

## 동충하초(冬蟲夏草)의 단백다당류 생성 특성

최용욱 · 이영엽 · 정용영 · 권태영 · †정용준  
전주대학교 자연과학부

### Properties in Formation of Protein-Binding Polysaccharide in *Cordyceps militaris*

Yong-Yook Choi, Young-Youp Lee, Yong-Young Jung, Tae-Yong Kwon and †Yong-Joon Chung  
Department of Natural Science, Jeonju University

#### Abstract

The effects of liquid culture conditions and nutrient sources on the formation of protein-binding polysaccharide (PS) in *Cordyceps militaris* were examined. The formation amount of PS was increased in proportion to the growth rate of mycelium, in case of higher aeration or lower acidity. The optimum growth temperature of the mycelia was 25°C for the formation of PS. The optimum carbon source and nitrogen source were glucose and peptone, respectively. The ratio of C/N was optimal with 3% glucose to 0.5 % peptone. The sugar composition in the PS was greatly changed according to the carbon sources. The mycelium of *Cordyceps militaris* by liquid culture showed a higher electron donating ability than that by solid culture.

Key words : protein-binding polysaccharide, *Cordyceps militaris*, electron donating ability.

#### 서 론

동충하초(冬蟲夏草)는 곤충기생균 중의 충체에서 자실체를 외생하는 진균류를 말하며, 국내에서는 80여종이 알려져 있는데<sup>1-3)</sup>, 이들은 상당수가 생리활성 물질을 생성하므로<sup>4,5)</sup> 건강식품으로 각광을 받고 있다. 따라서 근래 들어 급증하는 수요에 한정된 자연산을 대신한 인공재배가 급속히 확산되고 있는 실정이다<sup>6)</sup>. 국내에서 생산되는 동충하초의 대부분은 눈꽃동충하초 (*Paecilomyces japonica*)이며, 최근에는 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris*)의 재배가 점차 늘어나고 있다. 눈꽃동충하초는 불완전아문에 속하나 근연종인 *P. gummii* (Berk)의 유성생식세대가 밝혀지면서

*Cordyceps* 속으로 귀속된 사실로 미루어 볼 때 이종도 *Cordyceps* 속으로의 귀속이 예상되며 동충하초는 분류학적으로 자낭균문의 핵균강, 육좌균목, 맥각균과에 속한다<sup>1-3)</sup>. 동충하초에서 생성되는 주된 생리활성물질은 cordycepin(3'-deoxyadenosine)이며<sup>6)</sup>, cordycepin의 활성에 대해서는 Smuckler와 Hadjiolov<sup>7)</sup>, Blakesley와 Boezi<sup>8)</sup>, Gumpert와 Edelheit<sup>9)</sup> 등이 항세균성을 보고하였고, Lovinger 등<sup>10)</sup>, Richardson 등<sup>11)</sup>은 항바이러스성을 보고하였다. 한편 인체에 대한 생리적 기능에 대해서는 Cory 등<sup>12)</sup>이 항암성을 보고한 이래 수종의 종양에 억제효과가 있다고 밝혀지고 있다<sup>13,14)</sup>. 동충하초에 함유된 생리활성물질은 cordycepin 외에도 단백다당류와 같은 물질을 기대할 수 있는데, 버섯

† Corresponding author : Yong-Joon Chung, Department of Natural Science, Jeonju University, Hyojadong 1 ga 1200, Jeonju, Chonrabukdo 560-759, Korea.

Tel : 82-63-220-2560, Fax : 82-63-220-2054, E-mail : chungyj@jeonju.ac.kr

류의 약리작용에 대한 과학적인 연구는 Lucas와 Ringler<sup>15)</sup>에 의해 그물버섯의 열수 추출물이 암세포의 증식을 억제함이 보고되면서 항암성에 대한 연구가 폭 넓게 전개되고 있다. 또한 생리활성물질의 규명도 활발하게 진행되고 있는데, 상황버섯(*Phellinus linteus*)과 같은 담자균류에서 항암 활성을 나타내는 성분은 주로 단백질다당류 (protein-binding polysaccharide, PS)임이 밝혀지고 있다<sup>16-18)</sup>. 담자균류에서 항암 활성물질로써 분리된 다당류의 조성은 균류의 종류에 따라 차이가 있으나<sup>17,19)</sup> 상황버섯의 경우 glucose가 주를 이루며 galactose를 비롯하여 mannose, arabinose, xylose 등 다양한 종류가 검출되는데  $\beta$ -glucan의 비율이 높을수록 항암 활성이 높은 것으로 알려져 있다<sup>16,17)</sup>. 그러나 구성당의 조성과 활성과의 관계에 대해서는 명확한 결론은 없다. 동충하초 생산을 위한 액체배양에 관한 연구는 Sung 등<sup>20)</sup>은 번데기동충하초 (*C. militaris*), Lee 등<sup>21)</sup>은 풍뎅이동충하초 (*C. scarabaeicola*)의 균사체 배양을 위한 배양이나 영양원에 대한 최적조건을 보고 하였는데 *Cordyceps* 속의 균주는 대부분 PDA배지에서 적합하였으며, 영양상 특별한 제한인자는 없었고, 배지의 pH는 중성부근, 배양온도는 25°C가 가장 적합하였다. 한편 자실체의 생성은 광조사가 필요하고, 생육온도는 18~20°C이며, 많은 습도가 필요하고, 생육기간은 30~50일 정도의 기간이 소요되는데, Choi 등<sup>22)</sup>은 눈꽃동충하초, Sung 등<sup>23)</sup>은 번데기동충하초, Lee 등<sup>24)</sup>은 풍뎅이동충하초의 자실체 생성조건을 규명하였다. 그러나 이들의 연구는 대부분 균사체의 생육이나 자실체의 생성에 국한되었으며, 항암생리활성성분으로 알려진 단백질다당류의 생성조건이나 조성에 미치는 영향에 관한 보고는 아직 없다. 따라서 본 연구에서는 번데기동충하초의 온도, pH, 영양원과 같은 배양조건이 생리활성물질성분인 단백질다당류의 생성에 미치는 영향을 조사하였으며, 배양액, 균사체 및 자실체에서의 단백질다당류 생성 특성을 조사함으로써 액체배양에 의한 생리활성물질의 효율적인 생산방법의 개발 가능성을 타진하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 배양

