(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0084899
(43) 공개일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 43/16 (2006.01) *A01G 18/20* (2018.01)
A23L 31/00 (2016.01) *A23L 33/10* (2016.01)
C12N 1/14 (2018.01)
(52) CPC특허분류
A01N 43/16 (2013.01)
A01G 18/20 (2018.02)
(21) 출원번호 10-2019-0177401
(22) 출원일자 2019년12월30일
심사청구일자 2019년12월30일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
신현재
전라남도 화순군 도곡면 원화길 32
최문희
광주광역시 동구 천변좌로604번안길 5, 402호(소태동)
(74) 대리인
특허법인리채

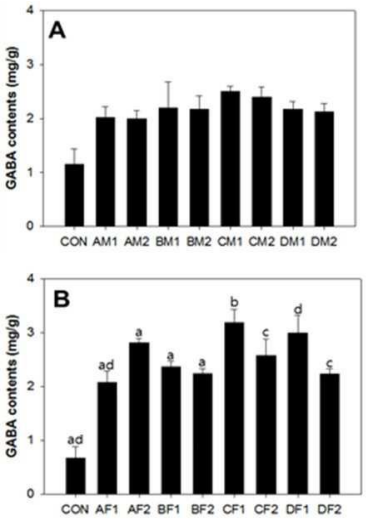
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **버섯의 감마-아미노부티르산 함량 증가용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 버섯의 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA) 함량 증가용 조성물에 관한 것으로 본 발명의 조성물을 버섯에 처리하면 버섯 내의 기능성 물질로서 GABA의 함량을 증대시킬 수 있는바, 건강기능식품 및 의약품 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23L 31/00 (2020.05)
A23L 33/10 (2016.08)
C12N 1/14 (2021.05)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711089295
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 생체강화(biofortification)에 기반한 대사조절을 통한 꽃송이버섯의 베타글루칸, GABA 함량 증대와 대량 생산체계 확립
기 여 율 1/1
과제수행기관명 조선대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

알긴산 나트륨(sodium alginate)을 포함하는 버섯의 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA) 함량 증가용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 알긴산 나트륨은 괭생이모자반(Sargassum horneri), 모자반(Sargassum fulvellum) 또는 톳(Sargassum fusiforme) 유래 알긴산 나트륨인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 알긴산 나트륨은 중합도(degree of polymerization, DP)가 2 내지 7인, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 알긴산 나트륨은 조성물 총 중량의 0.05 내지 10% 포함되는, 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 버섯은 꽃송이버섯인, 조성물.

청구항 6

버섯에 알긴산 나트륨(sodium alginate)을 처리하는 단계를 포함하는 GABA 함량이 증가된 버섯의 생산방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 버섯은 꽃송이버섯인, 방법.

청구항 8

청구항 6 및 7 중 어느 한 항의 방법으로 생산된 GABA 함량이 증가된 버섯.

청구항 9

청구항 8의 버섯을 포함하는 신경 안정용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 버섯의 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA) 함량 증가용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA)은 억제성 신경전달 물질로서, 혈압상승을 억제하고 시력 증진에 효과가 있으며, 불안감, 초조감 등을 진정시키는 작용을 하는 것으로 알려진 물질이다. 동물의 경우 뇌, 심장, 폐, 신장 등에 분포되어 있으며, 식물의 경우 발아 현미, 녹차 등에서 주로 발견되고 있다.

[0004] 스트레스에 시달리는 현대인, 특히 수험생, 알코올 과다 섭취자 등의 경우에는, 뇌와 혈중 GABA 농도가 낮은 것으로 보고되어 있으며, 체내 GABA 농도의 극심한 부족은 발작, 경련, 간질 증세를 일으키는 것으로 알려져 있어서, 이들 증세를 완화 내지는 치료하기 위해서, 체내 GABA 농도를 높이기 위한 목적의 식품 또는 약제 개발이 이루어지고 있다.

[0005] 버섯은 널리 사용하는 식품 재료로서, 식용 버섯에는 다양한 아미노산을 비롯하여 비타민류, 단백질, 효소류 등 많은 영양 성분이 함유되어 있다. 또한 최근에는 버섯으로부터 다양한 약용학적 가치도 발굴되고 있는데, 예를 들어 콜레스테롤 억제, 고혈압 예방, 항암효과 등이 폭넓게 연구되고 있다.

[0006] 다만, 이러한 다양한 생리활성 물질을 포함하는 버섯에서 GABA 함량 증가를 위한 방법에 대한 연구는 전무한 실정이다.

[0007] 이에 버섯의 기능성 성분 특히, GABA의 함량을 증가시키고, GABA의 함량을 높인 버섯 유래 건강기능식품의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1778260호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 버섯의 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA) 함량 증가용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 GABA 함량이 증가된 버섯의 생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 GABA 함량이 증가된 버섯을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 GABA 함량이 증가된 버섯을 포함하는 신경 안정용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 1. 알긴산 나트륨(sodium alginate)을 포함하는 버섯의 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA) 함량 증가용 조성물.

[0016] 2. 위 1에 있어서, 상기 알긴산 나트륨은 괭생이 모자반(Sargassum horneri), 모자반(Sargassum fulvellum) 또는 톳(Sargassum fusiforme) 유래 알긴산 나트륨인, 조성물.

[0017] 3. 위 1에 있어서, 상기 알긴산 나트륨은 중합도(degree of polymerization, DP)가 2 내지 7인, 조성물.

[0018] 4. 위 1에 있어서, 알긴산 나트륨은 조성물 총 중량의 0.05 내지 10% 포함되는, 조성물.

[0019] 5. 위 1에 있어서, 상기 버섯은 꽃송이버섯인, 조성물.

[0020] 6. 버섯에 알긴산 나트륨(sodium alginate)을 처리하는 단계를 포함하는 GABA 함량이 증가된 버섯의 생산방법.

[0021] 7. 위 6에 있어서, 상기 버섯은 꽃송이버섯인, 방법.

