(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0068536
(43) 공개일자 2022년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01G 18/20 (2018.01) *A01G 18/40* (2018.01)
A01G 18/50 (2018.01) *C12N 1/14* (2018.01)
(52) CPC특허분류
A01G 18/20 (2018.02)
A01G 18/40 (2018.02)
(21) 출원번호 10-2020-0155419
(22) 출원일자 2020년11월19일
심사청구일자 2020년11월19일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
경상남도
경상남도 창원시 의창구 중앙대로 300, 경상남도도청 (사림동)
(72) 발명자
양재경
경상남도 진주시 강변길 31, 103동 402호(가좌동, 가호 에일린의 뜰 아파트)
하시영
경상북도 구미시 형곡서로 11-15, 102동 1507호(형곡동, 형곡시영아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

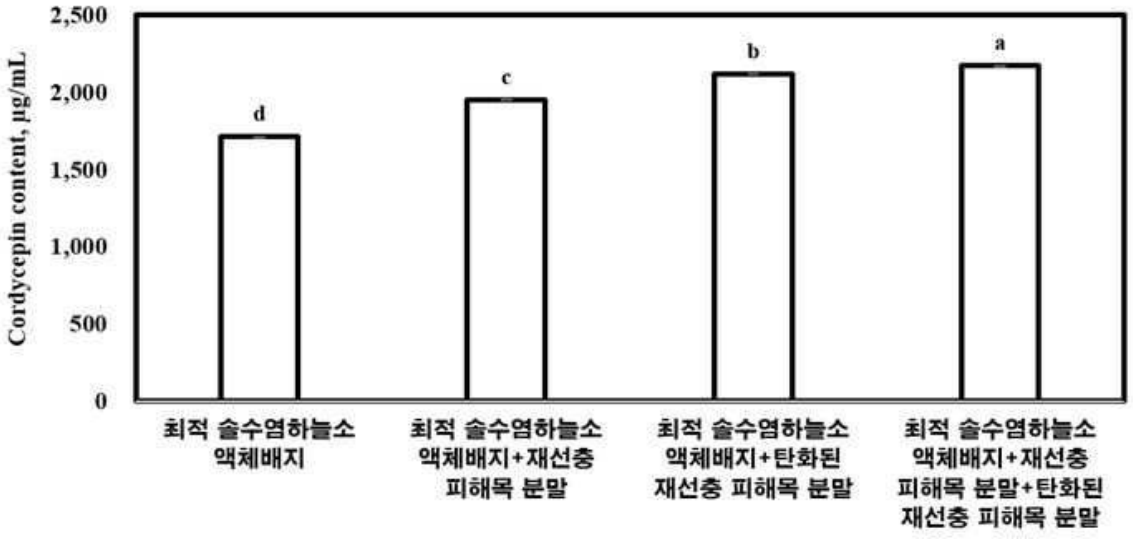
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **소나무재선충피해목을 포함하는 동충하초 균사체 배양용 배지조성물**

(57) 요 약

본 발명은 소나무재선충피해목을 포함하는 동충하초 배양용 배지조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 소나무재선충피해목 분말 및 탄화된 소나무재선출피해목 분말이 포함된 배지조성물에 배양된 동충하초 균사체는 종래 액체배지에서 배양된 동충하초 균사체와 비교하여 우수한 균사체의 생장량 및 코디세핀 함량 증가 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 배지조성물은 솔수염하늘소 동충하초 균사체의 대량생산 및 유용한 생리활성 물질인 코디세핀 생산 증가를 위한 동충하초 배양용 배지조성물로 제공될 수 있다.

대 표 도 - 도27



(52) CPC특허분류
A01G 18/50 (2018.02)
C12N 1/14 (2021.05)
(72) 발명자
정지영
경상남도 창원시 마산회원구 양덕서로 30, 104동 1702호(양덕동, 메트로시티)
이동환
경상남도 진주시 진주대로879번길 19, A동 1305호 (주약동, 현대성우트리팰리스)
최지원
경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 중리상곡로 134, 201동 903호(동신2차아파트)
박재현
경상남도 진주시 숙호산로 8, 1203호(이현동, 우신파크맨션)
유찬열
경상남도 거창군 거창읍 강남로 266, 106동 701호 (거창코아루에듀시티)
박준호
경상남도 창원시 마산합포구 진동면 동촌길 185, 102동 2204호(마산 신화하니엘 더 마린)
박성웅
경상남도 진주시 명석면 광제산로108번길 34

명 세 서

청구범위

청구항 1

기본배지 및 소나무재선충피해목을 포함하는 솔수염하늘소 동충하초 배양용 배지조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 소나무재선충피해목은 소나무재선충피해목 분말, 탄화된 소나무재선충피해목 분말 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 배지조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 배지조성물은 소나무재선충피해목 10 내지 40 중량부 및 기본배지 60 내지 90 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 배지조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 기본배지는 조성물 100 중량부에 대하여, 배지 1 내지 5 중량부, 대두 1 내지 10 중량부, 솔수염하늘소 5 내지 15 중량부 및 물 70 내지 90 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 배지조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 배지는 PDB (Potato Dextrose Broth) 및 SDB (Sabouraud Dextrose Broth)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 배지조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 솔수염하늘소는 건조된 원형 또는 분말로 첨가되는 것을 특징으로 하는 배지조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 배지조성물은 pH 4 내지 pH 6인 것을 특징으로 하는 배지조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 배지조성물은 솔수염하늘소 동충하초 균사체의 생장 및 코디세핀 함량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 배지조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 따른 배지조성물에 동충하초 균사체를 접종하는 단계; 및

상기 배지조성물에 접종된 동충하초 균사체를 배양하는 단계를 포함하는 솔수염하늘소 동충하초 균사체 배양방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 배양방법은 솔수염하늘소 동충하초 균사체의 생장량 및 코디세핀 함량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 솔수염하늘소 동충하초 균사체 배양방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 소나무재선충피해목을 포함하는 솔수염하늘소 동충하초의 균사체 생장 및 코디세핀 함량 증가를 위한 배지조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동충하초는 겨울에는 곤충의 몸에 있다가 여름에는 풀처럼 나타난다는 데서 이름지어진 일종의 버섯으로, 곰팡이의 일종인 동충하초균이 살아있는 곤충의 몸속으로 들어가 발생하는 곤충기생성 약용버섯이다. 동충하초로는 시네시스 동충하초 (Cordyceps sinensis), 밀리타리스 동충하초(Codyceps militaris, 번데기 동충하초), 눈꽃 동충하초(Paecilomyces japonica) 등이 잘 알려져 있는데, 장수하늘소 유충을 기주로 하는 장수하늘소 동충하초(Cordyceps staphylinidicola)는 가장 많이 이용되는 번데기 동충하초(Cordyceps miliatris)에 비해서도 높은 코디세핀을 함유하는 균주들이 자연에 존재한다.

[0003] 동충하초는 동의보감을 통해서 오랫동안 많은 효능이 인정되어 각종 성인병 질환의 치료 및 건강유지를 위하여 사용되어 왔다. 중국에서는 육상선수들이 동충하초를 복용하고 기적의 기록들을 나타낸다고 하여 동충하초를 3대 천연식품 건강 명약으로 인정하고 있다.

[0004] 동충하초는 작물들 중 단백질 함량이 가장 높은 (건조함량의 28%이상) 군에 속하고, 면역력을 강화시키는 물질이 다량 함유되어 있다. 동충하초의 면역활성물질 중에는 키닉산(quinic acid)의 이성체로 밝혀진 '코디세핀(Cordycepin :3'-deoxy-adenosine)' 이 포함되어 있으며, 동충하초 중에서도 밀리타리스 동충하초가 다른 동충하초에 비하여 코디세핀의 함량이 월등히 높다. 코디세핀은 핵산 물질로서 세포의 유전정보에 관여하면서 저하된 면역기능을 활성화하여 정상세포가 암세포로 전환되는 것을 방지하는 작용을 한다. 동충하초를 투입한 임상실험에서 암세포를 죽이는 면역세포인 NK세포(natural killer cell/자연살해세포)와 면역세포에서 분비되는 사이토카인의 함량이 18%~25% 증가되는 것으로 확인되어 혈액암치료용으로 활용되고, 건강기능식품으로서도 많은 관심을 받고 있다. 이러한 결과를 토대로 국내에서는 코디세핀이 함유된 동충하초가 버섯으로는 유일하게 건강기능식품으로 식약처인증을 받았다. 또한 동충하초는 혈압과 당뇨를 조절하는 효능과 폐와 간 기능 등에도 많은 도움을 주는 것으로 임상연구결과가 발표되고 있다.

