

Optimization of media components for cordycepin production from *Paecilomyces japonica*

변학규¹, 한대석², 홍억기¹

¹강원대학교 환경·생물공학부, ²한국식품개발연구원

전화 (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

Abstract

This study was concentrated on the variation of cordycepin production from liquid culture of *Paecilomyces japonica*. Cordycepin production was measured from mycelium and culture broth of *P. japonica*. Optimum media composition was studied on inorganic N-sources, inorganic salts, trace elements and C/N ratio. In this results, cordycepin production in medium containing $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, histidine and CaCO_3 was higher than control in culture broth.

서론

동충하초에 대한 연구는 활발히 이루어져왔다. 그러나, 고체 배양을 이용한 자실체 생산이 주를 이루고 있을 뿐 액체배양을 통한 균사체 및 배양여액으로부터의 유용물질 생산에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서, *P. japonica*(눈꽃동충하초)의 액체배양을 통해 균사체 및 배양여액에서 유용물질인 cordycepin을 분석하였다. 따라서, 본 연구에서는 cordycepin의 농도를 높이기 위한 배지성분의 영향을 검토하였다. cordycepin 생산에 필요한 최적 배지조성을 확립하기 위하여 무기질소원, 무기염류, 금속이온 및 C/N ratio를 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 보존

본 실험에 사용된 균주는 *Paecilomyces japonica*(눈꽃동충하초)를 사용하였다. 전배양에서 사용된 YMP medium에서 3일간 배양한 후 5mL을 취하여 멸균된 glycerol 1mL과 증류수 2mL을 섞어 10mL vial에서 잘 혼합한 후 -75°C 에서 냉동보관하였다.

배양조건

냉동보관된 8mL의 활성화된 cell solution stock을 250mL flask(working volume 50mL)에 접종하여 2일간 전배양을 실시하였다. 본배양은 전배양액 5%를 취하여 접종하였으며 7일간 배양하였다. Flask배양은 shaking incubator(Vision Scientific Co., VS-8480SR)에서 25°C , 200rpm, 초기 pH7로 조절하였으며 pH적정을 위해 2N HCl과 2N NaOH를 사용하였다.

시료의 전처리

배양액을 6000rpm에서 25분동안 원심분리하여 고액분리를 하였다. 균사체는 methanol을 가한 뒤 60분동안 sonication하였고, 배양여액은 상등액에 2배의 ethanol을 가하여 4°C 에서 24hr동안 방치하여 생긴 침전물을 제거하였다. 이렇게 준비된 sample들의 상등액을 완전히

감압증발시킨 후 남은 추출물을 증류수로 녹였다. 이것을 0.45 μ m의 membrane filter로 여과한 다음 적당히 희석하여 HPLC로 분석하였다.

분석조건

Cordycepin의 분석은 HPLC(Waters, Model 930)를 사용하였고, 분석조건은 다음과 같다.

- Column : μ Bondapak C₁₈ (300mm L × 3.9mm ID)
- Detector : UV detector (260nm)
- Mobile phase : 0.1%TFA/Acetonitrile (9:1)
- Flow rate : 0.5mL/min

결과 및 고찰

동충하초의 품질 지표 물질인 cordycepin을 균체내와 배양여액에서 분석하였다. 대조구에 사용된 배지조성은 Glucose 10g/L, Yeast Extract 10g/L이었다. 균체내의 경우 다소 차이는 있었으나 cordycepin농도가 매우 낮음을 알 수 있었다. 따라서, 배양여액에서의 cordycepin 농도에 대해 초점을 맞추었다. Fig. (A)는 각각 5g/L의 무기질소원을 첨가한 경우이다. 그 결과 (NH₄)₂HPO₄에서 6.3mg/L로 control에 비해 약 2.5배 높은 농도의 cordycepin이 검출되었다. Fig. (B)는 세가지의 amino acid를 각각 1,2,3g/L로 첨가량의 변화를 주어 실험한 결과이다. Histidine 2g/L를 첨가했을 때 control보다 약 1.5배 높은 결과를 나타내었다. Fig. (C)는 무기염류를 각각 1g/L 첨가했을 때의 결과이다. 그 결과 CaCO₃를 첨가했을 때 control보다 좋은 결과를 나타내었다. Fig. (D)의 경우는 금속이온을 각각 0.1g/L 첨가했을 때의 결과이다. Figure에서 볼 수 있듯이 검토된 금속이온은 cordycepin생성에 저해요인임을 알 수 있었다.

