(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0061497
(43) 공개일자 2022년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01G 18/20 (2018.01) *A01G 18/40* (2018.01)
A23L 31/15 (2016.01) *A61K 36/06* (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01) *C12N 1/14* (2018.01)
(52) CPC특허분류
A01G 18/20 (2018.02)
A01G 18/40 (2018.02)
(21) 출원번호 10-2020-0147555
(22) 출원일자 2020년11월06일
심사청구일자 2021년05월11일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
이중헌
서울특별시 강남구 자곡로3길 45 (자곡동, LH 강남브리즈힐)
김지우
광주광역시 서구 무진대로 919 (광천동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 11 항

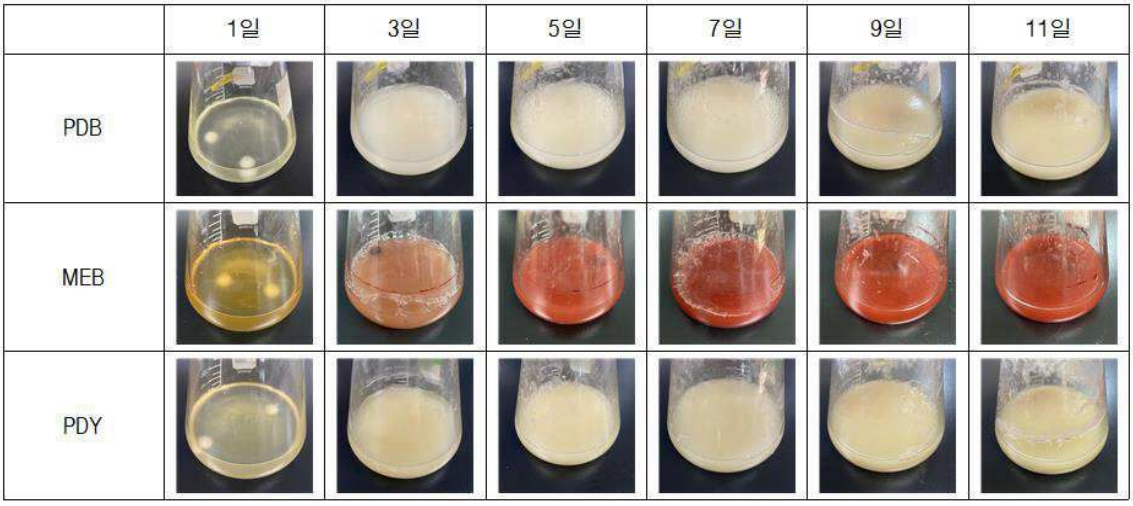
(54) 발명의 명칭 **아까시재목버섯 유래 카로티노이드 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 아까시재목버섯 유래 카로티노이드 생산방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물과, 상기 배지를 이용한 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물 또는 추출물 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 배양용 배지는 아까시재목버섯으로부터 카로티노이드

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



생산을 촉진시킬 수 있는바, 상기 배양용 배지를 이용하여 아까시재목버섯으로부터 카로티노이드 물질을 효과적으로 생산할 수 있다. 한편, 카로티노이드 물질은 자유 라디칼 소거능이 우수하여 탁월한 항산화 효과를 나타내므로, 본 발명의 배양용 배지를 이용하여 제조되는 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물 또는 추출물은 활성산소에 의해 생성되는 산화물들에 기인하는 노화 및 각종 질환의 억제 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물 또는 추출물은 천연물질로서 독성 및 부작용이 없는바, 인체에 안전한 이점을 갖는다.

(52) CPC특허분류
A23L 31/15 (2020.05)
A61K 36/06 (2013.01)
A61P 39/06 (2018.01)
C12N 1/14 (2021.05)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/302 (2013.01)

(72) 발명자
신현재
전라남도 화순군 도곡면 원화길 32
최문희
전라남도 여수시 망마로 82-10 (신기동, 대림산업 제2사택)
김건희
광주광역시 동구 동계로13번길 8-5 (동명동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2020191
과제번호	2020191A00-2022-BA01
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림과학기술개발사업
연구과제명	산림버섯 균사체 및 자실체 기반 고부가가치 가죽소개 기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교
연구기간	2020.04.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤을 포함하는, 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤은 2:2:0.1의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는, 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 카로티노이드는 베타-카로틴인 것을 특징으로 하는, 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물.

