(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0065525
(43) 공개일자 2018년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/40 (2006.01) *C12N 1/14* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/40 (2013.01)
C12N 1/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0166517
(22) 출원일자 2016년12월08일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
강성우
전라북도 전주시 완산구 척동길 42, 304호 (효자동3가)
(72) 발명자
김승욱
서울특별시 노원구 공릉로46길 32, 104동 905호
유하영
서울특별시 동대문구 약령시로 25, 106동 1901호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 5 항

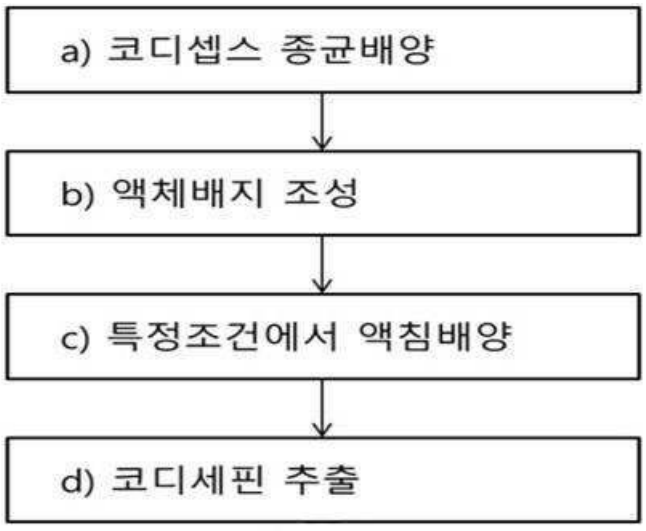
(54) 발명의 명칭 **환경 조건 조절을 통한 코디세핀 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 코디셉스를 액침 조건에서 균사체 형태로 배양시 교반속도, 온도, pH와 같은 환경 조건 조절을 통해 코디세핀의 생산량을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 코디셉스 균사체를 최적의 환경 조건 하에서 액침 배양함으로써 고가의 물질인 코디세핀을 높은 함량으로 생산할 수 있다. 따라서, 기능성은 입증되었지만 가격으로 인해 활용에 제한을 받고 있는 코디세핀의 생산 단가를 낮출 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이수권

서울특별시 마포구 백범로25길 63, 105동 1504호

이자현

서울특별시 구로구 고척로52길 53, 110동 403호

강성우

전라북도 전주시 완산구 척동길 42, 304호 (효자동3가)

김동섭

경기도 구리시 장자호수길 77, 502동 2203호

이주훈

인천광역시 남동구 석산로 35, 106동 2303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0354616

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 첫걸음기술개발

연구과제명 동충하초 대사산물의 생물전환기술에 의한 항노화 원료 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.12 ~ 2016.11.11

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 코디셉스 균사체를 종균 배양하는 단계;

(b) 상기 종균 배양된 코디셉스 균사체를 액체 배지에 접종하여 액침 배양하는 단계; 및

(c) 상기 액침 배양 후 코디세핀을 회수하는 단계;를 포함하는 코디세핀(Cordycepin) 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 액침 배양은 22 내지 28 ℃의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 코디세핀 생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 액침 배양은 pH 5.5 내지 6.5의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 코디세핀 생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 액침 배양은 교반 속도 30 내지 80 rpm의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 코디세핀 생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 코디셉스 균사체는 코디셉스 시넨시스(Cordyceps sinensis), 코디셉스 밀리타리스(Cordyceps militaris), 코디셉스 오피오글로쏘이데스(Cordyceps ophioglossoides), 코디셉스 시카데(Cordyceps cicadae), 코디셉스 소보리페라(Cordyceps sobolifera), 코디셉스 베아우베리아(Cordyceps beauveria) 및 코디셉스 바씨아나(Cordyceps bassiana)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 코디세핀 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 코디셉스를 액침 조건에서 균사체 형태로 배양시 교반속도, 온도, pH와 같은 환경 조건 조절을 통해 코디세핀의 생산량을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동충하초는(cordyceps; 코디셉스)는 예로부터 불로장생의 묘약으로 알려져 있었으며, 중국의 진시황과 양귀비도 동충하초를 복용하였다는 등 역사적으로 귀인들이 쓰는 고급 약초로 알려져 있다. 동충하초란 겨울에는 벌레 몸속에 들어가 숙주를 영양원으로 삼아 잠복하고 있다가 여름에는 곤충의 몸을 뚫고 버섯이 자라나게 된다는 뜻에서 유래된 말로 원래 나방의 유충에서 유래한 버섯을 지칭하였으나 현재는 곤충, 균류 등에서 나오는 버섯을 모두 총칭하여 동충하초(코디셉스)라고 부른다. 발생조건이 까다롭기 때문에 자연에서 발견되는 동충하초는 극히 드물고 희귀성 때문에 매우 고가로 거래되어 일반인이 접하기는 어려웠었다. 우리 나라에서는 2000년대 이후 인공재배 방법이 국내 농가에 보급되면서 점차 일반화되고 있지만, 대한민국 식품의약안전처에는 아직 밀리타리스 동충하초 (Cordyceps militaris) 한 종만이 식품으로 등재되어 있고, 기능성과 안전성에 대한 과학적인 자료가 부족하여 현재도 많은 연구가 진행중이다.