[0005] 동충하초는 버섯류 중에서도 많은 소비가 이루어지고 있지만 천연에서 채집되는 양은 매우 적어서 수요를 충당할 수 없으므로 전 세계의 많은 농가들이 인공재배법으로 재배사를 만들어서 대량 재배하고 있으나 동충하초는 성장속도가 느리고, 외부환경에 민감하여 농약을 살포할 수 없는 식물이어서 재배가 매우 까다로와 오랫동안 재배를 해온 농가에서도 동충하초 재배의 수확률이 저조한 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2020-0048792호 (2020.05.08. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 솔수염하늘소 동충하초의 균사체 생장 향상 및 코디세핀 함량을 증가시키기 위해 소나무재선충피해목을 포함하는 동충하초 배양용 배지조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 기본배지 및 소나무재선충피해목을 포함하는 솔수염하늘소 동충하초 배양용 배지조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 배지조성물에 동충하초 균사체를 접종하는 단계; 및 상기 배지조성물에 접종된 동충하초 균사체를 배양하는 단계를 포함하는 솔수염하늘소 동충하초 균사체 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, SDB 1.5 중량%, 대두 2.5 중량% 및 솔수염하늘소 4.1 중량%를 포함하는 액체배지에 소나무재선충피해목 분말 및 탄화된 소나무재선출피해목 분말이 포함된 배지조성물에 배양된 동충하초 균사체는 종래 액체배지에서 배양된 동충하초 균사체와 비교하여 우수한 균사체의 생장량 및 코디세핀 함량 증가 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 배지조성물은 솔수염하늘소 동충하초 균사체의 대량생산 및 유용한 생리활성 물질

인 코디세핀 생산 증가를 위한 동충하초 배양용 배지조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 증대에 효과적인 대두 (Soybean) 첨가 액체배지 개발을 위한 실험 모식도이다.

도 2는 대두 첨가량에 따라 제조된 PDB 및 SDB 액체배지이다.

도 3은 PDB 액체배지에서 대두 첨가량에 따른 균사체 생장량 변화를 확인하기 위해 균사체의 건조 무게를 확인한 결과로, PDBC: PDB (Potato Dextrose Broth) 단독; PDBS1: PDB+2.5 g/L soybean; PDBS2: PDB+5.0 g/L soybean; PDBS3: PDB+10.0 g/L soybean; PDBS4: PDB+20 g/L soybean을 의미한다. 각 결과 값은 평균 ± SE (n = 5)로 나타내었다.

도 4는 SDB 액체배지에서 대두 첨가량에 따른 균사체 변화를 확인하기 위해 균사체의 건조 무게를 확인한 결과로, SDBC: SDB (Sabouraud Dextrose Broth) 단독; SDBS1: SDB+2.5 g/L soybean; SDBS2: SDB+5.0 g/L soybean; SDBS3: SDB+10.0 g/L soybean; SDBS4: SDB+20 g/L soybean을 의미한다. 각 결과 값은 평균 ± SE (n = 5)로 나타내었다.

도 5는 PDB 액체배지에서 대두 첨가량에 따른 균사체량을 확인을 위해 600 nm에서 흡광도를 확인한 결과로, PDBC: PDB (Potato Dextrose Broth); PDBS1: PDB+2.5 g/L soybean; PDBS2: PDB+5.0 g/L soybean; PDBS3: PDB+10.0 g/L soybean; PDBS4: PDB+20 g/L soybean을 의미한다. 각 결과 값은 평균 ± SE (n = 5)로 나타내었다.

도 6은 SDB 액체배지에서 대두 첨가량에 따른 균사체량을 확인을 위해 600 nm에서 흡광도를 확인한 결과로, SDBC: SDB (Sabouraud Dextrose Broth) 단독; SDBS1: SDB+2.5 g/L soybean; SDBS2: SDB+5.0 g/L soybean; SDBS3: SDB+10.0 g/L soybean; SDBS4: SDB+20 g/L soybean을 의미한다. 각 결과 값은 평균 ± SE (n = 5)로 나타내었다.

도 7은 PDB 및 SDB 액체배지에서 대두 첨가량에 따른 균사체 생장을 확인한 결과이다.

도 8은 Cordycepin standard의 calibration curve (R2=0.9999189)이다.

도 9는 PDB 액체배지에서 생장한 동충하초 균사체 배양액의 코디세핀 성분 피크를 확인한 결과이다.

도 10은 SDB 액체배지에서 생장한 동충하초 균사체 배양액의 코디세핀 성분 피크를 확인한 결과이다.

도 11은 PDB 액체배양액과 SDB 액체배양액의 코디세핀 성분 피크를 비교한 결과이다.

도 12는 대두 2.5 g/L이 첨가된 SDB 액체배지(SDBS1)에서 생장한 동충하초 균사체와 배양액의 코디세핀 성분 피크를 확인한 결과이다.

도 13은 PDB 및 SDB 배지에서 대두 첨가량에 따른 동충하초 균사체 배양액의 코디세핀 함량을 확인한 결과로, PDBC: PDB (Potato Dextrose Broth) 단독; PDBS1: PDB+2.5 g/L soybean; PDBS2: PDB+5.0 g/L soybean; PDBS3: PDB+10.0 g/L soybean; PDBS4: PDB+20 g/L soybean. SDBC: SDB (Sabouraud Dextrose Broth) 단독; SDBS1: SDB+2.5 g/L soybean; SDBS2: SDB+5.0 g/L soybean; SDBS3: SDB+10.0 g/L soybean; SDBS4: SDB+20 g/L soybean을 의미한다. 각 결과 값은 평균 ± SE (n = 5)로 나타내었다.

도 14는 pH 조건에 따른 액체배지이다.

도 15는 액체배지에서 pH 조건에 따른 균사체 생장량을 확인한 결과이다. 각 결과 값은 평균 ± SE (n = 5)로 나타내었다.

도 16은 흡광도를 이용한 액체배지에서 pH 조건에 따른 균사체 생장량 변화를 확인한 결과이다. 각 결과 값은 평균 ± SE (n = 5)로 나타내었다.

도 17은 액체배지에서 pH 조건에 따른 균사체 배양액의 코디세핀 함량을 확인한 결과이다.

도 18은 솔수염하늘소 투입 형태에 따른 액체배지이다.

도 19는 2.5 g/L이 첨가된 SDB 액체배지(SDBS1)에서 솔수염하늘소 첨가 형태에 따른 균사체 생장량을 확인한 결과이다.

도 20은 2.5 g/L이 첨가된 SDB 액체배지(SDBS1)에서 솔수염하늘소 첨가 형태에 따른 코디세핀 함량을 확인한 결과이다.

도 21은 2.5 g/L이 첨가된 SDB 액체배지(SDBS1)에서 솔수염하늘소 첨가량에 따른 균사체 생장량을 확인한 결과이다.

도 22는 2.5 g/L이 첨가된 SDB 액체배지(SDBS1)에서 솔수염하늘소 첨가량에 따른 코디세핀 함량을 확인한 결과이다.

도 23은 솔수염하늘소 분말도에 따른 액체배지이다.

도 24는 2.5 g/L이 첨가된 SDB 액체배지(SDBS1)에서 솔수염하늘소 분말도에 따른 균사체 생장량을 확인한 결과이다.

도 25는 2.5 g/L이 첨가된 SDB 액체배지(SDBS1)에서 솔수염하늘소 분말도에 따른 코디세핀 함량을 확인한 결과이다.

도 26은 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 증대를 위한 솔수염하늘소 최적 투입 조건을 확인한 결과이다.

도 27은 솔수염하늘소 첨가배지에서 재선충피해목 분말과 탄화된 재선충피해목 분말 혼합에 따른 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0013] 동충하초는 기주의 대상이 되는 곤충의 몸에 침입하여 기주의 양분을 통해 자실체를 형성시키는 약용버섯으로, 동물성 단백질을 영양성분으로 하기 때문에 일반 버섯류에서는 찾아볼 수 없는 유용한 물질, 즉 인간의 각종 질병치료에 이용되어질 수 있는 유용한 성분을 포함하여 기능성 식품으로서의 고부가가치가 있으나, 대량 재배가 어렵고 외부환경에 민감하여 재배가 매우 까다로운 문제점이 있는 바, 상기 문제점을 해결하기 위하여 본 발명을 완성하였다.

[0015] 본 발명은 기본배지 및 소나무재선충피해목을 포함하는 솔수염하늘소 동충하초 배양용 배지조성물을 제공할 수 있다.

[0016] 상기 소나무재선충피해목은 소나무재선충피해목 분말, 탄화된 소나무재선충피해목 분말 또는 이들의 혼합물인 것일 수 있다.

[0017] 상기 배지조성물은 소나무재선충피해목 10 내지 40 중량부 및 기본배지 60 내지 90 중량부로 포함되는 것일 수 있다.

[0018] 상기 기본배지는 조성물 100 중량부에 대하여, 배지 1 내지 5 중량부, 대두 1 내지 10 중량부, 솔수염하늘소 5 내지 15 중량부 및 물 70 내지 90 중량부를 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 보다 상세하게는 상기 배지조성물은 물 100 중량%에 대하여, SDB 3 중량%, 대두 5 중량% 및 솔수염하늘소 8.2 중량%를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 상기 배지는 PDB (Potato Dextrose Broth) 및 SDB (Sabouraud Dextrose Broth)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0021] 상기 솔수염하늘소는 건조된 원형 또는 분말로 첨가되는 것일 수 있다.

[0022] 상기 배지조성물은 pH 4 내지 pH 6인 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 pH 4.5 내지 5.6일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 상기 배지조성물은 솔수염하늘소 동충하초 균사체의 생장 및 코디세핀 함량을 증가시키는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명은 상기 배지조성물에 동충하초 균사체를 접종하는 단계; 및 상기 배지조성물에 접종된 동충하초 균사체를 배양하는 단계를 포함하는 솔수염하늘소 동충하초 균사체 배양방법을 제공할 수 있다.

[0025] 보다 상세하게는 배지조성물에 접종된 동충하초 균사체를 배양하는 단계는 24℃에서 5 내지 10일간 배양하는

것일 수 있으나, 이에 제한되는 것을 아니다.

