



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0150030
(43) 공개일자 2022년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01G 18/20 (2018.01) A01G 18/40 (2018.01)
A01G 18/50 (2018.01)
(52) CPC특허분류
A01G 18/20 (2018.02)
A01G 18/40 (2018.02)
(21) 출원번호 10-2021-0057213
(22) 출원일자 2021년05월03일
심사청구일자 2021년05월03일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
양재경
경상남도 진주시 강변길 31, 103동 402호(가좌동, 가호 에일린의 뜰 아파트)
하시영
경상남도 진주시 내동면 내동로 223, 201호(장미연립)
정지영
경상남도 창원시 마산회원구 양덕서로 30, 104동 1702호(양덕동, 메트로시티)
(74) 대리인
특허법인태백

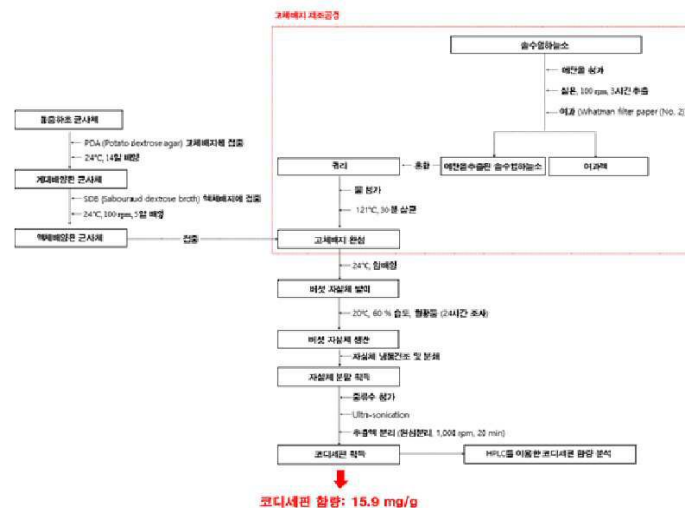
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 유도하기 위한 술수염하늘소 교체배지 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 유도하기 위한 술수염하늘소 교체배지 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 에탄올 추출된 술수염하늘소 교체배지로 생산된 동충하초 자실체의 코디세핀 함량을 측정할 경우, 기존의 동충하초 자실체를 생산하기 위한 교체배지들에 비해서 높은 코디세핀 함량을 나타냄을 확인함에 따라, 동충하초 자실체로부터 보다 더 효과적으로 코디세핀을 유도할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01G 18/50 (2018.02)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0000093500
과제번호	2020252B10-2021-0001
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림융복합 전문인력 양성(대학(원)생 창의도전 아이디어 연구지원)
연구과제명	LED광 제어기술에 의해 배양된 고품량 cordycepin 동충하초 균사체로부터 자실체 생
산 및 이를 원료로 하는 향압, 향염증 기능성 건강 보조식품 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교 산학협력단 산학지원과
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 곡류에 에탄올 추출된 술수염하늘소를 첨가하는 단계;
 - 2) 상기 1)단계에서 제조된 혼합물에 물을 첨가하는 단계; 및
 - 3) 상기 2)단계에서 제조된 혼합물을 고온 멸균하는 단계
- 를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 술수염하늘소 고체배지의 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 곡류는 귀리, 현미, 쌀 및 보리로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 술수염하늘소 고체배지의 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 에탄올 추출된 술수염하늘소는

- a) 술수염하늘소와 에탄올 혼합 후 진탕배양하는 단계;
- b) 상기 a)단계에서 제조된 혼합물을 감압 여과하는 단계; 및
- c) 상기 b)단계에 의해 생성된 잔사를 건조하는 단계

를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 술수염하늘소 고체배지의 제조방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 a)단계는 에탄올 100 중량부에 대하여 술수염하늘소를 2.5 내지 7.5 중량부로 혼합한 후 15 내지 25 ℃에서 2 내지 4시간 동안 90 내지 110 rpm으로 진탕배양하는 것을 특징으로 하는 술수염하늘소 고체배지의 제조방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 c)단계는 상기 b)단계에 의해 생성된 잔사를 15 내지 25℃에서 40 내지 56시간 동안 건조하는 것을 특징으로 하는 술수염하늘소 고체배지의 제조방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 1)단계는 에탄올 추출된 술수염하늘소 100 중량부에 대하여 곡류 15 내지 30 중량부로 첨가하는 것을 특징으로 하는 술수염하늘소 고체배지의 제조방법.