[0003] 한편, 상기 동충하초의 유용성분으로 가장 주목받고 있는 코디세핀(cordycepin)은, 1950년 쿠닝햄(Cunningham)

등에 의해 밝혀진 이후, 약리 활성에 관해 많은 연구가 이루어졌다. 코디세핀은 m-RNA의 합성을 저해하고 항세균, 항진균, 면역증강 및 항암효과가 있는 것으로 주로 알려져 있다. 또한, 최근에는 코디세핀의 혈소판 응집억제 작용에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데, 이에 대한 예로, 한국등록특허 제464876호에서는 동충하초의 코디세핀을 함유하는 항혈전제 조성물이 개시되어 있다.

[0004] 이에, 버섯 형태인 인공 자실체 배양방법에 대한 연구는 오래 전부터 진행되어왔으나, 일반적으로 자실체 배양은 약 60 ~ 90일 정도가 소요되며, 유용 성분인 코디세핀을 자실체로부터 추출하기 위해서는 복잡한 추출 과정을 거쳐야 한다는 단점으로 인해 코디세핀을 유효성분으로 하는 기능성 식품, 화장품, 의약품 등의 분야에 높은 함량을 사용하기 어려운 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제464876호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명에서는 코디셉스를 액침 조건에서 균사체 형태로 배양시 교반속도, 온도, pH와 같은 환경 조건 조절함으로써 생산성이 극대화된 코디세핀 생산 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0008] (a) 코디셉스 균사체를 종균 배양하는 단계;

[0009] (b) 상기 종균 배양된 코디셉스 균사체를 액체 배지에 접종하여 액침 배양하는 단계; 및

[0010] (c) 상기 액침 배양 후 코디세핀을 회수하는 단계;를 포함하는 코디세핀(Cordycepin) 생산 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 따르면, 상기 액침 배양은 22 내지 28 ℃의 조건에서 수행될 수 있다.

[0012] 본 발명에 따르면, 상기 액침 배양은 pH 5.5 내지 6.5의 조건에서 수행될 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 액침 배양은 교반 속도 30 내지 80 rpm의 조건에서 수행될 수 있다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 코디셉스 균사체는 코디셉스 시넨시스(Cordyceps sinensis), 코디셉스 밀리타리스(Cordyceps militaris), 코디셉스 오피오글로쏘이데스(Cordyceps ophioglossoides), 코디셉스 시카데(Cordyceps cicadae), 코디셉스 소보리페라(Cordyceps sobolifera), 코디셉스 베아우베리아(Cordyceps beauveria) 및 코디셉스 바씨아나(Cordyceps bassiana)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 코디셉스 균사체를 최적의 환경 조건 하에서 액침 배양함으로써 고가의 물질인 코디세핀을 높은 함량으로 생산할 수 있다. 따라서, 기능성은 입증되었지만 가격으로 인해 활용에 제한을 받고 있는 코디세핀의 생산 단가를 낮출 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에 따른 코디세핀 생산방법 공정을 나타낸 순서도이다.

도 2는 코디셉스 균사체를 액침 배양시 배양 온도에 따른 코디세핀 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 3은 코디셉스 균사체를 액침 배양시 배양 pH에 따른 코디세핀 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 4는 코디셉스 균사체를 액침 배양시 교반 속도에 따른 균주의 생장 형태를 나타낸 이미지이다.

