



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월10일
(11) 등록번호 10-1856473
(24) 등록일자 2018년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/02 (2006.01) C07C 33/05 (2006.01)
C12N 1/14 (2018.01)

(73) 특허권자
대한민국

(52) CPC특허분류
C12P 7/02 (2013.01)
C07C 33/05 (2013.01)

(72) 발명자

김명길

서울특별시 강남구 개포로 311 902동 1303호 (개포동, 우성9차아파트)

이성숙

서울특별시 송파구 동남로 225 108동 801호 (가락동, 래미안파크팰리스)

(뒷면에 계속)

(21) 출원번호 10-2016-0108147

(22) 출원일자 2016년08월25일

심사청구일자 2016년08월25일

(65) 공개번호 10-2018-0023211

(43) 공개일자 2018년03월07일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160046360 A*

Microbiological Research, 2016, 제182권, 제141-149면.

Korean Chem. Eng. Res., 2005, Vol. 43, No. 3, pp. 419-424.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(74) 대리인

황이남

전체 청구항 수 : 총 9 항

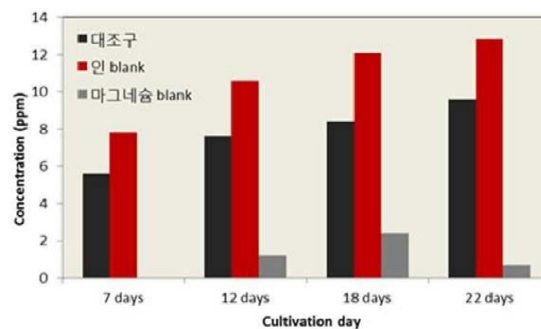
심사관 : 류민정

(54) 발명의 명칭 겨울우산버섯의 균사 배양액으로부터 유데스몰의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 마그네슘을 포함하고, 인을 포함하지 않는 제한 배지에서 겨울우산버섯을 배양함으로써, 유데스몰을 고수율로 대량 생산할 수 있는 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 의한 유데스몰의 생산방법은 겨울우산버섯의 균사 배양액으로부터 유데스몰을 효율적으로 대량 생산할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 1/14 (2013.01)

C12N 2523/00 (2013.01)

C12N 2527/00 (2013.01)

(72) 발명자

유선화

서울특별시 동대문구 고산자로 534 106동 703호 (제기동, 한신아파트)

이수연

서울특별시 동대문구 이문로 22 1406호 (휘경동, 유니스타워)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

마그네슘을 포함하고, 인을 포함하지 않는 제한 배지에서, 겨울우산버섯을 배양하는 단계를 포함하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제한 배지는 증류수 1L 당, 글루코스 10g, 암모늄 타르트레이트($C_4H_{12}N_2O_6$) 0.2g, 마그네슘 설페이트($MgSO_4$) 0.5g, 칼슘 클로라이드($CaCl_2$) 0.1g을 포함하는 것을 특징으로 하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제한 배지의 pH는 3.5~4.5인 것을 특징으로 하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 겨울우산버섯을 배양하는 단계는 포테이토 텍스트로스 아가(PDA) 배지에서 전배양한 겨울우산버섯의 균사를 상기 제한 배지에 접종한 후, 진탕배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 배양은 25~30℃의 온도 및 50~150 rpm의 조건으로 5~25일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 배양은 28℃의 온도 및 100 rpm의 조건으로 22일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제한 배지의 용량 1L, 28℃의 온도 및 100 rpm의 조건으로 22일 동안 배양시에 비하여, 상기 제한 배지의 용량 8L, 28℃의 온도 및 100 rpm의 조건으로 22일 동안 배양시의 유데스몰 수율이 6.8~7.1배 증가하는 것을 특징으로 하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제한 배지의 용량 8L, 28℃의 온도 및 100 rpm의 조건으로 22일 동안 배양시의 유데스몰 농도는 91~92 ppm인 것을 특징으로 하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 겨울우산버섯을 배양하는 단계의 종료 후에, 상기 겨울우산버섯의 균사 배양액에 유기 용매를 첨가하여 진탕 추출한 다음, 농축하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유데스몰의 생산방법.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 겨울우산버섯의 균사 배양액으로부터 유데스몰(eudesmol)의 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 마그네슘을 포함하고, 인을 포함하지 않는 제한 배지에서 겨울우산버섯을 배양함으로써, 유데스몰을 고수율로 대량 생산할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미생물로부터 유래되는 천연물을 흔히 미생물의 2차 대사과정을 통해 생성된다고 알려져 있으며, 미생물의 무한한 대사 능력을 통해 생성된다고 알려져 있다.