본 실험에 사용된 눈꽃동충하초와 번데기동충하초는 강원대학교 동충하초 은행에서 분양 받았으며, 인공배지에 의한 액체종균배양은 PDA (potato dextrose agar) 배지에 25°C에서 7일간 배양하여 접종원으로 사용하였고 생산을 위한 기본배지로는 glucose 3%, pep-

tone 1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%,  $\text{MgSO}_4$  0.1%를 사용하였다. 접종 시에는 살균된 cork borer로 선단 부근의 균사체를 떼내어 일정량을 접종하였다. 액체배양에는 500 ml의 합성수지제 배양병에 배양액을 200 ml씩 넣고 5일 간격으로 배양한 후 시료를 취하였다. 천연배지로서 번데기에 의한 동충하초의 재배는 1000 ml 용 내열성 플라스틱병에 100 g 내외의 누에번데기를 넣어 무균화 작업한 후 5~10일 정도 생육시킨 액체종균을 3~5 ml 정도 분사하여 접종하였다. 접종 후 25°C에서 약 7~10일정도 균사 배양하였다. 균사배양 후 생육환경은 20°C에서 습도는 95%로 바꿔주고 환기는 많은 양이 필요하지 않지만 하루에 15분씩 4~6회 정도 반복해서 신선한 공기로 환기시켜 주었다. 또한 자실체를 많이 발아시키기 위해서 광조사는 충분히 밝게 해주었으며 눈꽃동충하초는 약 150~300 Lx, 번데기동충하초는 300~500 Lx의 광조사를 하였다. 그리고 나서 눈꽃동충하초의 경우는 32일 동안 더 배양하였고, 번데기동충하초는 45일 더 배양하여 동결건조한 것을 시료로 사용하였으며 균사체 부분(누에번데기 포함)과 자실체를 각각 분리하여 실험에 사용하였다.

### 2. 배양조건 및 균체생장도 측정

액체배양을 위한 배양온도는 15, 20, 25 및 30°C로, pH는 0.1N HCl이나 0.1N NaOH를 사용하여 4.0에서 7.5까지 조정하였으며, 통기량의 영향은 진탕배양은 130 rpm으로 배양하면서 정지배양과 비교하였다. 균사체의 성장량은 200 ml의 배양액을 거-즈로 가볍게 여과하여 균사체를 모으고, 80°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 칭량한 결과로 생육도를 판정하였다. 동충하초가 생산하는 단백질다당류의 특성을 보다 명확하게 하기 위해 상황버섯 (*Phellinus linteus*), 영지버섯 (*Ganoderma lucidum*) 및 표고버섯 (*Letinula edodes*)의 자연산 및 참나무원목에 재배한 균이(菌耳)와 액체배양액 및 균사체에서 얻어진 단백질다당류를 비교분석하였는데, 액체배양은 동충하초와 동일한 방법으로 시행하였다.

### 3. 단백질다당류의 분리 및 정제

누에번데기에 배양한 시료는 냉동 건조하여 자실체와 균사체를 나누어 분쇄하고, 20배량의 증류수를 가하여, 110°C에서 2시간 가열한 다음, Waring blender에서 10,000 rpm으로 3분간 마쇄하였다. 6,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 모으고, 잔사는 증류수로 2회 세척하여 합하였다. 추출물은 감압농축하고, 4배량의 ethanol을 가하여 냉장고에서 24시간 보관하

였다가 원심분리한 침전물을 냉동건조하고 침량하여 고형물량을 측정하고, 단백다당류의 분석시료로 사용하였다. 액체배양에서는 합성섭유로 된 망사로 자연여과하여 균사체를 분리하여 80°C로 건조시켜서 분쇄하고, 배양액은 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 rotary evaporator에서 농축하여 고체 시료와 같은 방법으로 단백다당류를 분리하였다. 열수 추출에서 추출효율이나 성분의 열안정성을 조사하기 위하여 100~120°C에서 30분~4시간 가열하면서 가열온도와 시간을 달리하여 추출효율을 상호 비교하였다. 동결건조한 추출물은 증류수에 용해하여 증류수에서 5일간 투석하여 재차 동결건조하였다.

