

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0092744 (43) 공개일자 2016년08월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 19/10 (2006.01) C12N 1/14 (2006.01) C12P 1/02 (2006.01)	(71) 출원인 건양대학교산학협력단 충청남도 논산시 대학로 121 (내동)	
(52) CPC특허분류 C12P 19/10 (2013.01) C12N 1/14 (2013.01)	(72) 발명자 이우일 대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 308동 303호	
(21) 출원번호 10-2015-0013514	(74) 대리인 김대영	
(22) 출원일자 2015년01월28일 심사청구일자 2015년01월28일		

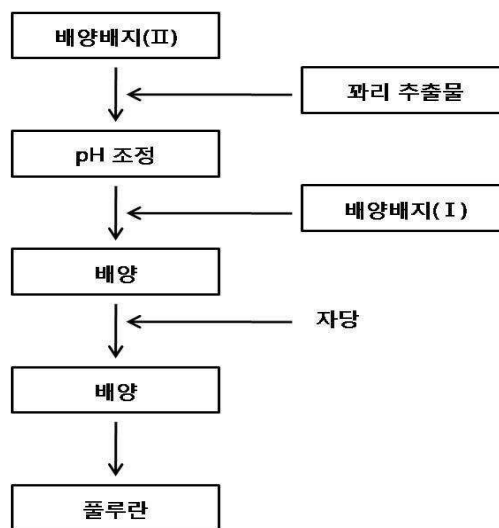
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 아우레오바시디움 플루란스의 멜라린 색소 억제방법 및 플루란 제조방법

(57) 요약

본 발명은 천연 추출 유도체를 이용한 멜라린 색소가 억제된 플루란의 제조방법으로, (1) 아우레오바시디움 플루란스를 글루코스, 맥아추출물, 펩톤을 포함하는 배양배지(I)에 투입 후, 40 ℃의 온도에서 48시간 배양하여 균주를 활성화시키는 균주 활성화 단계; (2) 천연 추출 유도체로 파리 열매를 동결건조하여 분쇄하여 정제수와 혼합한 후, 80 내지 100 ℃의 온도에서 30 내지 60분 동안 가열하여 파리 추출물을 제조하는 단계; (3) 자당, 인산 수소이칼륨, 염화나트륨, 황산마그네슘 7수화물, 황산암모늄, 이스트추출물을 포함하는 배양배지(II)에 상기 제 2 단계에서 얻어진 파리 추출물을 혼합 후, pH를 4 내지 8이 되도록 조정하여 배양 중간물을 제조하는 단계; (4) 상기 (3) 단계의 배양 중간물에 상기 (1) 단계에서 얻어진 균주를 첨가 하여 70 내지 150 시간 동안 배양 후, 자당을 첨가하여 48시간 동안 배양하는 단계가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 1/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-B-7252-010102

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 LINC산학공동기술개발지원사업

연구과제명 Aureobasidium pullulans으로 부터 maltotriose로 구성된 다당류 중합체 추출 및 생산

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 아우레오바시디움 플루란스를 글루코스, 맥아추출물, 펩톤을 포함하는 배양배지(I)에 투입 후, 40 ℃의 온도에서 48시간 배양하여 균주를 활성화시키는 균주 활성화 단계;
- (2) 천연 추출 유도체로 파리 열매를 동결건조하여 분쇄하여 정제수와 혼합한 후, 80 내지 100 ℃의 온도에서 30 내지 60분 동안 가열하여 파리 추출물을 제조하는 단계;
- (3) 자당, 인산수소이칼륨, 염화나트륨, 황산마그네슘 7수화물, 황산암모늄, 이스트추출물을 포함하는 배양배지(II)에 상기 제 2 단계에서 얻어진 파리 추출물을 혼합 후, pH를 4 내지 8이 되도록 조정하여 배양물을 제조하는 단계;
- (4) 상기 (3) 단계의 배양물에 상기 (1) 단계에서 얻어진 균주를 첨가 하여 70 내지 150 시간 동안 배양 후, 자당을 첨가하여 48시간 동안 배양하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소가 억제된 플루란 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제 (1) 단계에서 아우레오바시디움 플루란스는 배양배지(I)의 조성물 총 질량 대비 30 내지 50 wt% 인 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소가 억제된 플루란 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 제 (3) 단계에서 배양배지(II)와 파리 추출물은 질량대비 1 : 0.2 내지 1 : 0.7 인 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소가 억제된 플루란 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 제 (3) 단계의 pH는 인산, 황산, 염산 중 어느 하나를 사용하여 pH 4 내지 6으로 하여 배양하는 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소가 억제된 플루란 제조방법.