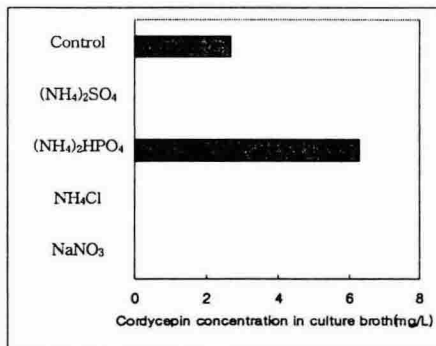
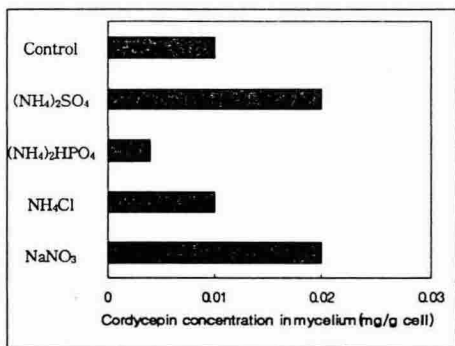
요약

본 연구는 *P. japonica*의 액체배양을 통해 HPLC를 이용하여 유용물질인 cordycepin의 농도를 분석하였다. 배지성분중 무기질소원, 아미노산, 무기염류 및 금속이온의 영향을 검토하였다. 그 결과 균사체의 경우에는 cordycepin의 농도가 매우 낮음을 알 수 있었고, 배양여액의 경우에는 (NH₄)₂HPO₄, histidine, CaCO₃ 등을 첨가했을 때 control에 비해 높은 농도의 cordycepin의 생성을 확인할 수 있었다.

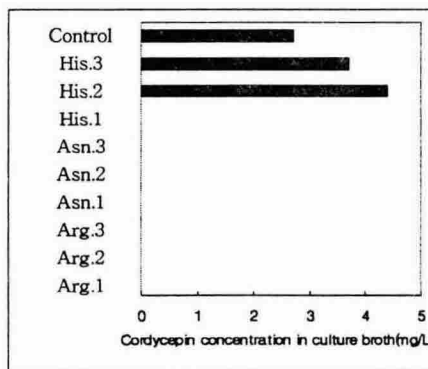
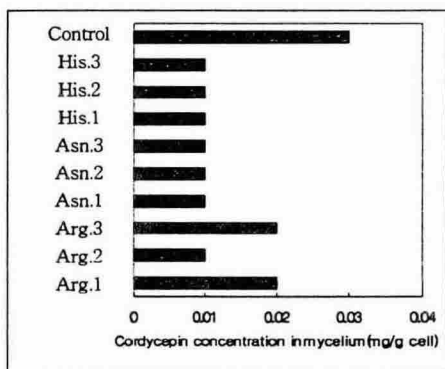
참고문헌

1. Glazer, R. I. (1978), The effects of 2'-deoxycoformycin on the action of cordycepin on nuclear RNA synthesis in regenerating liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46, 191-197
2. Rodman, L. E., D. R. Farnell, J. M. Coyne, P. W. Allan, D. L. Hill, K. L. K. Duncan, J. E. Tomaszewski, A. C. Smith, and J. G. Page (1997), Toxicity of cordycepin in combination with the adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycoformycin in beagle dogs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 147, 39-45

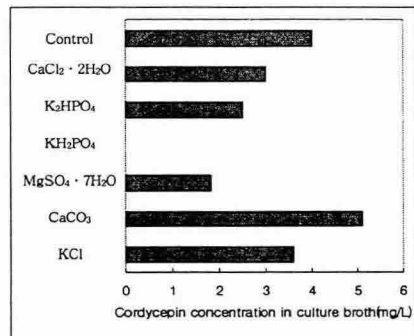
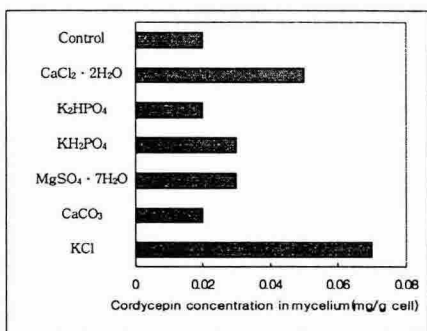
3. Beach, L. R. and J. Ross (1977), Cordycepin: Inhibitor of newly synthesized globin messenger RNA, *J. Biol. Chem.*, 253, 2628-2632



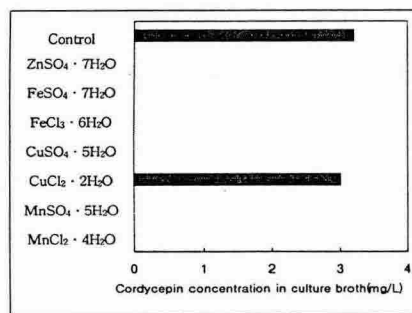
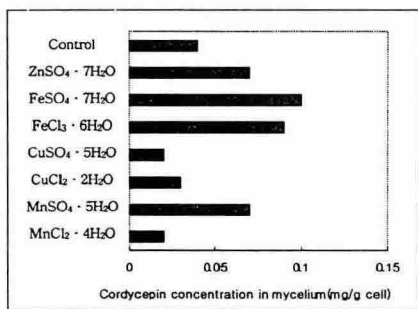
(A) Effect of inorganic N-sources on the cordycepin production



(B) Effect of amino acids on the cordycepin production



(C) Effect of inorganic salts on the cordycepin production



(D) Effect of trace elements on the cordycepin production