

麥角菌의 培養에 관한 研究(IV)

韓國產 麥角菌의 培養

金炳珏 · 沈美慈 · 崔應七 · 朴永仁

서울대학교 약학대학 미생물약품화학교실

Studies on the Culture of Ergot Fungus(IV)

Culture of Korean Ergot Fungus

Byong Kak KIM, Mi Ja SHIM, Eung Chil CHOI and Young In PARK

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy
Seoul National University, Seoul, Korea

To isolate ergot strains which are capable of growing and producing alkaloids in submerged culture, strains were isolated from the sclerotia parasitizing the *Graminae* plants in Korea and the experiments of submerged culture of these strains yielded the following results: 1) The mycelia which were respectively isolated from the sclerotia parasitizing *Agropyron semicostatum* NEES, *Arundinella hirta* TANAKA var. *ciliata* KOIDSUMI, *Ischaemum antheophoroides* MIQ. var. *eristachyum* HONDA, and *Phleum pratense* L. grew in Medium D by submerged culture. 2) When the strain of the ergot of *Agropyron semicostatum* was inoculated into six different nutrient solutions for submerged culture, its mycelium grew well in Media C, D and F, but produced alkaloids only in Medium C, indicating that Medium C is relatively suitable for the strain. 3) The extraction of the alkaloids from the culture broth by ether and T.L.C. analysis of the extract showed that it contained at least two types of alkaloids.

서 론

麥角 및 그 알칼로이드類의 用途가 擴張됨에 따라 需要가 增加 하였고 때문에 麥角을 생산함에 있어서 天然으로 發生하는 麥角菌核의 量이 不足하게 되어서 栽培寄生法을 採擇하여 왔었다.¹⁻³⁾ 근래에 와서 麥角菌을 人工培地에서 培養하여 麥角 알칼로이드를 直接生成시키는 方法, 즉 발효법을 수립하는데 成功하였다. 사실은 이 발효법에 관한 研究는 前記한 栽培寄生法에 關한 研究가 시작되기 훨씬 前부터 進行되었다.⁵⁾ 그러나 麥角菌의 菌絲는 人工培地에서 成長하였지만 麥角 알칼로이드를 生成치 못하였었다. 그러다가 麥角菌의 菌絲를 表面培養法에 의해 알칼로이드 成分을 生成시키는데

최음 成功하였던 것은 ABE와 그 협조자들이었다.^{6,7)}

그후 1958년에 이르러 TYLER⁸⁾, 또 1960년에 BRADY와 TYLER⁹⁾ 등은 *Claviceps purpurea*(Fr.) TULASNE의 培地의 組成, 培養條件 및 麥角 알칼로이드 生成과 代謝等에 관하여 報告 하였다.

著者들이 그동안 調査한 범위내에서는 韓國產 麥角菌의 培養의 研究는 전혀 報告된 바 없으므로 이 研究에 착수하였다.

最近에 著者들^{10,11)}은 韓國產 麥角을 수집하여 그 알칼로이드 成分을 分析하여 報告하였다. 著者들은 알칼로이드가 가장 많이 함유된 것으로 밝혀진 「개밀」에 寄生한 菌核과 其他 禾本科 植物에 寄生된 菌核으로부터 麥角 菌株를 分離하였으며, 그 培養 여부를 검토하고

나아가서 알칼로이드가 생성되는가를 實驗하였다.

그 結果 使用한 培地에서 菌絲의 成長이 良好하였으며 그 培養液에서 알칼로이드가 檢出 되었기에 이에 報告하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 實驗 材料

이 實驗에 使用한 麥角 菌核은 1971년 가을 京畿道 水原 等地의 禾本科 植物인 개밀, 새, 갯쇠보리, 티모시 등에 寄生한 것을 採集한 것이며 Table I 과 같다.

Table I. Korean ergots used for strain isolation.

