

Cordycepin 생성을 위한 배양조건 및 배지조성의 최적화

조성준¹ · 이태희¹ · 채대훈² · 한영환*

¹동국대학교 생물학과, ²동서제약(주), 동국대학교 생명과학과

*Cordyceps militaris*의 액체배양시 cordycepin(3'-deoxyadenosine) 생성에 영향을 주는 물리화학적 조건 및 배지 조성의 영향을 조사하였다. 사용된 17종 균주 중에서 *C. militaris* KCTC 6862, *C. militaris* KCTC 16932 및 *C. militaris* DGUM 32003이 우수한 cordycepin 생산성을 보여주었다. Cordycepin 생산에 적합한 최적 온도와 pH는 각각 24 °C와 pH 6.0-10 범위이었다. YM배지에 탄소원으로 glucose를, 질소원으로 tryptone을 각 1% 첨가하였을 때 우수한 cordycepin 생산을 보여주었다. Tryptone을 질소원으로 하는 YMG 액체배지에서 5일간 배양하였을 경우, 39 mg/l의 cordycepin의 농도가 측정되었다. 0.1%의 다양한 인산원을 각각 첨가한 결과, cordycepin 생산을 저해하였다.

Key words □ cordycepin, *Cordyceps militaris*, culture condition, tryptone

동충하초는 포자가 곤충의 유충, 번데기 또는 성충내로 침입하여 기주 안에서 내생 균핵을 만든 후 밖으로 자실체를 형성하고, 성숙된 자실체는 다시 포자를 형성함으로써 다른 곤충에 기생하게 되는 생활주기를 가진다(9). 동충하초속 진균의 분류학적 위치는 자낭균강(Ascomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하며, 전 세계적으로 현재까지 약 800여종의 동충하초가 알려져 있고 이 중 국내에서 채집 및 분류된 것은 78종이다(2).

동충하초가 생성하는 cordycepin(3'-deoxyadenosine)은 핵산계 항생제로 알려져 왔으며, 현재까지 주로 *C. militaris* 및 *C. sinensis* 등의 자실체를 이용하여 추출하고 있다. Cordycepin은 항세균 및 항진균 활성, 항말라리아 활성, 항종양 활성 및 HIV-1에 대한 항바이러스 활성에 관한 약리효능이 연구되어왔다(1, 5, 6, 8, 10).

Cordycepin의 생산은 *C. militaris* 및 *C. sinensis* 등의 고체 배양을 이용한 고비용의 자실체 추출 방법으로 생산되고 있으며, 균사체 및 배양액을 이용한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구는 Cordyceps 속균의 액체배양을 통하여 cordycepin의 대량생산 확립을 목적으로, 배지조성 및 물리화학적 조건이 균사 생육 및 cordycepin의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 균주 및 시약

본 연구에 사용된 Cordyceps 속균은 한국유전자은행(Korean Collection for Type Culture, Daejeon)에서 분양 받은 8종의 균주

와 동국대학교 미생물학실험실(DGUM)에서 보존중인 9종의 균주를 사용하였다. 배지 조성을 위해 사용된 시약은 Difco(Detroit, USA)사 및 국산 특급시약을 사용하였고, 비교 표준품으로 사용된 cordycepin은 Sigma(St. Louis, USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

동충하초 균사의 배양

최적 균사생육 온도 및 pH의 규명을 위하여, 온도를 16, 20, 24, 28, 30, 37°C로 조절한 항온기에 배양하였으며, pH는 초기의 pH 4.0-11 범위에서 수행하였다. 복합배지의 균사생육과 cordycepin 생산에 영향을 미치는 물리화학적 조건을 결정하기 위해 여러 종류의 복합 액체배지를 사용하였다. 첨가된 탄소원, 질소원, 인산원의 이용성에 대한 실험은 YMG 액체배지(0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose)를 사용하였다. 액체배양은 100 ml의 액체배지를 250 ml 삼각플라스크에 넣어 제조한 후 멸균하여 사용하였다. 각 액체배지에 potato dextrose 한천배지(PDA)에 배양된 종균을 cork borer(직경, 10 mm)로 떼어내어 액체배지에 3개씩 접종하여 24°C에서 5일간 120 rpm으로 진탕배양 하였다. 탄소원과 질소원의 첨가는 1%를, 인산원은 최종 농도가 0.1%가 되도록 배지에 첨가하여 사용하였다.

균사 생육의 측정

균사 생육의 측정을 위하여 5일간 배양된 균사 배양액 100 ml를 Whatman No. 2 여과지를 이용하여 여과한 후 여과지의 균사를 105°C에서 24시간 건조하여 건조중량을 측정하였다.