청구항 5

아우레오바시디움 플루란스를 배양하여 플루란을 제조하는 방법에 있어서, 천연 추출 유도체로 파리 열매를 사용하는 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소가 억제된 플루란.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아우레오바시디움 플루란스(Aureobasidium Pullulans)에서 분비되는 멜라닌 색소를 억제하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로는 아우레오바시디움 플루란스의 배양 배지에 파리 추출물 및 비타민 C를 사용하여 멜라닌 색소가 억제된 플루란을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 플루란(Pullulan)은 다당류 형태의 복합체로서 1938년 Bauer에 의해 아우레오바시디움 플루란(Aureobasidium Pullulans)으로부터 최초로 발견 되었으며, 1958년 Bernier에 의해 균주로부터 분리된 후 계속해서 분자적 특성에 대한 연구가 이루어졌다. 아우레오바시디움 플루란의 세포 외막에서 형성되는 플루란은 Glucose분자가 각각

Intramolecule α -1,4 Glucosidic bond, Intermolecule α -1,6 Glucosidic bond의 형태로 결합하고 있으며, 이러한 결합을 중심으로 Maltotriose 단량체를 형성한다. 형성된 각각의 Maltotriose 단량체들은 폴리머 형태를 구성하고 있으며, 평균적으로 10~100 kDa의 분자량을 갖는다. 이러한 Maltotriose 단량체들은 산업적으로 의약품의 피복물, 식품첨가물, 화장품 등 여러 분야에 적용되고 있다. 특히 화장품 분야에서는 보습기능성이 히아루론산(Hyaluronic acid)보다도 100배의 보습력을 갖는 물질로 알려져 있다.

[0003] 아우레오바시디움 플루란은 흑효모 균주의 일종으로 균종의 배양 시 멜라닌 색소 활성 기전의 영향을 받게 되는데, 이는 티로시나제 효소에 의해 티로신이 도파로 변환되고, 도파는 다시 도파퀴논으로 전환되며 도파퀴논은 시스테인과 결합하여 5-S-시스테인도파를 형성하고, 이는 다시 Benzothiazine 중간체를 만들어 Pheomelanin을 활성화시켜 나타나는 현상이다.

[0004] 현재 플루란 원료의 생산에 있어 중국과 일본 등 여러 나라에서는 생산 공정 시스템에 charcoal을 이용하여 플루란의 순도를 높이고 있는 실정이다. 이러한 생산 공정 시스템은 Aureobasidium Pullulans로부터 얻어지는 플루란의 수율과 생산 시 공정 단계의 증가로 비효율적이라 분석될 수 있다.

[0005] 파리 (Physalis alkekengi var. francheti (Masters) Hort)는 우리나라 각지에 재배하는 다년생 초본으로 해발 600m 이하의 숲 가장자리에 자라는 다년초로서 높이 60~90 cm 정도이다. 잎은 호생하며 광란형으로 끝이 날카롭고 치아식의 거치가 있으며 절마다 2매씩 난다. 꽃은 엽액에서 나오며 흰색으로 1개씩 달리며 소화경은 길이 3~4cm이고, 꽃받침은 짧은 통형이며, 끝이 알개 5개로 갈라지고 가장자리에 털이 있다. 과실은 구형의 액과로 적색으로 익는다. 생약으로는 전초를 사용하며 산장 (Physalis Herba), 등롱이라고도 한다. 성분으로는 전초에 피살린 A, B, C (physalin A, B, C), 사포닌 (saponin), 플라보노이드(flavonoid), 알칼로이드 (alkaloid)가 있으며 열매에는 0.12% 카로티노이드 (carotenoid)인 붉은 색소, 아스코르빈산, 수지, 펙틴, 탄닌, 쓴맛물질, 카로틴, 알칼로이드, 퀘르세틴 (quercetin), 카페인산, 시나민산, 페롤라산 등이 있고 뿌리에는 3-알파-티글로옥시트로판, 피살린, 제아크산틴이 함유되어있고 씨에는 리놀레인을 주성분으로 하는 기름이 함유되어 있다.