[0003] 미생물의 증식에 필요한 물질을 총괄적으로 영양물이라고 하는데, 미생물 배지 조성의 원리는 배양하고자 하는 미생물의 특성에 따라 필요한 필수 영양물질을 공급한다.

[0004] 일반적으로 배지의 기본 조성은 탄소(C), 질소(N), 산소(O), 수소(H)와 같은 주요 원소(major element)와 P, K, S, Mg와 같은 저농도 원소(minor elements), 비타민과 같은 증식 필수인자(growth factor) 등을 대표적으로 들 수 있다.

[0005] 미생물의 대사 과정을 분석하기 위한 경우, 특정한 성분을 배제한다든가, 특정 성분을 첨가하는 방법이 있으며, 또한 성장 인자나 억제 인자를 첨가하여야 하는 경우가 있다.

[0006] 일반적으로 배지의 기본 조성은 탄소(C), 질소(N), 산소(O), 수소(H)와 같은 주요 원소(major element)와 P, K, S, Mg와 같은 저농도 원소(minor elements), 비타민과 같은 증식 필수인자(growth factor) 등을 대표적으로 들 수 있다.

[0007] 미생물의 대사 과정을 분석하기 위한 경우, 특정한 성분을 배제한다든가, 특정 성분을 첨가하는 방법이 있으며, 또한 성장 인자나 억제 인자를 첨가하여야 하는 경우가 있다.

[0008] 미생물 유래 천연물은 항생제 개발의 바탕이 되었을 뿐만 아니라, 새로운 미생물이 지속적으로 발견되고 미생물의 대량 배양이 용이한 장점을 지니고 있다. 그런데, 생리활성 물질의 창출은 주로 동식물과 같은 천연물로부터 얻거나, 미생물 세포주의 대사산물로부터 추출정제하는 방법이 있으므로, 이러한 생리활성 물질의 창출은 인간의 보다 건강한 삶을 영위하기 위해 중요한 부분이라 할 수 있다.

[0009] 현재 미생물로부터 분리한 2차 대사산물은 약 16,500 여종인데, 주로 방선균 유래 (62%), 곰팡이 유래(20%), 세균 유래(18%)로서, 버섯과 담자균 유래의 생리활성 물질 분리는 그 비율이 극히 적은 실정으로서, 새로운 자원의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0010] *P. brumalis* 균종은 백색부후균으로 알려져 있는 담자균류로 봄~가을에 활엽수의 고목이나 죽은 가지에 군생하며, 목재의 화학성분을 분해시키는 미생물로 알려져 있다.

[0011] 우리나라에 자생하는 버섯의 종류는 약 1,500여종이 알려져 있으나, 그 중 극히 일부인 십여 수종이 식용이나 약용 버섯으로 사용되고 있다.

[0012] 그러나, 몇몇 버섯으로부터 항생 물질(antibiotic), 항암 물질(antitumor), 항바이러스 물질(antivirus)과 같은 다양한 생리활성 물질 등이 발견되어 식용이 아니더라도 잠재적인 농산업 자원으로서의 가치를 갖는다.

[0013] 버섯을 포함하는 균류는 생장 과정 중에 다양한 성분의 물질을 합성, 분비 및 축적한다. 1차 대사산물로 단백질, 다당류, 유기산, 비타민, 지방 등의 영양 성분이 있으며, 2차 대사산물로는 항암 물질, 항생 물질, 테르페노이드(terpenoid) 류 및 독신(toxin) 등의 약리활성 성분들이 있다.

[0014] 버섯에 함유된 생리활성 물질에 관한 연구는 식물에 비해 아직 미개척 분야지만, 미생물로서의 자원이 풍부하기 때문에 신물질 창출을 위한 중요한 자원으로 이용할 수 있다.

[0015] 한편, 생강으로부터 세스퀴테르펜의 일종인 베타 유데스몰(β -eudesmol) 등의 추출방법 (Korean J. Food & Nutr. Vol.13, No.1. 66-70 (2000)), 흰참마귀로부터 추출된 세스퀴테르펜 락톤 화합물을 함유하는 심혈관 질환 및 암 치료용 조성물 (한국공개특허 제10-2004-0070985호), 실측백나무속으로부터 추출한 세스퀴테르펜 유도체를 포함하는 고지혈증, 지방간, 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물 (한국등록특허 제10-0905419호) 등이 개시되어 있다.