Cordycepin의 정량

Cordycepin 농도의 측정은 Cunningham(3)등의 방법을 변형하여 사용하였다. 24°C에서 5일간 진탕배양 된 Cordyceps속 균의

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 054-770-2213, Fax: 054-770-2515
E-mail: yhhan@dongguk.ac.kr

균사체를 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 분리하였다. 상등액을 4°C에서 원심분리 (5,000 × g, 20분)하여 침전물을 제거하였다. 침전물을 제거한 여액을 membrane filter(Whatman, pore size 0.2 μm)를 이용하여 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Watchers(Watchers 120 ODS-AP, 260 nm)를 사용하였으며, 이동상은 KH₂PO₄ 8.84 g과 tetrabutyl ammonium chloride 0.32 g을 980 ml의 증류수에 녹인 다음 acetonitrile 20 ml을 첨가하여 사용(유속, 1.0 ml/min)하였다. Cordycepin 농도는 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma사에서 구입한 표준품으로 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다. 분석결과는 3회 분석한 평균값으로 표시하였다.

결과 및 고찰

Cordycepin 생산 균주의 선발

17종의 균주에 사용된 모든 복합배지에서의 균사생육은 큰 차이를 보였으며, PI배지를 사용하였을 경우 우수한 균사생육을 보여주었다. 복합배지별 각 균주들의 cordycepin 생산은 C.

militaris KCTC 6862, *C. militaris* KCTC 16932 및 *C. militaris* DGUM 32003에서 우수한 결과를 보였으며, YMG 액체배지에서 대체적으로 높은 cordycepin 생산성을 보여주었다. 상기 균주들의 cordycepin 생산성은 Cunningham(3)등의 보고와 비슷한 결과를 보였다(Table 1).

Cordycepin 생산의 최적 온도 및 pH

Cordyceps 속균의 cordycepin 생산성의 최적 온도 규명을 위하여 16~37°C에서 균사를 배양한 결과, 24°C에서 우수한 cordycepin 생산성(19.6 mg/l)을 나타내었다(Fig. 1). 초기 pH의 영향은 pH 4.0~11 범위에서 결정하였다. 초기의 pH가 5.0 이하이거나 11 이상인 경우에는 cordycepin 농도가 현저하게 낮아졌으나, pH 6.0~10 범위에서는 16~19 mg/l로 일정하였다(Fig. 2).

탄소원과 질소원의 첨가에 따른 cordycepin 생산 영향

YMG 배지에 다양한 탄소원을 1%씩 첨가하였을 때, *C. militaris* DGUM 32003에서 glucose를 첨가한 경우가 cordycepin 생산성이 37 mg/l로 우수한 cordycepin 생산성을 보여주었다(Fig.

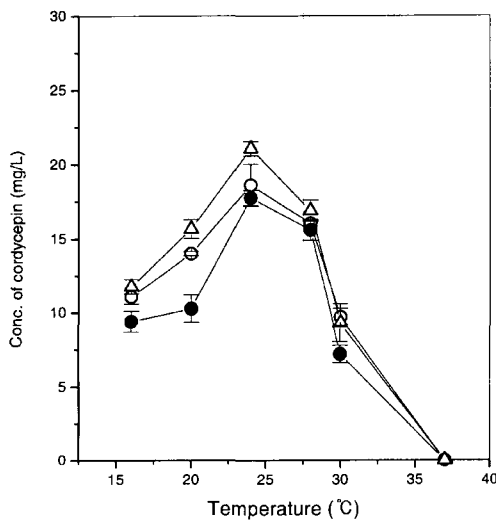


Fig. 1. Effect of temperature on the production of cordycepin of *C. militaris*. The cultivation was carried out for 5 days in the YMG broth (pH 6.0). Symbol ○-○, *C. militaris* KCTC 6682; ●-●, *C. militaris* KCTC 16932; △-△, *C. militaris* DGUM 32003.

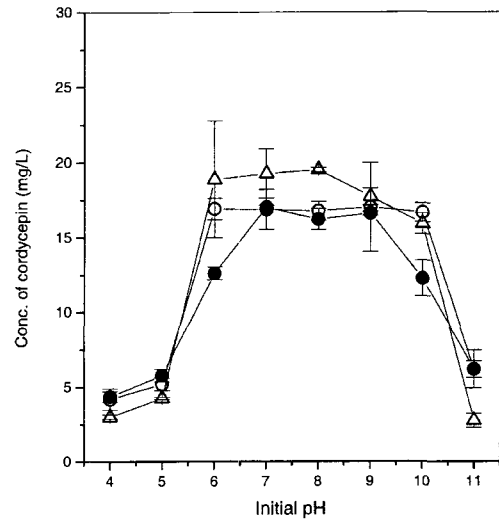


Fig. 2. Effect of initial pH on the production of cordycepin of *C. militaris*. The cultivation was carried out at 24°C for 5 days in the YMG broth. Symbol ○-○, *C. militaris* KCTC 6682; ●-●, *C. militaris* KCTC 16932; △-△, *C. militaris* DGUM 32003.