#### 4. 다당류의 함량

다당류의 함량은 Hodge와 Hofreiter<sup>25)</sup>의 방법에 따라 phenol-sulfuric acid 법으로 분석하였는데 시료액 1 ml에 5% phenol 1.0 ml와 96% sulfuric acid 5 ml를 가하고 10분 후에 490 nm에서 흡광도를 측정하고, glucose량으로 환산하였다.

#### 5. 다당류의 구성 당 조성

구성 당의 조성은 동결건조한 시료 10 mg에 0.1N HCl 5 ml를 가하여 100°C에서 5시간 가수분해하고, 3배량의 ethanol을 가하여 하룻밤 방치 후, 원심분리한 상등액을 동결건조하여 HPLC로 분석하였다. HPLC에 의한 분석조건은 column은 Aminex 87H, 이동상은 0.007 M sulfuric acid를 0.8 ml/min로 흘려보냈다. 한편 가수분해한 시료의 일부는 10 ml의 cap tube에 넣어 감압건조하고, 1.0 ml의 pyridine을 가하여 60°C에서 15분간 가열하였다. 여기에 hexamethyldisilazane 0.9 ml와 trifluoroacetic acid 0.1 ml를 차례로 가하고 30초간 강하게 진탕한 다음 GC로 분석하였다. GC의 분석조건은 column의 충전제는 OV-17을 사용하였고, 150°C에서 325°C까지 10°C/min으로 승온시켰으며, 주입구와 검출기의 온도는 300°C를 유지시키면서 헬륨가스를 50 ml/min으로 흘려보냈다.

#### 6. 단백다당류의 전자공여능

항산화성과 free radical 소거능은 Brand-Williams 등<sup>26)</sup>의 방법에 준하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 법으로 측정하였다. 즉 시험관에 시료액 1 ml와 증류수 3 ml를 가하여 37°C 항온수조에서 예열하고, 200  $\mu$ mole의 DPPH-acetone 혼합용액을 가하여 반응시켰다. 5분 후에 515 nm에서 흡광도를 구하여 잔존하는 산화형 DPPH의 농도를 측정하였으며, 단백다당류의

환원속도 ( $\mu$ moles/min mg)로 전자공여능을 산출하였다.

## 결 과

### 1. HPLC에 의한 다당류의 분석

다당류표준품을 사용하여 시료를 HPLC에 의해 비교분석한 결과, 대부분의 시료에서 glucose와 galactose가 공통적으로 검출되었으며, 일부 fucose, arabinose, xylose, ribose가 검출되었다. 이때 다당류의 분석한계는 0.03 mg/100 ml였으며 분석조건은 재료 및 방법에 기술한 조건에 따랐다.

### 2. 생리활성물질의 추출 효율

액체배양에 의해 15일간 배양한 동충하초의 자실체를 사용하여 열수 추출시 가열온도와 시간에 따른 단백다당류의 추출효율은 Fig. 1과 같다. 단백다당류는 비교적 안정된 화합물이나 고온에서 장시간 가열하면 일부 파괴된다는 점에서 균사체에서의 추출조작은 대부분 110°C에서 2시간 가열하고, 실온에서 냉각 후 warring blender로 파쇄하였다. 단백다당류의 추출효율은 100°C에서는 가열시간이 경과하면서 점차 증가하여 30분 가열에 비해 18% 가량 추출효율이 증가하였으며, 120°C에서는 30분에서 최고치를 보이고 점차 하락하므로써 열에 의한 파괴 가능성을 보였다. 110°C에서는 가열 2시간 후 최고치를 보이고, 4시간 후에도 큰 변화가 없어 단백다당류의 추출을 위한 가장 효율적인 조건으로 생각되었다.

### 3. 탄소원의 영향

탄소원을 달리한 배지에서 균사체의 성장도와 단백

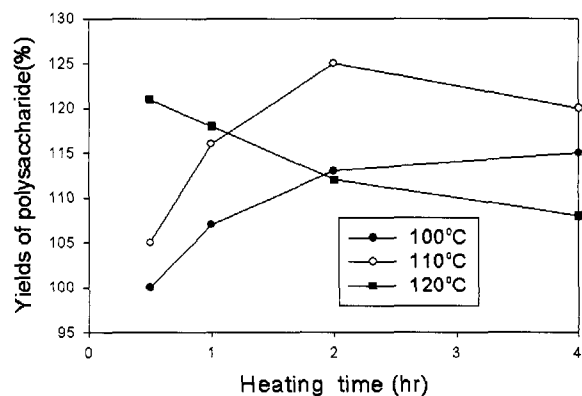


Fig. 1. The yield of protein-binding polysaccharide from mycelium and fruiting bodies of *Cordyceps militaris* by hot-water extraction.

