



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0102873
(43) 공개일자 2008년11월26일

(51) Int. Cl.

C12P 7/54 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0049884

(22) 출원일자 2007년05월22일

심사청구일자 2007년05월22일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

윤한대

경남 진주시 칠암동 284-2

조계만

경남 함양군 안의면 이전리 144

김민근

경남 함안군 가야읍 묘사리 석산 219-5

(74) 대리인

류창희, 이덕록

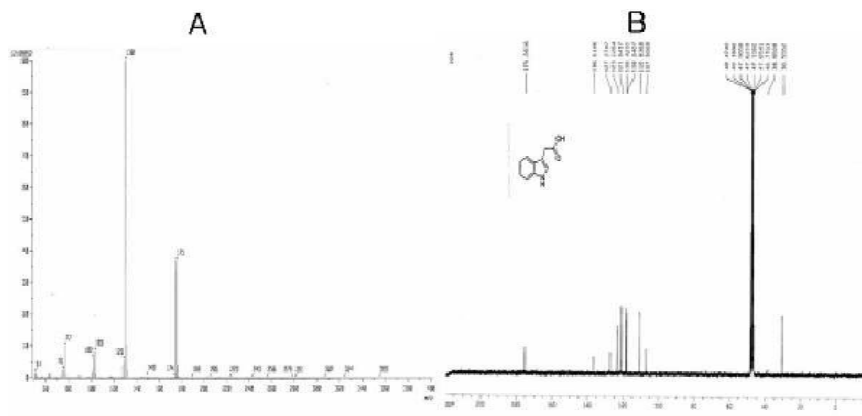
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 슈도모나스속 균주로부터 인돌 아세트산의 분리 및 이를 이용한 식용버섯의 생육촉진방법

(57) 요약

본 발명은 슈도모나스속 균주로부터 인돌 아세트산의 분리 및 이를 이용한 식용버섯의 생육촉진방법에 관한 것으로, 버섯의 생육을 촉진하는 세균인 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주로부터 생육촉진물질인 옥신(auxin)의 유도체인 인돌 아세트산(IAA)를 분리 정제하는 방법을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 추출물과 루신 또는 아르기닌의 아미노산을 혼합 처리하여 새송이 버섯의 균사의 생육을 촉진하는 방법을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 식용버섯의 생육촉진방법은 버섯의 생육을 촉진할 수 있을 뿐만 아니라 기름 등의 생산비 및 노동비를 상당히 절감할 수 있으며 저가용 버섯 배지 개발 등에 사용할 수 있고 새송이 버섯 외에 다른 식용버섯과 원예 및 채소 재배 등에 이용할 수 있다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주 배양액 또는 상기 배양액의 에틸 아세테이트층 추출물로부터 분리함을 특징으로 하는 인돌 아세트산(indole acetic acid, IAA)의 분리방법.