[0026] 상기 배양방법은 솔수염하늘소 동충하초 균사체의 생장량 및 코디세핀 함량을 증가시키는 것일 수 있다.

[0027] 상기 동충하초 균사체의 코디세핀 함량은 솔수염하늘소의 투입량, 투입크기 및 배양시간과 하기의 수학식 1과 같은 상관관계를 가지는 것일 수 있다.

[0028] [수학식 1]

[0029] $Y1=-3624.37595+161.74173A+649.65098B+1062.81758C-17.98434AB-23.56214AC-2.33472BC-4.62463A^2-76.22227B^2-60.03783C^2$

[0030] 상기 수학식 1에서 Y1은 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 (mg/L), A는 분말도 (mm), B는 투입량 (g/50mL) 및 C는 배양기간 (day)을 나타낸다.

[0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0034] **<실시예 1> 동충하초 균사체 (*Cordyceps militaris*) 생장 및 코디세핀 함량 증가를 위한 액체 배지 선별**

[0035] 1. 대두 (soybean) 첨가량에 따른 동충하초 균사체 생장량 확인

[0036] 동충하초 균사체 생장량 향상을 위한 액체 배지 개발을 위해, Potato Dextrose Broth (PDB) 및 Sabouraud Dextrose Broth (SDB)를 사용하였으며, 표 1과 같은 함량으로 대두 분말을 액체배지에 첨가하고 교반기를 이용하여 혼합하여 도 2와 같이 다양한 함량의 대두가 포함된 액체배지를 준비하였다.

표 1

[0037]

배지	Potato extract (g)	Dextrose (g)	Peptone (g)	Soybean (g)	Agar (g)
PDB	4	20			
PDBS1	4	20		2.5	
PDBS2	4	20		5	
PDBS3	4	20		10	
PDBS4	4	20		20	
SDB		20	10		
SDBS1		20	10	2.5	
SDBS2		20	10	5	
SDBS3		20	10	10	
SDBS4				20	

[0039] 상기 대두가 첨가된 액체배지를 고압멸균기 (autoclave)를 이용하여 121℃에서 15분간 고압멸균하고, 고압멸균된 액체배지에 동충하초 균사체 (*Cordyceps militaris*, 5 mm)를 3 core 투입한 다음 24℃, 100 rpm 진탕배양기 (shaking incubator)에서 7일간 배양하였다.

[0040] 이후 액체배지에서 배양된 균사체 생장량을 측정하기 위해 배양 종료된 액체배지를 원심분리하여 상등액을 제거하고 분리된 균사체를 멸균수로 세척한 후 동결건조기를 이용하여 72시간 건조 후 무게를 측정하였다.

[0041] 그 결과, 도 3과 같이 PDB 액체배지에 대두 10.0 g/L가 첨가된 PDBS3이 가장 높은 균사체 생장량을 나타내었으며, 대두가 첨가되지 않은 PDB 배지와 비교하여 PDBS3에서는 1.8배의 균사체 생장량이 확인되었다. 대두 10.0 g/L 이상 첨가된 PDB 배지에서는 대두 첨가량이 균사체에 유의적인 영향을 나타내지 않는 것으로 확인됨에 따라, 대두 10.0 g/L이 첨가된 PDBS3 배지가 동충하초 균사체 생장에 가장 효과적인 것으로 확인되었다.

[0042] 또한, 도 4와 같이 SDB 액체배지에서는 대두 2.5 g/L가 첨가된 SDBS1에서 가장 높은 균사체량이 확인되었으며, 대두가 첨가되지 않은 SDBC 배지와 비교하여 SDBS1에서 1.2배 이상의 균사체량이 확인되었다.

[0043] 상기 결과로부터 PDB와 SDB 배지 모두 대두가 첨가되었을 때 균사체량이 증가하는 것으로 확인되었으며, 특히 SDB 배지보다 PDB 배지에 10 g/L 대두를 첨가하였을 때 가장 높은 균사체량 (0.22 g/50mL)을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0045] 또한, 균사체 생장량을 흡광도로 확인하기 위해, 배양 기간 동안 1일 1회 균질화된 배양액 1 mL를 수집하였으며, 수집된 배양액은 UV-spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0046] 그 결과, 도 5 내지 도 6과 같이 대두가 첨가된 PDB와 SDB 배지 모두 6일차에서 급격히 균사체량이 증가하는 것으로 확인되었으며, 특히 PDBS3이 가장 높은 균사체량 증가 효과를 나타내었다.

[0047] 상기 결과들로부터 동충하초 균사체의 높은 생장량 증대를 나타낸 PDBS3이 동충하초 균사체 생장에 가장 효과적인 것이 확인되었다.

[0049] 한편, 대두 투입량에 따른 동충하초 균사체의 코디세핀 (cordycepin) 함량을 HPLC를 이용하여 확인하였다.

[0050] 건조된 균사체 1 mg을 HPLC 등급의 메탄올 1 mL와 혼합하고 HPLC 분석기기를 이용하여 코디세핀을 정성·정량 분석하였다.

[0051] HPLC 분석 컬럼은 Agilent Eclipse Pluse C18 (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 이동상으로 HPLC 등급의 메탄올과 물을 15 : 85 (w:w)로 혼합하여 사용하였다. 유속 1 mL/min, 컬럼 온도 30℃, PDA 260 nm detector, injection volume 10 μL 조건으로 분석을 수행하였다.

[0052] 정성분석은 cordycepin standard의 retention time을 이용하여 검출을 확인하였으며, 정량분석은 농도별 cordycepin standard의 HPLC 정량 분석 결과로부터 작성된 도 8의 calibration curve에 이용하여 도출하였다.

[0053] 그 결과, 도 9 내지 도 13을 참고하면 대두 2.5 g/L가 첨가된 SDB 배지(SDBC1)에서 생장한 동충하초 균사체의 코디세핀 함량이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 대두가 첨가되지 않은 SDB 배지와 비교하여 대두 첨가는 동충하초 균사체 배양액 내 코디세핀 함량을 증가시키는 효과적임이 확인되었다.

[0054] 또한, PDB 배지에서 생장한 동충하초 균사체 배양액보다 SDB 배지에서 생장한 동충하초 균사체 배양액에서 높은 코디세핀 함량이 확인되었다.

[0055] 상기 결과로부터 대두가 첨가된 SDB 배지는 동충하초 균사체의 생장 및 코디세핀 함량을 모두 증가시킬 수 있음이 확인되었으며, 특히 대두 2.5 g/L가 첨가된 SDB 배지가 균사체 생장 및 코디세핀 함량 증가를 위한 최적의 배지 조건임이 확인되었다.

[0057] 2. 액체 배지 pH에 따른 균사체 생장량 및 코디세핀 함량 확인

[0058] 도 14와 같이 1N HCl과 1M NaOH를 사용하여 대두 2.5 g/L가 첨가된 SDB 배지의 pH를 pH 4.5, pH 5.0, pH 5.5 및 pH 6.0 조건으로 조절한 후 pH에 따른 균사체 생장량 및 코디세핀 함량을 확인하였다.

[0059] 상기 액체 배지에 앞선 실험과 동일한 방법으로 동충하초 균사체 (5 mm)를 3 core 투입한 다음 24℃, 100 rpm 진탕배양기에서 7일간 배양하였다.

[0060] 배양 종료 후 액체 배지를 원심분리하여 상등액을 제거하고 균사체를 멸균수로 세척한 후 동결건조기를 이용하여 72시간 건조 후 무게를 측정하였으며, 앞선 실험과 동일한 방법으로 흡광도를 측정하여 배양된 균사체의 생장량을 확인하였다.

[0061] 그 결과, 도 15 및 도 16과 같이 pH 5.5에서 가장 높은 동충하초 균사체 생장량이 확인되었다.

[0062] 상기 결과로부터 동충하초 균사체 생장을 위한 액체 배지의 pH 조건은 pH 5.5인 것으로 확인되었으나, pH 조절 전, SDB의 pH가 5.5~5.6인 점을 고려했을 때, 동충하초 균사체 생장을 위해서 pH 조절이 필수적이지 않은 것으로 확인되었다.

[0064] 한편, 배지의 pH 조건에 따른 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 HPLC를 이용하여 앞선 실험과 동일한 방법으로 분석하였다.

[0065] 그 결과, 도 17과 같이 동충하초 균사체 또는 배양액의 pH가 낮을수록 코디세핀 함량이 증가하는 것이 확인되었으며, 상기 결과는 종래 보고된 연구(Chung 등, 2019)와 동일한 경향을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0066] 상기 결과로부터 동충하초 균사체 또는 배양액의 코디세핀 함량 증가를 위해서는 대두 2.5 g/L가 첨가된 SDB 배지의 pH는 4.5가 적합한 것으로 확인되었다.

[0068] **<실시예 2> 동충하초 균사체 생장에 적합한 솔수염하늘소 첨가 배지 개발**

[0069] 1. 솔수염하늘소 첨가 형태에 따른 동충하초 균사체 생장량 및 코디세핀 함량 확인

[0070] 액체배지에 동충하초 균사체 생장을 위해 솔수염하늘소 투입형태 조건을 확인하였다. 솔수염하늘소를 경남산림환경연구원에서 제공받았으며, 실험에서 사용한 액체배지는 각각 대두 2.5 g/L가 투입된 SDB 배지를 이용하였다. 액체배지에 투입된 솔수염하늘소의 투입형태는 원형 및 분말 형태로 전건 무게로 표 2와 같은 조건으로 첨가하였다.