다당류의 생성량을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 단백질 다당류의 생성량은 균체와 배양액에서 상당한 생성량의 차이를 보였으며 탄소원에 따른 생성량은 배양액에서는 탄소원에 따라 차이가 그다지 크지 않았으나 균체에서는 xylose를 제외한 모든 탄소원에서 배양액 100 ml당 30 mg 이상의 생성량을 보였으며, 그 중 glucose, sucrose, 전분 순으로 비교적 높은 생성량을 보여 주었다. 이러한 현상은 균사체의 생육량과 관련이 있는 것으로 생각된다. 탄소원을 달리한 배양액에서 단백질 다당류를 분리하여 구성단당류의 조성을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 탄소원에 따라 다당류에서 구성단당류의 조성은 상당히 큰 차이를 보여 glucose의 투

여에서는 주당(周糖)이 glucose 였으나 mannose, galactose 및 lactose를 투여하면 galactose가 주당 내지는 glucose와 비슷한 수준으로 증가하고, mannose의 구성비도 높아졌는데, 배지의 당종류에 따라 다당류의 조성이 변화함은 Lee 등<sup>26)</sup>의 보고에서도 확인되었다. 그러나 전반적으로는 액체배양에서는 glucose 이외의 단당류는 함량이 감소하는 경향을 보였다. 진균류에서 유래하는  $\beta$ -glucan은 galactose의 비율이 높은 편인데<sup>26)</sup>, 단당류의 조성이 활성에 미치는 영향은 미지이나 자연산과의 비교에 의해 간접적으로 유추하고 있으며, 액체배양시 필요에 따라서는 탄소원의 조합으로 이 점은 해결이 가능하다고 생각된다.

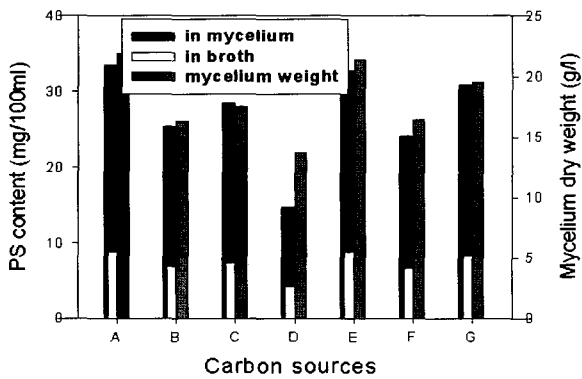


Fig. 2. The effect of carbon sources on the formation of protein-binding polysaccharide in *Cordyceps militaris* at 25°C for 15 days.

A : glucose, B : mannose, C : galactose, D : xylose, E : sucrose, F : lactose, G : starch.

Table 1. The effect of carbon sources on sugar composition in protein-binding polysaccharide isolated from mycelium of *Cordyceps militaris*

Carbon <sup>1)</sup> sources	Ratio to glucose					
	Gal	Man	Fuc	Xyl	Ara	Rib
Glucose	0.59	0.23	0.08	0.04	0.01	0.01
Mannose	0.84	0.65	0.03	0.01	-	-
Galactose	1.23	0.78	0.04	0.01	0.01	0.02
Xylose	0.98	0.63	0.05	0.02	-	-
Sucrose	0.47	0.22	0.04	0.01	0.01	-
Lactose	0.98	0.64	0.03	0.01	-	0.03
Starch	0.87	0.55	0.06	0.01	-	-

<sup>1)</sup> Gal : galactose, Man : mannose, Fuc : fucose, Xyl : xylose, Ara : arabinose, Rib : ribose.

#### 4. 질소원의 영향

균사체의 생육과 배양액에서 생리활성물질의 생성에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해 단백질 다당류의 함량을 조사한 결과는 Fig. 3과 같았다. 질소원에 따른 균체내 다당류의 함량도 균체량에 비례하는 경향을 보였다. 균체내에서나 배양액에서 모두 peptone을 질소원으로 사용한 경우가 가장 높았고, urea가 가장 낮았으나 전반적으로 질소원에 따른 차이는 그다지 크지 않았다. 결과적으로 sodium nitrate나 ammonium nitrate도 peptone과 거의 비슷한 성장수준으로 액체배양 시 무기태 질소원으로 충분히 사용 가능한 것으로 생각된다.

#### 5. C/N율의 영향

배양액의 C/N율에 따른 단백질 다당류의 생성량은 Fig. 4와 같다. 배지의 C/N비율에 따른 단백질 다당류의 생성량은 균사체의 생육에 비례하는 경향을 보여 glucose/peptone의 비율이 2~3%/0.5%일 때 가장 왕성하였

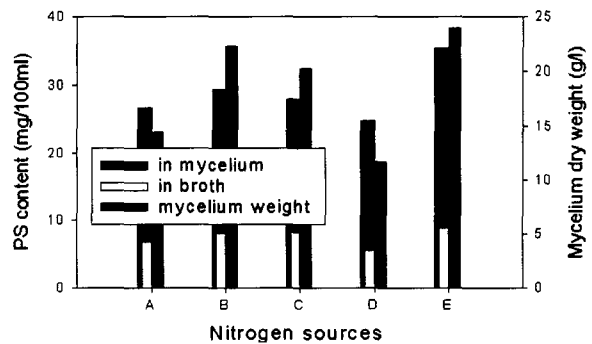


Fig. 3. The effect of nitrogen sources on the formation of protein-binding polysaccharide in *Cordyceps militaris* at 25°C for 15 days.

A : ammonium sulfate, B : sodium nitrate, C : ammonium nitrate, D : urea, E : peptone.

