

광조건이 *Cordyceps militaris*의 Cordycepin 생산에 미치는 영향

조성준¹ · 이태희¹ · 채대훈² · 한영환*

¹동국대학교 생물학과, ²동서제약(주), 동국대학교 생명과학과

*Cordyceps militaris*의 액체배양시 cordycepin(3'-deoxyadenosine) 생산성에 영향을 주는 광조건의 영향을 조사하였다. 사용된 *Cordyceps* 속균중에서 *C. militaris* KCTC 6064가 우수한 cordycepin 생산성을 보여주었다. 광조건(1,000 lux)에서 YM배지에 *C. militaris* KCTC 6064를 120시간 배양한 결과, 51.6 mg/l의 가장 우수한 cordycepin 생산성을 보여주었다. 광조건에서의 cordycepin 생산성은 96시간 배양까지는 증가되었으나, 96시간 이후에는 cordycepin 생산이 감소하였다.

Keywords □ *Cordyceps militaris*, cordycepin, light illumination

동충하초의 분류학적 위치는 자낭균강(Ascomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하며, 전 세계적으로 현재까지 약 800여종의 동충하초가 알려져 있고, 이중 국내에서 채집 및 분류된 것은 78종이다(2). 번데기동충하초[*Cordyceps militaris* (L.) Link.]는 주로 나비목의 유충 또는 번데기를 기주로 주황색의 곤봉형 자좌를 형성하는 곤충기생균(entomopathogenic fungi)의 일종이며, 자낭각은 반돌출형이며 원통형의 자낭 안에 자낭포자들이 존재한다(9). 동충하초에서 추출되는 cordycepin(3'-deoxyadenosine)은 핵산계 항생제로서, 주로 *C. militaris* 및 *C. sinensis* 등의 자실체에서 추출되고 있다. Cordycepin은 항세균 및 항진균 활성, 항말라리아 활성, 항종양 활성 및 HIV-1에 대한 항바이러스 활성에 관한 약리 효능이 보고 된 바있다(1, 5, 6, 8, 10). Cordycepin의 생산은 *C. militaris* 및 *C. sinensis* 등의 고체 배양을 이용한 고비용의 자실체 추출을 통한 방법으로 생산되고 있으며, 분리 및 정제에 관한 연구는 있었으나 cordycepin 생산성에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 *C. militaris*의 자실체 형성에 중요한 요인인 광조건에 의한 cordycepin의 생산 특성을 조사하여 cordycepin의 대량 생산을 위한 기초 자료의 확보를 목적으로 수행되었다.

본 실험에서 사용한 균주는 한국유전자은행(Korean Collection for Type Culture)에서 분양받아 계대배양하여 사용하였다. *C. militaris* 균사의 배양은 YMG 한천배지(0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, agar 2%, pH 6.0)에 동충하초 균사를 접종한 후 24°C에서 7일간 배양하였다. 배양된 종균을 cork borer(직경, 10 mm)로 떼어낸 다음 YMG 액체배지(100 ml/250-ml Erlenmeyer flask)에 3개씩 접종하여 24°C에서 5일간 진탕배양(120 rpm)하였다. 광조건은 500~3,000 lux의 범위에서 광조사

시간대별 cordycepin 생산성을 조사하였다.

Cordycepin의 측정은 Cunningham등의 방법을 변형하여 사용하였다(3). 24°C에서 5일간 진탕배양 된 *C. militaris* 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 HPLC를 이용하여 분석하였다. Column은 Watchers(Japan)사의 watchers 120 ODS-AP(150 × 4.6 mm, 5 μm particle size)을 사용하였으며, 검출기와 pump는 각각 Young Lin UV/Vis detector(260 nm)와 Young Lin M930을 사용하였다. Cordycepin 생산성은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma(St. Louis, USA)사에서 구입한 표준품으로 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다. 분석결과는 3회 분석한 평균값으로 표시하였다.

C. militaris 균주별 명조건에서 5일간 배양한 결과, 광조사가 없는 암조건에서 보다는 명조건에서 높은 cordycepin 생산성을 나타냈다(Table 1). Cordycepin 생산성은 *C. militaris* KCTC 6064가 31.7 mg/l로 가장 우수한 cordycepin 생산성을 보여주었다. 본 실험 결과는 현재까지 보고된 암조건 하에서의 cordycepin

Table 1. Effect of light illumination on cordycepin production of *Cordyceps militaris*^a

Strain	Condition	Conc. of cordycepin ^b (mg/L)
KCTC 6064	1000 lux	31.7±1.2
	No light	23.2±1.0
KCTC 16931	1000 lux	7.3±1.1
	No light	3.6±0.1
KCTC 16932	1000 lux	17.9±0.6
	No light	15.5±0.1

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 054-770-2213, Fax: 054-770-2515

E-mail: yhhan@dongguk.ac.kr

^aThe mycelia were cultivated at 5 days 24°C for in YMG broth (pH 6.0) with light or without light.

^bMean ± standard deviation.