[0071] 솔수염하늘소 분말은 원형상태를 60℃에서 3일간 건조한 후 분쇄하였으며, 분쇄된 분말을 체를 이용하여 40 mesh를 통과시켜 사용하였다.

[0072] 상기 조건과 같이 솔수염하늘소가 첨가된 액체배지에 앞선 실험과 동일한 방법으로 동충하초 균사체를 첨가하여 배양한 후 솔수염하늘소 첨가 형태에 따른 균사체 생장량 및 코디세핀 함량 변화를 확인하였다.

[0073] 그 결과, 도 19 및 도 20과 같이 솔수염하늘소가 원형으로 첨가되었을 때, 가장 높은 균사체량과 코디세핀 함량이 확인되었다.

표 2

[0074]

항목	미처리	원형	분말
분말도	-	-	40 mesh
투입량	-	20 g/L	20 g/L
배양 기간	7일	7일	7일
배양 온도	24 ℃	24 ℃	24 ℃
RPM	100	100	100

[0076] 2. 솔수염하늘소 첨가량에 따른 동충하초 균사체 생장량 확인

[0077] 표 3과 같은 조건으로 액체배지에 솔수염하늘소를 첨가하였다.

[0078] 솔수염하늘소의 첨가량은 전건무게 기준으로 배지 1L 당 2.5-30 g/L를 첨가하였으며, 솔수염하늘소가 첨가된 액체배지를 121℃ 15분 동안 고압멸균기를 이용하여 고압멸균하여 제조하였다. 제조된 솔수염하늘소 액체 배지에 동충하초 균사체 (5 ㎜) 3 core를 투입하였으며, 24℃, 100 rpm의 진탕배양기에서 7일간 배양하였다. 배양 후 앞선 실험과 동일한 방법으로 균사체 생장량 및 코디세핀 함량 변화를 확인하였다.

[0079] 그 결과, 도 21 및 도 22와 같이 솔수염하늘소 원형 20.0 g/L이 첨가 군의 코디세핀 함량이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

표 3

[0080]

항목	미처리	원형	분말
분말도	-	-	40 mesh

투입량	-	2.5 g/L 5 g/L 10 g/L 20 g/L 30 g/L	2.5 g/L 5 g/L 10 g/L 20 g/L 30 g/L
배양 기간	7일	7일	7일
배양 온도	24 ℃	24 ℃	24 ℃
RPM	100	100	100

[0082] 3. 배지의 솔수염하늘소 분말도에 따른 동충하초 균사체 생장량 및 코디세핀 수준 확인

[0083] 솔수염하늘소 분말도에 따른 동충하초 균사체의 생장량 및 코디세핀 수준 변화를 확인하였다.

[0084] 솔수염하늘소를 60℃ 건조기에서 3일간 건조 후 분쇄하고, 체(sieve)를 이용하여 40 mesh, 80 mesh, 100 mesh를 통과한 분말을 각각 제조하였다.

[0085] 표 4와 같은 조건으로 액체배지에 제조된 솔수염하늘소 분말을 첨가하고 121℃, 15분간 autoclave를 이용하여 고압멸균하였다. 고압멸균된 솔수염하늘소 액체배지에 앞선 실험과 동일한 방법으로 동충하초 균사체를 접종한 후 배양하여 균사체 생장량 및 코디세핀 함량 변화를 확인하였다.

[0086] 그 결과, 도 24 및 도 25와 같이 원형의 솔수염하늘소가 첨가된 실험군에서 높은 동충하초 균사체 생장량이 확인되었으며, 특히 코디세핀 함량이 매우 증가된 것을 확인할 수 있었다.

표 4

[0087]

항목	미처리	원형	분말
분말도	-	-	원형 (natural type) 0.952mm 0.0952mm
투입량	-	20 g/L	20 g/L
배양 기간	7일	7일	7일
배양 온도	24 ℃	24 ℃	24 ℃
RPM	100	100	100

[0089] 4. 반응표면분석(RSM)을 이용한 코디세핀 함량 증대를 위한 솔수염하늘소 첨가배지의 최적 조건 확인

[0090] 투입량, 분말도 및 배양 기간을 변수로 하고, Design-expert version 12를 이용하여 표 5와 같이 코디세핀 최대 함량을 위한 최적의 솔수염하늘소 첨가배지 코드 및 실측값을 얻었으며, 하기 수학식 1을 이용하여 코디세핀 함량을 확인하였다.

[0091] [수학식 1]

[0092] $Y1=-3624.37595+161.74173A+649.65098B+1062.81758C-17.98434AB-23.56214AC-2.33472BC-4.62463A^2-76.22227B^2-60.03783C^2$

[0093] 상기 수학식 1에서 Y1은 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 (mg/L), A는 분말도 (mm), B는 투입량 (g/50mL) 및 C는 배양기간 (day)을 나타낸다.

[0094] 그 결과, 도 26과 같이 SDB 배지 1.5 g/mL, 대두 (Soybean) 2.5 g/mL, 솔수염하늘소 원형 4.1 g/mL 및 증류수 50 mL의 배지 조건으로 7일간 배양할 때, 코디세핀 최대 함량이 2171.25 mg/L (R^2=0.9720)인 것으로 확인되었다.

표 5

[0095]

Run	Coded			Actual			Cordycepin content
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	Y1
1	-1	0	-1	0.0952	3	1	124.43
2	0	0	0	0.952	3	7	1730.92
3	-1	0	1	0.0952	3	14	2119.28
4	1	1	0	9.52	6	7	308.74
5	0	0	0	0.952	3	7	1765.12
6	0	-1	-1	0.952	1.5	1	112.81
7	1	0	-1	9.52	3	1	104.18
8	-1	-1	0	0.0952	1.5	7	1793.16
9	1	0	1	9.52	3	14	320.56
10	0	-1	1	0.952	1.5	14	655.23
11	-1	1	0	0.0952	6	7	1952.11
12	0	1	1	0.952	6	14	613.48
13	0	0	0	0.952	3	7	1731.83
14	0	0	0	0.952	3	7	1712.59
15	1	-1	0	9.52	1.5	7	913.36
16	0	1	-1	0.952	6	1	155.11
17	0	0	0	0.952	3	7	1712.73

Independent variables	Levels		
	-1	0	1
X_1: Particle size, mm	0.0952	0.952	9.52
X_2: Input weight, g	1.5	3	6
X_3: Incubation time, day	1	7	14

[0097] 5. 소나무재선충피해목 분말 및 탄화된 소나무재선충피해목 분말 첨가에 따른 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 확인

[0098] 최적의 솔수염하늘소 첨가배지에서 소나무재선충피해목 분말 20 g/L와 탄화된 소나무재선충피해목 분말 20 g/L를 각각 투입했을 때와 소나무재선충피해목 분말 및 탄화된 소나무재선충피해목 분말을 각각 10 g/L 씩 동시에 투입했을 때의 코디세핀 함량을 확인하였다.

[0099] 소나무재선충피해목을 분쇄 후 100 mesh를 통과시켜 분말로 제조하였으며, 탄화된 소나무재선충피해목 분말은 소나무재선충피해목을 500℃, 1시간 동안 탄화로에서 탄화시킨 후 상기 방법으로 제조하였다.

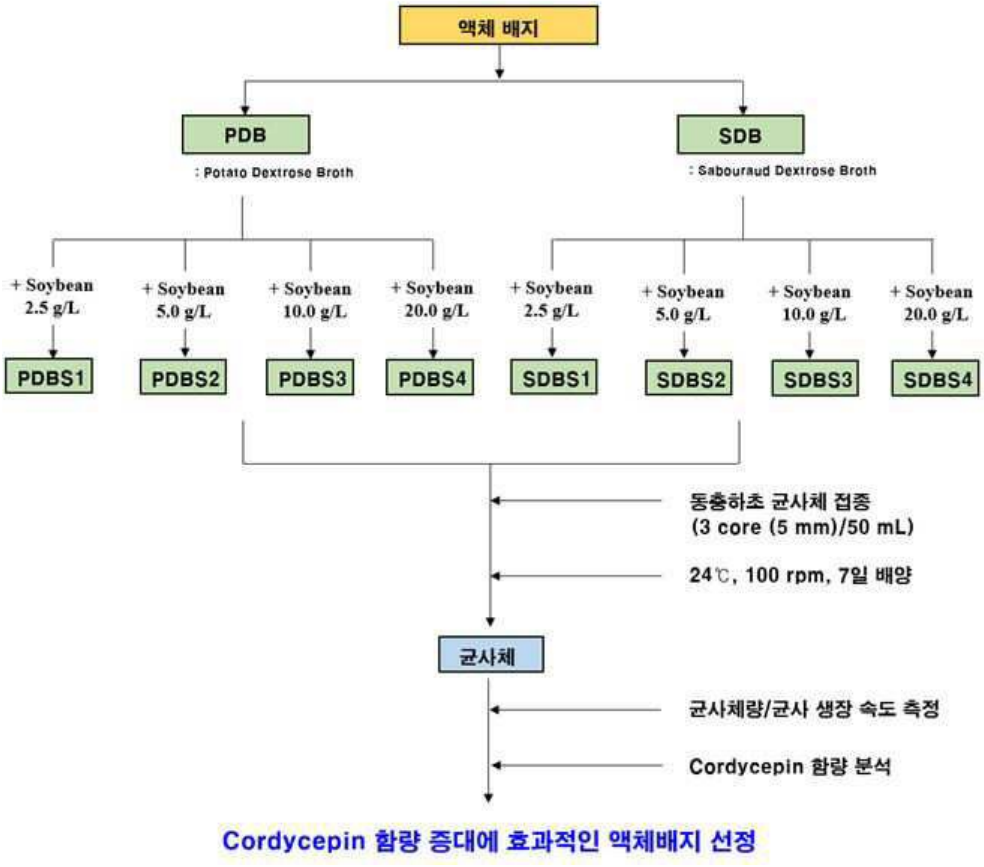
[0100] 제조된 소나무재선충피해목 분말 및 탄화된 소나무재선충피해목 분말을 최적의 솔수염하늘소 액체배지에 첨가한 후 앞선 실험들과 동일한 방법으로 동충하초 균사체를 접종한 후 배양하여 코디세틴 함량을 확인하였다.