도 5는 코디셉스 균사체를 액침 배양시 교반 속도에 따른 코디세핀 생산량을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 종래 코디셉스로부터 코디세핀을 생산하는 방법인 자실체 배양은 일반적으로 약 60 ~ 90일 정도의 장기간이 소요되며, 유용 성분인 코디세핀을 자실체로부터 추출하는 방법이 복잡할 뿐만 아니라 생산성이 낮고 높은 단가로 인하여 우수한 기능성에도 불구하고 식품, 화장품, 의약품 등에 적용하기 어렵다는 문제가 있었다.

[0019] 이에, 본 발명자들은 코디세핀 생산량 증가를 위한 연구 중에 코디셉스 균사체를 액침 배양 시에 배양 온도, pH, 교반 속도 조절을 통해 코디세핀의 생산량을 급격히 증가시킬 수 있음을 확인하였으며, 특히 교반속도 조절을 통해 배양액 내에 공급되는 산소량을 조절함으로써 코디세핀의 생산성이 크게 향상될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0020] 따라서, 본 발명은 (a) 코디셉스 균사체를 종균 배양하는 단계; (b) 상기 종균 배양된 코디셉스 균사체를 액체 배지에 접종하여 액침 배양하는 단계; 및 (c) 상기 액침 배양 후 코디세핀을 회수하는 단계;를 포함하는 코디세핀(Cordycepin) 생산 방법을 제공한다.

[0021] 구체적으로 상기 (a) 단계는 코디셉스 균사체를 종균 배양하는 단계이다. 이때, 상기 종균 배양은 코디셉스 균사체를 육안으로 확인하기 위하여 PDA(Potato Dextros Agar) 고체배지를 이용하는 것이 바람직하며, 20-30 ℃에서 약 2-3주 동안 배양하는 것이 바람직하다. 상기 배양을 통해 오염 여부 및 단일 종 여부를 확인한 후 상기 균사체 배지를 멸균된 루프를 이용하여 YPD(Yeast extract, Peptone, Glucose, Agar) 사면 배지에 접종한 후 20-30 ℃ 약 1-2주 동안 배양하는 것이 바람직하다.

[0022] 다음으로, 상기 (b) 단계는 상기 사면 배지에서 배양된 균사체를 액체배지에 접종하여 액침 배양하는 단계이다. 보다 구체적으로, 상기 (b) 단계에서는 상기 (a)단계의 사면배지 내 균사체를 멸균수 또는 계면활성제 0.1%가 첨가된 멸균수 10 ~ 20 ml를 첨가하여 포자를 액체로 회수한 후 포자 농도를 헤모사이토미터(Haemocytometer)로 계수하여 상기 액체 배지 내 총 포자 수를 약 0.8 ~ 1.6 × 10^8로 맞추어 주는 것이 바람직하다. 이때, 상기 액체 배지는 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되는 곰팡이 배양용 액체 배지일 수 있으며 그 조성은 Glucose 20 g/L, Yeast extract 10 g/L, Peptone 5 g/L, $MgSO_4 7H_2O$ 1 g/L, KH_2PO_4 2 g/L 일 수 있으나 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 액침 배양 시 배양 온도, pH, 교반 속도 등의 환경 조건 조절을 통해 코디세핀의 생산량을 급격히 증가시키는 방법을 제공한다.

[0024] 구체적으로 상기 (b) 단계의 액침 배양은 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이 22 내지 28 ℃의 조건에서 수행되는 것이 바람직하다.

[0025] 또한, 상기 (b) 단계의 액침 배양은 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이 pH 5.5 내지 6.5의 조건에서 수행되는 것이 바람직하다.

[0026] 또한, 상기 (b) 단계의 액침 배양은 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이 교반 속도 30 내지 80 rpm의 조건에서 수행되는 것이 바람직하다. 이때, 상기 교반 속도 조절을 통해 배양액 내에 공급되는 산소량을 조절할 수 있는데. 상기 교반 속도 범위 내에서 코디세핀의 생산성이 크게 향상되는 것은 배양액 내에 코디셉스 균사체 배양시 어느 정도의 산소 공급이 필요하기는 하지만 코디셉스 균사체가 무기 호흡에 가까운 과정을 거치도록 공급되는 산소량을 조절하는 것이 코디세핀 생산량 향상에 유리하다는 것을 암시한다.