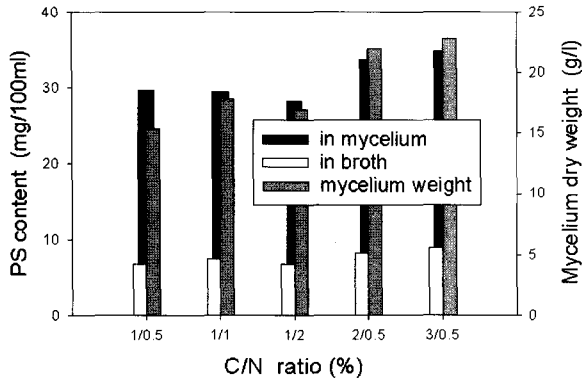


Fig. 4. The effect of C/N ratio<sup>1)</sup> on the formation of protein-binding polysaccharide in *Cordyceps militaris* at 25°C for 15 days.

<sup>1)</sup> C/N ratio = glucose % : peptone %.

으나 균체에서의 함량은 건조균체에 대해 29.7~ 33.8 mg/100ml 수준으로 C/N율에 크게 영향을 받지 않았다. 따라서 glucose 3%에 peptone 0.5%가 최적조건이라고 할 수 있다.

6. 통기량의 영향

통기량에 따른 균사체 및 배양액에서 단백질다당류의 생성량을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 진탕배양시 균체내에는 36.2 mg/100g, 배양액에서는 9.8 mg/100ml인 반면에 정지배양에서는 균체 20.9 mg/100g, 배양액 5.6 mg/100ml로 월등하게 생성량이 낮았다. 이러한 결과는 통기에 의해 산소의 공급량이 증가하면서 과산화물의 생성량도 높아져 가중되는 생리적 stress를 해소할 목적으로 단백질다당류의 생성이 촉진되는 것으로 추정된다.

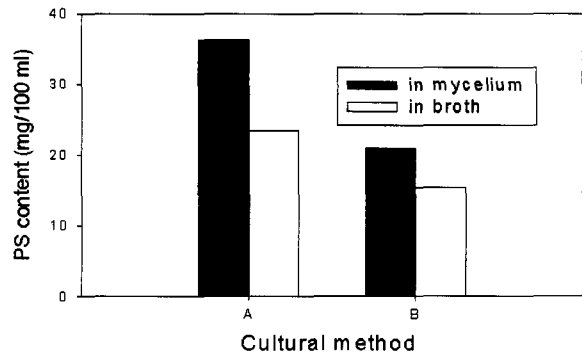


Fig. 5. The formation of protein-binding polysaccharide by culture methods of *Cordyceps militaris* at 25°C for 15 days.

- A : shaking culture (130 rpm/min.),
- B : stationary culture.

7. 배양온도의 영향

배양온도별로 배양액과 균사체에서 단백질다당류의 생성량을 조사한 결과는 Fig. 6 및 Fig. 7과 같다. 균사체에서 혹은 배양액에서 단백질다당류의 함량을 조사한 결과는 30°C에서 생성속도가 가장 빠르게 진행되어 배양 9일 이후에 최고치에 달하였으며, 온도가 낮을수록 생성량도 낮아졌다. 일반적으로 물질의 생산능력은 균체량에 비례하나 이러한 결과가 얻어졌다는 것은 단백질다당류의 생성이 단순히 물질생산의 보유능력에 좌우되기보다는 생리적 stress에 대한 자기방어적 필요에 의해서 생산되는 것으로 온도가 높을수록 호흡량이 증가하므로써 superoxide anion과 같은 산화물의 증가에 대항하기 위해 생성량이 증가하였다고 볼 수 있다. 결국 단백질다당류의 생산을 위해서는 30°C의 고온이 유리하다고 할 수 있다.

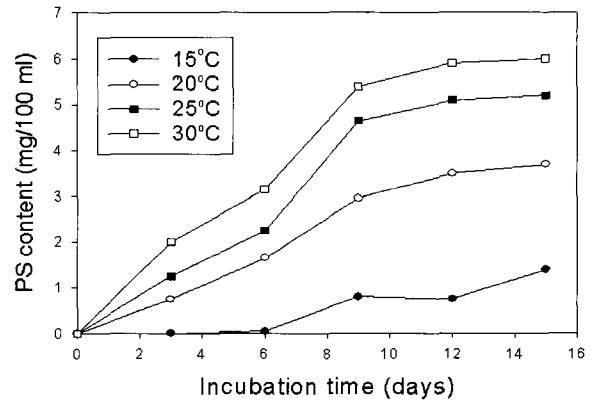


Fig. 6. The effect of incubation time on the formation of protein-binding polysaccharide in culture broth of *Cordyceps militaris*.

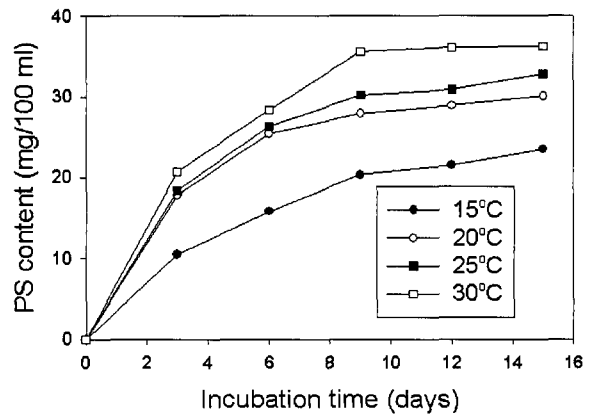


Fig. 7. The effect of incubation time on the formation of protein-binding polysaccharide in mycelium of *Cordyceps militaris*.

