. 또한 pH 8에서 가장 잘 자라는 감자덩이버섯의 이러한 성장 특성은 외생균근균보다는 부생균에 더 가까운 것으로 보이며, 이 균이 발생한 지역의 토양특성을 반영한 결과라 생각된다. 서해안 해안사구 중 태안군 지역의 토양 pH는 7.3[23]인 것으로 알려져 있기 때문이다. 일반적으로 외생균근균은 pH 5 또는 pH 6에서, 많은 부생균들은 pH 7 또는 pH 8에서 가장 잘 자라며, 각 균들의 최적 성장 pH 또한 이들이 발생한 산림 토양의 pH와 상관관계가 있는 것으로 알려져 있기 때문이다[24]. 본 연구에 사용한 액체 시험배지의 조성은 수집 장소의 토양 성분과 다르고, 감자덩이버섯이 발생했던 토양의 pH 또한 측정하지는 못했지만, 감자덩이버섯이 pH 8.0의 MMN 액체배지에서 가장 잘 성장한 이유도 버섯 발생지의 토양 산도와 무관하지 않은 것으로 보인다. 헝가리에서 감자덩이버섯은 알칼리성 토양에서 발생하는 것으로 알려져 있고[5], desert truffle인 *Terfezia*속의 덩이버섯들은 표층 토양의 산도가 pH 7.9~8.5인 곳에서 발생하는 것으로 보고되었다[3]. *Terfezia boudieri*의 경우, 그 균의 자낭과(ascocarp)와 접촉해있거나 자낭과를 덮고 있는 바로 위의 토양은 pH 7.85, 자낭과와 10 cm 깊이로 떨어진 곳의 토양은 pH 7.55인 것으로 보고되어[8] 약알칼리성 환경에서 버섯이 발생하는 것을 알 수 있다. 이와 같이 감자덩이버섯을

포함한 desert truffles의 발생지에 대한 토양 분석과 실험실 내 균사체 배양 조건에 관한 국외 연구 결과들을 종합해보면, 감자덩이버섯의 균사체가 pH 8.0인 액체배지에서 최대 균 성장력을 나타낸 것도 버섯 발생지의 토양 pH와 관련이 있기 때문이라 생각된다. 감자덩이버섯 배양 후 액체배지 내 산도 변화를 조사한 결과, initial pH 4.0을 제외하고는 final pH값이 0.3~2.5 정도로 감소하였으며, initial pH값과 final pH값의 격차는 initial pH 5.0이나 initial pH 6.0보다는 initial pH 7.0이나 pH 8.0에서 더 컸다(Table 3). 전반적으로 initial pH값보다 final pH값이 낮아진 이유는 initial pH값이 증가할수록 감자덩이버섯이 호흡을 통해 방출하는 CO₂량이 증가하게 되고, 대사 활성도 활발해져 균이 생산하는 유기산 등의 물질이 액체배지에 용해됨으로써 pH값이 감소한 것으로 보인다. Yamanaka[24]는 알칼리 환경에서 균을 배양하게 되면 CO₂가 용해되어 용액 내 carbonate ion이 증가하기 때문에 배지 내 pH가 감소할 수 있다고 하였다. Sánchez 등[22]은 외생균근균의 액체배양 시 initial pH 값과 final pH값이 다른 이유는 균사체가 유기산을 생산하거나 선택적으로 이온을 흡수하여 나타난 결과일 수 있다고 하였다. 이러한 측면에서 감자덩이버섯 배양 후 pH값이 감소된 원인은 이 균주의 호흡과 대사 활동에 기인한 것이라 해석된다. 한편, 균체량과 final pH값의 상관관계를 살펴본 결과, initial pH 4, 5, 6에서는 균체량도 final pH값도 통계적으로 유의하게 다르지 않았으나($p < 0.05$), initial pH 7.0 이상에서는 균체량 증가와 함께 final pH값도 유의하게 높아진 것을 알 수 있었다. 이론적으로는 균 성장력이 클수록 더 많은 유기산이 액체배지로 방출되어 pH가 더 감소하게 되는 것으로 알려져 있지만, 균체량 생산과 pH 감소는 상관관계가 없는 경우도 있다[22]. 감자덩이버섯의 경우에는 initial pH 8.0에서 균체량이 최대였지만 final pH 값은 5.5로 이보다 균체량이 적은 다른 액체배지에서보다 final pH 값이 더 높았다. 따라서 final pH의 절대값으로 비교한 경우에는 균체량 생산과 pH 감소가 상관관계가 없는 것으로 보인다. 그러나 배양 전 액체배지의 산도가 모두 동일하지 않았기 때문에 final pH의 절대적인 수치 비교보다는 initial pH와 final pH 간의 상대적인 격차를 비교하는 것이 균체량과 pH 감소 관계를 이해하는 데에