[0022] 8. 위 6 및 7 중 어느 한 항의 방법으로 생산된 GABA 함량이 증가된 버섯.

[0023] 9. 위 8의 버섯을 포함하는 신경 안정용 건강기능식품.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 조성물을 버섯에 처리하면 버섯 내의 기능성 물질로서 GABA의 함량을 증가시킬 수 있는바, 건강기능식품 및 의약품 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 엘리시터를 처리한 꽃송이 버섯의 성장 사진이다.

도 2는 ELISA kit를 이용하여 측정한 알긴산 나트륨 처리한 꽃송이버섯 균사체(A) 및 자실체(B)의 GABA 함량이다.

도 3은 알긴산 나트륨을 처리한 꽃송이버섯의 GABA와 표준 GABA의 HPLC 분석 결과이다.

도 4는 HPLC를 이용하여 측정한 알긴산 나트륨 처리한 꽃송이버섯 균사체(A) 및 자실체(B)의 GABA 함량이다.

도 5는 알긴산 나트륨을 처리한 꽃송이버섯의 MTT assay 결과이다.

도 6은 알긴산 나트륨을 처리한 0.1mg/㎖ 농도의 꽃송이버섯의 수상돌기 보호 효과를 확인한 도이다.

도 7은 알긴산 나트륨을 처리한 1mg/㎖ 농도의 꽃송이버섯의 수상돌기 보호 효과를 확인한 도이다.

도 8은 엘리시터 처리한 꽃송이 버섯의 신경세포 내 신호전달경로 변화를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030] 본 발명은 알긴산 나트륨(sodium alginate)을 포함하는 버섯의 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA) 함량 증가용 조성물을 제공한다.

[0031] 알긴산 나트륨은 백색-엷은 황색을 띤 섬유상, 알갱이, 과립 또는 분말로 거의 냄새가 없으며, 맛이 없는 고분자 물질이다. 알긴산 나트륨은 통상적으로 시판되는 것을 이용한 것일 수 있고, 해조류로부터 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 해조류는 갈조류, 녹조류, 홍조류 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 모자반, 괭생이 모자반, 톳, 다시마, 미역, 감태, 김, 우뭇가사리, 청각, 파래 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 더욱 구체적으로 알긴산 나트륨은 괭생이 모자반(Sargassum horneri), 모자반(Sargassum fulvellum) 또는 톳(Sargassum fusiforme) 유래 알긴산 나트륨일 수 있다.

[0033] 상기 알긴산나트륨은 공지된 방법으로 해조류로부터 추출된 것일 수 있다. 예를 들면 해조류를 알칼리 처리 후 산 처리하거나, 산 처리 후 알칼리 처리하여 추출된 것일 수 있다.

[0034] 알칼리는 Na_2CO_3 등의 약염기 혹은 NaOH 등의 강염기 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 산은 HCl, H_2SO_4, HF, HNO_3, $HClO_4$ 등의 강산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 알칼리 처리는 가열 하에 수행된 것일 수 있다. 예를 들면 40℃ 내지 120℃ 등으로 가열된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 산 처리는 적정 크기의 분자량을 갖는 알긴산 나트륨이 얻어지도록 수행된 것일 수 있고, 예를 들면 12시간 내

지 36시간 수행되어 얻어진 것일 수 있다.

[0037] 알긴산 나트륨은 예를 들면 그 중합도(DP)가 1 내지 10, 구체적으로 2 내지 7인 것일 수 있다. 구체적으로 알긴산 나트륨은 글루론산(guluronate) 또는 만누론산(mannuronate), 또는 이들이 혼합된 단량체가 1 내지 10개, 2 내지 7개 결합된 것일 수 있다. 알긴산 나트륨은 그 원료, 채취시기 및 산의 처리시기와 시간 등에 따라 분자량에 큰 차이가 있을 수 있다. 상기 범위 내의 분자량을 가진 알긴산 나트륨을 사용하면, 버섯의 GABA 함량 증가 효과를 극대화할 수 있다.

[0038] 알긴산 나트륨은 조성물 총 중량의 0.05 내지 10% 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어 알긴산 나트륨은 증류수에 0.05 내지 10 중량%, 구체적으로 0.07 내지 5 중량%, 더욱 구체적으로 0.09 내지 3 중량% 포함될 수 있다. 상기 알긴산 나트륨의 농도는 버섯 재배 조건에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0039] 조성물은 버섯 재배를 위한 첨가물을 더 포함할 수 있다. 첨가물은 버섯 재배용 배지 또는 배지 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 조성물은 상기 성분들을 용해 또는 분산시키는 용매 또는 분산매를 더 포함할 수 있다. 용매 또는 분산매로는 알긴산 나트륨이 용해 또는 분산될 수 있는 것이라면 특별한 제한이 없으며 예를 들면, 물, 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합물일 수 있고, 구체적으로 물일 수 있다. 다만, 100% 에탄올, 100% 메탄올 등은 버섯의 생육을 저해할 수 있으므로, 물과 혼합되거나, 물만을 사용하는 것이 보다 바람직하다.

[0041] 조성물은 알긴산 나트륨을 포함함으로써, 이를 이용하여 버섯을 재배하는 경우 다량의 GABA를 함유하는 버섯을 생산할 수 있다.