청구항 4

글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤을 포함하는 배지 조성물에 아까시재목버섯 균사체를 접종시켜 배양하는 단계를 포함하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물의 제조 방법.

청구항 5

제4항의 방법으로 제조된 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 카로티노이드는 베타-카로틴인 것을 특징으로 하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 배양물은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물.

청구항 8

(a) 제5항의 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 상등액에 에탄올을 가하여 추출하는 단계를 포함하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물의 제조 방법.

청구항 9

제6항의 방법으로 제조된 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 카로티노이드는 베타-카로틴인 것을 특징으로 하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 추출물은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아까시재목버섯 유래 카로티노이드 생산방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물과, 상기 배지 조성물을 이용한 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물 또는 추출물 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 호기성 생명체의 정상적인 세포대사와 신체 기능은 자유 라디칼 생성과 항산화 방어 사이의 균형을 필요로 한다. 항산화제는 자유 라디칼을 제거하기 위해 방출할 수 있는 여분의 전자를 가진 물질을 일반적으로 부른다. 자유 라디칼은 과산화수소 (H2O2), 슈퍼옥사이드 음이온 및 인체에서 지속적으로 생성되는 하이드록실 라디칼(OH-)과 같은 자유 라디칼을 포함하는 세포 내의 활성산소종(ROS)이다. 과도한 자유 라디칼이 발생하는 상황에서는 지질 과산화 또는 암을 촉진하는 돌연변이 또는 세포 사멸을 유발할 수 있는 DNA 부가 물 형성과 같은 연쇄 반응에 의해 세포가 파괴되어 비정상적인 신체 기능과 다양한 질병을 유발한다(Filipa et al. al., 2011, Banerjee et al., 2012). 모든 생명체는 자유 라디칼을 제거하기 위한 자연적인 방어 메커니즘을 가지고 있지만, 과도한 ROS 생산이 이루어지고 있다. 따라서 카로티노이드 계열 항산화제가 풍부한 음식을 섭취하면 내인성 방어 시스템이 산화 손상을 줄이는 데 도움이 된다(Temple, 2000; Fang et al., 2002; Liu, 2003).

[0003] 버섯은 맛과 풍미로 전 세계적으로 높이 평가되며 신선하고 가공된 상태로 섭취된다. 섬세하고 맛있는 음식 외에도 항산화 화합물, 단백질, 탄수화물, 지질, 효소, 미네랄, 비타민이 상당량 함유된 특별한 생화학 성분을 가지고 있다.

[0004] 한편, 아까시재목버섯(Fomitella fraxinea (Fr.) Imaz.), 일본명은 벳코우타케(ベッコウタケ)은 민주름버섯목 구멍장이버섯과의 버섯으로, 봄부터 가을에 걸쳐 활엽수의 고목 또는 생나무의 뿌리 근처에 중생하는 1년생 또는 다년생의 근주부후균이다. 아까시재목버섯은 우리나라, 일본 등지의 아시아 유럽, 아메리카에 걸쳐 분포하고 있으며 항암효과, 면역증강 등의 약효를 가진 약용 버섯으로 알려져 있다.

[0005] 일반적인 아까시재목버섯의 배양에서는 카로티노이드를 생산하지 못하며, 아까시재목버섯 유래 카로티노이드에 관련된 물질은 이전까지 보고된 적이 없다.

[0006] 이에, 본 발명자는 아까시재목버섯 유래의 카로티노이드를 생산하고자, 아까시재목버섯을 특정 성분이 포함된 배양배지 및 배양조건에서 배양하였으며, 그 결과 베타-카로틴과 같은 카로티노이드계열의 항산화 물질을 다량으로 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2013-0065618호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 카로티노이드 생산을 효과적으로 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 배양용 배지 조성물을 이용하여 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 방법으로 제조된 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물을 제공하는