Table 1. Effect of complex media on the production of mycelia and cordycepin of *Cordyceps militaris*

Strain	Production ^a	CV ^b	MC	PI	YM	YMG
KCTC 6862	Mycelia	8.2±0.1	3.5±0.3	8.4±0.5	3.8±0.1	5.5±0.1
	Cordycepin	21.9±0.1	1.7±0.3	22.4±0.3	21.0±0.1	21.2±0.9
KCTC 16932	Mycelia	5.2±0.2	2.9±0.3	5.6±0.01	3.4±0.1	3.8±0.1
	Cordycepin	15.0±1.4	21.5±7.2	23.2±1.1	1.0±0.1	21.9±6.2
DGUM 32003	Mycelia	7.2±0.1	2.7±0.1	14.7±0.2	5.9±0.2	6.8±0.1
	Cordycepin	22.2±1.9	5.5±0.1	25.2±0.3	0.5±0.1	26.4±0.9

^aMean ± standard deviation for mycelia (g/l) and cordycepin (mg/l)

^bThe cultivation was carried out at 24°C for 5 days in following media: CV; *Coriolus versicolor*, MC; mushroom complex, PI, *Phellinus igniarius*; YM; yeast extract-malt extract, YMG; YM+glucose.

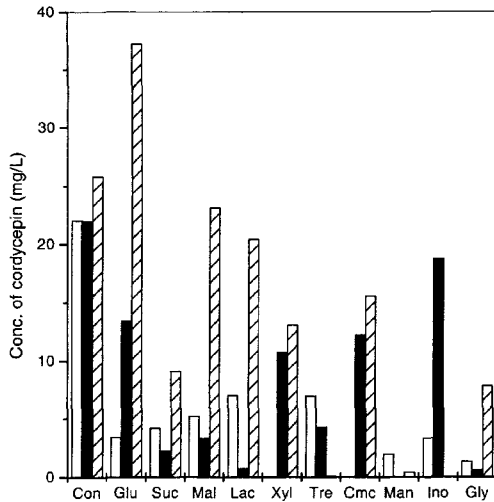


Fig. 3. Effect of carbon source on the production of cordycepin of *C. militaris*. The cultivation was carried out at 24°C for 5 days in the YMG broth with 1% each carbon source (Con, control; Glu, glucose; Suc, sucrose; Mal, maltose; Lac, lactose; Xyl, xylose; Tre, trehalose; Cmc, CMC; Man, mannitol; Ino, inositol; Gly, glycerol). Symbol □, *C. militaris* KCTC 6682; ■, *C. militaris* KCTC 16932; ▨, *C. militaris* DGUM 32003.

3). Maltose에서는 대조군과 비슷한 cordycepin 생산성을 보여주었으나, 다른 종류의 탄소원 첨가 시에는 비교적 저조하였다.

YMG 배지에 다양한 질소원을 1%씩 첨가하여 cordycepin 생산성에 미치는 영향을 실험한 결과, tryptone을 첨가하였을 때, *C. militaris* DGUM 32003에서 cordycepin 생산성이 39 mg/l로 가장 우수한 cordycepin 생산성을 보여주었다(Fig. 4). Tryptone을

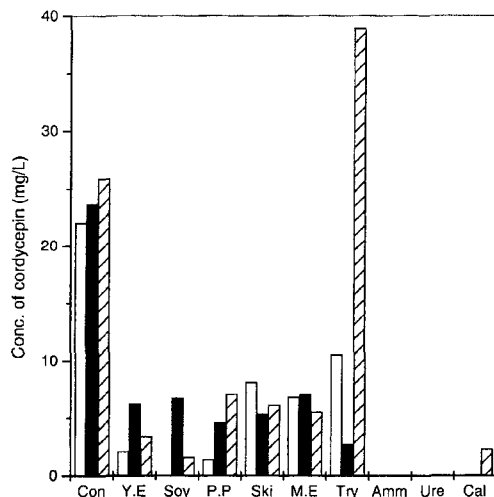


Fig. 4. Effect of nitrogen source on the production of cordycepin of *C. militaris*. The cultivation was carried out at 24°C for 5 days in the YMG broth with each 1% nitrogen source (Con, control; Y.E, yeast extract; Soy, soytone; P.P, proteose peptone; Ski, skimmilk; M.E, malt extract; Try, tryptone; Amm, ammonium sulfate; Cal, calcium nitrate). Symbol □, *C. militaris* KCTC 6682; ■, *C. militaris* KCTC 16932; ▨, *C. militaris* DGUM 32003.