Sclerotium No.	Ergot fungus	Host plant		Site of collection
		Scientific name	Korean name	
1	<i>Claviceps purpurea</i>	<i>Agropyron semicostatum</i> NEES	개밀 (Gae-mil)	Suwon
2	<i>C. purpurea</i>	<i>Arundinella hirta</i> TANAKA var. <i>ciliata</i> KOIDZUMI	새 (Sae)	Suwon
3	<i>C. purpurea</i>	<i>Ischaemum antheophoroides</i> MIQ. var. <i>eristachyum</i> HONDA	갯쇠보리 (Gaet soebori)	Suwon
4	<i>C. purpurea</i>	<i>Phleum pratense</i> LINNE	티모시 (Timothy grass)	Suwon

2. 菌核의 分離

麥角 菌核으로 부터 菌株을 分離하는데 GRÖGER-TYLER 法¹⁴⁾을 使用하였다. 즉 菌核을 잘 털어낸 후 50% n-propanol, 4% formaldehyde로 각각 2분간씩 세척 진탕하여 그 表面을 消毒하였다. 다음 滅菌 증류수로 세척한 후 菌核의 表面을 긁어내고 얇게 질라 TYLER-SCHWARTING의 Nutrient medium agar slant¹⁵⁾에 각각 옮겼다. 24±1°C에서 培養後 生成된 菌絲를 계대배양하여 液內 培養에 利用 하였다.

3. 液內 培養

개밀, 새, 갯쇠보리, 티모시에서 채취된 菌核에서 자라난 菌絲를 무균적으로 분리하여 microblendor(Waring Co.)에 옮기고 液內培養用 培地를 少量씩 각각넣고 10초동안 homogenize 하였다. homogenize된 菌絲 10ml를 培養液 100ml씩 넣어 滅菌한 500ml 엘렌다이어 프라스크에 옮긴후 진탕기에서 24±1°C로 250rpm의 速度로 7~10日間 진탕시켜 培養하였다.

여기서 使用한 培地의 種類와 組成은 다음과 같다.

1) 種菌用 培地

Nutrient medium (TYLER and SCHWARTING)¹⁵⁾

2) 液內培養用 培地

Medium A(ABE)⁷⁾

Medium B(Modified STOLL-ABE nutrient medium)¹⁶⁾

Medium C(Alkaloid production medium)¹⁷⁾

Medium D(TYLER and SCHWARTING nutrient medium에서 한천만을 제거)

Medium E(TYLER, SCHWARTING and ABE)

Medium F(MARY and KELLEHER)¹⁸⁾

4. 菌絲의 乾燥 重量

培養한 培養液을 미리 평량한 여과지로 菌絲를 흡인 여과하고 常溫에서 48시간 乾燥시킨後 평량하여 총중량에서 여과지의 중량을 감한 差를 菌絲의 乾燥重量으로 하였다.

5. 알칼로이드의 抽出

여액 100ml 당 10% 암모니아수 1.7ml를 넣어 알칼리성으로 한後 分液여두에 옮기고 同量의 無水 ether을 넣어 30分間 진탕 하였다. ether層을 取하여 水浴上에서 증발농축 한후 증발접시에 옮겨 용매를 완전히 날려 보냈다. 그다음 99% methanol 2ml에 녹여 다음과 같이 T.L.C. 판에 培地와 농축액을 각각 여러번 spotting 하여 麥角알칼로이드 存在 여부를 실험하였다.

6. 麥角 알칼로이드 檢出 및 定量

T.L.C. 판은 silica gel G를 사용하여 常法에 따라 제조하였다.

T.L.C. 판에 methanol溶液을 spotting 하고 자외선 하에서 형광의 유무를 관찰하고 2% p-dimethylaminobenzaldehyde(略字: PDAB) N-HCl 용액을 噴霧하고, 2~3分 후에 다시 1% sodium nitrite溶液을 분무하여 發色되는 靑紫色을 檢査 하였다. 또한 ethylacetate : 95% ethanol: dimethyl formamide¹⁹⁾ (13 : 1 : 1)을 展開溶媒로 해서 60分間 展開시킨후 자외선 하에서 형광의 유무를 관찰하고 2% PDAB, 1% NaNO₂ 溶液을 분무하여 發色되는 각 알칼로이드 spot의 Rf值를 계산 하였다.