것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 방법으로 제조된 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0014] 본 발명은 글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤을 포함하는, 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤은 2:2:0.1의 중량비로 포함될 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 카로티노이드는 베타-카로틴일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤을 포함하는 배지 조성물에 아까시재목버섯 균사체를 접종시켜 배양하는 단계를 포함하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물의 제조 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 카로티노이드는 베타-카로틴일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배양물은 항산화 활성을 가질 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 (a) 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 상등액에 에탄올을 가하여 추출하는 단계를 포함하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물의 제조 방법을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 카로티노이드는 베타-카로틴일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 항산화 활성을 가질 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 배양용 배지 조성물은 아까시재목버섯으로부터 카로티노이드 생산을 촉진시킬 수 있는바, 상기 배양용 배지를 이용하여 아까시재목버섯으로부터 카로티노이드 물질을 효과적으로 생산할 수 있다. 한편, 카로티노이드 물질은 자유 라디칼 소거능이 우수하여 탁월한 항산화 효과를 나타내므로, 본 발명의 배양용 배지를 이용하여 제조되는 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물 또는 추출물은 활성산소에 의해 생성되는 산화물들에 기인하는 노화 및 각종 질환의 억제 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물 또는 추출물은 천연물질로서 독성 및 부작용이 없는바, 인체에 안전한 이점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 다양한 고체 배지에서 아까시재목버섯을 접종하여 5일째 배양한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 다양한 액체 배지에서 아까시재목버섯을 접종한 후 시간경과에 따른 배양 결과를 나타낸 것이다.

도 3a는 글루코오스와 맥아추출물의 조성을 달리하여 제조된 MEB(Malt Extract Broth)배지에 아까시재목버섯을 접종하여 5일간 배양시킨 결과를 나타낸 것이다.

도 3b는 맥아추출물 및 펩톤의 조성을 달리하여 제조된 MEB(Malt Extract Broth)배지에 아까시재목버섯을 접종하여 5일간 배양시킨 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 기포 컬럼 배양기(Bubble column reactor)에서 아까시재목버섯 균사체 성장을 보여주는 사진이다.

도 5a는 MEB(Malt Extract Broth) 액체 배지를 이용하여 배양한 아까시재목버섯 배양물의 원심분리 전(왼쪽), 원심분리 후 상등액을 보여주는 사진이다.

도 5b는 아까시재목버섯 배양물의 상등액을 94% 에탄올 용매를 이용하여 추출한 추출물 사진이다.

도 6a는 본 발명의 아까시재목버섯 배양물의 상등액 추출물에 대한 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 6b는 베타-카로틴에 대한 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다(검은색 그래프는 10ppm의 베타-카로틴에 대한 스펙트럼이며, 붉은색 그래프는 100ppm의 베타-카로틴에 대한 스펙트럼이고, 파란색은 아까시재목버섯 배양물의 상등액 추출물에 대한 스펙트럼이다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤을 포함하는, 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0028] 본 발명에서 언급하는 "카로티노이드(carotenoid)"는 식물, 조류, 박테리아 및 균류가 지방과 기본 유기대사 물질로 합성하는 유기 색소로서, 대표적인 카로티노이드계 물질로는 베타-카로틴 및 라이코펜 등이 있다.

[0029] 본 발명에서 언급하는 "아까시재목버섯"은 담자균문(*Basidiomycota*), 균심아강(*Hymenomycetidae*), 민주름버섯목(*Aphyllophorales*), 구멍장이버섯과(*Polyporaceae*), 재목버섯속(*Fomitella*)에 속하며 학명은 *Perenniporia fraxinea* (Bull.) Ryvarden 이다. 아까시재목버섯의 형태학적 특징으로는 일년생으로 갓은 지름이 5 ~ 20cm, 두께 1 ~ 2cm 정도이고, 처음에는 반구형이며 연한 황색 또는 난황색의 혹처럼 덩어리진 모양으로 발생하였다가 생장하면서 반원형으로 편평해진다.

[0030] 본 발명자는 아까시재목버섯 유래의 카로티노이드를 생산하고자, 아까시재목버섯을 다양한 배양배지 적용하여 배양한 결과, 특정 성분을 포함하는 배양배지에만 아까시재목버섯으로부터 카로티노이드 물질을 효과적으로 생산할 수 있을 확인하였으며, 이러한 아까시재목버섯으로부터 카로티노이드를 생산할 수 있는 배양배지는 종래에 전혀 알려진 바가 없다. 즉, 본 발명에서는 특정배지에서의 아까시재목버섯으로부터 카로티노이드 생산 가능성을 최초로 규명하였다.