Table 3. Mycelial growth of *Mattitrolomyce sterfezioides* (KFRI 2830) in culture media (MMN) with different initial pH values

Initial pH of culture media	Dry weight of mycelium (mg/flask/60 days)	Final pH of culture media
4.0	27.4 ± 0.8^c	4.3 ± 0.0^c
5.0	28.5 ± 0.5^c	4.3 ± 0.0^c
6.0	27.8 ± 1.1^c	4.3 ± 0.1^c
7.0	39.1 ± 1.9^b	4.4 ± 0.0^b
8.0	41.6 ± 1.4^a	5.5 ± 0.1^a

Culture medium (MMN) is a modified Melin-Norkrans medium containing 10 g/Lof glucose instead of sucrose. Values with the same uppercase letters in each column are not significantly different (Duncan's multiple range test). Each value is a mean \pm SD of seven replicates ($p < 0.05$).

더 근접한 방법이라 생각한다. 이러한 관점에서 보면, 배양 전과 후 pH 간격 차가 컸던 initial pH 7과 8인 액체배지에서 균체량이 배양 전과 후 pH 간격 차가 상대적으로 작았던 initial pH 4, 5, 6인 액체배지에서 보다 더 많았기 때문에 감자덩이버섯의 균 성장력이 커질수록 액체배지 내 pH 감소율이 커진 것으로 볼 수도 있다.

질소원의 종류에 따른 감자덩이버섯의 배양 특성

감자덩이버섯과 주로 균근을 형성하는 기주식물은 아까시나무이다[3, 5]. 아까시나무의 뿌리에는 대기 중 질소(N₂)를 고정하며 암모늄(NH₄⁺)으로 전환시키는 질소고정균이 공생하고 있기 때문에 감자덩이버섯이 발생하는 근권에는 암모늄 형태의 무기질소원이 풍부하리라 생각된다. 또한 토양 내에도 유기물을 암모늄염으로 전환시키는 토양 세균이나 암모니아 화합물을 산화하여 아질산염이나 질산염(NO₃⁻)으로 전환시키는 질화세균이 존재하기 때문에 질산염 형태의 무기질소원도 존재할 것이다. 아까시나무 근권에 이러한 무기질소원이 풍부하긴 하지만, 아까시나무와 균근을 형성하며 살아가는 감자덩이버섯균이 토양 내 어떠한 종류의 무기질소원을 더 잘 획득하여 균 성장에 이용하는지에 대해서는 보고된 바 없다. 감자덩이버섯이 발생했던 아까시나무 근권 내 질소원의 종류와 함량에 대한 조사는 아직 이루어지지 않았지만, 이 균의 균사체 성장에 유리한 배양 조건을 알기 위해 질산염과 암모늄염 형태의 2가지 무기질소원에 대한 이용 능력을 조사하였다.