[0101] 그 결과, 도 27과 같이 최적 솔수염하늘소 액체배지에 소나무재선충피해목 분말이 첨가된 실험군에서 코디세틴 함량이 약 1.2배 증가된 것을 확인할 수 있었으며, 특히 소나무재선충피해목 분말과 탄화된 소나무재선충피해목 분말이 함께 첨가된 실험군에서 가장 높은 코디세핀 함량이 확인되었다.

[0103] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

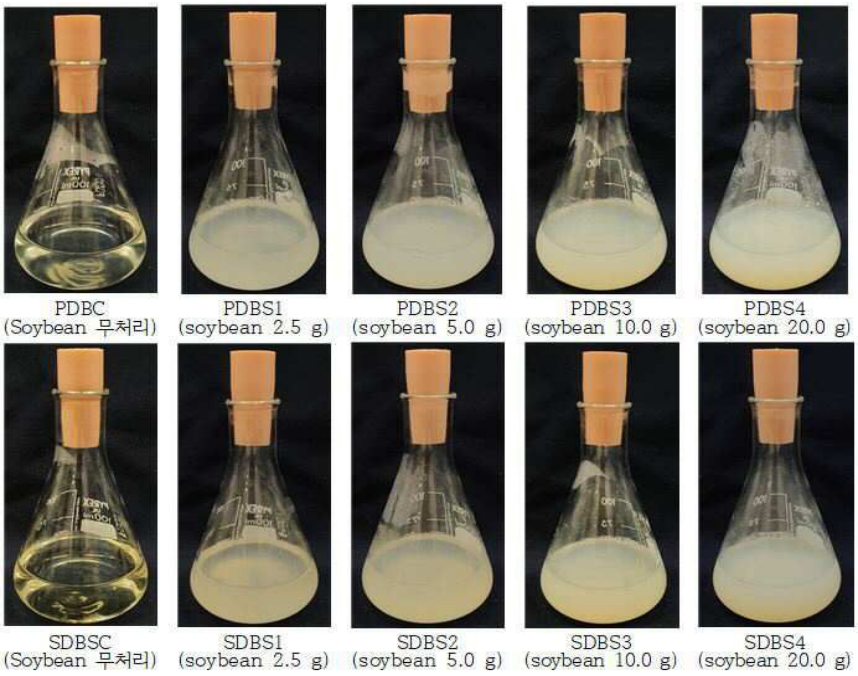
도면

도면1

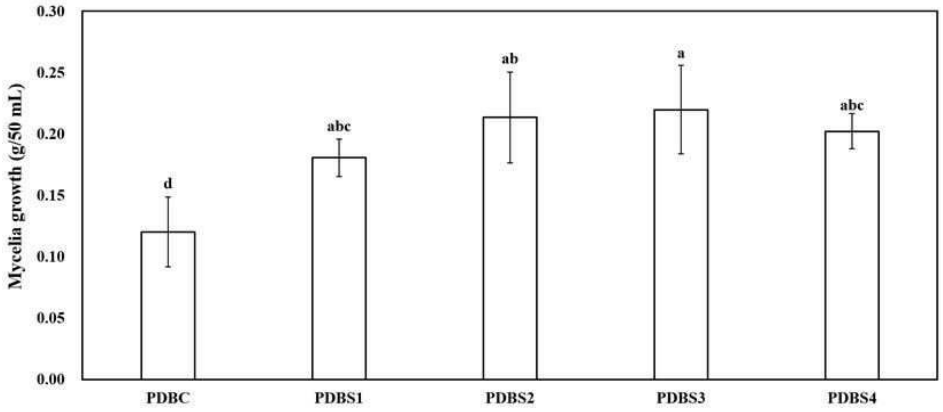


Cordycepin 함량 증대에 효과적인 액체배지 선정

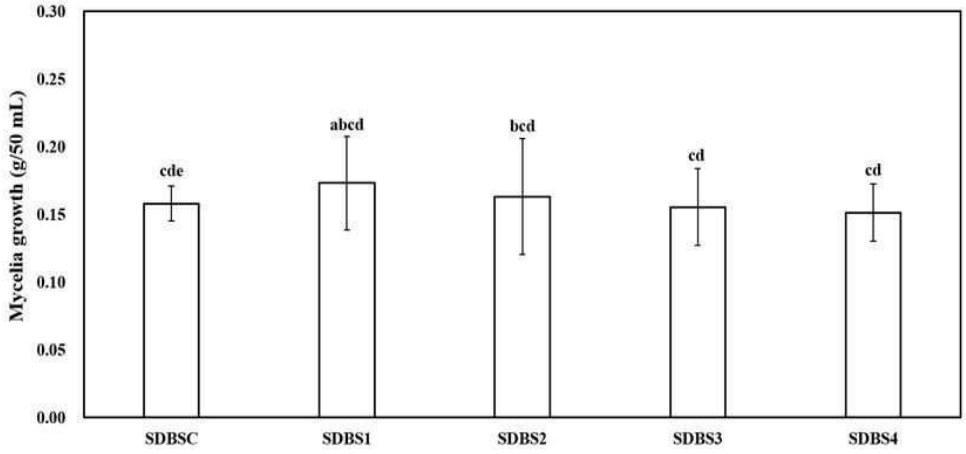
도면2



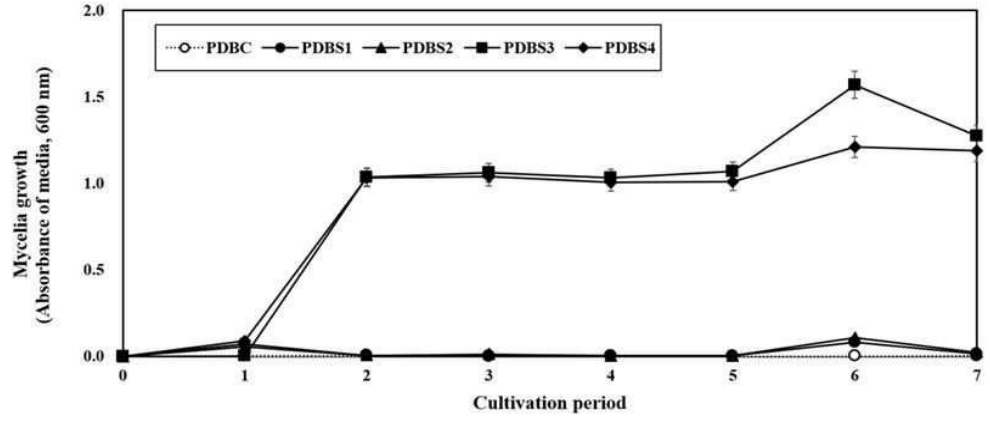
도면3


Mycelia growth (g/50 mL)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
d
abc
ab
a
abc
PDBC
PDBS1
PDBS2
PDBS3
PDBS4

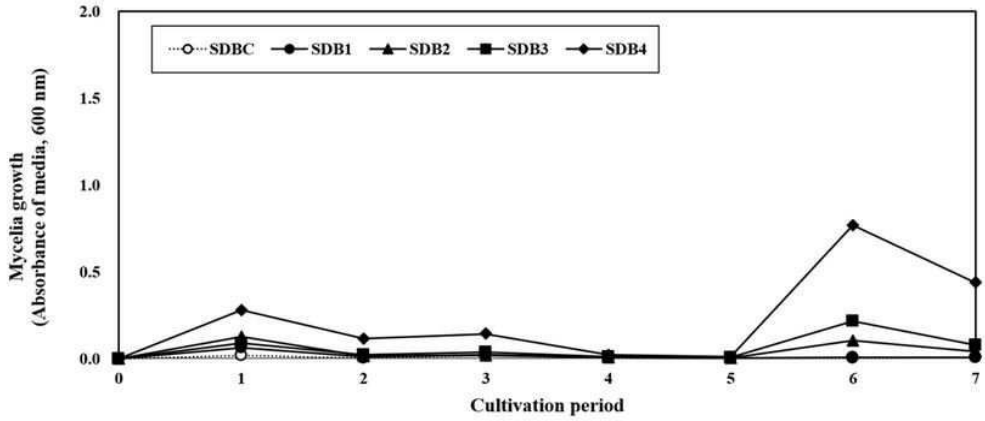
도면4


Mycelia growth (g/50 mL)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
cde
abcd
bcd
cd
cd
SDBSC
SDBS1
SDBS2
SDBS3
SDBS4