[0031] 본 발명의 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물은 글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일구체예에서, 본 발명의 카로티노이드 생산을 촉진할 수 있는 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물은 상기 글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤을 2:2:0.1의 중량비로 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 상기 카로티노이드는 베타-카로틴일 수 있다. 하기 실시예에서는 본 발명의 아까시재목버섯 배양용 배지 조성물에 아까시재목버섯 균사체를 접종하여 배양하였으며, 그 결과 아까시재목버섯 배양물이 붉은 색을 띄며 성장하는 것을 확인하였으며, 상기 아까시재목버섯 배양물의 상등액 추출물에서 크로마토그래피에 의한 스펙트럼 분석을 통해 베타-카로틴 화합물을 확인하였다.

[0034] 또한, 본 발명은 글루코오스, 맥아추출물 및 펩톤을 포함하는 배지 조성물에 아까시재목버섯 균사체를 접종시켜 배양하는 단계를 포함하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물의 제조 방법을 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물을 제공한다.

[0036] 본 발명의 일구체예에서, 상기 카로티노이드는 베타-카로틴일 수 있으며, 상기 배양물은 항산화 활성을 가질 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 (a) 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 상등액에 에탄올을 가하여 추출하는 단계를 포함하는, 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 추출물의 제조 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명의 상기 (a) 단계는, 아까시재목버섯 배양물의 상등액을 수득하는 단계로서, 자세하게는 카로티노이드를 포함하는 아까시재목버섯 배양물을 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 수득하는 단계일 수 있다.

[0039] 본 발명의 상기 (b) 단계는, 아까시재목버섯 배양물의 상등액에 용매를 가하여 추출하는 단계로서, 자세하게는 상기 (a) 단계를 통해 수득한 상등액에 90-95% 에탄올 용매를 가하여 20-25℃ 온도에서 40-60분간 추출하는 단계일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일구체예에서, 상기 카로티노이드는 베타-카로틴일 수 있으며, 상기 배양물은 항산화 활성을 가질 수 있다.

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **<실시예 1>**

[0045] **2차원 균사체 배양 특성**

[0046] 아까시재목버섯을 서로 다른 다섯 종류의 배지에 각각 접종하여 성장을 확인하였다. 배지는 100ml 기준 하기 고체 배양물 조성표와 같이 제조하였으며(하기 표 1 참조), 오토클레이브를 사용하여 121℃에서 15분간 멸균하였다. 멸균한 배지는 클린벤치 내에서 직경 90mm의 멸균 배양 플레이트(SPL Petri Dish)에 부어 응고시켰다. 균사 디스크를 배양이 활발하게 성장하는 가장자리에서 8mm 직경의 멸균한 코르크 보어(cork borer)를 사용하여 절단하였다. 절단한 1개의 디스크를 멸균 배양 플레이트에 접종하였으며 접종된 플레이트를 인큐베이터에 25 ℃의 온도에서 배양하였다. 고체 배지에서 키운 아까시재목버섯 균사체는 배지에 따라 서로 다른 성장 특성을 보인다.

[0047] 그 결과 도 1에서 나타낸 바와 같이, 5일째 배양 결과 아까시재목버섯은 배양물에 따라 각각 다른 색과 형상을 띄고 있으며 플레이트 전면은 MEA(Malt Extract Agar) 배지에서 배양된 것을 제외하고 흰색으로 성장하는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

[0049] 100ml 기준 고체배지 조성표

PDBA (Potato Dextrose Broth Agar)	MEA (Malt Extract Agar)	PDA (Potato Dextrose Agar)	PDYA (Potato Dextrose Yeast Agar)	PPYA (Potato Peptone Yeast Agar)
PDB : 2.7g Agar : 1.5g	Glucose : 2g Malt extract : 2g Peptone : 0.1g Agar : 2g	Glucose : 2g Potato starch : 0.7g Agar : 1.5g	Glucose : 2g Potato starch : 0.7g Yeast : 0.5g Agar : 1.5g	Glucose : 2g Potato starch : 0.7g Peptone : 1g Yeast : 0.3g Agar : 1.5g

[0051] **<실시예 2>**

[0052] **플라스크 배양 특성 (최적배지, 5-12일 배양)**

[0053] 본 실험에서는 아까시재목버섯을 PDYA(Potato Dextrose Yeast Agar) 배지에 고체 계대 배양하여 카로티노이드를 생산하는 액체 배지로 MEB(Malt Extract Broth) 배지를 활용하였다. 20g/L 글루코오스와 20g/L 맥아추출물(malt extract) 및 1g/L 펩톤을 활용하여 생산하였으며 균사체 성장에 대한 다양한 성장 매체의 효과를 연구하였다(하기 표 2 참조).