청구항 7

곡류 5 내지 15 중량%, 에탄올 추출된 술수염하늘소 35 내지 45 중량% 및 잔량의 물을 포함하는, 동충하초 자실체 생산용 고체배지용 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 에탄올 추출된 술수염하늘소는 에탄올 100 중량부에 대하여 술수염하늘소를 2.5 내지 7.5 중량부로 혼합한 후 15 내지 25℃에서 2 내지 4시간동안 90 내지 110 rpm으로 교반하고 여과한 잔사를 건조하여 수득한 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체 생산용 고체배지용 조성물.

청구항 9

가) 액체배양된 동충하초 균사체를 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 따라 제조된 술수염하늘소 고체배지에 투

입하고 암배양 하는 단계; 및

나) 상기 암배양 후 형광등 조건의 배양기로 이동하여 자실체를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체 생산방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 동충하초는 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)인 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체 생산방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 암배양은 22 내지 26 °C의 배양기에서 12 내지 16일 동안 암배양하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체 생산방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 자실체 배양은 최초 발이가 발생한 시점을 기준으로 40 내지 60일간 배양하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체 생산방법.

청구항 13

- i) 청구항 9에 따라 생산된 동충하초 자실체를 동결 건조시키고 분말로 제조하는 단계;
- ii) 상기 동결 건조된 동충하초 자실체 분말을 증류수에 혼합한 후, 초음파 처리하는 단계; 및
- iii) 상기 초음파 처리한 혼합물을 원심분리한 후 상등액을 여과하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체로부터 코디세핀 생산방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 i)단계는 -70 내지 -90 °C에서 60 내지 84시간 동결 건조시키는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체로부터 코디세핀 생산방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 ii)단계는 증류수 100 중량부에 대하여 동충하초 자실체 분말을 15 내지 25 중량부로 혼합한 후 50 내지 70 분 동안 45 내지 55 °C에서 초음파 처리하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체로부터 코디세핀 생산방법.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 상기 iii)단계는 900 내지 1100 rpm으로 15 내지 25분간 원심분리하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체로부터 코디세핀 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 유도하기 위한 술수염하늘소 고체배지 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동충하초(冬蟲夏草)는 겨울에는 벌레, 여름에는 버섯으로 나온다는 뜻에서 이름이 붙여졌다. 대부분이 곤충병원성진균(entomopathogenic fungi)으로 약 800여종이 알려져 있으며, 기주곤충에 감염되어 내부에서 균사 생장을 하여 자실체를 생성하는 것이 큰 특징이다. 이러한 동충하초는 아시아(중국, 한국, 일본 등)에서 예전부터 약초로 쓰여 왔다. 그 효능으로는 면역력 증강, 성인병 예방, 천식, 빈혈에 좋은 약재로 사용되어져 왔다.

[0003] 동충하초는 동의보감을 통해서 오랫동안 많은 효능이 인정되어 각종 성인병 질환의 치료 및 건강유지를 위하여

사용되어 왔다. 중국에서는 육상선수들이 동충하초를 복용하고 기적의 기록들을 나타낸다고 하여 동충하초를 3대 천연식품 건강명약으로 인정하고 있다.

[0004] 동충하초는 작물들 중 단백질 함량이 가장 높은 (건조함량의 28%이상) 군에 속하고, 면역력을 강화시키는 물질이 다량 함유되어 있다. 동충하초의 면역활성물질 중에는 키닉산(quinic acid)의 이성체로 밝혀진 '코디세핀(Cordycepin :3'-deoxy-adenosine)'이 포함되어 있으며, 동충하초 중에서도 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)가 다른 동충하초에 비하여 코디세핀의 함량이 월등히 높다. 코디세핀은 핵산 물질로서 세포의 유전 정보에 관여하면서 저하된 면역기능을 활성화하여 정상세포가 암세포로 전환되는 것을 방지하는 작용을 한다. 동충하초를 투입한 임상 실험에서 암세포를 죽이는 면역세포인 NK세포(natural killer cell/자연살해세포)와 면역세포에서 분비되는 사이토카인의 함량이 18%~25% 증가되는 것으로 확인되어 혈액암 치료용으로 활용되고, 건강기능식품으로서도 많은 관심을 받고 있다. 이러한 결과를 토대로 국내에서는 코디세핀이 함유된 동충하초가 버섯으로는 유일하게 건강 기능식품으로 식약처 인증을 받았다. 또한 동충하초는 혈압과 당뇨를 조절하는 효능과 폐와 간 기능 등에도 많은 도움을 주는 것으로 임상연구결과가 발표되고 있다.