알칼로이드 定量은 MICHELON-KELLEHER 法을²⁰⁾ 이용하였다. 알칼로이드 溶液을 정확히 취해서 0.1% PDAB 溶液 2ml씩을 정확히 加해서 10分間 방치하여 0.1%

sodium nitrite 溶液을 증석에서 調劑하여, 0.1ml 씩 加하여 잘 섞어서 發色되는 靑紫色을 590nm에서 Spectronic 20을 利用하여 optical density를 측정하여 比色 定量하였다.

7. 菌絲의 形態

菌株를 分離하여 液內培養液에서 10日間 成長한 후 菌絲를 無菌的으로 種菌 loop를 使用하여 slide 上에 놓고 各개의 hyphal strand의 관찰을 쉽게 하도록 分解시켰다²¹⁾ HRUSHOVETZ^{22,23)} 등의 방법을 기초로 하여 各菌絲를 無水 ethanol: 氷초산 : full strength lactic acid (6 : 1 : 1)로 10分間 고정시켰다. 증류수로 씻은후 菌絲를 실온에서 1N-HCl로 4分間 처리한다. 그후 55°C에서 10分間 처리하여 맑게 했다. 균사를 다시 0.2M-KH₂PO₄ 50ml에 0.2M-NaOH로 pH 6.9되게 하여 증류수로

200ml로 만든 완충액으로 씻었다.

그후 hyphal cell內에 核를 분명히 식별하기위해 핵 염색 용액을 使用 했다. 염색 stock solution은 glycerin 10ml에 GIEMSA 색소 1g을 용해시켜 55°C에서 4시간 oven에서 加熱시킨후 methanol 10ml를 加하여 調整하였다. 이 stock solution 1ml에 완충액 4ml의 比率로 하여 시료를 10分間 염색 시키고 菌絲가 脫色될 때까지 씻은 후 菌絲를 1000배로 觀察 했다.

결과 및 고찰

1. 菌絲의 形態

개밀에 寄生한 菌核의 菌株를 Medium D에 液內培養 시켜 10日 경과후 菌絲를 取하여 인공한 염색을 하여본 결과 Fig. 1과 같다.



Fig. 1. Morphology of the mycelium grown in submerged culture. (1000×)

2. 麥角菌의 液內 培養

麥角 菌核 4種으로부터 分離하여 사면배지에서 成長시킨 菌絲를 液體培地인 Medium D에 移植하여 液內 培養을 시행한바, 成長된 균사의 건조중량과 알칼로이드 검출 시험 결과는 Table II와 같다.

Table II. Mycelial growth of four ergot strains in submerged culture in Medium D.

Sclerotium No.	Dry wt. of mycelium (g/100ml medium)	Detection of alkaloid
1	0.76	negative
2	0.48	negative
3	0.41	negative
4	0.41	negative

Table II에 表示된 바와같이 液內 培養하는데 成功하였다.

이들 4種의 菌株 1호, 즉 *Agropyron semicostatum* NEES에 寄生한 麥角 菌株의 成長이 가장 良好하였다.

그러나 麥角 알칼로이드에 대하여 檢出試驗을 행하였을 때 모두 음성으로 나타났다. 따라서 Medium D에서는 菌絲의 成長은 이루어 졌지만 알칼로이드가 生成되지 않았으므로 다른 6種의 培地를 선정하여 다시 液內培養 을 試圖하였다. 뿐만아니라 4種의 菌株中 金과 共同研究 者들의 연구^{10,11)}에서 麥角 알칼로이드가 비교적 많이 함유된 것으로 보고된 개밀의 맥각에서 分離한 菌株를

Table III. Mycelial growth and alkaloid production of "Gae-mil" ergot strain in various media.