[0042] 적용 대상인 버섯은 GABA 생성능(GABA 경로, GABA shunt)을 가진 모든 버섯이 제한 없이 사용될 수 있다. 예를 들면, 가죽밤그물버섯, 갈색솔방울버섯, 개암다발버섯, 검은비늘버섯, 고무버섯, 국수버섯, 굴털이(젖버섯), 그물버섯, 기와버섯(청버섯), 꽃송이버섯, 꾀꼬리버섯, 노란구름벚꽃버섯(흑갈색벚꽃버섯), 노란달걀버섯, 노랑난버섯, 노루궁뎅이버섯, 느타리버섯, 능이버섯, 달걀버섯, 댕구알버섯, 덕다리버섯, 독청버섯아재비, 두엄먹물버섯, 땅송이, 마른산그물버섯, 만가닥버섯, 말불버섯, 맛버섯(나도팽나무버섯), 망태버섯, 모래배꼽버섯, 목이버섯, 방추광대버섯, 밤버섯, 배불뚝이깔대기버섯, 배젖버섯, 버터애기버섯, 볏짚버섯, 북방처녀버섯, 붉은점박이광대버섯, 뽕나무버섯부치, 뿔나팔버섯, 새송이버섯, 석이버섯, 소혀버섯, 솔버섯, 솜귀신그물버섯, 송이버섯, 싸리버섯, 안장버섯, 양송이버섯, 옥수수깜부기버섯, 우산버섯, 잎새버섯, 왕송이버섯, 자주국수버섯, 젖버섯, 젓비단그물버섯, 접시껄껄이그물버섯, 족제비눈물버섯, 졸각버섯, 좀나무싸리버섯, 참부채버섯, 찹쌀떡버섯, 처녀버섯, 청머루무당버섯, 치마버섯, 큰갓버섯, 턱수염버섯, 털밤그물버섯, 트러플, 팽이버섯, 표고버섯, 푸른우유버섯, 풀버섯, 풍선끈적버섯, 피즙갈색깔때기버섯, 황금무당버섯, 황소비단그물버섯, 흰가시광대버섯, 흰달걀버섯, 흰우단버섯, 흰우산버섯 또는 흰그물버섯 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 꽃송이버섯일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 버섯은 균사체 또는 자실체일 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 균사체 또는 자실체에 처리될 수 있고, 자실체 형성 전의 균사체에 처리될 수도 있다.

[0046] 본 발명은 버섯에 알긴산 나트륨을 처리하는 단계를 포함하는 GABA 함량이 증가된 버섯의 생산방법을 제공한다.

[0047] 알긴산 나트륨은 예를 들어, 용매에 분산 또는 용해된 것일 수 있다. 용매는 증류수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 방법은 버섯 균사체 또는 자실체에 알긴산 나트륨을 처리하는 것일 수 있다.

[0049] 알긴산 나트륨은 버섯 균사체의 성숙 이후에 처리될 수 있다. 균사체가 성숙되면 자실체가 형성되는 것으로, 구체적으로 버섯은 (1차) 균사가 접합/조직화하여 2차 균사가 형성될 수 있고, 또한, 2차 균사가 접합/조직화하여 3차 균사를 형성하거나, 시원체를 형성하고, 이후에 자실체가 형성될 수 있다. 본 발명에서 알긴산 나트륨은 2차 균사의 형성 이후, 3차 균사의 형성 이후, 시원체의 형성 이후, 또는 보다 구체적으로 버섯 균사체가 성숙하여 자실체로 발전하기 전인 프리모달(primordial) 상태에서 처리될 수 있다. 이때 알긴산 나트륨은 균사체에 처리될 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명에서 알긴산 나트륨은 자실체 형성 중 또는 자실체 형성 이후에도 처리될 수 있다. 이때 알긴산 나트륨은 균사체 또는 자실체에 처리될 수 있다. 자실체 형성 중이라는 것은 자실체의 자루 형성 중 또는 갓 형

성 중 일 수 있고, 자실체 형성 이후는 갓의 형성 이후일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 알긴산 나트륨은 매일 또는 일정 시간 간격을 두고 처리될 수 있다. 알긴산 나트륨의 처리 시간과 양은 버섯의 재배 조건에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어 하루에 1회 내지 4회, 구체적으로 아침, 저녁으로 2회 처리될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 1회 분무량은 버섯 배양용기 당 2 내지 10 ㎖, 구체적으로 3 내지 8 ㎖ 처리할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0052] 알긴산 나트륨은 버섯을 재배할 때 침봉, 침수, 살수 또는 분무 등의 방법으로 처리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 알긴산 나트륨의 처리 방법은 구체적인 예를 들면, 골목(버섯 재배용 나무)에 침봉 호스를 찔러넣어 알긴산 나트륨 용액을 공급하는 것일 수 있고, 용기 내에 알긴산 나트륨 용액을 채우고, 골목을 담그는 방식일 수 있고, 버섯 재배사 내에 분사노즐을 이용하여 알긴산 나트륨 용액을 뿌리는 것일 수 있고, 각각의 골목에 스프레이를 이용하여 분무하는 방식일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0054] 배지는 버섯의 배양 시 필요한 영양원 등을 공급할 수 있는 액체 또는 고형의 재료를 포함할 수 있다. 예를 들어, 배지는 톱밥, 면실피, 비트펄프, 원목, 한천배지, PDB(Potato dextrose broth) 액체배지, 밀가루 액체배지, MCM(mushroom complete medium) 액체배지 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명의 버섯은 통상의 버섯 재배 방법으로 통상의 기술자에 공지된 방법으로 생산될 수 있다. 예를 들어 버섯 재배용 배지의 형태는 병배지, 판배지, 성형배지, 봉지 배지 등 배지의 형태와 형상은 다양하게 적용될 수 있다. 또한, 버섯 재배사의 형태는 비닐하우스, 판넬재배사, 유리온실 등에서 선반형 다층구조 재배, 지면균상 재배 방법 등 다양한 재배 환경에서도 적용될 수 있다.

[0057] 본 발명은 상기 방법으로 생산된 GABA 함량이 증가된 버섯을 제공한다.

[0058] 본 발명의 방법으로 생산된 버섯은 GABA 함량이 현저히 증가된 것일 수 있다. 예를 들면 알긴산 나트륨 무처리 버섯 대비 GABA 함량이 1.5배 내지 10배, 1.5배 내지 7배, 1.5 내지 5배 등이 증가된 것일 수 있다.

[0060] 본 발명은 상기 방법으로 생산된 GABA 함량이 증가된 버섯을 포함하는 신경 안정용 건강기능식품을 제공한다.

[0061] GABA는 포유류의 중추신경계에서 억제성 신경전달물질로 작용하고, 숙취해소, 불안감해소, 고혈압강하, 인슐린 효과의 증대, 우울증 해소 등의 효과가 있다.