[0005] 하지만 코디세핀은 2021년 04월 기준 100 mg당 1,339,500원의 고가에 판매되며 (Sigma-Aldrich, Germany), 화학적인 합성 방법의 경우, 다량의 약품이 첨가되어 환경적 또는 산업적으로 불리한 문제점이 있다. 따라서 유일하게 자연적인 코디세핀 생산이 가능한 동충하초 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며, 특히 동충하초의 자실체로부터 코디세핀을 증대시키는 연구가 절실하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명은 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 유도하기 위해서 에탄올 추출된 솔수염하늘소를 이용한 고체배지의 제조방법을 제공하고자 한다.

[0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 얻어진 동충하초 자실체 생산을 위한 고체배지용 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 얻어진 동충하초 자실체 생산을 위한 고체배지용 조성물을 이용하여 동충하초 자실체 생산방법을 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 동충하초 자실체 생산방법에 의해 생산된 자실체로부터 코디세핀 생산방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 1) 곡류에 에탄올 추출된 솔수염하늘소를 첨가하는 단계; 2) 상기 1)단계에서 제조된 혼합물에 물을 첨가하는 단계; 및 3) 상기 2)단계에서 제조된 혼합물을 고온 멸균하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 솔수염하늘소 고체배지의 제조방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 곡류 5 내지 15 중량%, 에탄올 추출된 솔수염하늘소 35 내지 45 중량% 및 잔량의 물을 포함하는, 동충하초 자실체 생산용 고체배지용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 가) 액체배양된 동충하초 균사체를 상기 제조된 솔수염하늘소 고체배지용 조성물에 투입하고 암배양하는 단계; 및 나) 상기 가)단계에 의해 암배양 후 형광등 조건의 배양기로 이동하여 자실체를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체 생산방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 i) 상기 생산방법에 의해 생산된 동충하초 자실체를 동결 건조시키는 단계; ii) 상기 동결 건조된 동충하초 자실체를 분말로 제조 후 증류수에 혼합한 후, 초음파 처리하는 단계; 및 iii) 상기 초음파 처리한 혼합물을 원심분리한 후 상등액을 여과하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 에탄올 추출된 솔수염하늘소 고체배지로 생산된 동충하초 자실체로부터 코디세핀 함량을 측정할 경우, 기존의 동충하초 자실체를 생산하기 위한 고체배지들에 비해서 높은 코디세핀 함량을 나타냄을 확인함에 따라, 에탄올 추출된 솔수염하늘소 고체배지로 생산된 동충하초 자실체로부터 보다 더 효과적으로 코디세핀을