Table 2. Effect of light intensity on cordycepin production of *Cordyceps militaris*^a

Light intensity (lux)	Conc. of cordycepin ^b (mg/l)		
	KCTC 6064	KCTC 16931	KCTC 16932
500	18.7±0.4	5.1±0.2	11.2±0.5
1000	31.7±1.2	7.3±1.1	17.9±0.6
2000	23.4±1.0	5.5±0.4	14.4±0.6
3000	28.4±0.2	6.9±0.2	17.5±0.3

^aThe mycelia were cultivated for 5 days at 24°C in YMG broth (pH 6.0) with light.

^bMean ± standard deviation.

Table 3. Effect of change of light condition on cordycepin production of *C. militaris* KCTC 6064 after initial inoculation of the mycelia^a

Accumulated light illumination time (hr)	Conc. of cordycepin ^b (mg/l)
0	23.2±1.0 ^c
24 ^b	30.8±0.6
48	39.3±2.0
72	43.0±2.6
96	51.6±3.1
120	36.9±0.2

^aThe mycelia were cultivated for 5 days at 24°C in YMG broth (pH 6.0) with changes of light condition.

^bAt the time of 24 hr, light illumination was stopped and then, 96 hr of total 120 hr cultivation was carried out without light.

^cMean ± standard deviation.

생산량의 측정 실험에서 나타난 Cunningham등(3)의 20~24 mg/l, Frederiksen등(4)의 10~15 mg/l 및 Stephen등(7)의 10~18 mg/l의 결과보다 우수한 cordycepin 생산성을 보였다

광조건을 500~3,000 lux의 범위에서 실험한 결과, 조도의 조건에 따라 cordycepin 생산성이 다르게 나타났다. 1000 lux의 조건에서 각 균주들의 cordycepin 생산성이 우수하였다. 또한 광조건 하에서는 *C. militaris* KCTC 6064의 cordycepin 생산성을 조사한 결과, 균사체 접종 후 72~96시간에서 cordycepin의 생산이 우수하였으며, 96시간 이후에는 생산성이 감소하였다(Table 3). 초기 명조건에서 배양 후 암조건으로 조건을 바꾸어 주었을 때의 cordycepin 생산성이, 암조건에서 배양 후 명조건으로 배양한 것보다 더 많은 cordycepin 생산성을 보였다(Table 3, 4). 초기 명조건에서 96 시간 배양 한 후 암조건에서 24시간 배양한 경우가 51.6 mg/l의 cordycepin 생산성을 나타내어 가장 우수한 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었음.

Table 4. Effect of illumination time on cordycepin production of *C. militaris* KCTC 6064 after initial inoculation of the mycelia^a

Accumulated light illumination time (hr)	Conc. of cordycepin ^b (mg/l)
0	23.2±1.0 ^c
24 ^b	37.9±0.6
48	44.0±1.1
72	42.7±0.8
96	35.5±0.2
120	31.7±1.0

^aThe mycelia were cultivated for 5 days at 24°C in YMG broth (pH 6.0) with changes of light condition.

^bAt the time of 24 hr, light was illuminated for 96 hr of total 120 hr cultivation.

^cMean ± standard deviation.

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 from cultures of *Cordyceps militaris*. *J. Chem. Soc.* 2299-2300.
- Frederiksen, S., H. Malling, and H. Klenow. 1965. Isolation of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) from the liquid medium of *Cordyceps militaris*. *Biochim. Biophys. Acta.* 95, 189-193.
- Mueller, W.E.G., B.E. Weiler, R. Charubala, W. Pfeleiderer, 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.
- 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.
- Stephen, H., C. Don, D.J. James, and A.M. Closkey. 1966. Further evidence on the structure of cordycepin. *Biochim. Biophys. Acta.* 117, 480-482.
- Suger, A.M. and R.P. Mccaffrey. 1998. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin). *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1424-1427.
- Sung, J.M., Y.S. Choi, B. Bhushan, and Y.J. Park. 2002. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* 30, 6-10.
- 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.
- Ying, J., X. Mao, Q. Ma, Y. Zong, and H. When. 1987. Icons of medical fungi from China. *Science press. Beijing, China.* 60-85.

(Received July 5, 2005/Accepted August 5, 2005)

ABSTRACT : Effect of Light Conditions on Production of Cordycepin of *Cordyceps militaris***Sung-Jun Jo¹, Tae-Hee Lee¹, Dae-Hoon Chae² and Yeong-Hwan Han***¹Department 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 light on production of cordycepin (3'-deoxyadenosine) was investigated using *Cordyceps militaris*. Among *Cordyceps* spp. tested, *C. militaris* KCTC 6064 was the best for cordycepin production. After 120-hr cultivation of *C. militaris* KCTC 6064 at 24°C in YMG broth with light (1,000 lux), 51.6 mg/l of cordycepin was produced. In general, production of cordycepin with light illumination was better than that without light. Cordycepin production under light illumination was enhanced up 96-hr cultivation, whereas after 96-hr, cordycepin production was decreased.