[0062] 본 발명의 건강기능식품은 GABA를 고함량으로 포함하는 버섯을 포함하고 있어, GABA의 유용한 성분을 인체에 전달할 수 있으며, 이에 GABA가 가지는 건강기능성을 그대로 누릴 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 건강기능식품은 숙취 해소 효능, 신경 안정 효능, 혈압 강하 효능 등의 건강기능성을 가지며, 특히 신경 안정에 탁월한 효과가 있다.

[0063] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0064] 본 발명의 건강기능식품이라 함은, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0065] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0066] 식품 첨가물 공전에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 상기 추출물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0068] 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 상기 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 상기 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0069] 환 형태의 건강기능식품은 상기 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0070] 과립 형태의 건강기능식품은 상기 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0071] 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류. 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복함제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0072] 건강기능식품은 영양제의 용도로 경구 적용될 수 있으며, 적용 형태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면 경구 투여되는 경우, 하루 섭취량은 5000mg 이하인 것이 바람직하고, 하루 섭취량이 2000mg 이하인 것이 보다 바람직하며, 하루 섭취량이 500 내지 1500mg, 또는 650mg인 것이 가장 바람직하다. 캡슐제 또는 정제로 제제화하는 경우, 1일 1회 1정을 물과 함께 투여할 수 있다.

[0073] 상기 알긴산 나트륨 및 이의 추출방법, 버섯 및 이의 생산방법에 관련된 구체적인 설명은 상술한 바와 같다.

[0074]

[0075] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0077] **재료 및 방법**

[0078] **1. 꽃송이버섯 공시균주 및 생장**

[0079] 꽃송이버섯 균주는 전남산림자원연구소가 채집 및 선발한 JF02-06 균주로, PDA 배지에 계대하여 분양받아 사용하였으며, 국내외의 꽃송이버섯 균사 생장의 최적 조건에 대한 연구 결과를 토대로 배양하였다. 꽃송이 버섯은 25±1 ℃ incubator (JSSI-300CL, JSR, Korea)에서 암배양하였으며, 균사의 면적이 petri-dish 전체 면적의 90-95% 정도가 되었을 때(프리모달 상태) 실험 배지에 계대하였고, 배지에 0.1 중량% 및 0.5 중량%의 엘리시터를 혼합하여 배양하였다. 분리된 원균은 4℃에 보관하며 3-4개월마다 새로운 PDA에 계대하였다. 균사 생장은 petri-dish 중앙에 균사체를 접종하고 수직으로 교차하는 지름의 길이를 측정하여 평균값을 생장 길이로 하였고 배양일 수에 따라 신장한 양을 기록하였다. 자실체가 형성된 이후에 엘리시터는 아침, 저녁으로 하루 2회 분무하였으며, 분무량은 배양 용기 당 5㎖로 하여 하루 총 10㎖를 분무하여 배양하였다. 자실체에 엘리시터는 프리모달 상태에서 자실체의 갓 형성 때까지 처리되었다. 자실체의 생장은 8주 간 생장 및 변화를 관찰하였다. 이때. 엘리시터 종류 및 첨가 비율은 표 1에 나타내었으며(표 1과 같은 약자로 명명함), 각 엘리시터 처리 후의 생장사진은 도 1(A(대조군), B(sigma사 알긴산 나트륨), C(팽생이모자반 알긴산 나트륨), D(모자반 알긴산 나트륨), C(톳 알길산 나트륨)에 나타내었다.

표 1

[0081]

엘리시터	농도 (%)	약자	
		균사체	자실체
무처리 (사용 안 함)	-	M CON	F CON
시그마 sodium alginate	0.1	AM1	AF1
	0.5	AM2	AF2
팽생이모자반 sodium alginate	0.1	BM1	BF1
	0.5	BM2	BF2
모자반 sodium alginate	0.1	CM1	CF1
	0.5	CM2	CF2
톳 sodium alginate	0.1	DM1	DF1
	0.5	DM2	DF2

[0083] **2. 알긴산 나트륨(엘리시터) 제조**

[0084] 팽생이모자반, 모자반, 톳에서 추출한 알긴산 나트륨(sodium alginate)을 엘리시터로 사용하였다. 대조군으로 sigma사의 알긴산 나트륨을 사용하였다. 25 g의 해조류를 2%(w/v) formaldehyde(수용액) 800 ㎖로 24시간 동안 상온에서 전처리 후 증류수로 세척하고, 0.2 M HCl(수용액) 800 ㎖로 24시간 동안 전처리하였다. 전처리가 완료된 해조류를 증류수로 세척하여 2%(w/v) Na_2CO_3(수용액) 1L로 3시간 동안 100℃에서 알긴산 나트륨을 추출하였다. 추출물을 필터로 여과 후 10,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하고, 3배 부피의 에탄올을 첨가하여 알긴산 나트륨을 침전시켰다. 이를 아세톤으로 세척하고, 48시간 동안 60℃에서 건조하였다. 건조된 알긴산 나트륨을 0.1 중량% 및 0.5 중량%가 되도록 증류수에 용해시켜 알긴산 나트륨 수용액을 제조하였다.

[0086] **3. GABA 측정**

[0087] **3.1. ELISA Kit**

[0088] GABA 정량은 QuickDetectTM GABA ELISA Kit (Biovision)를 사용하여 측정하였다. Sandwich 정량법을 사용하였으며, GABA 용액 (16.88 pg/mL ~ 324.00 pg/mL)으로 standard curve를 작성하여 시료의 GABA 함량을 계산하였다. 꽃송이버섯 (균사체, 자실체) 건조 시료는 막자사발로 분쇄 후 분말화하고, 이를 PBS(pH 7.40)에 녹여 5%(w/v) 용액을 제조하여 실험하였다. 40 ㎕ sample dilution buffer와 10 ㎕ sample을 microplate의 각각의 well에 넣고 잘 혼합시켰다. 100 ㎕ HRP-Conjugate reagent를 각각의 well에 넣고 30분 동안 37℃에서 sealer로 microplate를 덮은 상태에서 혼합시켰다. 각각의 well에 남아있는 용액을 제거하고 세척용액을 이용하여 5번 정도 세척하였다. 50 ㎕ Chromogen Solution A와 50 ㎕ Chromogen Solution B를 각각의 well에 넣고 15분 동안 37℃에서 빛을 차단하고 혼합시켰다. 그 후, 50 ㎕ stop solution을 첨가하고 450 nm에서 흡광값을 측정하였다.