[0006] 종래의 선행기술로 파리 추출물을 이용한 플루란 제조방법은 아니지만, 이와 유사한 플루란 제조방법에 대한 기술로, 공개특허 제10-2011-0089044호(2011.08.04)에서는 플루란을 생산하는 미생물을 이용하여 완충능력이 있는 시료를 배양배지에 첨가하거나 배양 조건인 pH를 달리하여 다양한 분자량을 갖는 플루란의 제조방법에 관한 것으로, 플루란의 제조 공정이 복잡하며, 멜라린 색소에 대한 언급이 되어져 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 공개특허 제10-2011-0089044호(2011.08.04)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 첫 번째 목적은 단일화 과정을 통해 천연 추출 유도체를 이용한 플루란 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 두 번째 목적은 캡슐내부에 천연 추출 유도체를 통해 플루란에 함유된 멜라린 색소를 억제하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 (1) 아우레오바시디움 플루란스를 글루코스, 맥아추출물, 펩톤을 포함하는 배양배지(I)에 투입 후, 40 °C의 온도에서 48시간 배양하여 균주를 활성화시키는 균주 활성화 단계; (2) 천연 추출 유도체로 파리 열매를 동결건조하여 분쇄하여 정제수와 혼합한 후, 80 내지 100 °C의 온도에서 30 내지 60분 동안 가열하여 파리 추출물을 제조하는 단계; (3) 자당, 인산수소이칼륨, 염화나트륨, 황산마그네슘 7수화물, 황산암모늄, 이스트추출물을 포함하는 배양배지(II)에 상기 제 2 단계에서 얻어진 파리 추출물을 혼합 후, pH를 4 내지 8이 되도록 조정하여 배양물을 제조하는 단계; (4) 상기 (3) 단계의 배양물에 상기 (1) 단계에서 얻어진 균주를 첨가 하여 70 내지 150 시간 동안 배양 후, 자당을 첨가하여 48시간 동안 배양하는 단계의 멜라닌 색소가 억제된 플루란 제조방법을 제공한다.

- [0011] 일 실시예로, 상기 제 (1) 단계에서 아우레오바시디움 플루란스는 배양배지(Ⅰ)의 조성물 총 질량 대비 30 내지 50 wt% 일 수 있다.
- [0012] 일 실시예로, 상기 제 (3) 단계에서 배양배지(Ⅱ)와 파리 추출물은 질량대비 1 : 0.2 내지 1 : 0.7일 수 있다.
- [0013] 일 실시예로, 상기 제 (3) 단계의 pH는 인산, 황산, 염산 중 어느 하나를 사용하여 pH 4 내지 6으로 하여 배양할 수 있다.
- [0014] 본 발명은 아우레오바시디움 플루란스를 배양하여 플루란을 제조하는 방법에 있어서, 천연 추출 유도체로 파리 열매를 사용한 멜라닌 색소가 억제된 플루란을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 의하면, 본 발명에서는 천연 추출 유도체를 이용한 플루란을 간단한 공정을 통해 제조하였다.
- [0016] 또한, 본 발명의 플루란은 천연 추출 유도체를 포함함으로써, 멜라닌 색소를 억제하는 효과가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 천연 추출 유도체를 이용한 플루란 제조방법의 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 UV 분석결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있는 바람직한 실시예를 포함한 발명의 구성을 상세히 설명한다. 본 발명의 각 도면에 있어서, 구조물들의 사이즈나 치수는 본 발명의 명확성을 기하기 위하여 실제보다 확대하거나 축소하여 도시한 것이고, 특징적 구성이 드러나도록 공지의 구성들은 생략하여 도시하였으므로 도면으로 한정하지는 아니한다. 본 발명의 바람직한 실시예에 대한 원리를 상세하게 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0019] 본 발명에서 도 1은 천연 추출 유도체를 이용한 플루란을 제조하는 방법으로, 균주활성화 단계, 파리 추출물 제조 단계, 플루란을 생산하는 단계로 이루어진다.
- [0020] 보다 자세하게는 (1) 아우레오바시디움 플루란스를 글루코스, 맥아추출물, 펩톤을 포함하는 배양배지(Ⅰ)에 투입 후, 40 ℃의 온도에서 48시간 배양하여 균주를 활성화시키는 균주 활성화 단계, (2) 천연 추출 유도체로 파리 열매를 동결건조하여 분쇄하여 정제수와 혼합한 후, 80 내지 100 ℃의 온도에서 30 내지 60분 동안 가열하여 파리 추출물을 제조하는 단계, (3) 자당, 인산수소이칼륨, 염화나트륨, 황산마그네슘 7수화물, 황산암모늄, 이스트추출물을 포함하는 배양배지(Ⅱ)에 상기 제 2 단계에서 얻어진 파리 추출물을 혼합 후, pH를 4 내지 8이 되도록 조정하여 배양물을 제조하는 단계, (4) 상기 (3) 단계의 배양물에 상기 (1) 단계에서 얻어진 균주를 첨가하여 70 내지 120 시간 동안 배양 후, 자당을 첨가하여 48시간 동안 배양하는 단계로 이루어진다.
- [0021] 상기 (1) 단계에서 글루코스, 맥아추출물 및 펩톤은 2:1:1의 중량비로 투입하여 배양배지(Ⅰ)를 제조할 수 있으며, 상기 제조된 배양배지(Ⅰ)에 글루코스, 맥아추출물, 펩톤의 총 질량 대비 30 내지 50 wt%의 아우레오바시디움 플루란스를 접종하여 배양한다. 이때 바람직하게는 글루코스, 맥아추출물 및 펩톤과 아우레오바시디움 플루란스는 질량대비 1:1의 비율일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 (1) 단계를 실시하면서 제 (2) 단계를 동시에 실시할 수 있으며, 상기 (2) 단계는 천연 추출 유도체의 추출물을 제조하는 단계로 본 발명에서는 상기 천연 추출 유도체로 파리 열매를 사용하는 것이 바람직하다. 이때, 상기 파리 열매를 24 시간동안 동결건조 후 분쇄하여 정제수와 혼합할 수 있고, 바람직하게는 정제수는 파리 열매의 질량보다 10 내지 30배로 사용할 수 있다. 또한, 정제수와 혼합 후 오토클레브를 이용하여 80 내지 100℃의 온도에서 30 내지 60분간 열수 추출을 할 수 있다.
- [0023] 상기 천연 추출 유도체로 사용되는 파리 열매는 아우레오바시디움 플루란 균주가 추후 과정을 통해 발현될 때 생성되는 멜라닌 색소를 억제하고 동시에 파리 열매의 미백효과 성분을 플루란에 공급해 줄 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 상기 (3) 단계는 자당, 인산수소이칼륨, 염화나트륨, 황산마그네슘 7수화물, 황산암모늄, 이스트추