[0027] 다음으로, 상기 (c) 단계는 상기 액침 배양 후 코디세핀을 회수하는 단계이다. 이때, 상기 코디세핀의 회수는 상기 액침 배양 후 코디세핀의 농도가 가장 높은 시기에 원심분리 또는 기타 일반적인 여과 방법을 통해 균체를 분리함으로써 수행될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따르면, 상기 코디셉스 균사체는 코디셉스 시넨시스(Cordyceps sinensis), 코디셉스 밀리타리스(Cordyceps militaris), 코디셉스 오피오글로쏘이데스(Cordyceps ophioglossoides), 코디셉스 시카데(Cordyceps cicadae), 코디셉스 소보리페라(Cordyceps sobolifera), 코디셉스 베아우베리아(Cordyceps beauveria) 및 코디셉스 바씨아나(Cordyceps bassiana)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 코디셉스 밀리타리스(Cordyceps militaris)일 수 있다.

[0030] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0032] 실시예 1. 코디세핀 함량 분석

[0033] 코디세핀 함량분석은 UV Detector (SPD- 20A, Shimadzu, Japan)가 탑재된 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하였고, 컬럼(column)은 XBridge C18 5 um (250 × 4.6 mm, Waters)를 사용하였다. 컬럼의 이동상 (mobile phase)은 15% methanol이 포함된 20 mM phosphoric acid를 사용하였으며, 유속은 0.6 mL/min 이었다.

[0035] 실시예 2. 액침 배양시 환경 조건 조절을 통해 생산된 코디세핀 함량 분석

[0036] 먼저, PDA(Potato Dextrose Agar) 평판 배지에 보관중인 코디셉스 밀리타리스(*Cordyceps militaris*) 균주를 멸균된 루프를 이용하여 YPD (Yeast extract, Peptone, Glucose, Agar) 사면배지에 접종한 후 25 ℃에서 약 1-2주 동안 배양하였다. 다음으로, 상기 사면배지 내 균사체는 멸균수 또는 계면활성제 0.1%가 첨가된 멸균수 10-20 ml를 첨가하여 포자를 액체로 회수한 후 포자 농도를 Haemocytometer로 계수하고 곰팡이 배양용 액체배지 (Glucose 20 g/L, Yeast extract 10 g/L, Peptone 5 g/L, $MgSO_47H_2O$ 1 g/L, KH_2PO_4 2 g/L)에 총 포자 수가 약 $0.8 \sim 1.6 \times 10^8$로 되도록 희석하여 접종하고, 배양시 배양온도, pH 및 교반속도를 조절하면서 배양하였다.

[0037] 먼저, 전술한 배양 조건 중 액침 배양시 배양 온도에 따른 코디세핀 생산량 변화를 측정하였으며, 그 결과를 하기 도 2에 나타내었다.

[0038] 이를 통해 코디세핀 생산량은 배양 온도와 밀접한 관련이 있으며 특히 배양 온도가 25 ℃일 때 코디세핀 생산량이 가장 높다는 것을 확인하였다.

[0039] 다음으로, 전술한 배양 조건 중 액침 배양시 배양 pH에 따른 코디세핀 생산량 변화를 측정하였으며, 그 결과를 하기 도 3에 나타내었다.

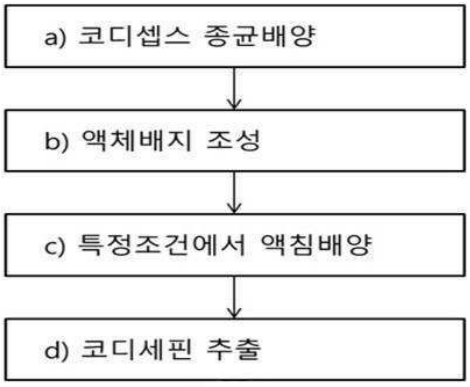
[0040] 이를 통해 pH 6의 약산성에서 약 67 ppm의 cordycepin이 생산됨을 확인하였는바 본 발명에 따른 코디셉스 균사체는 산성 또는 염기성 배지보다 pH 6의 약산성에서 가장 높은 코디세핀 생산능을 보인다는 것을 확인하였다.

[0041] 다음으로, 전술한 배양 조건 중 액침 배양시 교반 속도에 따른 코디셉스 균사체의 생장 형태 및 코디세핀 생산량 변화를 측정하였으며, 그 결과를 각각 하기 도 4 및 도 5에 나타내었다.