유기 및 무기질소원이 모두 포함된 M 배지에서 감자덩이버섯의 균체량은 26.8 ± 1.4 mg/flask였다(Table 4). 암모늄염 배지(M1)에서 균체량은 20.7 ± 0.3 mg/flask, 질산염 배지(M2)에서는 균체량이 38.0 ± 1.2 mg/flask로 측정되어 M1보다 M2에서 균체량이 약 1.8배 더 유의하게 많았다(Table 4). 또한 M보다 M2에서 균체량이 약 1.4배 더 많아 비록 무기질소원이 결여되긴 하였으나 질산염 형태의 무기질소원이 공급되면 감자덩이버섯의 균 성장력이 증가하는 것으로 나타났다. 배양 후 각 배지의 final pH를 측정할 결과, M과 M1에서는 initial pH값보다 1.2 정도 감소된 반면, M2에서는 7.3 ± 0.1로 initial pH값보다 1.8 정도 증가하였다. 이러한 현상은 곰보버섯(*Morchella esculenta*)의 무기질

소원 이용능력과 유사한 특성으로, 곰보버섯균들은 균사 성장 시 암모늄염보다는 질산염 형태의 무기질소원이 함유된 배지(M2)에서 균체량이 더 많은 것으로 보고되었으며[20], final pH도 7.0 부근으로 상승한 것으로 조사되었다. 감자덩이버섯을 배양한 후 균체량이 가장 많았던 M2에서 final pH가 상승한 이유는 정확히 알 수 없으나, 배양 시간이 길어질수록 배지 내 유기산보다는 배지 내 pH 상승에 관여하는 이온의 방출량이 더 많아지기 때문이라 추정한다. 한편, 담자균류에 속하는 많은 외생균근균들은 질산염보다는 암모늄염 형태의 무기질소원이 함유된 배지(M1)에서 더 잘 성장하는 경향이 있다[20]. 감자덩이버섯과 곰보버섯은 모두 외생균근을 형성하는 자낭균류이기 때문에 무기질소원에 대한 이용능력이 비슷하고 외생균근을 형성하는 담자균류와는 다를 수 있다. 그러나 외생균근을 형성하는 자낭균류에 대한 무기질소원 이용 능력에 관한 연구가 부족하기 때문에 이러한 특성을 두 부류 간의 다른 특성이라 단정하긴 어렵고, 이에 대한 비교 연구가 지속적으로 이루어져야 확인 가능할 것이다.

감자덩이버섯의 효소 활성 조사

트리플을 형성하는 균류들은 기주식물 주변의 유기물들을 보다 단순하고 수용성인 분자 형태로 분해하기 위해 세포 밖으로 많은 효소들을 방출하게 되는데, 특히 이러한 세포 외 효소들은 트리플균이 기주식물의 뿌리에 침입하여 균락을 이루는 것을 도와 기주식물과 공생하거나 균이 영양분을 획득하는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[25]. *Tuber*속에 속하는 일부 종들(*T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. brumale*, *T. magnatum* and *T. excavatum*)은 tyrosinase와 laccase 활성이 있는 것으로 보고되었다[26]. 또한 값비싼 식용버섯인 *Tuber aestivum*균사체는 효소탐색용 고체배지 상에서 3종류의 효소(amylase, peroxidase and catalase) 활성을, *Tuber maculatum*는 무려 7종의 효소(amylase, xylanase, laccase, lipase, peroxidase, cellulase, catalase) 활성을 나타내는 것이 관찰되어 미생물에 의한 환경복원(bioremediation)이나 식품생물공학 분야에 유용한 효소로 기대를 받고 있다[25]. 트리플을 형성하는 균류들은 균근을 형성하는 자낭균류이긴 하지만, 전술한 *Tuber*의 일부 종들

Table 4. Mycelial growth of *Mattirolomyce sterfezioides* (KFRI 2830) in three different liquid media containing different inorganic nitrogen sources

Culture media (Initial pH)	Dry weight of mycelium ^a (mg/flask/56days)	Final pH of culture media after 56 days
M (5.5)	26.8 ± 1.4	4.3 ± 0.0
M1 (5.5)	20.7 ± 0.3	4.2 ± 0.1
M2 (5.5)	38.0 ± 1.2 ^b	7.3 ± 0.1

M, modified Melin-Norkran's (MMN) medium; M1, modified MMN medium containing ammonium nitrogen (NH₄)Cl; M2, modified MMN medium containing nitrate nitrogen KNO₃.