유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명에 따른 에탄올 추출된 솔수염하늘소를 이용한 고체배지 제조방법, 이를 이용한 동충하초 자실체 생산방법 및 이에 생산된 동충하초 자실체로부터 코디세핀 생산하는 방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 고체배지 제조 공정에 따른 동충하초 자실체의 코디세핀 함량에 대한 HPLC 분석 피크를 나타낸다.
- 도 3은 RSM(Response surface methodology) 분석법을 통해 최적 고체배지 제조 조건에 대한 예측모델 및 그 예측모델을 최적화한 것으로, X_1 은 에탄올 추출된 솔수염하늘소 투입량(g), X_2 은 수분함량(%), X_3 은 배양기간(day s)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0017] 동충하초는 기주의 대상이 되는 곤충의 몸에 침입하여 기주의 양분을 통해 자실체를 형성시키는 약용버섯으로, 동물성 단백질을 영양성분으로 하기 때문에 일반 버섯류에서는 찾아볼 수 없는 유용한 물질, 즉 인간의 각종 질병치료에 이용되어질 수 있는 유용한 성분을 포함하여 기능성 식품으로서의 고부가가치가 있으나, 대량 재배가 어렵고 외부환경에 민감하여 재배가 매우 까다로운 문제점이 있는 바, 상기 문제점을 해결하기 위하여 본 발명자들은 에탄올 추출된 솔수염하늘소를 이용한 고체배지를 개발하고, 이를 이용한 동충하초 자실체로부터 코디세핀 함량을 증대시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 본 발명은 1) 곡류에 에탄올 추출된 솔수염하늘소를 첨가하는 단계; 2) 상기 1)단계에서 제조된 혼합물에 물을 첨가하는 단계; 및 3) 상기 2)단계에서 제조된 혼합물을 고온 멸균하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 솔수염하늘소 고체배지의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 상기 곡류는 귀리, 현미, 쌀 및 보리로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것으로 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 귀리는 다른 곡류에 비하여 단백질, 필수 아미노산, 수용성 섬유질이 풍부하기 때문에 동충하초 자실체 생산을 위한 영양분 역할을 수행할 수 있다.
- [0022] 상기 에탄올 추출된 솔수염하늘소는 a) 솔수염하늘소와 에탄올 혼합 후 진탕배양하는 단계; b) 상기 a)단계에서 제조된 혼합물을 감압 여과하는 단계; 및 c) 상기 b)단계에 의해 생성된 잔사를 건조하는 단계를 포함하여 제조될 수 있다.
- [0023] 상기 a)단계는 에탄올 100 중량부에 대하여 솔수염하늘소를 2.5 내지 7.5 중량부로 혼합한 후 15 내지 25 ℃에서 2 내지 4시간 동안 90 내지 110 rpm으로 진탕배양할 수 있다. 상기 솔수염하늘소의 함량인 2.5 내지 7.5 중량부로 혼합할 경우, 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 14 내지 15 mg/g 범위를 나타냈지만, 상기 솔수염하늘소의 함량인 2.5 중량부 미만 또는 7.5 중량부 초과일 경우, 코디세핀 함량이 8 내지 10 mg/g 으로 저하되는 문제가 야기될 수 있다.
- [0024] 상기 c)단계는 상기 b)단계에 의해 생성된 잔사를 15 내지 25℃에서 40 내지 56시간 동안 건조할 수 있다.
- [0025] 상기 1)단계는 에탄올 추출된 솔수염하늘소 100 중량부에 대하여 곡류 15 내지 30 중량부로 첨가할 수 있다. 상기 곡류의 함량인 15 내지 30 중량부일 경우, 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 약 15 mg/g을 나타냈지만, 상기 곡류의 함량인 15 중량부 미만 또는 30 중량부 초과일 경우, 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 약 10 mg/g으로 낮아지는 문제가 야기될 수 있다.
- [0026] 본 발명은 곡류 5 내지 15 중량%, 에탄올 추출된 솔수염하늘소 35 내지 45 중량% 및 잔사의 물을 포함하는, 동충하초 자실체 생산용 고체배지용 조성물을 제공한다.
- [0027] 이때, 상기 곡류가 5 내지 15 중량% 함량 범위일 경우, 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 14.5 mg/g 내지 15.1 mg/g을 나타냈지만, 상기 함량 범위를 벗어날 경우, 동충하초 자실체의 코디세핀 함량은 8 mg/g 내지 10 mg/g으로 감소하는 문제가 야기될 수 있다.