청구항 2

식용버섯의 균사를 배양함에 있어서, 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 추출물 또는 상기 추출물로부터 분리한 인돌 아세트산과 아미노산을 1:1 (v/v)의 비율로 혼합 처리함을 특징으로 하는 식용버섯의 생육촉진방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 버섯은 새송이 버섯임을 특징으로 하는 식용버섯의 생육촉진방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 아미노산은 루신 또는 아르기닌임을 특징으로 하는 식용버섯의 생육촉진방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <9> 본 발명은 슈도모나스속 7014 균주로부터 인돌 아세트산의 분리 및 이를 이용한 식용버섯의 생육촉진방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주에서 생육촉진물질인 인돌 아세트산(indole acetic acid, 이하 IAA로 지칭)을 분리 정제하고, 상기 인돌 아세트산을 포함하는 균주의 추출물과 아미노산의 혼합처리에 의한 식용버섯의 생육촉진방법에 관한 것이다.
- <10> 버섯은 건강식품으로서의 가치를 지니는 중요한 식품 재료이며 항균작용, 항바이러스작용, 강심작용, 항혈전작용 등 다양한 유용물질을 다량 함유하고 있어 현대인들의 기호도에 적합한 대체의약 식품으로서의 기능이 있다고 할 수 있다. 국내의 식용 버섯의 연간 생산량은 소비자 판매가 기준 약 1조 원으로 국내 농업 총생산액에 대한 그 비중이 지속적으로 증가하고 있다.
- <11> 미생물은 특수한 환경에서 자신의 생존을 위하여 종간의 끊임없는 투쟁과 공생 등의 미묘한 화학 전쟁을 계속하고 있다. 이러한 화학전쟁과 관련하여 4가지 측면이 강조되어 왔다. 첫째로 일반적으로 높은 특이 활성을 갖는 천연 생산물이며, 둘째로 소량으로도 주어진 일을 수행하며 필요한 시간 내에 소량씩 퍼질 수 있도록 미생물들에 의하여 계속 생산되며, 셋째로 미생물에서 유래한 대부분의 천연화합물들은 분해되기 쉬우며, 마지막으로 여러 가지 원핵생물과 진핵생물의 상호작용 설명에 훌륭한 모델을 제공한다. 미생물 생리활성물질로는 지베렐린(Gibberellin, GA₃)이 가장 대표적인데 이는 1920년대 Kurosawa에 의한 벵키다리병균(*Gibberella fujikuroi*)의 연구로 시작되어 현재 생장조절제 중 가장 많은 양이 생산되고 있다(농약공협회 농약연보, 1997). 이 지베렐린은 세포신장 촉진, 종자발아 촉진 및 생장과 신초 발생 및 과실발달 등을 촉진한다. 한편, 옥신(Auxin)은 인돌 아세트산(indole acetic acid, IAA) 및 인돌 부티르산(indole butyric acid, IBA) 등의 여러 유도체들이 존재하며 수직생장, 형성층의 세포분열 및 발근효소활력 촉진 등의 기능이 있어 식물 생장조절물질 및 제초제로도 사용을 하고 있으며 많은 원핵생물에서 생성이 된다고 보고되어 있다.
- <12> 한편, 일반적으로 호르몬 등의 생리활성물질 전구체는 대부분 다양한 아미노산으로부터 출발을 하며 특히, 송이버섯(*Tricholoma matsutake*)의 균사배양 시 다양한 아미노산의 첨가로 균사생육이 촉진된다고 보고되어 있다.
- <13> 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출한 것으로, 본 발명의 목적은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 균주로부터 생육촉진물질인 IAA를 분리 동정하고자 한다.
- <14> 본 발명의 다른 목적은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 균주의 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 추

출물과 다양한 아미노산의 혼합처리에 따른 식용버섯의 생육촉진방법을 제공하는 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<15> 본 발명의 상기 목적은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주 배양액에서 유기용매 추출을 통해 버섯 균사에 대해 생육촉진활성이 있는 물질을 분리하고, 이를 박층크로마토그래피(TLC), 정제용 고압액체크로마토그래피(Prep-HPLC), Mass와 탄소-NMR(Carbon-NMR, C-NMR) 및 TLC와 분석용 고압크로마토그래피(Anay-HPLC)를 거쳐 인돌 아세트산(IAA)을 분리 및 정제하고, 상기 슈도모나스속 균주의 인돌 아세트산을 포함하는 추출물과 아미노산의 혼합처리에 의한 식용버섯의 생육촉진을 검정함으로써 달성하였다.

발명의 구성 및 작용

<16> 본 발명은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주 배양액의 유기용매 추출단계; 상기 추출물에서 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 유기용매층의 박층크로마토그래피(TLC), 정제용 고압액체크로마토그래피(Prep-HPLC), Mass와 탄소-NMR(Carbon-NMR, C-NMR) 및 TLC와 분석용 고압크로마토그래피(Anay-HPLC)를 통한 인돌 아세트산의 분리 정제단계; 다양한 아미노산의 처리에 따른 버섯 생육촉진 검정단계; 및 슈도모나스속 균주의 인돌 아세트산을 포함하는 추출물과 아미노산 혼합처리에 의한 생육촉진 검정단계로 구성된다.