^aThe above values are mean ± SD of three replicates.

^bThe biomass of *M.terfezioides* grown in M2 medium is a significantly different from that of M1 medium (*t*-test, *p* < 0.05).

Table 5. Comparison of two extracellular enzyme (CM-cellulase and laccase) activities between ectomycorrhizal fungus *Mattirolomyces terfezioides* (KFRI 2830) and saprotrophic fungus *Trametes versicolor* (KCCM 11502)

Scientific name (strain No.)	CM-cellulase activity (mm) ^a	Laccase activity (mm) ^b	Ecology
<i>M. terfezioides</i> (KFRI 2830)	31.1 ± 0.4 (at pH 6.0)	56.5 ± 0.2	Mycorrhizal
	36.4 ± 1.4 (at pH 7.0)		
	37.6 ± 0.7 (at pH 8.0)		
<i>T. versicolor</i> (KCCM 11502)	49.0 ± 0.0 (at pH 6.0)	68.8 ± 0.3	Saprotrophic

All values listed in Table 5 are mean ± SD of three replicates.

^aAll strains were incubated on carboxymethylcellulose (CMC) agar plate (55 mm in diameter) for 8 days at 25°C. The cellulase activity of *M. terfezioides* was tested on CMC agar plates with different pH values. The CM-cellulase activity was determined by the size (mm in diameter) of cellulolytic zone only.

^bStrains were incubated on 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) agar plate (85 mm in diameter) for 5 days at 25°C. The laccase activity was determined by the size of chromogenic (blue-green) zone including the diameter (6 mm) of inoculant.

은 일반적인 부후성 균류처럼 cellulase나 laccase를 생산한다. Cellulase나 laccase는 산업적으로 이용가치가 있을 뿐만 아니라 균류의 영양 섭취 방식을 이해하는 데에도 중요한 효소로 취급되기 때문에 본 연구에서는 고체배지 상에서 감자덩이버섯의 cellulase와 laccase 활성을 조사하였다. 또한 감자덩이버섯의 cellulase와 laccase 활성이 어느 정도인지 알기 위해 두 효소를 모두 생산하는 부후균인 구름버섯 균주 (*T. versicolor* KCCM 11502)를 선택하여 비교균으로 사용하였다. CMC agar plate (pH 6.0)에서 *T. versicolor* KCCM 11502의 CM-cellulase 활성은 시험배지 전체에 나타나 접

종원의 직경을 제외한 투명대 (clear zone)의 크기가 49.0 ± 0.0 mm였다 (Table 5, Fig. 3A and 3B). 동일한 조건으로 제조된 배지 (pH 6.0)에서 감자덩이버섯은 31.1 ± 0.4 mm의 투명대를 형성하여 부후균보다는 효소활성이 낮았지만, CM-cellulase 활성이 있는 것으로 조사되었다. Desert truffles이 주로 알칼리성 토양에서 발생되며, 감자덩이버섯 또한 pH 8.0인 배지에서 균 생장이 우수한 것을 고려하여 pH 6.0 이상인 CMC agar plate에서 효소 활성이 증가되는지를 시험하였다. pH 7.0과 pH 8.0인 CMC agar plates에서 각각 36.4 ± 1.4 mm와 37.6 ± 0.7 mm로 나타나 효소 활성에 있어 두 시험균 간 유의한 차이는 없었으나 ($p < 0.05$), pH 6.0인 CMC agar plate에서 보다는 높은 효소 활성을 나타냈다. 감자덩이버섯의 CM-cellulase 활성이 CMC agar plate의 pH 변화에 따라 비례적으로 증가한 것은 아니지만, pH 7.0 이상에서 효소 활성이 증가된 것으로 보아 pH가 효소 활성에 일정 부분 영향을 끼침을 알 수 있었다. 감자덩이버섯의 리그닌 분해력을 조사하기 위해 ABTS agar plate 상에서 laccase 활성을 조사하였다. 청록 발색대의 크기를 측정한 결과, 56.5 ± 0.2 mm로 *T. versicolor* KCCM 11502의 효소 활성 (68.8 ± 0.3 mm)보다는 낮지만, 일반적인 외생균근성 담자균류보다는 비교적 높은 효소 활성을 나타냈다 (Table 5, Fig. 3C and 3D). 이와 같이 우리나라 산림에서 분리한 감자덩이버섯은 cellulase와 laccase 모두를 생산하는 능력이 있고 균사 성장 속도도 일반적인 외생균근성 담자균류보다 빨라 영양 섭취 방식이나 균의 성장 특성이 부후성 균류와 비슷함을 알 수 있었다.