[0016] 그러나, 상기 종래기술에 의한 세스퀴테르펜계 화합물의 유래는 식물로서, 이러한 식물 내의 성분을 생산하기 위해서는 식물로부터의 잎 채취, 증기 증류법에 의한 정유 추출, 크로마토그래피 원리에 의한 분획(separation) 및 단리(purification) 등의 복잡한 단계적 과정을 거쳐야 얻을 수 있으나, 식물에 포함되어 있는 세스퀴테르펜

계 화합물의 양 자체가 소량이기 때문에, 이용에 제한이 따른다.

[0017] 이에 버섯으로부터 유데스몰(eudesmol)의 대량 생산방법의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 연구를 지속적으로 수행하여, 버섯, 특히 겨울우산버섯의 균사체를 특정 조건에서 배양함으로써, 유데스몰의 대량 생산이 가능함을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

[0019] 따라서, 본 발명의 목적은 겨울우산버섯으로부터 특정 성분을 포함하지 않는 제한 배지에서 배양하는 단계를 포함함으로써, 유데스몰을 대량 생산할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명은 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 마그네슘을 포함하고, 인을 포함하지 않는 제한 배지에서, 겨울우산버섯을 배양하는 단계를 포함하는 유데스몰의 생산방법을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 의해 생산된 유데스몰을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 의한 유데스몰의 대량 생산방법은 특이적인 배양 조건, 즉 마그네슘을 포함하고, 인을 포함하지 않는 제한된 배지에서 배양함으로써, 겨울우산버섯의 균사 배양액으로부터 유데스몰을 효율적으로 대량 생산할 수 있는 장점을 지닌다.

[0023] 또한, 기존의 백색 부후균으로부터 생성되는 이차 대사산물에 관한 연구가 극히 드문 점을 감안할 때, 천연물 생산을 위한 새로운 미생물 자원으로서의 가치를 지니고 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 각 조건별 겨울우산버섯 배양액 추출물의 가스크로마토그래피(GC) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 배양 조건별로 검출되는 베타-유데스몰의 농도(ppm)를 나타낸 것이다.

도 3은 13L 대량 발효기를 나타낸 것이다.

도 4는 250 ml의 삼각플라스크 및 대량 발효기에서 배양한 겨울우산 배양액 추출물의 GC/MS 분석 결과를 나타낸 것으로서, A는 베타-유데스만(β -eudesmane), B는 베타-유데스몰(β -eudesmol)의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 마그네슘을 포함하고, 인을 포함하지 않는 제한 배지에서, 겨울우산버섯을 배양하는 단계를 포함하는 유데스몰의 생산방법에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 상기 유데스몰의 생산방법에서, 상기 제한 배지는 증류수 1L 당, 글루코스 10g, 암모늄 타르테이트($C_4H_{12}N_2O_6$) 0.2g, 마그네슘 설페이트($MgSO_4$) 0.5g, 칼슘 클로라이드($CaCl_2$) 0.1g을 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 상기 유데스몰의 생산방법에서, 상기 제한 배지는 상기 성분 이외에 망간, 철, 코발트, 아연, 구리 등으로부터 선택되는 저농도 원소(minor elements) 및 비타민과 같은 증식 필수인자(growth factor)를 더 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 상기 유데스몰의 생산방법에서, 상기 제한 배지의 pH는 3.5~4.5, 바람직하게는 4.0일 수 있다.

[0029] 본 발명의 상기 유데스몰의 생산방법에서, 상기 겨울우산버섯을 배양하는 단계는 포테이토 텍스트로스 아가(PDA) 배지에서 전배양한 겨울우산버섯의 균사를 상기 제한 배지에 접종한 후, 진탕배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 상기 유데스몰의 생산방법에서, 상기 PDB 배지는 일반적으로 곰팡이와 같은 진균을 배양 증식하는데

적합한 배지로 알려져 있으며, 특히 감자 등과 같은 탄소원이 풍부한 배지이다.