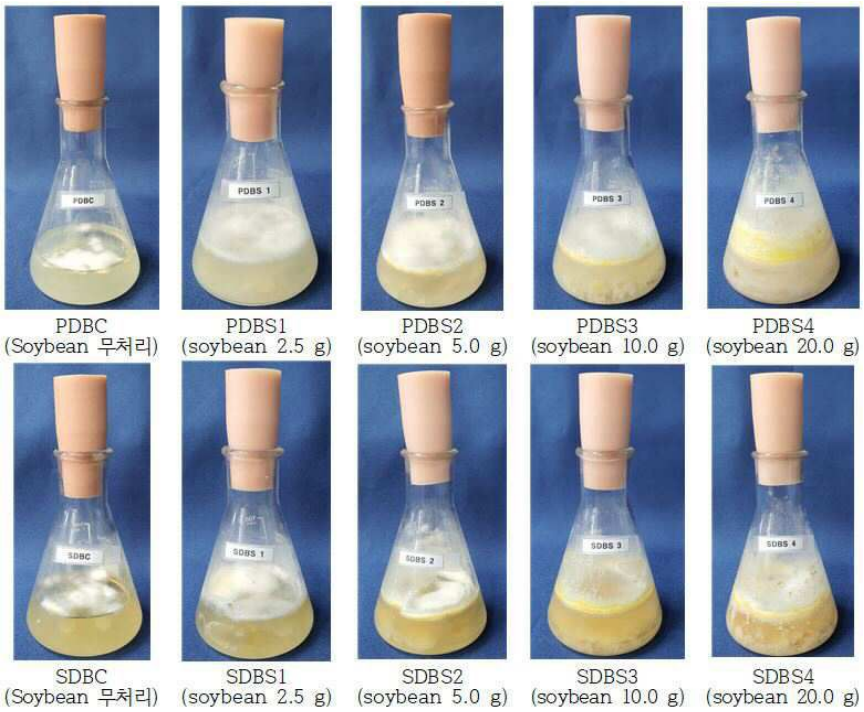
도면5


Mycelia growth
(Absorbance of media, 600 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PDBC
PDBS1
PDBS2
PDBS3
PDBS4
0
1
2
3
4
5
6
7
Cultivation period

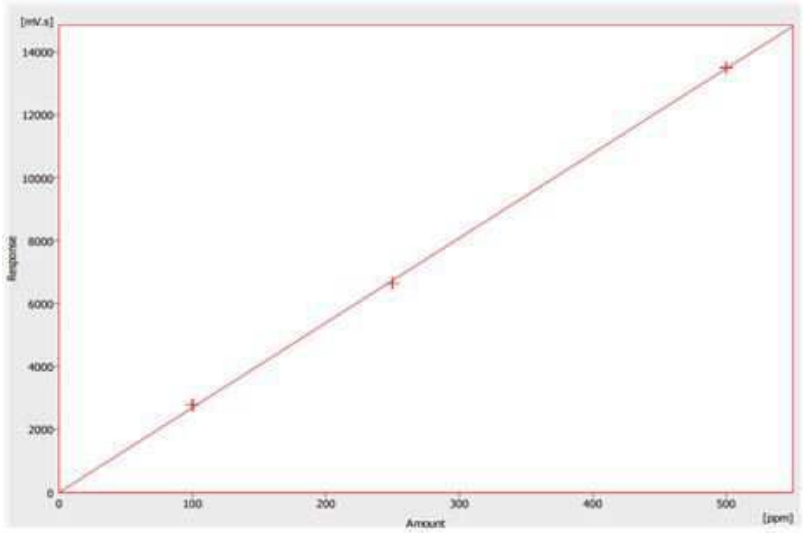
도면6


SDBC
SDB1
SDB2
SDB3
SDB4
Mycelia growth
(Absorbance of media, 600 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
6
7
Cultivation period

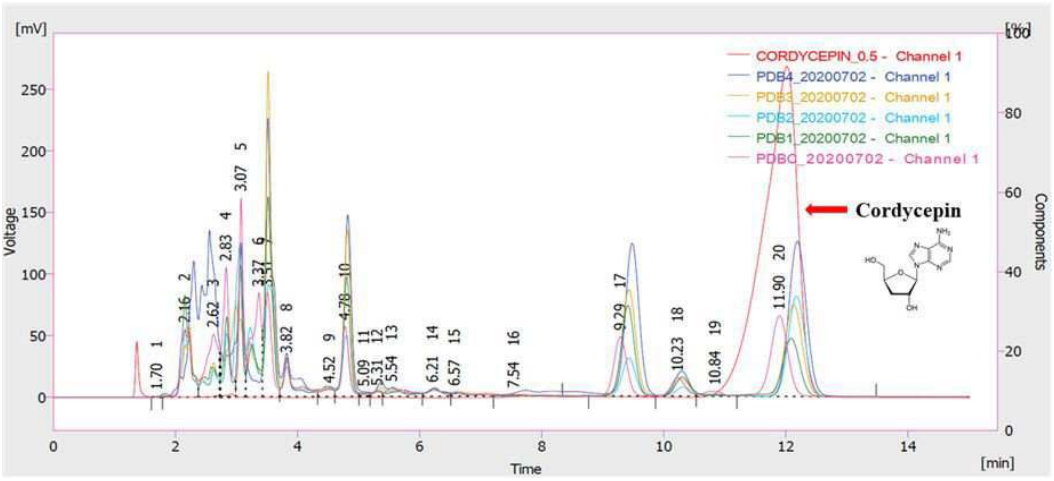
도면7


PDBC
(Soybean 무처리)
PDBS1
(soybean 2.5 g)
PDBS2
(soybean 5.0 g)
PDBS3
(soybean 10.0 g)
PDBS4
(soybean 20.0 g)
SDBC
(Soybean 무처리)
SDBS1
(soybean 2.5 g)
SDBS2
(soybean 5.0 g)
SDBS3
(soybean 10.0 g)
SDBS4
(soybean 20.0 g)

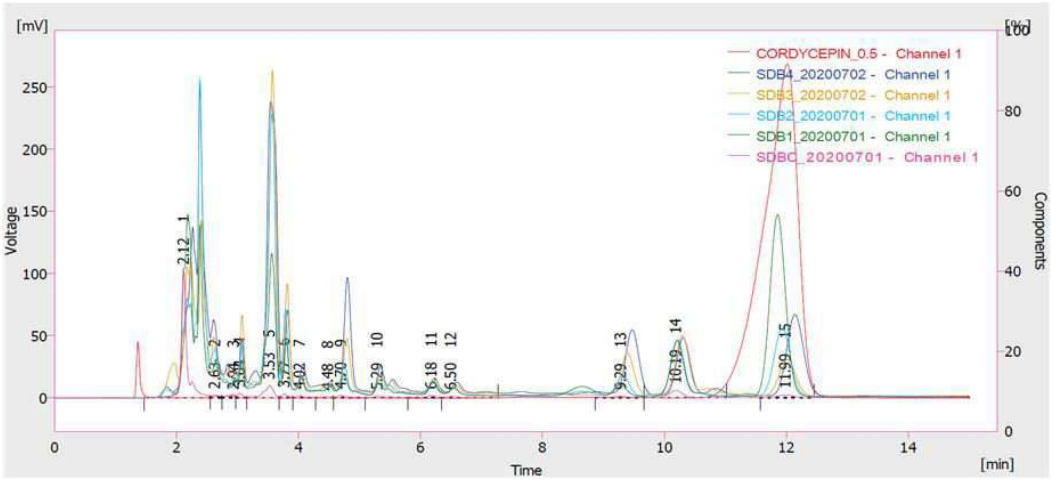
도면8


[mV.s]
Response
Amount
[ppm]

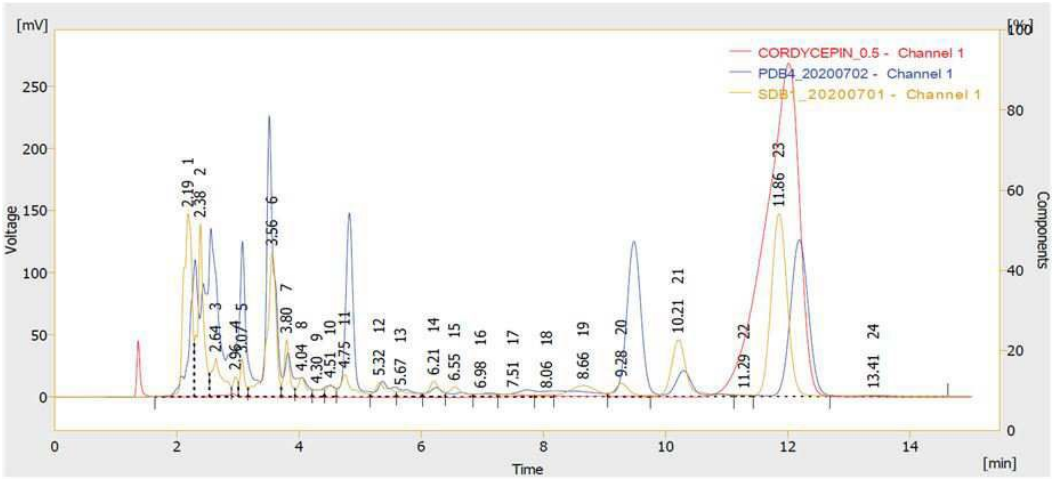
도면9


[mV]
Voltage
Time
[min]
[%]
Components
CORDYCEPIN_0.5 - Channel 1
PDB4_20200702 - Channel 1
PDB3_20200702 - Channel 1
PDB2_20200702 - Channel 1
PDB1_20200702 - Channel 1
PDBC_20200702 - Channel 1
Cordycepin