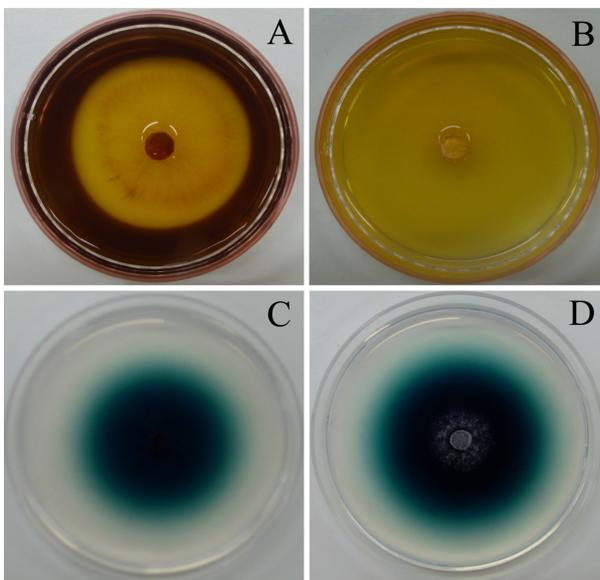


Fig. 3. Comparison of extracellular enzyme activities on solid media. A, CM-cellulase activities of *Mattirolomyces terfezioides* KFRI 2830; B, *Trametes versicolor* KCCM 11502 on carboxymethylcellulose (CMC) agar plates; C, Laccase activities of *Mattirolomyces terfezioides* KFRI 2830; D, *Trametes versicolor* KCCM 11502 (d) on 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) agar plates. The size of A and B petri-dishes is 55 mm diameter. The size of C and D petri-dishes is 85 mm diameter.

적 요

감자덩이버섯 (*Mattirolomyces terfezioides*)은 단맛을 가진 트러플의 한 종류로, 주로 아까시나무 (*Robinia pseudoacacia*)와 외생균근을 형성한다. 상업적으로 인공재배할 만한 가치가 있는 버섯으로, 본 연구에서는 우리나라 아까시나무 숲에서 수집한 감자덩이버섯균의 균사 성장특성과 효소 활성에 대해 조사한 바를 처음으로 보고하고자 한다. 이 균

은 PDA 배지, 30°C에서 가장 잘 성장하였고, 액체배양 시에는 pH 8.0의 MMN 배지에서 균 생장력이 가장 우수하였다. 또한 암모늄염보다는 질산염 형태의 무기질소원이 함유된 액체배지에서 균체량이 1.8배 더 높았으며, 효소 검색용 고체배지 상에서 carboxymethylcellase와 laccase 활성을 나타냈다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from Korea Forest Research Institute (FP 0801-2010-01), Republic of Korea.