- [0031] 일반적으로 곰팡이와 같은 진균을 배양하기 위해서는 진탕 배양기(shaker incubator) 또는 정지 배양기(stationary incubator)를 사용할 수 있는데, 정지 배양은 가만히 놓아 둔 상태에서 미생물을 증식시키는 방법이며, 진탕 배양은 산소 공급에 효율성을 높여주는 방법으로서, 정지 배양에 비해 산소 공급이 원활하게 이뤄질 수 있는 장점을 갖는다.
- [0032] 본 발명의 상기 유테스몰의 생산방법에서, 상기 배양은 25~30℃의 온도 및 50~150 rpm의 조건으로 5~25일 동안 수행할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 유테스몰의 생산방법에서, 상기 배양은 28℃의 온도 및 100 rpm의 조건으로 22일 동안 수행할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 상기 유테스몰의 생산방법은, 상기 제한 배지의 용량 1L, 28℃의 온도 및 100 rpm의 조건으로 22일 동안 배양시에 비하여, 상기 제한 배지의 용량 8L, 28℃의 온도 및 100 rpm의 조건으로 22일 동안 배양시의 유테스몰 수율이 6.8~7.1배, 바람직하게는 6.9~7.0배 증가할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 유테스몰의 생산방법에서, 상기 제한 배지의 용량 8L, 28℃의 온도 및 100 rpm의 조건으로 22일 동안 배양시의 유테스몰 농도는 91~92 ppm, 바람직하게는 91.5 ppm일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 유테스몰의 생산방법은 상기 겨울우산버섯을 배양하는 단계의 종료 후에, 상기 겨울우산버섯의 균사 배양액에 유기 용매를 첨가하여 진탕 추출한 다음, 농축하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상기 유테스몰의 생산 방법에서, 상기 균사 배양액에 염화나트륨을 첨가한 후, 유기 용매를 첨가하여 진탕 추출할 수 있는데, 그 이유는 유테스몰의 추출 효율을 높이기 위함이다.
- [0038] 본 발명의 상기 유테스몰의 생산 방법에서, 상기 유기 용매는 에틸아세테이트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 유기 용매는 필요에 따라 다양하게 변화시킬 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 방법에 의해 생산된 유테스몰에 관한 것이다.
- [0040] 유테스몰은 편백과 삼나무 정유에 포함되어 있는 성분으로서, 피부 진균(dermatophytes)이나 호흡기 질환 박테리아(respiratory track bacteria)에 대한 항미생물 활성(antimicrobial activity)이다.
- [0041] 또한, 유테스몰은 세스퀴테르펜 알코올 화합물로서, 알코올 관능기를 포함하고 있으며, 각종 생리활성에 관한 연구들이 보고된 바 있고, 항종양 활성을 나타낸다고도 알려져 있다.
- [0042] 한편, 유테스몰은 삼나무나 편백 정유의 주요 활성성분으로 알려져 있으며, 항진균 활성을 나타내는데, 특히, 무좀을 유발하고 백선을 유발하는 피부 진균(dermatophytes)에 속하는 *Trichophytons* 속 균주에 대해 항균 활성을 나타낸다고 알려져 있다.
- [0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0044]
- [0045] <실시예 1>
- [0046] *P. brumalis* 균사 배양겨울우산버섯(*P. brumalis*)은 국립산림과학원으로부터 계대배양 받아 한천 배지(Potato Dextrose Agar)에 배양하였다.
- [0047] 배양 일주일 후 한천 배지로부터 균사를 분리하여 호모게나이저를 이용하여 균질화(homogenizing)시켰다.
- [0048] 각 무기원소가 유테스몰 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 하기 표 1과 같은 조성의 각 무기원소 무첨가 액체 배지(pH 4) 100 ml이 첨가된 250 ml의 삼각 플라스크에 상기 균사를 접종하여 진탕 배양기(shaking incubator)에서 28℃, 100 rpm의 조건으로 배양하였다.

표 1

배양 원소	대조구	N-free	P-free	Mg-free	Ca-free
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g
Ammonium tartrate (C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆)	0.2 g	-	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	2 g	2 g	-	2 g	2 g
Magnesium sulfate (MgSO ₄)	0.5 g	0.5 g	0.5 g	-	0.5 g
Calcium chloride (CaCl ₂)	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	-

[0049]

[0050] 배양 후 7, 10, 12, 18 및 22 일째에 균사 배양액을 유기 용매인 에틸아세테이트(ethyl acetate)로 추출하였는데, 상기 추출은 50ml의 유기 용매를 첨가하여 15분 동안 진탕 추출법으로 3 반복 추출하였다.