- [0028] 또한, 상기 에탄올 추출된 솔수염하늘소는 일부 단백질이 추출되어 빠져나감에 따라 상대적으로 탄수화물의 함량이 증대될 수 있다. 코디세핀은 탄수화물의 영향을 받으며, 특히 탄수화물이 증가할수록 코디세핀 함량이 증가할 수 있다. 따라서 상대적으로 탄수화물 함량이 증가되었다고 판단되는 에탄올 추출된 솔수염하늘소는 코디세핀 함량 증대에 효과적인 역할을 수행하는바, 상기 에탄올 추출된 솔수염하늘소의 35 내지 45 중량% 함량 범위에서 동충하초 자실체의 코디세핀 함량은 14.5 mg/g 내지 15.1 mg/g인 반면, 상기 에탄올 추출된 솔수염하늘소의 중량%가 35 미만 또는 45 초과일 경우, 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 8 mg/g 내지 10 mg/g으로 감소하는 문제가 야기될 수 있다.
- [0029] 상기 에탄올 추출된 솔수염하늘소는 에탄올 100 중량부에 대하여 솔수염하늘소를 2.5 내지 7.5 중량부로 혼합한 후 15 내지 25℃에서 2 내지 4시간 90 내지 110 rpm으로 교반하고 여과한 잔사를 건조하여 수득할 수 있다.
- [0030] 본 발명은 가) 액체배양된 동충하초 균사체를 상기 제조된 솔수염하늘소 고체배지용 조성물에 투입하고 암배양하는 단계; 및 나) 상기 암배양 후 형광등 조건의 배양기로 이동하여 자실체를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체 생산방법을 제공한다.
- [0031] 상기 동충하초는 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 암배양은 22 내지 26℃의 배양기에서 12 내지 16일 동안 암배양할 수 있다. 이때, 상기 암배양 조건에서는 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 15 mg/g 이상을 나타냈지만, 상기 암배양 조건을 벗어나면 코디세핀 함량이 10 mg/g 이하를 나타내는 문제가 야기될 수 있다.
- [0033] 상기 자실체 배양은 최초 발이가 발생한 시점을 기준으로 40 내지 60일간 배양할 수 있다. 이때, 상기 배양기간에서는 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 14 내지 15 mg/g을 나타냈지만, 상기 배양기간을 벗어나면 코디세핀 함량이 10 내지 11 mg/g을 나타내는 문제가 야기될 수 있다.
- [0034] 본 발명은 i) 본 발명에 따라 생산된 동충하초 자실체를 동결 건조시키는 단계; ii) 상기 동결 건조된 동충하초 자실체를 분말로 제조 후 증류수에 혼합한 후, 초음파 처리하는 단계; 및 iii) 상기 초음파 처리한 혼합물을 원심분리한 후 상등액을 여과하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동충하초 자실체로부터 코디세핀 생산방법을 제공한다.
- [0035] 상기 i)단계는 -70 내지 -90 ℃에서 60 내지 84시간 동결 건조할 수 있다.
- [0036] 상기 ii)단계는 증류수 100 중량부에 대하여 동충하초 자실체 분말을 15 내지 25 중량부로 혼합한 후 50 내지 70 분 동안 45 내지 55 ℃에서 초음파 처리할 수 있다. 상기 동충하초 자실체 분말의 함량인 15 내지 25 중량부 범위에서는 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 14.5 내지 15.5 mg/g으로 나타냈지만, 상기 동충하초 자실체 분말의 함량 범위를 벗어나면 동충하초 자실체의 코디세핀 함량이 5 내지 10 mg/g을 나타내는 문제가 야기될 수 있다.
- [0037] 상기 iii)단계는 900 내지 1100 rpm으로 15 내지 25분간 원심분리할 수 있다.
- [0038] 상기 동충하초 자실체로부터 코디세핀 함량을 최대로 유도하기 위한 최적 배양 조건은 에탄올 추출된 솔수염하늘소의 투입량, 수분함량 및 배양기간과 하기의 수학적 식과 같은 상관관계를 가지는 것일 수 있다.
- [0039] [수학적 식 1]
- [0040]
$$Y_1 = -93.51500 + 3.4465X_1 + 1.0054X_2 + 1.30883X_3 + 0.0028X_1X_2 - 0.009X_1X_3 + 0.000267X_2X_3 - 0.102300X_1^2 - 0.005252X_2^2 - 0.013811X_3^2$$
- [0041] 상기 수학적 식 1에서 Y_1 은 코디세핀 함량 (mg/g), X_1 은 에탄올 추출된 솔수염하늘소의 투입량 (g), X_2 는 수분함량 (%) 및 X_3 는 배양기간 (days)을 나타낸다.
- [0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0045] <실시예 1> 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 유도하기 위한 술수염하늘소 고체배지 제조 공정

[0046] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 에탄올 추출한 술수염하늘소를 이용한 고체배지 제조방법, 동충하초 자실체 생산방법 및 상기 생산방법으로 생산된 동충하초 자실체로부터 코디세핀 생산방법을 나타낸 모식도이다.