REFERENCES

- Jamali S. Taxonomy of the truffles. *Plant Sci Today* 2014;1: 219-22.
- Bunyard BA. Truffles and false truffles: a primer. *Truffles* 2008;1:13-5.
- Kagan-Zur V, Roth-Bejerano N, Sitrit Y, Morte A. *Desert truffles*. Heidelberg: Springer; 2014.
- Seok SJ, Lim YW, Kim CM, Ka KH, Lee JS, Han SK, Kim SO, Hur JS, Hyun IH, Hong SG, et al. List of mushrooms in Korea. Seoul: Korea Society of Mycology; 2013.
- Gógán A., Bujáki G, Dimény J. Truffle cultivation- a way of sustainable agriculture and land use. *Bull UASVM CN* 2004; 61:150-3.
- Gógán Csorbainé A, Illyés Z, Dimény J, Merényi Z, Bratek Z. *Choiromyces meandriformis* and *Mattirolomyces terfezioides*: peculiar truffles with new perspectives. *Micol Ital* 2009;38:21-8.
- Akyüz M, Kirbağ S, Kurat M. Ecological aspects of the arid and semi-arid truffle in Turkey: evaluation of soil characteristics, morphology, distribution, and mycorrhizal relationships. *Turk J Bot* 2012;36:386-91.
- Dib-Bellahouel S, Fortas Z. Activity of the desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin, against associated soil microflora. *Afr J Microbiol Res* 2014;8:3008-16.
- Chevalier G. The European desert truffles. In: Kagan-Zur V, Roth-Bejerano N, Sitrit Y, Morte A, editors. *Desert truffles*. Heidelberg: Springer; 2014. p. 121-41.
- Slama A, Fortas Z, Boudabous A, Neffati M. Cultivation of an edible desert truffle (*Terfezia boudieri* Chatin). *Afr J Microbiol Res* 2010;4:2350-6.
- Orczán AK, Vetter J, Merényi Z, Bonifert É, Bratek Z. Mineral composition of hypogeous fungi in Hungary. *J Appl Bot Food Qual* 2012;85:100-4.
- Smith ME, Henkel TW, Rollins JA. How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecol* 2015;13:211-20.
- Ka KH, Jeon SM, Ryoo R, Kang JA, Hong KS. First record of *Mattirolomyces terfezioides* and *Tricholoma bakamatsutake* in Korea. *Kor J Mycol* 2015;43:125-8.
- Marx DH. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 1969;59:153-63.
- Jeon SM, Ka KH. Nitrogen source-requirement and preference of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Kor J Mycol* 2013;41:149-59.
- Jeon SM, Kim MS, Ka KH. Effects of medium, temperature and pH on mycelial growth and cellulase activity of ectomycorrhizal fungi from Korean forests. *Kor J Mycol* 2012;40: 191-203.
- Jeon SM, Ka KH. Mycelial growth and extracellular enzyme activities of wood-decaying mushroom strains on solid media. *Kor J Mycol* 2014;42:40-9.
- Al-Qarawi AA, Mridha MA. Status and need of research on desert truffles in Saudi Arabia. *J Pure Appl Microbiol* 2012; 6:1051-62.
- Stielow JB, Vaas LA, Göker M, Hoffmann P, Klenk HP. Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic Basidiomycota and Ascomycota. *Mycologia* 2012;104:324-30.
- Jeon SM, Ka KH. Cultural characteristics of Korean ectomycorrhizal fungi. *Kor J Mycol* 2015;43:1-12.
- Kovács GM, Vágvolgyi C, Oberwinkler F. *In vitro* interaction of the truffle *Terfezia terfezioides* with *Robinia pseudoacacia* and *Helianthemum ovatum*. *Folia Microbiol (Praha)* 2003;48: 369-78.
- Sánchez F, Honrubia M, Torres P. Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogam Mycol* 2001;22:243-58.
- Shin HS, Kim HJ, Han SH, Ko SY, Kang HJ, Lee SH, Lee CY, Kim CB, Bae YT, Shin JK, et al. Classification of west coastal dune vegetation and comparison of the inorganic constituents for the soil and present plants. *J Kor For Soc* 2013;102:345-54.
- Yamanaka T. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. *Mycologia* 2003; 95:584-9.
- Nadim M, Deshaware S, Saidi N, Abd-Elhakeem MA, Ojamo H, Shamekh S. Extracellular enzymatic activity of *Tuber maculatum* and *Tuber aestivum* mycelia. *Adv Microbiol* 2015;5: 523-30.
- Miranda M, Bonfigli A, Zarivi O, Ragnelli AM, Pacioni, G, Botti D. Truffle tyrosinase: properties and activity. *Plant Sci* 1992;81:175-82.