[0090] **3.2. HPLC**

[0091] 꽃송이버섯 건조 시료를 막자사발로 분쇄 후 분말화하여 H_2O로 5% (w/v) 용액을 제조하여 60℃에서 2시간 동안 추출하였다. 추출물을 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene (DNFB)로 유도체화하여 HPLC로 GABA 함량을 분석하였다. 180 ㎕의 꽃송이버섯 버섯 추출물, 180 ㎕의 10 mg/mL DNFB 용액, 100 ㎕의 0.5 M $NaHCO_3$ (pH 9.0), 20 ㎕의 H_2O을 혼합하여 교반(vortexing) 후 60℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 실온으로 냉각하고, 400 ㎕의 0.01 M KH_2PO_4 (pH 7.0)를 첨가하여 15분 동안 암실에서 반응시켰다. HPLC는 Shimadzu LC-20 series (Pump: LC-20AD, Degassor: DGU-20A, Column oven: CTO-20A, UV-VIS detector: SPD-20A, Japan)로 구성되었으며 분석조건은 표 2와 같다.

표 2

[0093]

HPLC equipment	Shimadzu LC-20 series						
Mobile phase	(Sol A) 5 mM CH_3COONa (pH 5.7):THF=95:5 (v/v) (Sol B) 0.05% TFA in 80% MeOH						
Column	Shim-pack GIS, ODS (250×4.6 mm, 5.0 ㎛particle size)						
Gradient program	Time [min]	0.01	15.00	65.00	105.00	115.00	117.00	125.00
	Sol A	80	70	35	0	0	80	80
	Sol B	20	30	65	100	100	20	20
Oven temperature	35℃						
UV wavelength	360 nm						
Injection volume	20 ㎕						

Flow rate	1.0 mL/min

[0095] **4. 초대 신경세포 배양**

[0096] ICR 생쥐의 배아기 15.5일의 뇌로부터 대뇌피질 부분을 분리하여 DNase I (Sigma)이 함유된 0.25% 트립신 용액(Gibco)으로 37℃에서 20분 간 처리하고, fetal bovine serum (Gibco)을 처리하여 트립신을 불활성화 시켰다. Poly-L-lysine (Sigma)으로 코팅된 배양용기에서 분리된 세포를 2% B27, Glutamax, penicillin/streptomycin (Invitrogen)이 포함된 Neurobasal medium로 배양시켰다. 신경세포는 37℃, 5% CO_2의 배양기에서 발달시키며 3-4일에 한 번씩 반절의 배양액을 새로 교체하였다.

[0098] **5. 면역형광법**

[0099] Poly-L-lysine이 코팅된 커버 글라스 위에서 배양된 신경세포에 각각의 시료를 48시간 동안 처리하고 4% paraformaldehyde가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)으로 15분 간 고정시킨 후, 0.1% Triton X-100/PBS로 투과성을 증가시켰다. 10% normal goat serum을 첨가하여 blocking buffer로 상온에서 1시간 동안 배양한 후 Map2 (Abcam), GAD67 (Millipore) 항체를 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. AlexaFluor 488, 647 (Invritrogen)이 합체된 2차 항체를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 유리 슬라이드 위에 mountin 배지를 첨가하여 신경세포 샘플을 안착시켰다. 신경세포는 Nikon A1 공초점현미경을 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0101] **6. MTT assay**

[0102] 초대 신경세포는 poly-L-lysine이 코팅된 배양용기에서 4-5일간 배양 후 각각의 시료를 가하여 24시간 동안 배양기에서 배양하였다. 살아남은 세포는 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium), 2 mg/㎖로 1시간 동안 반응시킨 후 dimethyl sulfoxide로 formazan 결정체를 녹여 immunosorbent assay microplate reader (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0104] **7. 웨스턴 블롯**

[0105] 신경세포는 각각의 시료를 20분간 처리한 후 radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) 용액을 처리하여 단백질을 추출하고 8% SDS-PAGE 젤에 걸어 0.22 ㎛ 니트로셀룰로즈 막에 2시간 동안 이동시켰다. 5% 무지방우유가 함유된 tris 버퍼 용액 (TBS)에서 blocking을 시킨 후 phospho-Akt Serine473 (Cell signaling), phospho-Erk 1/2 (Cell signaling), horseradish peroxidase-conjugated actin (Sigma) 항체를 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 0.1% tween이 함유된 TBS 용액으로 헹군 후 2차 항체를 첨가하여 chemiluminescence imager, ImageQuant LAS 4000 mini를 이용하여 신호강도를 측정하였다.

[0107] **8. Dendrite outgrowth 측정**

[0108] 실험 1에서 재배한 각각의 꽃송이 버섯을 0.1mg/㎖ 및 1mg/㎖의 농도의 용액으로 제조하여 48시간 동안 신경세포에 처리한 후 in vitro에서 대뇌 피질의 수상돌기의 길이를 4일째에 측정하였다. 공초점현미경으로 얻어진 이미지를 ImageJ 프로그램과 NeuronJ 플러그인을 이용하여 세포체로부터 발달되는 수상돌기의 길이를 측정하였다.

[0110] **9. 통계**

[0111] 실험 결과는 3회 반복 측정하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 통계처리는 SPSS (version 23.0)를 사용하였다 GABA 함량에 대한 ANOVA 분석 후 p value가 0.05 이하인 범위에서 유의적 차이를 확인하였고, Duncan's multiple range test로 사후검정하여 a, b, c 문자로 표시하였다. MTT assay와 dendrite outgrowth 결과에 대한 ANOVA 분석 후 p value가 0.001 이하인 범위에서 유의적 차이를 확인하였고, Bonferroni’s comparison

test로 사후검정하였다.