Medium	Dry wt. of mycelium (g/100ml medium)	Detection of alkaloid
A	0.40	negative
B	0.49	trace
C	0.75	positive
D	0.97	trace
E	0.32	trace
F	0.82	negative

上記한 6種의 培養液에 接種하여 試驗하였다.

이렇게 液內 培養하여 얻은 菌絲의 건조증량과 알칼로이드 生成여부는 다음 Table III과 같다.

Table III에서 보는바와 같이 菌絲의 成長은 Medium C, D 및 F에서 비교적 良好하였고, 알칼로이드 生成은 Medium C의 배양액에서 檢출하는데 成功하였다.

3. 알칼로이드의 生成

培養이 끝난후 菌絲를 여과하고 여액을 ether로 抽出 농축 하였다. 이때 菌株를 심지 않은 培養液 Medium C 자체도 똑같이 ether로 추출 농축 하였다.

A	·		A
B	⊙	·	B
C	⊙		C
D	⊙	·	D
E	·	·	E
F	·		F
AGRO- CLA- VINE	⊙		
EXTRACT		MEDIUM	

Fig. 2. Detection of ergot alkaloids.
black dots: positive.

그리고 生成된 알칼로이드의 定量을 試圖하였으나 성공치 못하였다. 즉 이것은 生成量이 적기 때문이며 定量이 可能할 정도의 알칼로이드를 生成시키기 위해서는 앞으로 突然變異를 誘發시켜 菌株를 改良하고 나아가서 培地의 組成과 培養條件을 再調整 하여야만 된다고 사료되는 바이다.

앞에서 개밀의 麥角 菌株의 液內 培養液에서 生成된 알칼로이드가 2種이라는 사실은 著者들이⁵⁾ 개밀에 寄生된 麥角 菌核 자체에서 檢出된 알칼로이드도 2種이라는 結果 一致되는 것은 興味있는 일이다. 과연 이들 알칼로이드 2種이 완전히 同一한 物質이냐에 여부에 대하여는 改良된 菌株를 利用하여야 可能할 것이다.

이 두가지 농축액을 박층판 및 여지에 각각 spotting 하여 PDAB시약을 분무하였을때 균주를 接種하여 발효시킨 배양여액에서만 알칼로이드가 檢出되고 Medium C 자체에서는 아무 墨色이 나타나지 않았다(Fig. 2).

이 결과 그 알칼로이드는 墨色 菌株의 발효에 의해 生成된 것임을 확인할 수 있었다. 이와같이 生成된 알칼로이드의 종류를 알아보기 위하여 Medium C의 발효 농축액을 T.L.C 法으로 分析하였다. 그 結果 2개의 알칼로이드 spot가 墨色되었고 Rf치는 각각 0.69 와 0.80 이었다(Fig. 3).

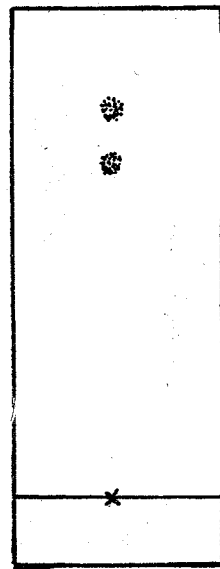


Fig. 3. Chromatogram of the extract.

결 론

液內 培養에서 菌絲의 成長과 알칼로이드 生成이 可能한 麥角 菌株를 分離할 目的으로 韓國產 禾本科 植物에 寄生한 菌核으로부터 麥角 菌株를 分離하였으며 이들을 液內培養하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 개밀, 새, 갯쇠보리, 티모시에 기생된 菌核으로부터 분리한 菌株는 모두 배양액D에서 그 菌絲가 成長하였다.
2. 개밀의 麥角 菌核으로부터 분리한 菌株를 6種의 培養液에서 液內培養 하였을때 菌絲의 成長은 배양액 C, D 및 F에서 잘 이루어졌으며 알칼로이드 生成은 배

양액 C에서만 검출되었다. 따라서 이 菌株에 대하여는 배양액 C가 비교적 適合함을 알았다.