### 8. pH의 영향

배지의 산도를 달리하여 번데기동충하초를 23°C에서 10일간 배양하고, 배양과 균사체에서의 단백다당류를 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 다당류 생성량은 균체와 배양액이 pH 4.5에서 가장 높은 함량을 보였고, pH가 상승하면서 약간 낮아지는 경향을 보였다.

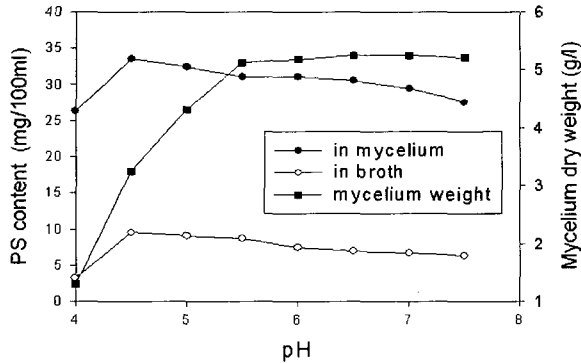


Fig. 8. The effect of pH on the formation of protein-binding polysaccharide in *Cordyceps militaris* at 25°C for 15 days.

또한 pH 5.0 이상에서 왕성한 균체의 증식에도 불구하고 균체량에 대한 생성비가 낮은 pH에서는 높은 반면 이에 반해서 pH가 높아지면 생성비가 상대적으로 낮아짐으로써 산도가 높을수록 단백다당류의 생성이 촉진되는 경향을 보였다. 이러한 현상은 온도의 경우에서와 같이 산도가 높아지면서 증가되는 생리적 stress에 대한 자가방어적 기능으로 다당류의 생성량이 높아졌던 것으로 추정된다.

### 9. 단백다당류의 함량 비교

버섯류에서 기대되는 생리활성물질 중 면역증진이나 항암성으로 가장 유망한 물질로 단백다당류<sup>27)</sup>를 들 수 있는데, 번데기동충하초 (*Cordyceps militaris*)의 액체배양에 의해 얻어지는 단백다당류의 특성을 보다 명확하게 파악하기 위해 기존의 항암성이 인정된 버섯 중 실제 재배되고 있는 4종의 버섯류를 대상으로 자실체, 균사체 및 배양액을 열수 추출방법에 의하여 얻어진 고형물량과 단백다당류의 함량을 조사, 비교한 결과는 Table 2와 같다. 식용으로 재배되는 표고버

Table 2. Relationship between electron donating ability and the content of solid and protein-binding polysaccharide isolated from cultivated mushrooms

Mushrooms	Solid <sup>1)</sup> (g%)	Protein-binding polysaccharide	
		PS <sup>2)</sup> (mg%)	Electron donating ability ( $\mu$ moles / min mg)
<i>Ganoderma lucidum</i>			
Wild fruit body	3.00	632.1	33.78
Cultured fruit body	1.75	691.1	11.90
Mycelium in broth	0.96	50.2	40.88
<i>Phellinus linteus</i>			
Cultured fruit body	1.24	339.6	15.01
Mycelium in broth	1.03	630.6	9.87
<i>Lentinula edodes</i>			
Cultured fruit body	1.91	890.3	30.66
Mycelium in broth	0.84	181.0	6.11
<i>Cordyceps militaris</i>			
Cultured fruit body	2.07	318.1	22.14
Mycelium in larvae	5.12	661.9	18.29
Mycelium in broth	1.12	231.3	29.54

<sup>1), 2)</sup> Dry weight base with g/100g and mg/100g, respectively. Samples were prepared by steaming extraction at 110°C for 2 hr, precipitated with ethanol at 80% level.

<sup>2)</sup> PS : amount of protein-binding polysaccharide.

섯 (*Lentimula edodes*)이나 느타리버섯 (*Peurotus ostreatus*) 등과 높은 생리적 효능이 인정되는 상황버섯 (*Phellinus* sp.), 영지버섯 (*Ganoderma lucidin*), 번데기 동충하초 등은 비교적 많은 양의 고형물추출량을 보였는데, 재배품과 자연산을 동시에 구할 수 있는 영지버섯의 경우 재배품의 1.75 g/100 g (dry weight base)에 비해 자연산은 3.00 g/100 g (dry weight base)로 큰 차이가 있다. 이러한 현상은 버섯의 생육조건이 달라지는데서 오는 결과이다. 또한 보편적으로 액체배양시 고체배양보다 고형물의 용출량은 1/2 정도 낮은 경향을 보였다. 번데기동충하초의 경우에는 자실체 2.07 g/100 g (dry weight base)에 대해 균사체가 5.12 g/100 g (dry weight base)로 2배 이상 높으나, 배지로 사용된 누에번데기에서는 많은 양의 수용성 고형물이 용출되었던 것으로 생각된다. 단백다당류의 함량은 영지버섯의 경우 자연산 632.1 mg/100g (dry weight base)에 대해 재배품은 691.1 mg/100g (dry weight base)로 재배품이 약간 높으나 큰 차이로 할 수는 없으며, 일반적으로 자연산을 선호하는 경향이 있으나 본 실험결과로는 이러한 속설을 인정할 수 없었다. 상황버섯은 정확한 종이 규명되지 않고 있는데 참나무에 배양한 자실체가 339.6 mg/100 g (dry weight base)로 함유하고 있는데 비해서 액체배양의 경우에는 630.6 mg/100 g (dry weight base)로 높은 함량을 보여주었다. 즉, 원목재배는 재료의 구입이나 가공, 살균, 접종 등에 많은 노력이 필요하며, 재배기간도 최소 1~2년 이상의 장시간이 소요되는 등 많은 어려움이 있지만, 액체배양은 배양기간이 짧고 재료 구입이 용이하여서, 실용성이 대단히 높다고 할 수 있다. 따라서 표고, 느타리, 번데기동충하초의 액체배양에서도 충분한 대량생산의 가능성을 발견할 수 있었다.