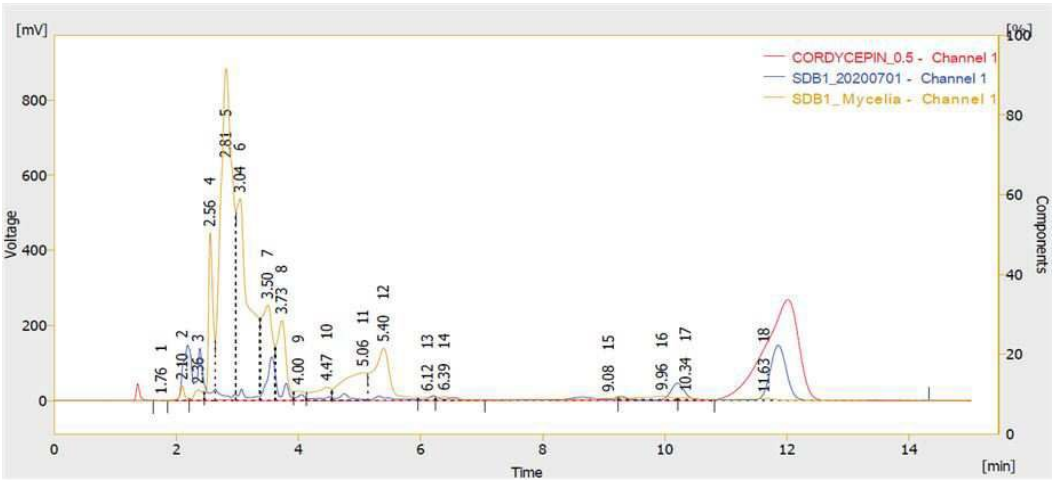
도면10


[mV]
Voltage
Time
[min]
[%]
Components
CORDYCEPIN_0.5 - Channel 1
SDB4_20200702 - Channel 1
SDB3_20200702 - Channel 1
SDB2_20200701 - Channel 1
SDB1_20200701 - Channel 1
SDBC_20200701 - Channel 1