<17> 본 발명은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주 배양액 또는 상기 배양액의 에틸 아세테이트층 추출물로부터 다음의 단계를 거쳐 인돌 아세트산(indole acetic acid, IAA)을 분리하는 방법을 제공한다:

<18> 버섯 생육촉진 균 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P를 1L의 영양 브로스(Nutrient broth) 액체 배지에 접종한 후 30℃에서 48시간 동안 160rpm으로 진탕배양하고 4℃, 6,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 회수하는 단계;

<19> 상기 상등액에 동량(1L)의 에틸 아세테이트를 첨가한 후 160rpm에서 12시간 교반하고 정치한 후 에틸 아세테이트층을 회수하고 진공농축기를 이용하여 완전히 농축한 다음 다시 메탄올 100mL에 녹인 후 감자한천배지 상에서 새송이 버섯 균사의 생육촉진을 검정하는 단계;

<20> 생육촉진이 검정된 슈도모나스속 추출물은 TLC를 통하여 7가지의 밴드를 확인하고, 이를 다시 회수하여 메탄올에 녹인 후 새송이 버섯의 균사 생육촉진을 검정하고, 정제용 HPLC를 통하여 정제하고 Mass와 C-NMR을 통하여 물질 구조를 동정하는 단계; 및,

<21> 상기 단계로부터 구조가 동정된 물질의 정확한 확인은 TLC와 분석용 HPL를 통하여 기존 표준물질과 비교하는 단계로 구성됨.

<22> 본 발명은 식용버섯의 균사를 배양함에 있어서, 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 추출물 또는 상기 추출물로부터 분리한 인돌 아세트산과 아미노산을 1:1 (v/v)의 비율로 혼합 처리함을 특징으로 하는 식용버섯의 생육촉진방법을 제공함을 특징으로 한다.

<23> 상기 식용버섯은 본 발명의 실시예에서는 새송이 버섯을 사용하여 실험하였으나, 식용이 가능한 어떠한 종류의 버섯에도 적용가능하다.

<24> 상기 아미노산은 루신 또는 아르기닌이며, 0.05mg/mL 농도의 아미노산 용액 형태로 감자한천배지에 200 μ L/20mL를 첨가하여 식용버섯의 균사 배양 시 첨가함을 특징으로 한다.

<25> 이하 본 발명의 구성을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<26> [실시예]

<27> **실시예 1: 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 균주의 배양 및 버섯 균사 생육촉진물질의 추출**

<28> 버섯의 생육을 촉진하는 세균인 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주로부터 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 물질을 도 1에 도시된 방법에 따라 추출, 구조 분석 및 확인하였다.

<29> 즉, 상기 균주를 1L의 영양 브로스(Nutrient broth) 액체배지에 접종한 후 30℃에서 48시간 동안 160rpm으로 진탕배양하고 4℃, 6,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 동량(1L)의 부피로 에틸 아세테이트를 첨가하고 160rpm에서 12시간 교반하고 정치한 후 에틸 아세테이트층을 다시 회수하고 진공농축기를 이용하여 완전히 농축하였다. 다시 메탄올 100mL에 완전히 녹인 후 감자한천배지(PDA) 20mL에 200 μ L를

첨가하고 완전히 섞은 후 고화시켜 배지를 만들고 여기에 코르크 보러(cork borer, No. 4)를 이용하여 얻어진 새송이 버섯 균사를 중앙에 접종하여 25℃에서 10일간 배양하였다.

<30> 도 2에 나타난 바와 같이, 감자한천배지 상에서 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 추출 물을 처리한 것은 90mm 이상 성장하여 배지 상에서 모두 성장이 이루어졌으나 무처리구인 경우에는 약 75mm 정도로 배지 상에서 $\frac{2}{3}$ 정도 밖에 성장을 하지 못함을 확인할 수 있었다.