[0047] 1. 술수염하늘소를 이용한 에탄올 추출방법

[0048] 술수염하늘소의 에탄올 추출은 삼각플라스크에서 술수염하늘소 20 g과 에탄올 400 g을 투입한 후 진탕배양기를 이용하여 실온에서 100 rpm으로 3시간 반응시켰다.

[0049] 에탄올 추출 후, Whatman filter paper (No. 2)를 이용하여 감압 여과하고 잔사를 48시간 실온에서 건조시켰다.

[0050] 이렇게 에탄올 추출된 술수염하늘소를 획득하여 고체배지의 원료로 사용하였다.

[0051] 2. 술수염하늘소를 이용한 고체배지 제조공정

[0052] 귀리 3.7 g, 상기 에탄올 추출된 술수염하늘소 16.3 g 및 물 20.2 g을 첨가하여 혼합한 후에 오토클레이브에서 121℃, 30분 동안 고온 멸균하여 배지를 제조하였다.

[0053] 3. 상기 고체배지에 의한 동충하초 자실체 생산방법

[0054] 사부로오드 텍스트로즈 배지(Sabouraud dextrose broth; 펩톤 10 g, 텍스트로즈 20 g, 증류수 1 L; pH 5.6)에 7일간 액체배양된 동충하초 균사체 현탁액 5 mL를 앞서 준비된 고체배지에 투입 후 24℃ 배양기에서 14일간 암배양 하였다. 상기 동충하초 균사체는 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)를 이용하였다.

[0055] 암배양 종료 후, 온도 20℃, 습도 60 %, 24시간 형광등 조건의 배양기로 이동한 다음 60일간 자실체를 배양하였다.

[0056] 4. 상기 생산방법에 의해 생산된 동충하초 자실체로부터 코디세핀 생산방법

[0057] 상기 생산방법에 의해서 생산된 동충하초 자실체의 배양 종료 후 성장한 자실체를 배양용기로부터 분리하고 -80℃로 설정된 동결건조기를 이용하여 72시간 동결 건조시켰다.

[0058] 동결 건조 후 분말로 제조한 자실체 1 g에 증류수 5 g를 투입하고 1시간 동안 50℃에서 초음파 처리(ultrasonication) (40 kHz 250 W, JINWOO 2010, Korea)를 실시하였다.

[0059] 1000 rpm으로 20분간 원심분리 (Union 32R Plus, HANIL, Korea)한 후 상등액을 0.45 μm 여과지로 여과한 다음 코디세핀(cordycepin)을 얻었다.

[0060] 상기 코디세핀의 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였으며, HPLC 시스템은 Kinetex 5 μ C18 100A column (Phenomenex, Torrance, CA, USA)이 장착된 YL9100 HPLC (영린, 한국)를 사용하였다. 이동상은 70 % 메탄올을 사용하였으며, 유량은 1.2 mL/min로 설정하였다. 주입량은 20 μL이고 UV/Visible Detector (Shimadzu SPA-20A) 260 nm로 검출하였다.

[0061] 표 1은 고체배지 제조 공정에 따른 동충하초 자실체의 코디세핀 함량을 나타낸다. 각 값은 평균 ± SE (n = 5)로 표시된다.

표 1

고체배지	코디세핀 함량, mg/g
술수염하늘소 배지	14.55 ± 0.11
에탄올 추출된 술수염하늘소 배지	15.10 ± 0.10

[0063] 그 결과, 표 1 및 도 2에 따르면, 에탄올 추출된 술수염하늘소를 투입한 고체배지에서 가장 높은 코디세핀 함량을 나타내었다. 따라서, 술수염하늘소 고체배지를 제조하는 것이 동충하초 자실체로부터 코디세핀 유도에 효율적일 것으로 판단되며, 바람직하게는 에탄올 추출된 술수염하늘소 배지를 제조하는 것이 더 효율적이었다.

[0065] <실시예 2> 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 고효율로 생산하기 위한 고체배지 제조공정의 최적화

[0066] 에탄올 추출된 술수염하늘소 투입량, 수분함량 및 배양 기간을 변수로 하고, Design-expert version 12를 이용

하여 표 2과 같이 최대 코디세핀 함량을 위한 RSM의 Box-behnken design으로부터 최적점을 도출하여 최적의 코드 및 실측값을 얻었으며, 하기 수학식 1을 이용하여 최적 고체배지 제조 조건을 도출하였다.