[0051]

[0052] <실시예 2> 유데스몰의 분석

[0053] 상기 실시예 1에서 추출한 용액은 바로 증발기(evaporator)로 농축하여 최종 부피를 2 ml로 맞춰 가스크로마토그래피(gas chromatography mass)를 이용하여 성분 분석을 실시하였다.

[0054] 추출된 각 수종의 정유는 곧바로 GC/MS 분석을 실시하였는데, GC (model-Agilent 7890A) column은 DB-5 (60.0 m × 320 μm × 1.8 μm)를, Hewlett-Packard HP 5973 series mass detector (MS)를 사용하였으며, 캐리어 가스는 헬륨을 이용하였다.

[0055] 이때, 온도 조건은 인젝터 220℃, 디텍터 250℃이었으며, 오븐 온도는 초기 온도 50℃에서 5분간 유지시킨 후, 5℃/분씩 승온시켜, 최종 온도가 250℃로 될 때까지 상승시킨 다음, 10분간 유지하였다. 또한, Split ratio는 20:1, mass range는 35-350 m/z, 스캔 모드로 분석 조건을 설정하였다.

[0056] 얻어진 시료 피크의 매스 데이터 표준 라이브러리 데이터(NITS, national institute of standards and technology)와의 비교를 통하여, 최종적으로 피크의 화합물 구조를 확인하였다.

[0057] 각 배양 조건별로 조성된 배양액을 분석한 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0058] 도 1은 각 조건별 겨울우산버섯 배양액 추출물의 가스크로마토그래피(GC) 분석 결과를 나타낸 것이다.

[0059] 도 1을 참조하면, 가장 뚜렷한 차이를 나타낸 배양 조건은 인 무첨가(phosphate free) 조건과 마그네슘 무첨가(magnesium free) 조건이었음을 알 수 있는데, 7일차 결과를 살펴보면 인 무첨가 배양, 마그네슘 무첨가 배양, 대조구 배양(control culture)에서 베타 유데스만(β-eudesmane)의 물질이 35.28분에 검출되었음을 알 수 있다.

[0060] 그런데, 인(P) 무첨가 배양에서만 39.51분에 베타 유데스몰(β-eudesmol)이 먼저 검출되었음을 알 수 있는데, 이는 인을 첨가하지 않았을 때 유데스몰 생성 시간이 빨라진다는 것을 보여 준다.

[0061] 한편, 배양 일수가 10일로 증가되면, 3가지 배양 조건에서 베타 유데스몰이 모두 검출되는데, 피크의 크기가 인 무첨가 배양, 대조구, 마그네슘 무첨가 배양 순으로 높게 측정되었다.

[0062] 피크의 면적이 클수록 수율이 높다는 것을 보여주는 것이기 때문에, 인(P)이 첨가되지 않았을 때 가장 높은 수율로 생성되었다. 반면에, 마그네슘의 경우 배양액에 첨가하지 않았을 때 비슷한 시간대에 피크가 검출되긴 하였으나, 질량 패턴(mass pattern)이 유데스몰에 낮은 매칭 퀄리티(matching quality)를 보였다.

[0063] 따라서, 겨울우산버섯 배양액에 마그네슘이 포함되어야 유데스몰이 원활히 생성될 수 있고, 이는 마그네슘이 겨울우산버섯의 세스퀴테르펜 대사 과정과 깊은 연관성이 있는 것으로 보여진다.

[0064] 도 2는 배양 조건별로 검출되는 베타 유데스몰의 농도(ppm)를 나타낸 것이다.

[0065] 도 2를 참조하면, 인 무첨가 배양에서 22일 동안 배양하였을 때, 베타 유데스몰의 농도가 가장 높게 검출되었는데, 그 농도는 약 13.2 ppm이었다.