출물을 포함하는 배양배지(Ⅱ)에 상기 제 (2) 단계에서 얻어진 파리 추출물을 혼합 후, pH를 4 내지 8이 되도록 조정하여 배양물을 제조하는 단계이다.

[0025] 이때, 배양배지(Ⅱ)에 사용되는 자당은 70 내지 80 중량%, 인산수소이칼륨은 10 내지 20 중량%, 염화나트륨은 1 내지 5 중량%, 황산마그네슘 7수화물은 0.5 내지 1 중량%, 황산암모늄 1 내지 5 중량%, 이스트추출물은 0.1 내지 0.5 중량%일 수 있으며 이에 한정된 것은 아니다.

[0026] 상기 (3) 단계에서 배양배지(Ⅱ)에 (2) 단계에서 얻어진 파리 추출물 혼합하는데, 이때 배양배지(Ⅱ)에 포함된 조성물과 파리 추출물은 질량대비 1 : 0.2 내지 1 : 0.7일 수 있다.

[0027] 또한, 상기 파리 추출물을 혼합 후, 인산, 황산, 염산 중 어느 하나를 사용하여 pH 4 내지 6으로 하여 배양할 수 있으며, 바람직하게는 인산을 사용하여 pH 4 내지 5로 조정하는 것이다. 이때, 상기 pH에 따라 추후 얻어지는 플루란의 분자량이 조절될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 (4) 단계는 상기 (3) 단계의 배양물에 상기 (1) 단계에서 얻어진 균주를 첨가 하여 70 내지 150 시간 동안 배양 후, 자당을 첨가하여 48시간 동안 배양하는 단계이다.

[0029] 보다 바람직하게는 상기 (3) 단계에서 pH가 조절된 배양물 대비 상기 (1) 단계에서 얻어진 아우레오바시디움 플루란스 균주를 10 내지 20 중량% 첨가하여 120시간 동안 배양할 수 있다. 또한 상기 120 시간 배양 후, 자당을 pH가 조절된 배양물 대비 20 내지 30 중량% 첨가하여 24 내지 48 시간동안 배양할 수 있다. 또한 상기 (1) 단계 내지 (4) 단계를 통해 얻어진 플루란을 여과시스템을 통해 여과하여 분리 정제할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 아우레오바시디움 플루란스를 배양하여 플루란을 제조하는 방법에 있어서, 천연 추출 유도체로 파리 열매를 사용하는 것을 특징으로 하는 천연 추출물 유도체를 이용한 플루란을 제공할 수 있다.