#### 10. 전자공여능의 측정

Brand-Williams 등<sup>28)</sup>이 제안한 DPPH를 이용한 전자공여능의 측정법은 30분 이상 장시간 반응을 시키는데, 영지버섯(*Ganoderma lucidin*) 및 구름버섯(*Coriolus versicolor*) 추출물을 이용하여 예비실험을 행한 결과, 조사한 DPPH 환원반응 경과에는 Fig. 9와 같다. 단백다당류에 의한 DPPH의 환원반응은 초기의 5분 이내에 대부분 이루어졌다. 따라서 이 방법을 이용할 경우에는 초기반응속도를 구하여 전자공여능을 비교, 평가하는 것이 보다 정확한 결과를 얻을 수 있다. 따라서 이러한 기초실험결과를 바탕으로 동충하초를 비롯한 4종의 대표적 버섯류의 자실체, 균사체 및 배양액에서 분리한 단백다당류에 대한 전자공여능을 측정비

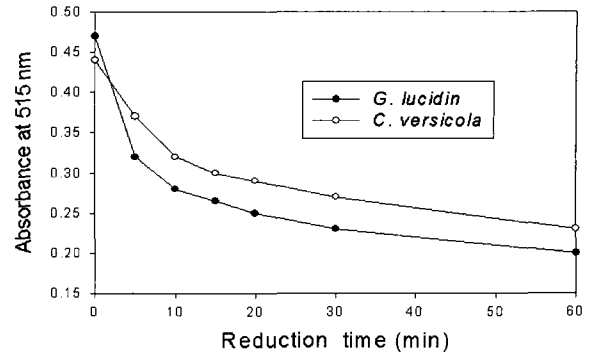


Fig. 9. The DPPH<sup>1)</sup> reduction by protein-binding polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidin* and *Coriolus versicolor*.

<sup>1)</sup> DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

교하였다 (Table 2). 그 결과 자연산 영지버섯의 자실체에서 분리한 단백다당류는 33.78  $\mu\text{mole}/\text{min mg}$ , 인공 재배 영지버섯에서는 11.90  $\mu\text{mole}/\text{min mg}$  등으로 전자공여능에 상당한 차이가 있으나 균사체 배양액에서 분리한 다당류의 경우, 40.88  $\mu\text{mole}/\text{min mg}$ 으로 월등 높아 고무적인 결과를 보였다. 반면에 참나무 환목에 배양한 상황버섯의 경우, 15.01  $\mu\text{mole}/\text{min mg}$ , 표고버섯의 경우, 30.66  $\mu\text{mole}/\text{min mg}$  등으로 높은 활성을 보였으나 균사체배양액에서는 상대적으로 낮은 전자공여능을 나타내었다. 본 실험의 번데기동충하초의 경우, 균체의 각 부위별로 조사한 결과 자실체 22.14  $\mu\text{mole}/\text{min.mg}$ , 균사체와 번데기 18.29  $\mu\text{mole}/\text{min mg}$ , 배양액 29.54  $\mu\text{mole}/\text{min mg}$ 으로 균체의 부위에 상관없이 높은 활성을 보였으며, 이러한 결과로부터 번데기동충하초의 경우에도 액체배양에 의해서도 충분히 유용한 물질을 생산할 수 있다는 가능성을 제시하는 자료라고 생각된다.

#### 요 약

국내에서 재배되고 있는 번데기동충하초 (*Cordyceps militaris*)의 배양조건과 영양원이 균사체의 생육과 단백다당류 생성에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 탄소원에 따른 단백다당류의 생성량은 균체와 배양액에서 glucose, sucrose, 전분의 순으로 30 mg/100ml 이상의 생성량을 보였다. 또한 탄소원에 따른 단백다당류를 구성하는 단당류의 조성은 크게 달라졌다. 탄소원과 질소원에 따른 단백다당류의 생성은 glucose와 peptone에서 가장 높았으며 탄소원과 질소원의 비율(C/N비)은 glucose 3%에 peptone 0.5%의

합량이 균체의 증식이나 단백다당류 생성에 가장 좋았다. 단백다당류의 생성량은 균사체 내에서는 진탕 배양에 의해 현저하게 증가하였으며 배지의 산도는 pH 4.5에서 최적을 보였으며 최적배양온도는 25°C이었다. DPPH 법으로 측정된 단백다당류의 항산화능을 측정할 결과, 번데기를 이용한 고체배양보다 액체배양에서 더 높은 전자공여능을 나타내었다.