[수학식 1]

$$Y_1 = -93.51500 + 3.4465X_1 + 1.0054X_2 + 1.30883X_3 + 0.0028X_1X_2 - 0.009X_1X_3 + 0.000267X_2X_3 - 0.102300X_1^2 - 0.005252X_2^2 - 0.013811X_3^2$$

상기 수학식 1에서 Y_1 은 코디세핀 함량 (mg/g), X_1 은 에탄올 추출된 술수염하늘소의 투입량 (g), X_2 는 수분함량 (%) 및 X_3 는 배양기간 (days)을 나타낸다.

표 2

RUN	CODED			코디세핀 함량, mg/g	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	
8	-1	-1	0	6.1	
15	1	-1	0	8.5	
11	-1	1	0	6.0	
4	1	1	0	9.8	
1	-1	0	-1	6.9	
7	1	0	-1	10.2	
3	-1	0	1	6.7	
9	1	0	1	7.3	
6	0	-1	-1	7.5	
16	0	1	-1	7.6	
10	0	-1	1	6.3	
12	0	1	1	6.8	
2	0	0	0	13.2	
5	0	0	0	13.9	
13	0	0	0	14.1	
14	0	0	0	12.5	
17	0	0	0	13.5	
독립 변수			CODE		
			-1	0	1
X ₁ , 에탄올 추출된 술수염하늘소 투입량, g			0	15	20
X ₂ , 고체배지 수분함량, %			75	100	125
X ₃ , 자실체 배양기간, days			30	45	60

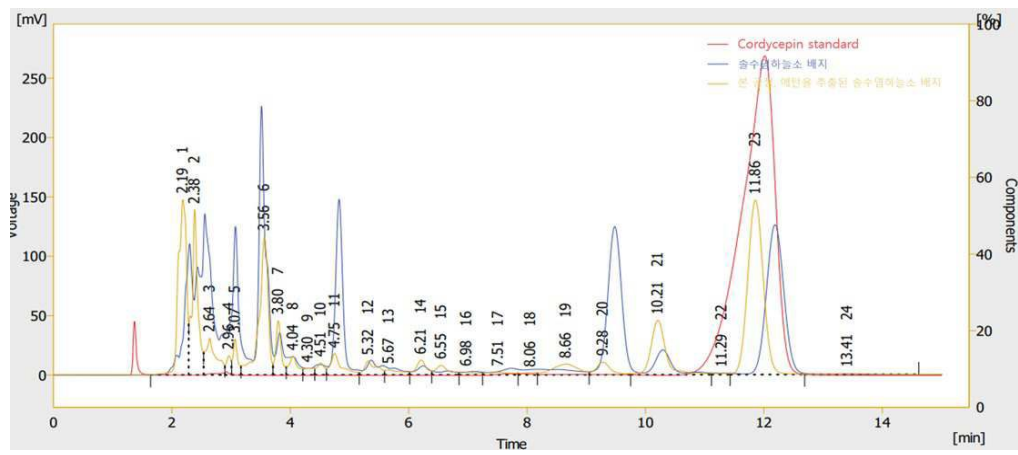
그 결과, 도출된 회귀식으로부터 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 고효율로 생산하기 위한 고체배지 제조 조건을 도 3과 같이 도출할 수 있었으며 귀리 3.7 g, 에탄올 추출된 술수염하늘소 16.3 g, 증류수 20.2 g 및 배양기간 43.0 일의 조건으로 배양할 때, 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 가장 효율적으로 생산할 수 있는 것으로 확인되었다.

또한, 표 3에 의한 ANOVA 분석으로 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 고효율로 생산하기 위한 최적 고체배지 제조 조건에 대한 예측모델의 신뢰성 테스트 결과로 도출된 동충하초 자실체로부터 코디세핀을 고효율로 생산하기 위한 최적 고체배지는 코디세핀 함량을 최대 15.2557 mg/g로 예측되었으며, 실측한 결과 15.9 mg/g의 유사한 코디세핀 함량을 나타내었다($R^2=0.9834$).

표 3

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	p-Value	
Model	145.49	9	16.17	46.20	<0.0001	significant
A - X_1	12.75	1	12.75	36.44	0.005	

도면2



도면3