[0113] **실험결과**

[0114] **1. GABA 측정**

[0115] **1.1. ELISA KIT**

[0116] GABA ELISA Kit로 균사체의 GABA 함량 측정 결과, 모자반 유래 알긴산 나트륨을 0.1% 농도로 처리한 시료 (CM1)의 GABA 함량이 가장 높았다(도 2, 표 3). 자실체에서는 대조군보다 모자반 유래 알긴산 나트륨을 0.1%와 0.5% 농도로 처리한 시료 (CF1, CF2)에서 유의적으로 GABA 함량이 약 3.5~5배 정도 증가하였다.

표 3

[0118]

Sample	GABA contents (mg/g)	Sample	GABA contents (mg/g)
M CON	1.13±0.28	F CON	0.68±0.22
AM1	2.01±0.20	AF1	2.02±0.21
AM2	2.00±0.15	AF2	2.81±0.09
BM1	2.20±0.48	BF1	2.44±0.07
BM2	2.17±0.25	BF2	2.14±0.10
CM1	2.50±0.10	CF1	3.19±0.25
CM2	2.39±0.18	CF2	2.58±0.30
DM1	2.17±0.15	DF1	2.91±0.32
DM2	2.12±0.16	DF2	2.23±0.10

[0120] **1.2. HPLC**

[0121] HPLC 분석결과는 도 3과 같다. 엘리시터 첨가 배지에서 배양된 꽃송이버섯의 GABA 함량 분석 후 one-way ANOVA를 수행하였다 (도 4 및 표 4). 균사체는 0.1% 모자반 알긴산 나트륨 첨가 배지 (CM1) 에서 3.28±0.07 mg/g으로 가장 높은 GABA 함량을 보였고, 자실체는 0.1% 모자반 알긴산 나트륨 첨가 배지 (CF1)에서 2.90±0.09 mg/g으로 가장 높은 GABA 함량을 보였고, 0.5% 모자반 알긴산 나트륨 첨가 배지 (CF2)에서 1.93±0.10 mg/g으로 가장 낮은 GABA 함량을 보였으나, 대조군 대비 전체적으로 GABA함량이 증가함을 알 수 있었다.

표 4

[0123]

Sample	GABA contents (mg/g)	Sample	GABA contents (mg/g)
M CON	1.56±0.08	F CON	0.82±0.10
AM1	2.57±0.03	AF1	1.61±0.07
AM2	2.87±0.03	AF2	2.35±0.18
BM1	3.20±0.02	BF1	2.47±0.01
BM2	2.69±0.02	BF2	2.53±0.07
CM1	3.28±0.07	CF1	2.90±0.09
CM2	2.80±0.05	CF2	1.93±0.10
DM1	3.12±0.12	DF1	2.13±0.07
DM2	2.90±0.06	DF2	2.22±0.03

[0125] **3. 독성실험결과**

[0126] 꽃송이버섯 균사체와 자실체의 모자반 알긴산 나트륨을 0.1% 농도로 처리한 시료 (CM1, CF1)를 배양된 초대 신경세포에 24시간 동안 처리하여 신경세포 생존률을 분석한 결과 균사체 CM1의 5 ㎎/㎖의 농도를 제외하고는 각각의 시료에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다(도 5). 이는 균사체 CM1의 2 ㎎/㎖, 자실체의 5 ㎎/㎖농도까지 꽃송이 버섯이 신경세포에 독성 효과를 보이지 않음을 나타낸다.

[0128] **4. 초대신경세포 수상돌기 발달 결과**

[0129] 면역형광법을 이용하여 초대 신경세포를 Map2양성/GAD67음성인 흥분성신경세포와 Map2양성/GAD67양성인 억제성신경세포로 분류하였고 ImageJ/NeuronJ 프로그램을 이용하여 하나의 신경세포에서 발달하는 총 수상돌기의 길이를 측정하였다. 결과적으로, 0.1 ㎎/㎖ 농도에서는 각각의 대조군에 비하여 신경세포의 수상돌기의 발달에 유의적인 차이가 없었으나 (도 6), 1 ㎎/㎖ 농도의 자실체 시료인 CF1에서는 대조군에 비해 억제성신경세포가 아닌, 흥분성 신경세포의 수상돌기 길이가 유의적으로 감소하였음을 발견하였다 (도 7).

[0131] **6. 신경세포 내 신호전달경로의 변화 결과**

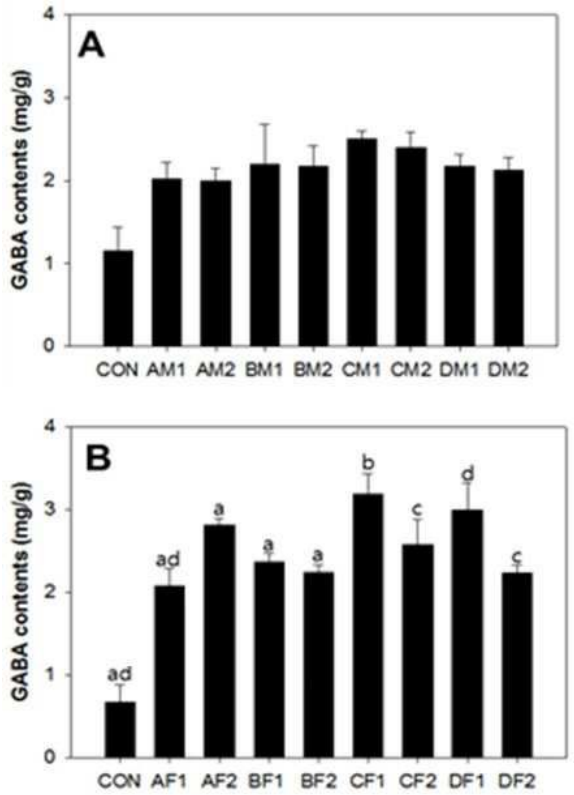
[0132] 꽃송이버섯 균사체와 자실체의 모자반 알긴산 나트륨을 0.1% 농도로 처리한 시료 (CM1, CF1)를 초대 신경세포에 20분 동안 처리하여 웨스턴 블롯팅을 이용하여 Akt와 Erk1/2의 인산화를 살펴보았다. 결과적으로 균사체와 자실체의 무처리군과 비교하였을 때 시료에 의한 세포 내 신호전달의 변화는 관찰되지 않았다 (도 8). 이는 꽃송이버섯 추출물이 흥분성 신경세포의 수상돌기 발달에 영향을 미치는 경로가 Phosphoinositide 3-kinase/Akt 혹은 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/Erk1/2 신호전달체계가 아닌 다른 경로를 통하여 조절함을 나타내는 것으로 예상된다.