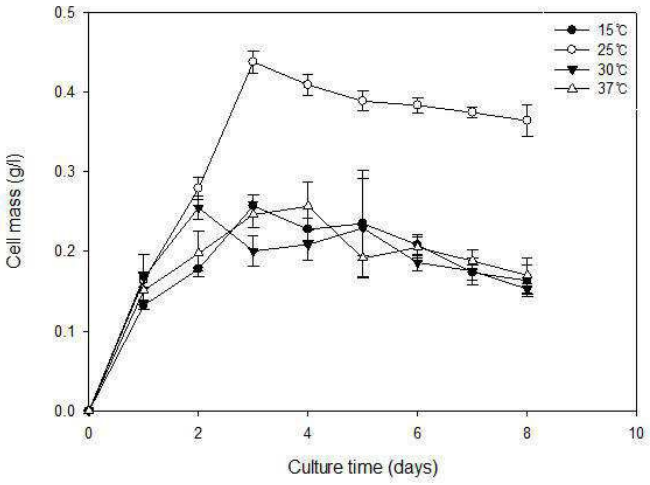
[0042] 이를 통해 교반 속도 0, 50, 100 rpm에서 균주가 배양액 표면에 분포하여 균사체가 자라는 것을 관찰할 수 있었고, 150, 200 rpm에서 균주가 배양액 내 고르게 퍼져 생장하는 것을 확인한 반면, 코디세핀의 생산량은 교반속도가 50 rpm에서 최대 약 420 ppm으로 가장 많이 생산되는 것을 확인하였다. 이를 통해 코디셉스 균사체는 교반속도가 높을수록 배양액 내에서 고르게 잘 생장하지만 코디셉스 균사체로부터 생산되는 코디세핀은 교반 속도에 비례하지 않고, 교반 속도 조절을 통해 코디셉스 균사체가 무기 호흡을 하게 되는 정도의 산소가 공급될 경우에 생산성이 높아진다는 것을 확인하였다.

도면

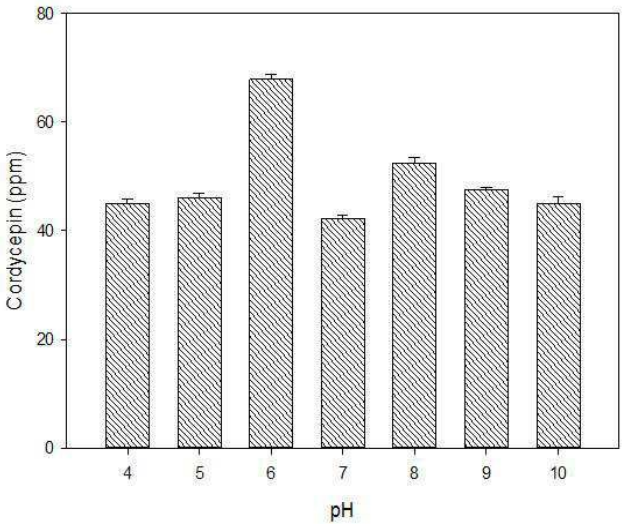
도면1



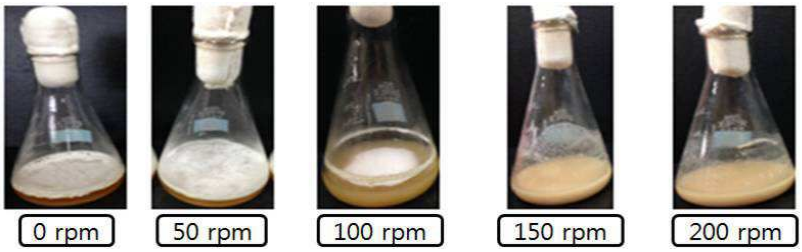
도면2



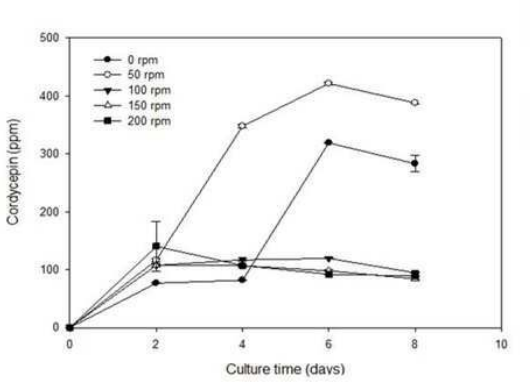
도면3



도면4


0 rpm
50 rpm
100 rpm
150 rpm
200 rpm

도면5


0 rpm
50 rpm
100 rpm
150 rpm
200 rpm
Cordycepin (ppm)
Culture time (days)
0
100
200
300
400
500
0
2
4
6
8
10