<31> **실시예 2: 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 물질의 정제 및 구조 동정**

<32> 상기 실시예 1에서 생육촉진이 검정된 추출물을 TLC에서 분리하기 위하여 에틸 아세테이트:이소프로판올:암모니아수(Ethylacetate:Isopropanol:Ammonium water)=50:25:25의 용매 조건에서 상기 실시예 1에서 분리한 추출물 10mL을 다시 1mL로 농축하여 TLC를 전개한 결과 7개의 분획으로 분리되었으며(도 3), 이들 각각의 분획을 다시 회수하여 메탄올 1mL에 완전히 녹인 후 감자한천배지 20mL에 200 μ L를 첨가하고 완전히 섞은 후 고화시켜 배지를 만들고 여기에 코르크 보러(No. 4)를 이용하여 얻어진 새송이 버섯의 균사를 중앙에 접종하여 25℃에서 10일간 배양하였다.

<33> 도 4에 나타난 바와 같이, 감자한천배지 상에서 분획 5번(fraction 5, F5)의 분획물을 처리한 것은 90mm 이상 성장하여 배지 상에서 모두 성장이 이루어졌으나 무처리구 및 활성물질을 녹이는데 사용한 유기용매(메탄올)만을 처리한 경우에는 약 50mm 정도로 배지 상에서 절반 정도 밖에 성장을 하지 못함을 확인할 수 있었다.

<34> 이를 대량으로 얻은 후 Prep-HPLC(이동상 용매: CHCl₃, 유속: 2mL/min, 검출과장: UV 280nm)를 시행한 결과 단일 밴드를 확인하였고, 이를 다시 회수하여 농축하여 정제하였다. Prep-HPLC로 정제된 분획을 Mass와 C-NMR을 통하여 물질 구조를 동정한 결과, 옥신(auxin)의 유도체인 IAA와 유사한 것을 확인하였다(도 5).

<35> **실시예 3: 슈도모나스속 균주 유래의 인돌 아세트산의 재확인**

<36> 상기 실시예 2에서 구조가 동정된 IAA 유사체의 정확한 확인을 위하여 상기 실시예 2에서 얻어진 분획 5번(F5)을 다음과 같은 TLC 조건, 즉 용매조건으로 에틸 아세테이트:이소프로판올:암모니아수(Ethylacetate:Isopropanol:Ammonium water) = 45:35:20 [v/v], 발색용액으로 Salkowski's reagent(Conc. H₂SO₄ 150mL + H₂O 250mL + 0.5M FeCl₃.6H₂O 7.5mL)로 스프레이 핫플레이트(hot plate)에서 가열하여 발색시켰다. 본 실험에서 사용한 실리카 겔(Silica gel)은 G F254, thickness 0.25 mm 60F-F254 (No. 5712-2, E. Merck)를 사용하였다. 표준물질은 시그마(Sigma)사의 IAA를 사용하였다. 분석 결과 표준물질과 동일함을 확인할 수 있었다.

<37> 그리고, 다시 분석용 HPLC(주입량: 20 μ L, 이동상 용매: 메탄올:아세테이트= 40:60, 유속: 1mL/min, 검출기 파장: 280nm에서 UV 검출기, 칼럼 온도: 30℃, 칼럼 (Perkin Elmer C18 reverse, 사이즈: 6mm×250mm, 타입:UG 120A 5 μ m)을 이용하여 재차 표준물질 IAA와 동일함을 확인하였다. 분석방법은 분리 샘플에서 표준물질을 가하는 co-running HPLC 방법으로 분석하였다.

<38> 도 6에 나타난 바와 같이, 표준물질과 분리 샘플의 피크가 정확하게 포개지는 것을 확인하였다. 이 두 가지의 결과로 상기 물질은 옥신(auxin)의 유도체인 IAA임을 정확하게 확인하였다.