[0067] <실시예 3> 스케일 업에 의한 유데스몰의 대량 생산

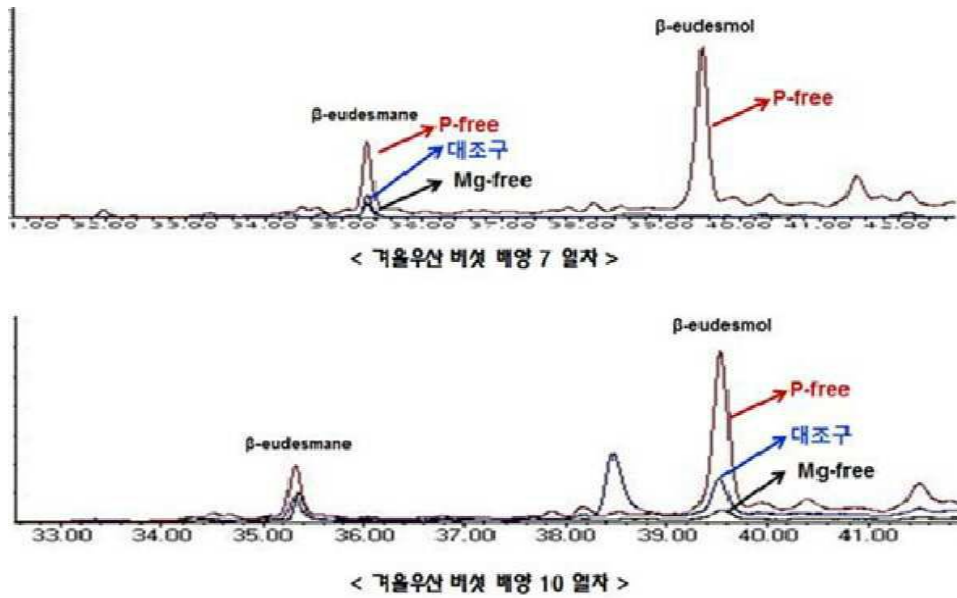
- [0068] 상기 실시예 1 및 실시예 2의 결과에 의하면, 베타 유데스몰의 수율이 높게 생산되는 배양조건은 확인하였으나, 아직은 그 양이 소량이기 때문에, 유용 산물로 밝혀진 유데스몰의 생산 수율을 높이기 위하여, 도 3과 같은 13 L 볼륨의 대량 발효기를 이용하여 스케일 업(scale up) 공정을 실시하였다.
- [0069] 배양 방법은 회분식 배양 방법을 이용하였다. 회분식 배양은 처음 공급한 원료기질이 모두 소비될 때까지 발효를 계속하는 방법으로 겨울우산버섯 균사를 발효조(fermentor)에 옮긴 후, 목적물의 생산에 최적인 조건을 유지하면서 배양하였다.
- [0070] 최적 조건으로 상기 실시예 1 및 실시예의 결과로부터 확인된 유데스몰 수율이 가장 높게 측정된 인 무첨가(phosphate free) 조건으로 배양하였다.
- [0071] 즉, 증류수 8 L에 대하여, 글루코스 80 g, 아모늄 타르테이트 1.6g, 마그네슘 설페이트 4 g, 칼슘 클로라이드 0.8 g을 첨가하여 조성된 배양액을 발효조에
- [0072] 투입한 후, 121℃에서 15분간 멸균시켜 주었다.
- [0073] 멸균 후 배양액이 상온으로 떨어진 다음, 즉시 겨울우산버섯의 균체(전건무게 8g)를 멸균된 주입기를 통해 발효조에 투입하였다. 이때, 배양액을 1M의 초산을 이용하여 pH를 4로 조정하였다.
- [0074] 이후 멸균된 마개로 봉인한 후, 10일 동안 100 rpm 및 28℃ 조건에서 배양하였고, 중간에 기질이나 다른 원소를 투입해 주지 않았다.
- [0075] 배양 후 22 일째에 균사 배양액을 유기 용매인 에틸아세테이트(ethyl acetate)로 추출하였는데, 상기 추출은 50ml의 유기 용매를 첨가하여 15분 동안 진탕 추출법으로 3 반복 추출한 다음, 상기 실시예 2와 같은 방법으로 GC/MS 분석한 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0076] 대량 발효기에서 22일 동안 배양한 결과, 상기 실시예 1과 같이 250 ml 삼각 플라스크에서 배양할 때보다 약 7배 정도의 높은 농도인 91.5 ppm의 베타 유데스몰이 생성되었다.
- [0077] 결과적으로, 대량 발효기를 이용해 겨울우산 배양을 성공하였고, 주요 산물인 베타 유데스몰의 수율이 250 ml의 삼각 플라스크를 사용하였을 때보다 수율이 약 7배 증가하였다.
- [0078] 상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