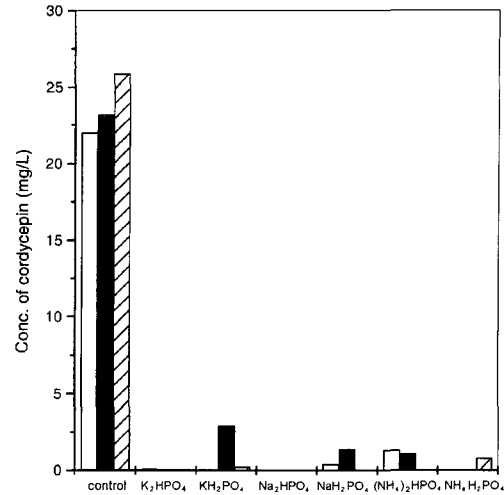


Fig. 5. Effect of phosphorus source on the production of cordycepin of *C. militaris*. The cultivation was carried out at 24°C for 5 days in the YMG broth with each 0.1% phosphorus source. Symbol □, *C. militaris* KCTC 6682; ■, *C. militaris* KCTC 16932; ▨, *C. militaris* DGUM 32003.

제외하고 기타 질소원 첨가실험은 대조군보다 낮은 cordycepin 생산성을 보여주었다. 본 실험 결과는 현재까지 보고된 배양액으로부터 cordycepin 생산성 측정 실험에서 Cunningham(3)등의 cordycepin 생산성 20~25 mg/l, Frederiksen(4)등의 10~15 mg/l, Stephen(7)등의 10~18 mg/l의 결과보다 우수한 cordycepin 생산성을 보였다.

인산원 첨가에 따른 cordycepin 생산 영향

YMG 액체배지에 0.1%의 인산원을 첨가하여 cordycepin 생산성을 측정하였다(Fig. 5). 각각의 인산원을 첨가한 후 최종 pH를 6.5로 고정시켰을 때 모든 균주에서 대조군보다 낮은 cordycepin 생산성을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었음.

참고문헌

- Ahn, Y.J., S.J. Park, S.G. Lee, S.C. Shin, and D.H. Choi. 2000. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2744-2748.
- Cory, J.G., R.J. Suhadolnik, B. Resnick, and M.A. Rich. 1965. Incorporation of cordycepin into ribonucleic acid of human tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 103, 646-653.
- Cunningham, K.G., S.A. Hutchinson, W. Manson, and F.S. Spring. 1951. Cordycepin a metabolic product form cultures of *Cordyceps militaris*. *J. Chem. Soc.* 2299-2300.
- Frederiksen, S., H. Mallng, and H. Klenow. 1965. Isolation of 3'-

- deoxyadenosine (cordycepin) from the liquid medium of *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 95, 189-193.
5. Mueller, W.E.G., B.E. Weiler, R. Charubala, W. Pfleiderer, L. Leserman, R.W. Sobol, R.J. Suhadolnik, and H.C. Schroeder. 1991. Cordycepin analogues of 2'5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase. *Biochem. Wash.* 30, 2027-2033.
 6. Penman, S. and M. Rosbach. 1970. Messenger and heterogeneous nuclear RNA in HeLa cells: differential inhibition by cordycepin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 67, 1878-1885.
 7. Stephen, H., C. Don, D.J. James, and A.M. Closkey. 1966. Further evidence on the structure of cordycepin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 117, 480-482.
 8. Suger, A.M. and R.P. Mccaffrey. 1998. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin). *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1424-1427.
 9. Sung, J.M., H.K. Lee, Y.S. Choi, Y.O. Kim, S.H. Kim, and G.H. Sung. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor. J. Mycol.* 25, 231-252.
 10. Trigg, P., W.E. Gutteridge, and J. Williamson. 1971. The effect of cordycepin on malaria parasites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65, 514-520.

(Received July 13, 2004/Accepted September 14, 2004)

ABSTRACT : Optimization of Culture Condition and Media Composition on the Production of Cordycepin by *Cordyceps militaris*.

Sung-Jun Jo¹, Tae-Hee Lee¹, Dae-Hoon Chae², and Yeong-Hwan Han* (¹Department of Department of Biology, Graduate School, Dongguk University, ²Dongseo Pharm. Co., *Department of Life Science, College of Natural Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea)

The effect of media composition and culture condition on mycelial growth and cordycepin (3'-deoxyadenosine) production was determined using *Cordyceps* spp. Among the strains of *C. militaris* and *C. sinensis* tested, *C. militaris* KCTC 6862, *C. militaris* DGUM 32003 and *C. militaris* KCTC 16932 were excellent for the production of cordycepin. The optimal temperature and pH for production of cordycepin were 24°C and pH ranged from 6.0 to 10, respectively. Among various sources of carbon and nitrogen tested, glucose and tryptone were very excellent for the production of cordycepin, respectively. After 5 days cultivation with 1% of tryptone with nitrogen source, 39 mg/l of cordycepin was produced. However, addition of phosphorus sources reduced the production of cordycepin.