도면

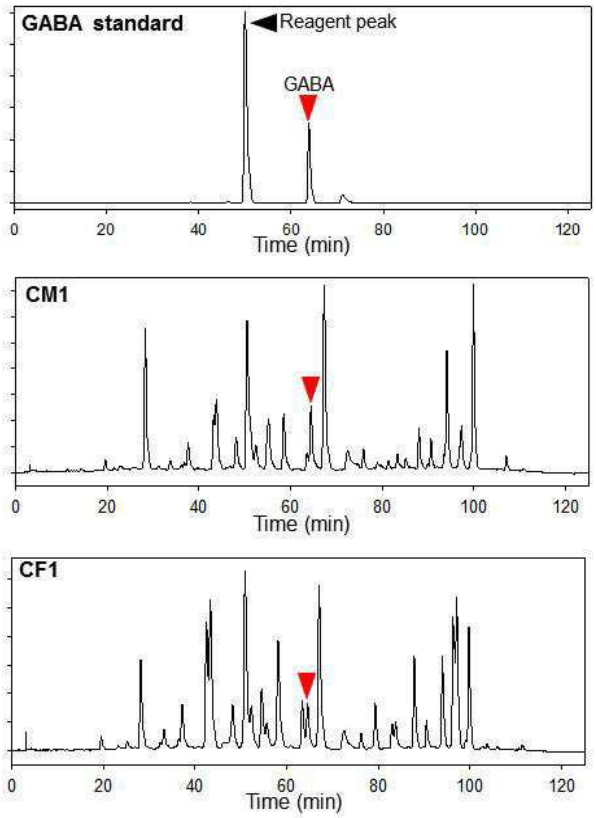
도면1



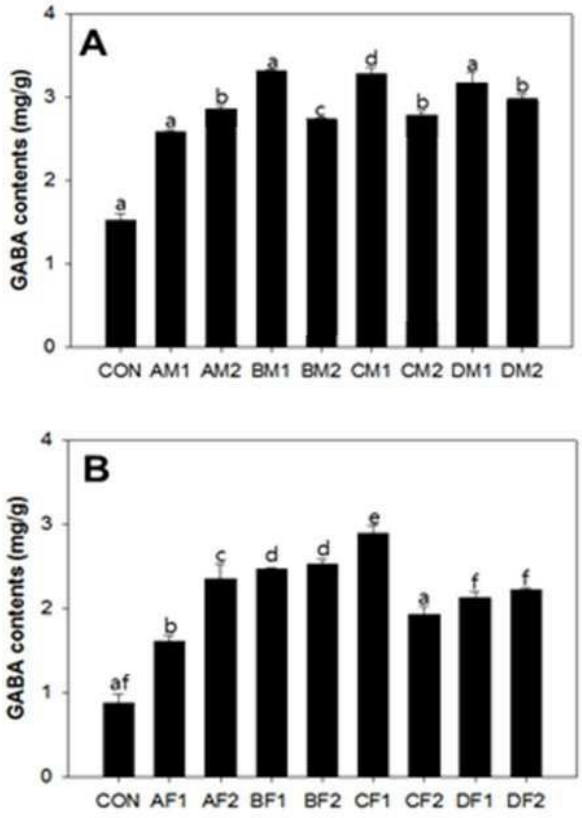
도면2


A
GABA contents (mg/g)
0
1
2
3
4
CON AM1 AM2 BM1 BM2 CM1 CM2 DM1 DM2
B
GABA contents (mg/g)
ad
ad
a
a
a
b
c
d
c
CON AF1 AF2 BF1 BF2 CF1 CF2 DF1 DF2

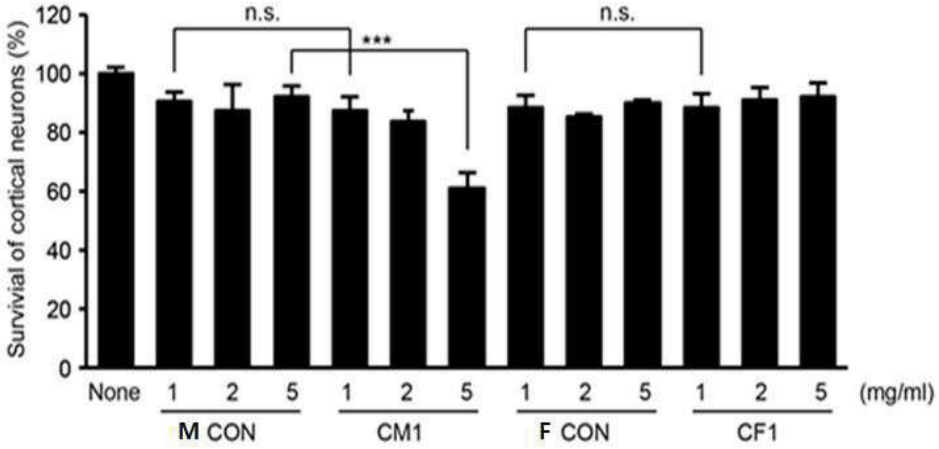
도면3


GABA standard
Reagent peak
GABA
0 20 40 60 80 100 120
Time (min)
CM1
0 20 40 60 80 100 120
Time (min)
CF1
0 20 40 60 80 100 120
Time (min)

