

Effect of Cultural Conditions on Polysaccharide Production and its Physicochemical Properties in *Cordyceps militaris*

Jeong Seok Kwon, Eock Kee Hong

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

TEL (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

Abstract

This study was concerned with the optimization of liquid culture conditions for mycelial growth and polysaccharide production and its physicochemical properties in *Cordyceps militaris*. The one factor at a time method was adopted to investigate the effects of medium composition, environmental factors and C/N ratio. Among the these variables, glucose 80g/L, yeast extract 10g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, KH_2PO_4 0.5g/L were proved to be the most suitable carbon, nitrogen, and mineral sources, respectively. The optimal temperature, initial pH, working volume were identified to be 24 °C, 7.0 and 100ml, respectively. Under the optimal conditions, the strategies in shake flask culture and 5L jar fermentor led to mycelial growth of 29.43 g/L, 28.88g/L and polysaccharide production of 2.53g/L, 6.38 g/L, respectively. Among the physicochemical properties, relative concentrations(w/v) of total sugar, uronic acid, protein and hexoseamine were identified to be 74.07%, 1.13%, 0.91%, and 0.46%, respectively. The fraction of neutral and acidic polysaccharide were identified to be 81.9% and 18.1%, respectively.

서론

동충하초는 겨울에는 곤충의 몸에 있다가 여름에는 풀처럼 나타나는 자실체로서 자낭균강의 맥각균목 동충하초과에 속하며, 전 세계적으로 100여속 750여종이 보고되었다. 예로부터 중국에서는 동충하초가 인삼, 녹용등과 함께 귀한 3대 한방 약재로 취급되어 왔으며, 결핵, 황달치료와 아편중독의 해독제로도 이용되어왔다. 동충하초중 이런 생리활성을 보이는 것 중 대표적인 것이 *cordyceps militaris*와 *cordyceps sinensis*이다. 최근 들어 동충하초 균사체의 액체배양을 이용하여 그 성분 및 생리활성물질등의 생산공정 개발이 연구되어지고 있고, 항당뇨, 항산화, 항돌연변이, 항암작용등의 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 대표적인 생리활성물질로는 cordycepin,

polysaccharide, SOD, cordycepic acid 등이 있다. 특히 polysaccharide는 항당뇨 및 항암 작용이 우수한 것으로 보고 되어지고 있고, 그것의 구조적 특징이나 이화학적 특성에 따라 항암효과 및 항당뇨 효과의 활성정도가 다름이 보고되고 있다. 따라서 동충하초의 인공재배의 난점과 자실체와 균사체의 성분 및 효능이 유사하다는 점을 착안하여, 균사체의 액체배양공정을 통하여 균사체 및 polysaccharide의 생산성을 최대화하고자 하였으며, polysaccharide의 이화학적특성을 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 실험에 사용된 균주는 *cordyceps militaris* KCTC 6064 이었으며, 기본배지로 YMK media를 사용하였으며, 그 조성은 glucose 20g/L, yeast extract 5g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L, KH₂PO₄ 2g/L 이었다.

배양조건

배양은 shaking incubator (Vision Scientific Co., VS-8480SR)에서 24℃, 150rpm에서 배양하였으며 초기 pH는 조절하지 않았다.

조당당체 추출

배양물을 각각 6000rpm에서 15분간 원심분리하여 균사체와 배양액을 분리한후 배양여액에 3배 volume의 ethanol을 가하여 4℃에서 24시간 방치후 filtering하여 소량의 증류수에 녹인후 회전진공식증발기를 이용하여 잔류 ethanol을 제거한후 dialysis tubing (cut off size : 12400 dalton)에 5일간 투석한 후 동결건조하여 분석시료로 사용하였다.

Polysaccharide의 이화학적 특성 분석

총당 함량은 phenol-sulfuric acid 법을 이용하여 정량하였으며 우론산 함량은 glucuronic acid를 표준 물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl reagent를 이용하여 함량을 분석하였다. 단백질함량은 BSA를 표준물질로 하여 Bradford 법을 이용하여 정량하였으며, ion exchange column chromatography (DEAE-cellulose, Cl⁻ form)과 gel filtration chromatography (sephacrose CL-6B)를 이용하여 분획하였다.

결과 및 고찰

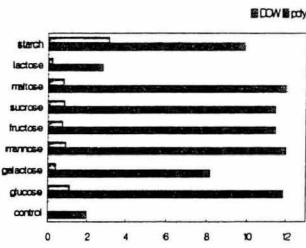


Fig 1. The effect of carbon sources on mycelial growth and polysaccharide production.

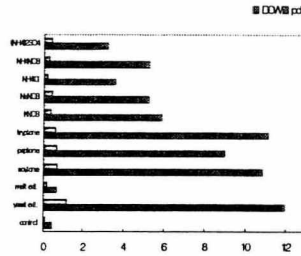


Fig 2. The effect of nitrogen sources on mycelial growth and polysaccharide production.