<39> **실시예 4: 아미노산 첨가에 의한 균사 생육촉진 조사**

<40> 본 실시예에서는 일반적으로 호르몬 등의 생리활성물질 전구체와 아미노산과의 연관성을 토대로 루신(leucine), 아르기닌(arginine), 발린(valine), 타이로신(tyrosine), 글루타메이트(glutamate), 트립토판(tryptophan), 글루타민(glutamine), 알라닌(alanine), 글리신(glycine), 페닐알라닌(phenylalanine), 프롤린(proline), 히스티딘(histidine), 세린(serine), 시스테인(cysteine), 아스파테이트(aspartate), 스레오닌(threonine), 아스파라긴(asparagine), 리신(lysine) 등의 L-형(L-type)의 필수아미노산 첨가에 의한 버섯 균사의 생육조건을 조사하였으며 이소루신의 경우에는 L-형과 D-형(D-type)을 사용하였다. 본 실험에 사용한 농도는 0.05mg/mL 아미노산 용액을 감자한천배지에 200 μ L/20mL를 첨가하여 실험하여 25℃에서 14일간 배양하여 배양 정도를 비교하였다.

<41> 도 7에 나타난 바와 같이, 아미노산 중에서 루신, 발린, 아르기닌, D-이소루신의 첨가가 균사 생육을 촉진시켰다.

<42> **실시예 6: 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014의 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 추출물과 아미노산 혼합처리에 의한 버섯의 생육촉진**

- <43> 상기 실시예 1의 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 에틸 아세테이트층 추출물(인돌 아세트산 포함)과 실시예 5의 아르기닌과 루신의 아미노산을 혼합처리하여 버섯의 생육촉진능을 확인하였다.
- <44> 즉, 감자한천배지(PDA) 20mL에 실시예 1의 추출물 200 μ L와 아르기닌과 루신의 0.05mg/mL 아미노산 용액 200 μ L를 첨가하고 완전히 섞은 후 고화시켜 배지를 만들고 여기에 코르크 보러(No. 4)를 이용하여 얻어진 새송이 버섯의 균사를 중앙에 접종하여 25℃에서 8일간 배양하였다. 무처리구와 실시예 1의 에틸 아세테이트층 추출물 200 μ L만을 첨가한 경우도 동일하게 실시하여 비교하였다.
- <45> 도 8 및 표 1에 나타난 바와 같이, 감자한천배지 상에서 무처리인 경우 66.9mm(성장률: 100%)정도 생육하였으며 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 균주의 추출물만을 처리한 경우는 79.3mm(성장률: 118.5%)정도 생육하였다.
- <46> 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 균주의 추출물과 아르기닌과 루신의 아미노산을 혼합처리한 경우 각각 84.7mm(성장률: 126.6%)와 85.0mm(127.1%)정도로 생육하여 무처리구 보다 약 26%이상의 성장률을 보였다.

표 1

- <47> 버섯 생육촉진 균주 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014의 버섯 균사 생육촉진활성이 있는 추출물과 아미노산 혼합처리에 따른 균사성장 길이와 비율

	무처리	슈도모나스속 추출물	슈도모나스속 추출물 +아르기닌	슈도모나스속 추출물 +루신
균사성장길이(mm)	66.9	79.3	84.7	85.0
균사성장율(%)	100	118.5	126.6	127.1