3. 生成된 알칼로이드의 종류가 2종임을 밝혀 내었다.

감사의 말씀

이 연구에 대하여 격려를 보내주신 미국 Washington 대학교 약학부장 겸 생약학교실 주임교수 Lynn R. BRADY박사, Purdue 대학교 약학대학 학장 Varro E. TYLER박사 그리고 Connecticut대학교 약학대학 학장 Arthur E. SCHWARTING박사와 William J. KELLEHER박사께 깊이 감사하는 바이다.

(1974. 11. 20 접수)

문헌

- 1) KIM, B.K.: *J. Dong Yang Pharm.* 2, 116(1960).
- 2) ABE, M., YAMANO, T., KOZU, Y., and KUSUMOTO, M.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 25, 458 (1952).
- 3) ABE, M., YAMANO, T., KOZU, Y., and KUSUMOTO, M.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 29, 697 (1955).
- 4) KIM, B.K.: *J. Pharm. Soc. Korea* 12, 85 (1968).
- 5) BONNS, W.W.: *Am. J. Botany* 9, 339 (1922).
- 6) ABE, M.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 20, 275, 353, 405 (1944), 513 (1945).
- 7) ABE, M., YAMANO, T., YAMATODANI, S., KOZU, Y., KUSUMOTO, M., KOMATSU, H., and YAMATA, S.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 34, 580 (1960).
- 8) TYLER, V.E., Jr.: *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* 47, 787 (1958).
- 9) BRADY, L.R., and TYLER, V.E., Jr.: *Lloydia* 23, 8 (1960).
- 10) KIM, B.K., HWANG, S.H., AUUCK, S., and LEE, E.K.: *Kor. J. Pharmacog.* 4, 23 (1973).
- 11) KIM, B.K., HWANG, S.H., CHOI, E.C., and KWON, C.H.: *Korean Biochem. J.* 7, 39 (1974).
- 12) KIM, B.K., KELLEHER, W.J., and SCHWARTING, A.E.: *Korean Biochem. J.* 5, 37(1972).
- 13) KELLEHER, W.J., KIM, B.K., and SCHWARTING, A.E.: *Lloydia* 32, 327 (1969).
- 14) GRÖGER, D., TYLER, V.E., Jr., and DUSENBERRY, J.E.: *Lloydia* 24, 97 (1961).
- 15) TYLER, V.E., Jr., and SCHWARTING, A.E.: *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* 41, 590 (1952).
- 16) ABOU-CHAAR, C.I., GRÖGER D., BRADY, L.R., and TYLER, V.E., Jr.: *Lloydia* 24, 159 (1961).
- 17) PIERCE, W.C.: "Quantitative Analysis," John Wiley, N.Y., 49 (1973).
- 18) MARY, N.Y., KELLEHER, W.J., and SCHWARTING, A.E.: *Lloydia* 28, 218 (1965).
- 19) GRÖGER, D., and TYLER, V.E., Jr.: *Lloydia* 26, 174 (1963).
- 20) MICHELLON, L.E., and KELLEHER, W.J.: *Lloydia* 26, 192 (1963).
- 21) ROBBERS, J.E., JONES, L.G., and KRUPINSKI, V.M.: *Lloydia* 37, 108 (1974).
- 22) HRUSHOVETZ, S.B.: *Can. J. Bot.* 34, 641 (1956).
- 23) KNOX-DAVIES, P.S., and DICKSON, J.G.: *Amer. J. Bot.* 47, 328 (1960).
- 24) SIDDIQUI, M.R., and KHAN, I.D.: *Trans. Mycol. Soc. Japan* 14, 195 (1973).
- 25) LEE, E.K., CHUNG, B.C., and LEE, S.C.: *Kor. J. Pl. Prot.* 9, 49 (1970).