[0031] 이하 실시예를 통해 보다 자세하게 설명한다.

[0032]

[0033] (실시예)

[0034] 실시예 1.

[0035] 실시예 1-1. 아우레오바시디움 플루란 균주의 배양

[0036] 아우레오바시디움 플루란스를 글루코스(D-Glucose) 20g, 맥아추출물(Malt Extract) 20g, 펩톤(Peptone) 1g으로 구성된 배양 배지(Ⅰ)에 혼합 후, 인큐베이터(Incubator) 내에서 200 rpm 교반하면서, 30 °C에서, 4일간 배양한다.

[0037] 1-2. 파리 추출물 제조

[0038] 파리 열매 20g을 24시간 동안 급속냉동 후 막자사발을 이용하여 잘게 분쇄한다. 분쇄된 파리 열매를 반응기에 넣고 물 250 ml을 첨가한 후 20분간 열수 추출하여 분말의 파리 추출물을 얻는다.

[0039] 실시예 2. 배양 배지(Ⅱ)의 제조

[0040] 자당(Sucrose) 100g, 인산수소이칼륨(K_2HPO_4) 2.5 g, 염화나트륨(NaCl) 0.5 g, 황산 마그네슘 7수화물($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.1g, 황산암모늄($(NH_4)_2SO_4$) 0.3g, 이스트추출물(Yeast Extract) 0.05g 및 상기 실시예 1-2에서 얻어진 파리 추출물 20 ml을 혼합한 후, 1N 인산(H_3PO_4)를 이용하여 pH 8.0로 조정한다. 이후, 증류수를 투입하여 총 부피가 500 ml가 되도록 한다.

[0041] 이후, 실시예 1-1에서 얻어진 아우레오바시디움 플루란 균주 50ml를 첨가하고, 5일 동안 배양하였다. 5일 후 자당 100g을 배양 배지(Ⅱ) 500ml에 첨가하고, 다시 2일 동안 배양하였다.

[0042]

[0043] 비교예 1.

[0044] 실시예 2와 동일하게 실시하되, 짜리 추출물 20 ml 및 1N 인산(H_3PO_4) 대신 아스코르빅산을 사용하여 실시한다.

[0045] 실험예

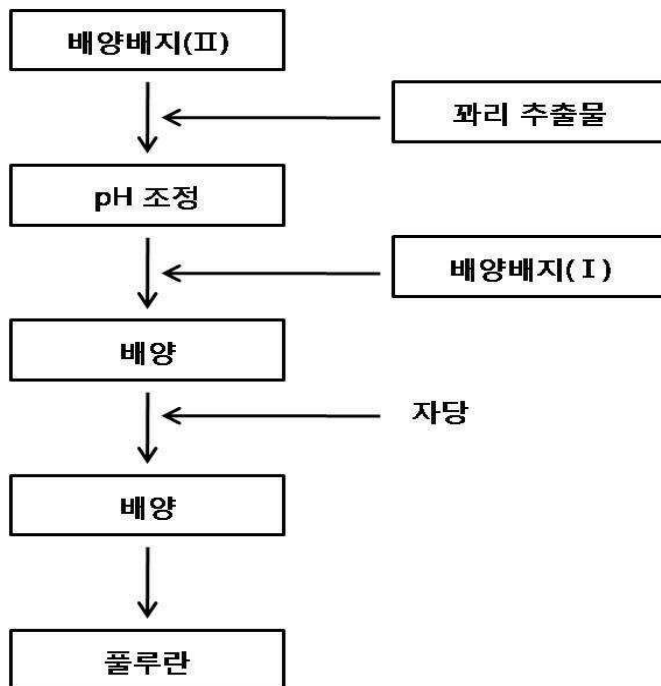
[0046] (멜라닌 색소 측정)

[0047] 본 발명에서는 멜라닌 색소측정은 UV-Visible 분광학 분석을 통해 실시하였으며, 이는 도 2에 나타났다.

[0048] 도 2에서 A는 짜리 추출물이 포함되지 않은 폴루란이고, B는 본 발명의 실시예 1에 따른 폴루란으로, 335 nm 범위에서 피크가 현저하게 감소된 것을 알 수 있으며, 이는 멜라린 색소의 감소로 사료된다.

도면

도면1



도면2