### 참고문헌

- Jang, YS. and Hong, SW. Notes on unrecorded fleshy fungi of *Cordyceps* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 14(1): 85-88. 1986
- Sung, JM, Kim, CH, Yang, KJ, Lee, HK and Kim, YS. Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *Kor. J. Mycol.* 21(2): 94-105. 1993
- Sung, JM, Lee, HK, Yoo, YJ, Choi, YS, Kim, SH, Kim, YU and Sung, KH. Classification of *Cordyceps* species based on protein banding pattern. *Kor. J. Mycol.* 26(1): 1-7. 1998
- Shim, JY, Lee, YS, Lim, SS, Shin, KH, Hyun, JE, Kim, SY and Lee, EB. Pharmacological activities of *Paecilomyces japonica*, a new type *Cordyceps* sp. *Kor. J. Pharmacogn.* 31(2): 163-167. 2000
- Kim, HW, Kim, YH, Fu, CX, Nam, KS, Lee, SJ, An, HS, Jeong, EH, Yun, SH, Sung, SK, Lee, SJ and Hyun, JW. *In vitro* antitumor activity of ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps militaris* on cancer cell lines from Korean patients. *Kor. J. Mycol.* 29(1): 61-66. 2001
- Cunningham, BKG, Hutchinson, SA., Manson, W and Spring, FS. Cordycepin, a metabolic product from of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and characterisation. *J. Chem. Soc.* 2290-2300. 1951
- Smuckler, EA, and Hadjiolov, AA. Inhibition of hepatic deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in comparison with the effects of amanitin and cordycepin. *Biochem. J.* 129(1): 153-66. 1972
- Blakesley, RW, and Boezi, JA. A kinetic and structural characterization of adenosine-5'-triphosphate: ribonucleic acid adenylyl-transferase from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta.* 414(2): 133-45. 1975
- Gumport, RI, Edelheit, EB. The synthesis of 3'- dATP and its use as an inhibitor of ATP-dependent DNA synthesis in toluene-treated *Escherichia coli*. *Biochemistry* 29: 2804-2809. 1976
- Lovinger, GG, Klein, RA, Gilden, RV and Hatanaka, M. The effect of cordycepin on cell transformation by RNA tumor viruses. *Virology* 55(2): 524-526. 1973
- Richardson, LS, Ting, RC, Gallo, RC and Wu, AM. Effect of cordycepin on the replication of type-c RNA tumor viruses. *Int. J. Cancer* 15: 451-456. 1975
- Cory, JG, Suhadolnik, RJ, Resnick, B and Rich, MA. Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid of human tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 103(4): 646-653. 1965
- Nakamura, K, Yamaguchi, Y, Kagota, S, Kwon, YM, Shinozuka, K and Kunitomo, M. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 79(3): 335-341. 1999
- Kodama, EN, McCaffrey, RP, Yusa, K and Mitsuya, H. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT+) leukemic cells. *Biochem. Pharmacol.* 59(3): 273-81. 2000
- Lucas, EH and Ringler, RL. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. *Antibiotics and Chemotherapy* 7: 1-4. 1975
- Tsukagoshi, S and Ohashi, F. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, Effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Jpn. J. Cancer Res.* 65: 557-560. 1974
- Franz, G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med.* 55: 493-497. 1989
- Lee, JW, Baek, SJ, Bang, BY, Kang, SW, Kang, SM, Kim, BY and Ha, IS. Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 32(3): 726-735. 2000
- Lee, JH, Cho, SM, Ko, KS and Yoo, ID. Effect of cultural conditions on the polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202. *Kor. J. Mycol.* 23(4): 325-331. 1995
- Sung, JM, Choi, YS, Shrestha, B and Park, YJ.



- Cultural characteristics of mycelial growth by *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* 30(1): 1-5. 2002
21. Lee, JK, Choi, YS and Sung, JM. Investigation on cultural characteristics of mycelial growth by *Cordyceps scarabaeicola*. *Kor. J. Mycol.* 28(2): 81-87. 2000
22. Choi, IY, Choi, JS and Lee, WH. The production of artificial fruiting body of *Paecilomyces japonica*. *Kor. J. Mycol.* 27(2): 87-93. 1999
23. Sung, JM, Choi, YS, Shrestha, B and Park, YJ. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* 30(1): 6-10. 2002
24. Lee, JK, Sung, JM and Park, YJ. Investigation of the condition of fruiting body formation by *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* 30(1): 11-17. 2002
25. Hodge, JE and Hofreiter, BT. Determination of reducing sugars and carbohydrates, In *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L. ed.). Vol. I. p. 388. Academic Press, New York. 1962
26. Lee, JH, Cho, SM, Ko, KS and Yoo, ID. Effect of cultural conditions on the polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phelinus linteus* L13202. *Kor. J. Mycol.* 23(4): 325-331. 1995
27. Lee, JW, Baek, SJ, Bang, KW, Kim, YS, Kim, KS. and Chun, UH. Immunomodulatory activities by difference in molecular size of the proteoglycan extracted from *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor. J. Mycol.* 29(1): 15-21. 2001
28. Brand-Williams, W, Cuvelier, ME, and Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25. 1995

---

(2004년 4월 30일 접수)