산업상 이용가능성

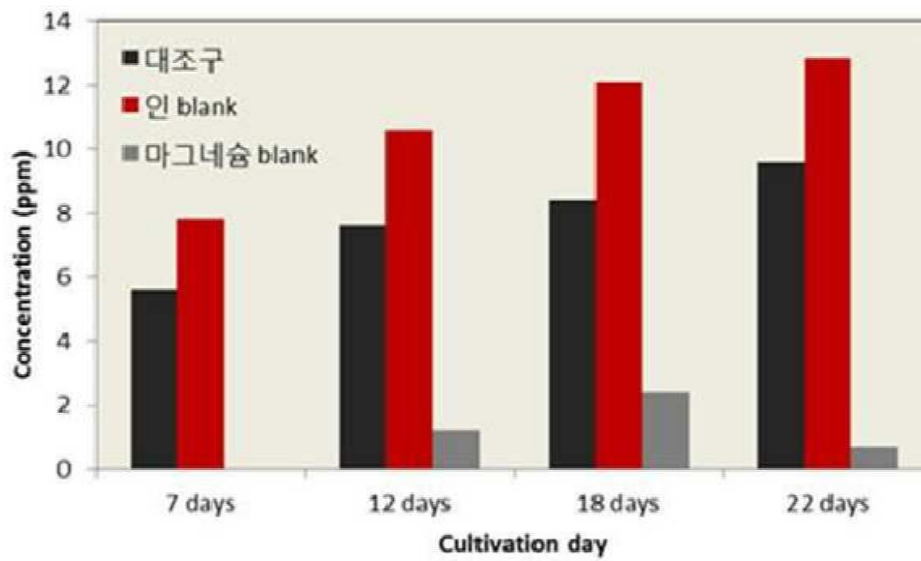
- [0079] 본 발명에 의한 유데스몰의 생산방법은 특이적인 배양 조건, 즉 마그네슘을 포함하고, 인을 포함하지 않는 제한된 배지에서 배양함으로써, 겨울우산버섯의 균사 배양액으로부터 유데스몰을 효율적으로 대량 생산할 수 있는 장점을 지니기 때문에, 본 발명이 속하는 기술분야에 유용하게 적용될 수 있다.

도면

도면1



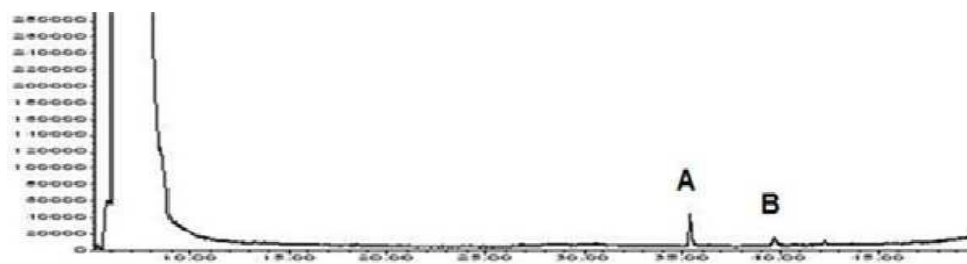
도면2



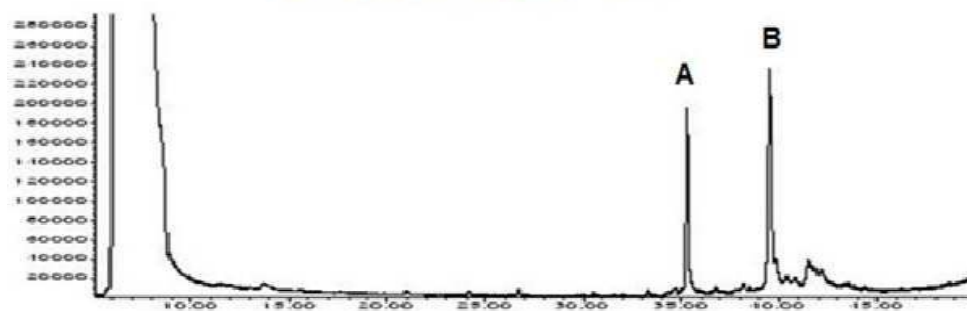
도면3



도면4



< 100 ml 배양 in 250 ml 삼각 flask >



< 8 L 배양 in 13 L 대량 발효기 >