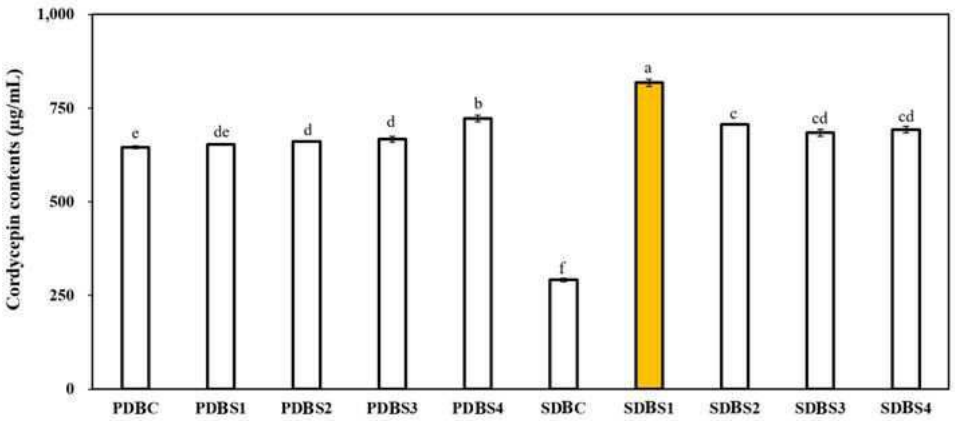
도면11



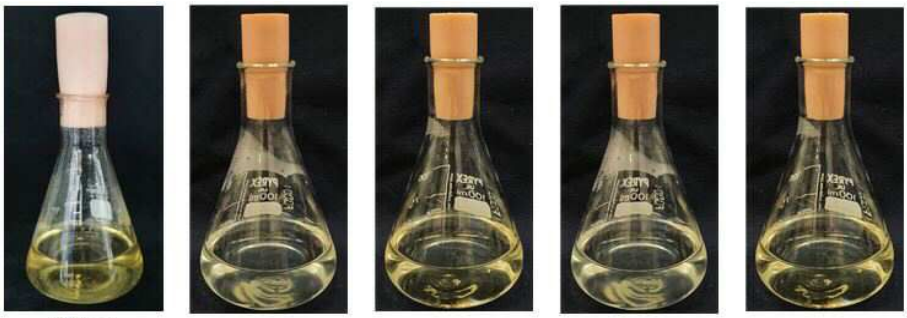
도면12



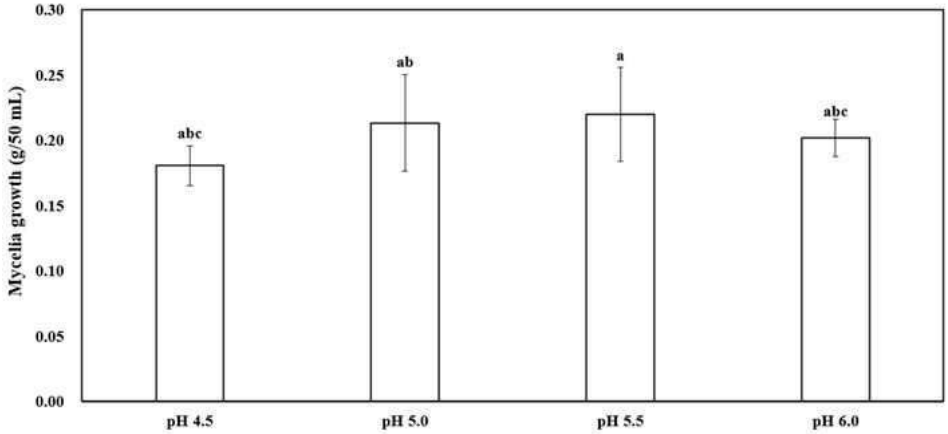
도면13



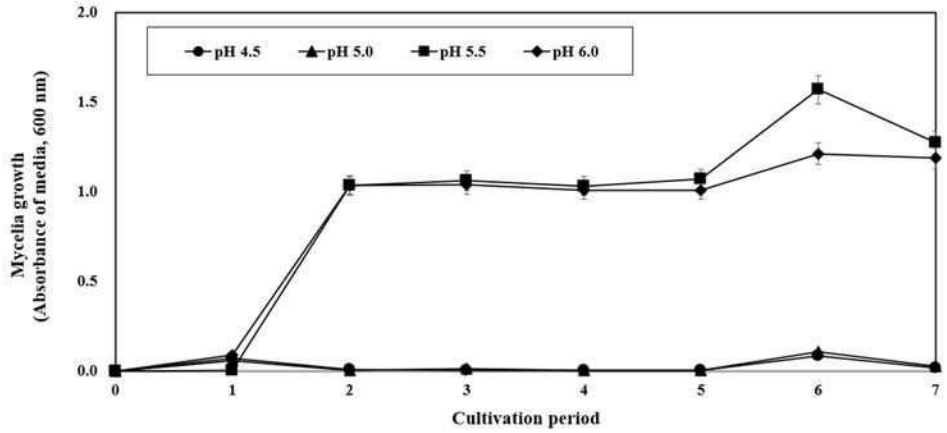
도면14



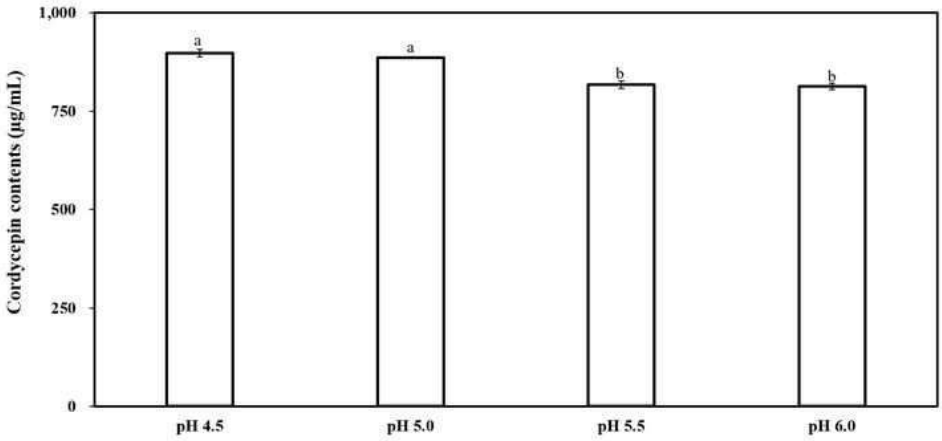
도면15



도면16



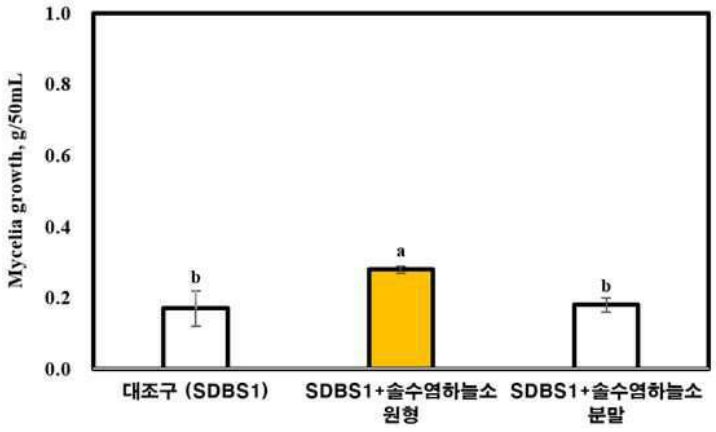
도면17



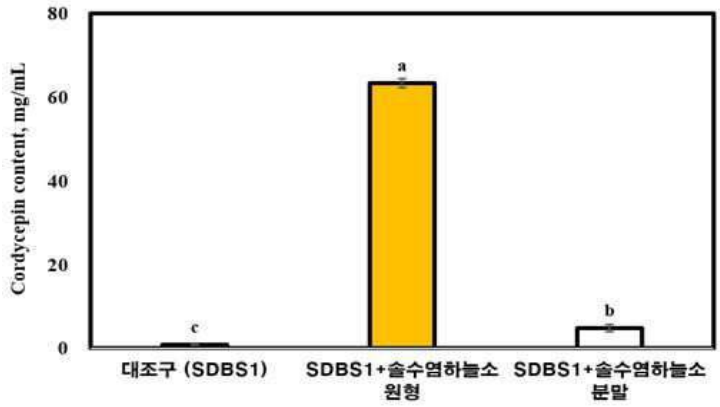
도면18



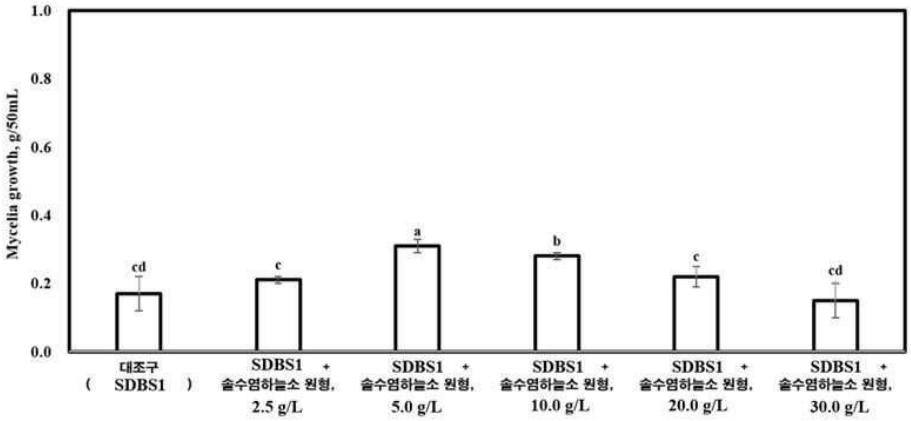
도면19



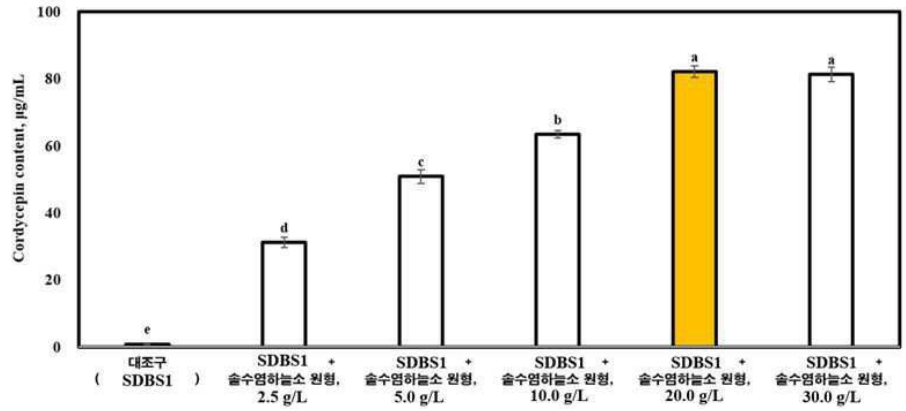
도면20



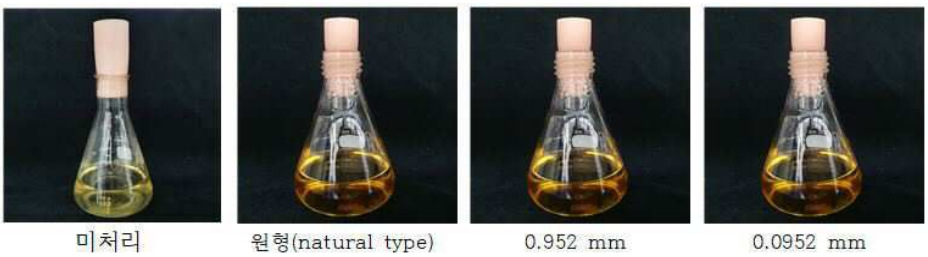
도면21



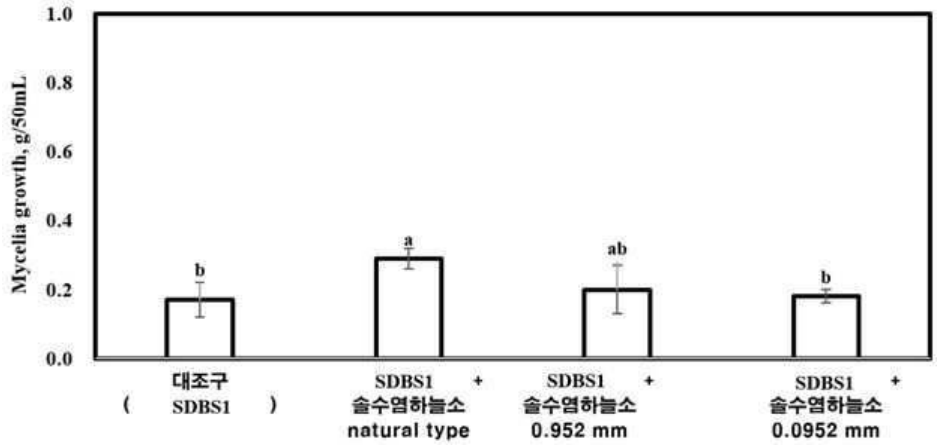
도면22



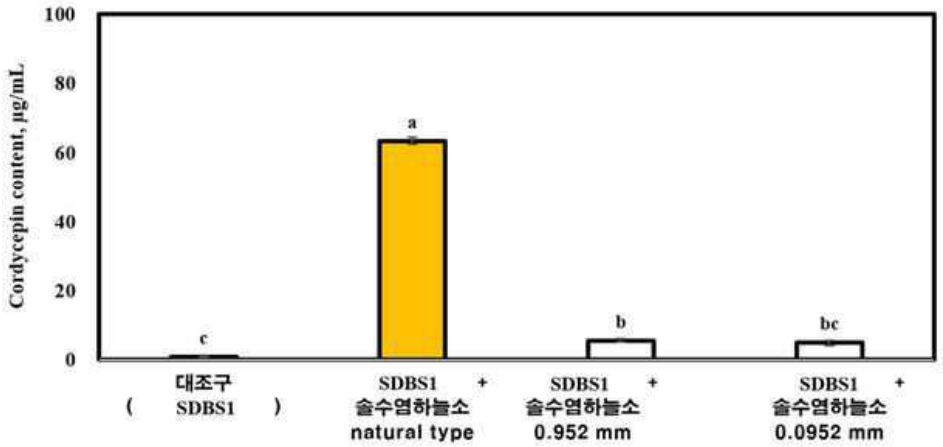
도면23



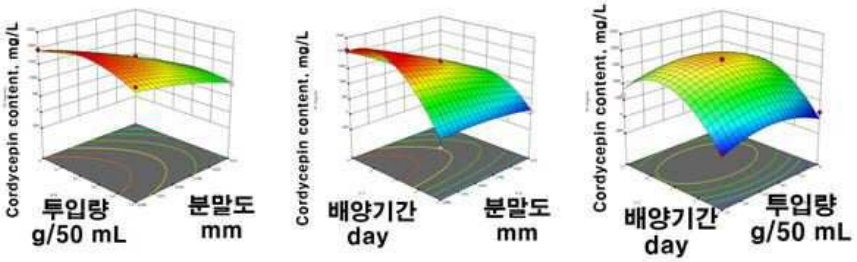
도면24


Mycelia growth, g/50mL
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
b
a
ab
b
대조구
(SDBS1)
SDBS1 + 솔수염하늘소 natural type
SDBS1 + 솔수염하늘소 0.952 mm
SDBS1 + 솔수염하늘소 0.0952 mm

도면25


Cordycepin content, μg/mL
100
80
60
40
20
0
c
a
b
bc
대조구
(SDBS1)
SDBS1 + 솔수염하늘소 natural type
SDBS1 + 솔수염하늘소 0.952 mm
SDBS1 + 솔수염하늘소 0.0952 mm

도면26



조성물	함량
SDB	1.5 g/mL
Soybean	2.5 g/mL
솔수염하늘소 (입자크기: 원형)	4.1 g/mL
증류수	50 mL

7일 배양

최대 cordycepin 함량: 2171.25 mg/L

(R^2=0.9720)

도면27