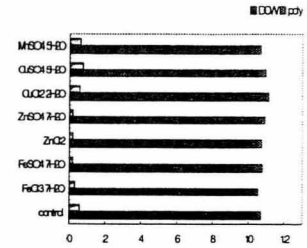


Fig 3. The effect of trace elements on mycelial growth and polysaccharide production.

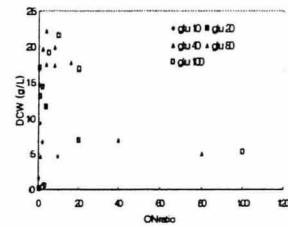


Fig 4. The effect of C/N ratio on mycelial growth.

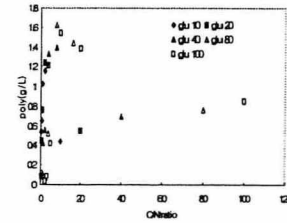


Fig 5. The effect of C/N ratio on polysaccharide production.

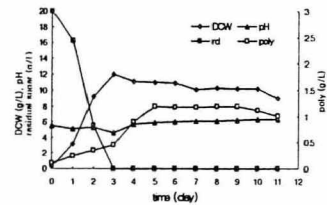


Fig 6. The time profiles of the mycelial growth and polysaccharide production at basal medium in flask culture.

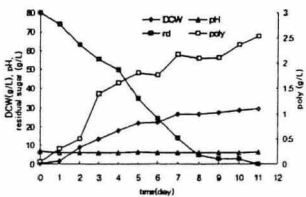


Fig 7. The time profiles of the mycelial growth and polysaccharide production at optimum medium in flask culture.

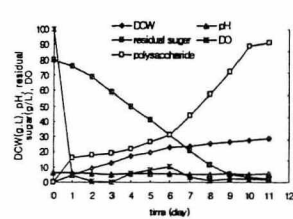


Fig 8. The time profiles of the mycelial growth and polysaccharide production at optimum medium in 5L jar fermentor.

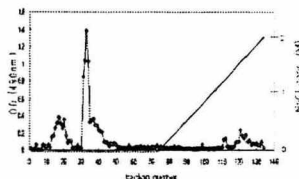


Fig 9. Ion exchange column chromatography of crude polysaccharide with DEAE-cellulose.

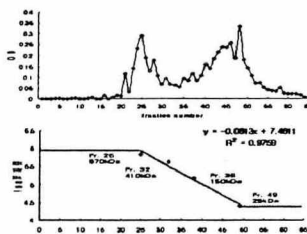


Fig 10. Gelfiltration chromatography of crude polysaccharide with sepharose CL-6B .

Table 1. Proximate composition of crude polysaccharide.

	(% , dry basis)			
	Total sugar	Protein	Uronic acid	hexose amine
Crude polysaccharide	74.07	0.91	1.13	0.46

cordyceps militaris 균사체의 액체배양의 최적성장조건 및 배지조성의 고찰 결과 온도, pH, working volume, 접종비는 각각 24°C, 7, 100ml, 2%임을 알수 있었다. 배지 조성 및 농도의 고찰결과 탄소원, 질소원, 무기염류 및 금속이온은 각각 glucose 80g/L, yeast extract 10g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L 이었으며, 기본배지에서 time profiling과 비교하였을 때, 균체량은 배양 11일째 두배 이상인 약 29g/L의 수율을 보였고, polysaccharide의 생성 역시 두배 이상인 약 2.6g/L의 수율을 보였다. 같은 배지조성에서의 5L 생물반응기에서의 경시변화에서는 polysaccharide는 6.4g/L의 수율을 보여 flask 배양에서보다의 mass transfer등의 원활함이 유리한 요인으로 작용하였을 것으로 판단 이후 여러 교반속도의 영향 및 그에 따른 morphology의 관찰이 필요할 것으로 판단되어진다. 일반적으로 morphology는 배양액의 점도에 큰 영향을 미치는 인자로서 product의 생산성에 큰 영향을 미칠 것으로 사료되어진다. 중성분획 및 산성분획의 함량에 있어서는 대부분이 중성분획으로 이루어져 있었으며, gel filtration결과 670kDa 이상의 고분자분획과 150kDa 및 25kDa의 다양한 분자량 분포를 보였다.

References

1. Park, K. S., J. Y. Lee, S. H. Kim, and S. J. Lee (1992), Extraction and separation of protein bound polysaccharide produced by *Coriouis versicolor*(Fr) Quel., *Kor. J. Mycol.*, 20, 72-76.
2. Parris, M. (2000), The use of mushroom glucans and proteoglucans in cancer treatment, *Altern. Med. Rev.*, 5(1), 4-27.
3. Blumenkrantz, N., and Asboe Hansen, G. (1973) *Anal. Biochem.* 54, 484-489.
4. Dische, Z. (1950) *J. Biol. Chem.* 183, 489-494.