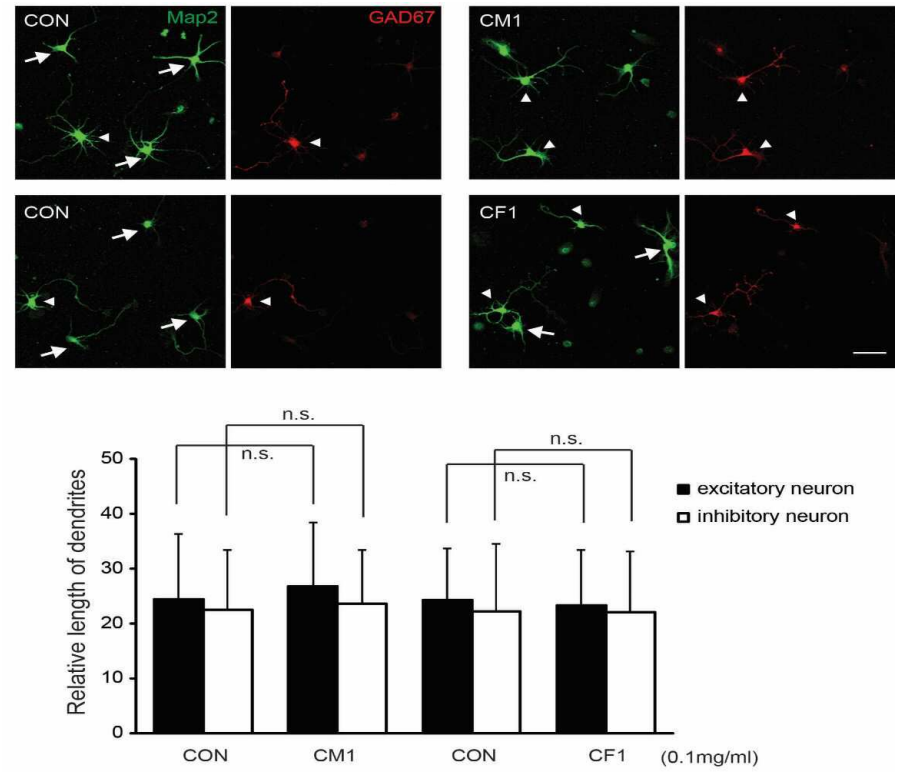
도면4


A
GABA contents (mg/g)
CON AM1 AM2 BM1 BM2 CM1 CM2 DM1 DM2
B
GABA contents (mg/g)
CON AF1 AF2 BF1 BF2 CF1 CF2 DF1 DF2

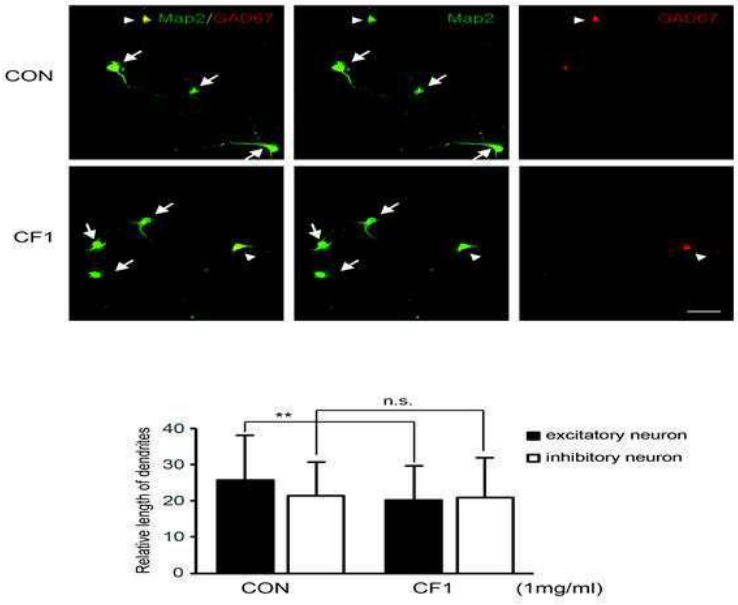
도면5


Survivial of cortical neurons (%)
n.s.
***
n.s.
None 1 2 5 1 2 5 1 2 5 1 2 5 (mg/ml)
M CON
CM1
F CON
CF1

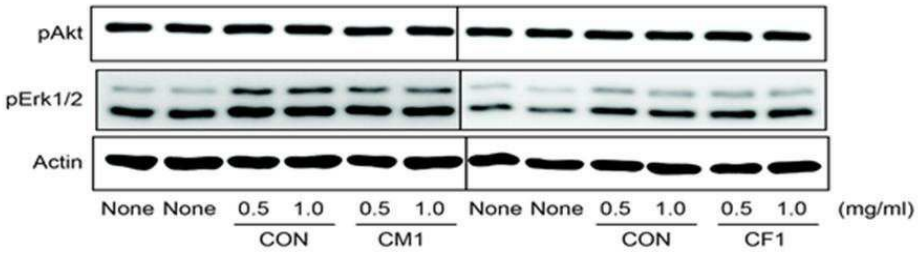
도면6


CON
Map2
GAD67
CM1
CON
CF1
n.s.
n.s.
n.s.
n.s.
Relative length of dendrites
50
40
30
20
10
0
excitatory neuron
inhibitory neuron
CON
CM1
CON
CF1
(0.1mg/ml)

도면7


CON
CF1
n.s.
**
Relative length of dendrites
40
30
20
10
0
excitatory neuron
inhibitory neuron
CON
CF1
(1mg/ml)

도면8


pAkt
pErk1/2
Actin
None None 0.5 1.0 0.5 1.0 None None 0.5 1.0 0.5 1.0 (mg/ml)
CON
CM1
CON
CF1