발명의 효과

- <48> 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이, 본 발명은 슈도모나스속 균주로부터 인돌 아세트산의 분리 및 이를 이용한 식용버섯의 생육촉진방법에 관한 것으로, 버섯의 생육을 촉진하는 세균인 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주로부터 생육촉진물질인 옥신(auxin)의 유도체인 인돌 아세트산(IAA)를 분리 정제하는 방법을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 추출물과 루신 또는 아르기닌의 아미노산을 혼합 처리하여 새송이 버섯의 균사의 생육을 촉진하는 방법을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 식용버섯의 생육촉진방법은 버섯의 생육을 촉진할 수 있을 뿐만 아니라 기름 등의 생산비 및 노동비를 상당히 절감할 수 있으며 저가용 버섯 배지 개발 등에 사용할 수 있고 새송이 버섯 외에 다른 식용버섯과 원예 및 채소 재배 등에 이용할 수 있어 농업 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 버섯의 생육을 촉진하는 세균인 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 버섯 균사에 대한 생육촉진활성이 있는 물질의 분리와 구조 동정 및 확인 과정을 도시한 것이다.
- <2> 도 2는 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 에틸 아세테이트 추출물 처리에 따른 새송이 버섯 균사의 생육을 검정한 결과를 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 에틸 아세테이트층의 TLC 결과(3A) 및 TLC 분획별 새송이 버섯 균사의 생육을 검정한 결과를 나타낸 것이다(3B).
- <4> 도 4는 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 에틸 아세테이트층의 TLC 결과로 얻은 분획 5번(F5)의 Prep-HPLC 결과를 나타낸 것이다.
- <5> 도 5는 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 에틸 아세테이트층의 TLC 결과로 얻은 분획 5번의 Prep-HPLC로 정제된 물질의 질량분석기와 탄소-NMR(Carbon-NMR)의 결과를 나타낸 것이다.
- <6> 도 6은 표준물질 인돌 아세트산(indole acetic acid)과 TLC 분획 5번의 TLC(6A)와 HPLC 분석결과(6B), 및 표준물질 인돌 아세트산과 TLC 분획 5번의 co-running을 통한 HPLC 분석결과를 나타낸 것이다.
- <7> 도 7은 루신(7A), 발린(7B), 아르기닌(7C) 및 D-이소루신(7D)의 아미노산 200 μ L(0.05mg/mL)을 감자한천배지에

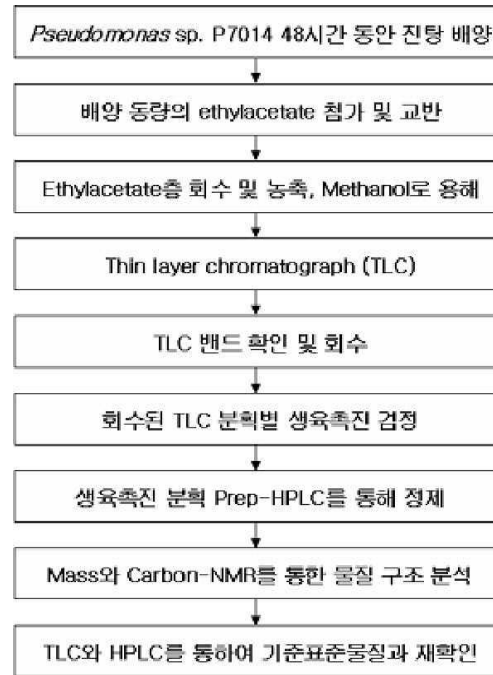
처리한 후 10일간 배양한 후 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

<8>

도 8은 새송이 버섯의 균사 배양 시, 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 7014 KACC 91277P 균주의 에틸 아세테이트층의 추출물과 아르기닌 또는 루신의 아미노산을 혼합처리하여 감자한천배지에서 8일간 배양한 후 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도면

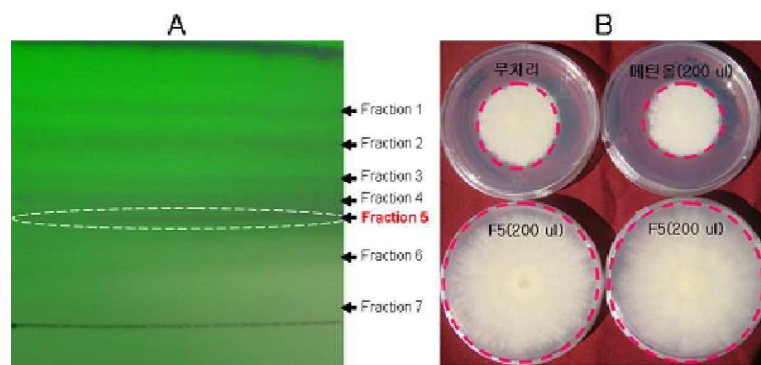
도면1



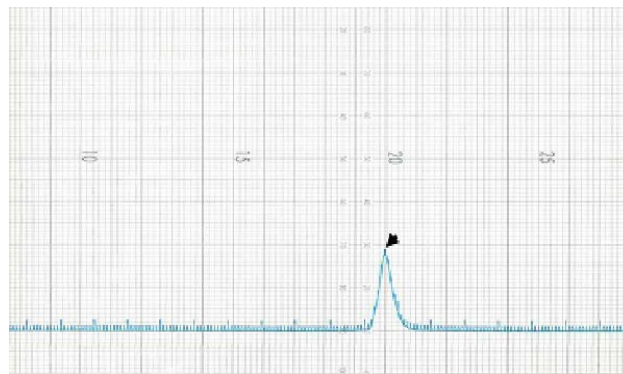
도면2



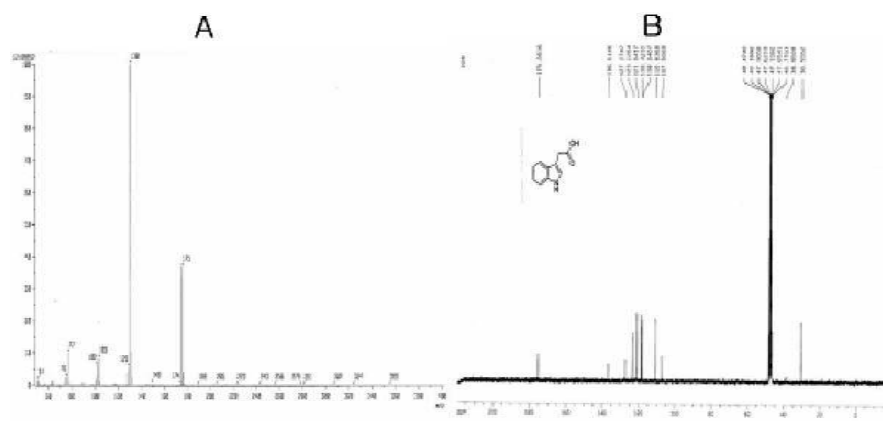
도면3



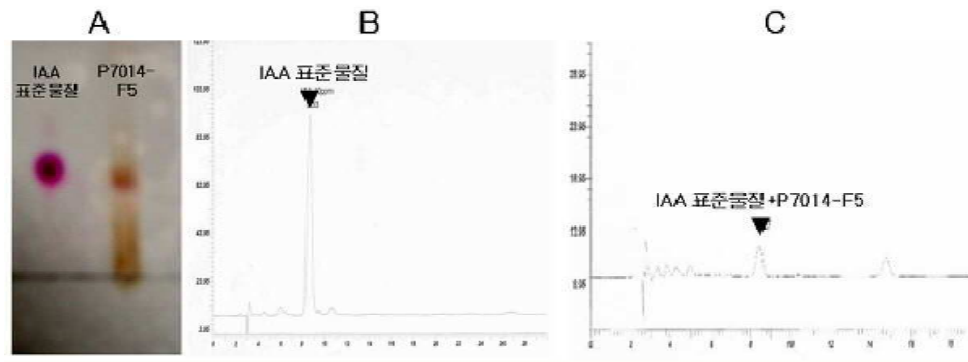
도면4



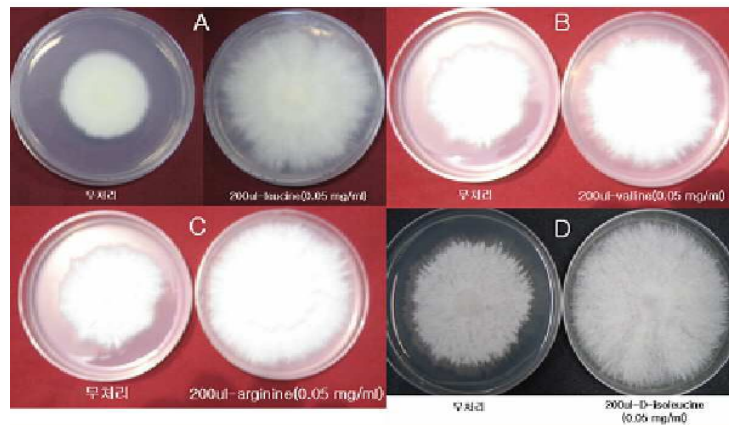
도면5



도면6



도면7



도면8