[0054] 먼저, 고체 계대배양을 진행하였다. 고체 계대배양에서 성장배지는 PDYA(Potato Dextrose Yeast Agar) 배지를 사용하였다. PDYA 배지는 300mL 실험실 삼각플라스크에 100ml의 증류수에 4.2g의 감자 덱스트로스 한천(Agar)과 0.5g의 효모 추출물(Yeast extract)을 용해시켜 준비하였다. 15분 동안 121℃에서 오토클레이브를 이용하여 완전히 용해시켜 멸균한 후 100ml의 PDYA를 배양 플레이트(SPL Petri Dish)에 부어 응고시켰다. 아까시재목버섯은 층류 챔버(Esco Lab culture)에서 접종 디스크를 무균조건 하에서 8mm 직경의 코르크보어를 사용하여 절단하고 한천 플레이트의 중앙에 배치하였다. 플레이트를 뚜껑으로 덮고 파라필름(Parafilm)을 이용하여 밀봉한 뒤 7일 동안 25℃의 최적 온도에서 인큐베이터 (Gen Labs)에서 어둠 속에서 배양하였다. 각 실험은 단일 접종물을 포함하여 3회 반복 실시되었다.

[0055] 자체 설계된 펀치로 한천 플레이트 배양물의 8mm를 펀칭하여 종자 액체 배지로 옮겼다. 세 종류의 배지 진탕 플

라스크 배양은 각각 100ml의 액체배지(PDB, MEB, PDY)가 들어있는 300ml 플라스크에서 수행되었으며 Shaking incubator(25℃, 200 rpm)에서 11동안 배양하였다. 100ml 기준 액체 배양물 조성비는 하기 표 2에서 자세히 나타내었다.

[0056] 그 결과 도 2에서 나타낸 바와 같이, 세 종류의 액체 배지(PDB, MEB, PDY) 중 MEB 액체 배지에서만 아까시재목버섯 배양물이 붉은 색을 띄며 성장하는 특성을 보이는 것을 확인하였다.

표 2

[0058] 100ml 기준 액체배지 조성표

PDB (Potato Dextrose Broth)	MEB (Malt Extract Broth)	PDY (Potato Dextrose Yeast)
PDB : 2.7g	Glucose : 2g Malt extract : 2g Peptone : 0.1g	Glucose : 2g Potato starch : 0.7g Yeast : 0.5g

[0060] 본 실험에서는 추가적으로 글루코오스, 맥아추출물(malt extract) 및 펩톤의 함량을 변화시켜 MEB 액상 배지를 제조하고(하기 표 3 및 표 4 참조), 배지 구성성분의 변화에 따른 아까시재목버섯 배양물의 붉은 색 변화를 관찰하였다.

표 3

[0062] 100ml 기준 글루코오스와 맥아추출물의 조성 변화

실험군	글루코오스	맥아추출물	펩톤
1	2g	2g	0.1g
2	2g	2g	0.1g
3	2g	1g	0.1g
4	2g	0g	0.1g
5	1g	2g	0.1g
6	0g	2g	0.1g

표 4

[0064] 100ml 기준 글루코오스와 맥아추출물의 조성 변화

실험군	글루코오스	맥아추출물	펩톤
1	2g	2g	0.1g
2	2g	1.5g	0.1g
3	2g	1g	0.1g
4	2g	0.5g	0.1g
5	2g	2g	0.2g
6	2g	2g	0.05g
8	2g	2g	0.01g

[0066] 그 결과 도 3에서 나타낸 바와 같이, 맥아추출물(malt extract)의 함량이 많을수록, 펩톤 함량이 적을수록 아까시재목버섯 배양물이 붉은 색을 띄는 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과를 통해, 맥아추출물의 양은 많

을수록 펩톤 양은 적을수록 카로티노이드 함량이 증대되는 것을 유추할 수 있었다.

[0068] **<실시예 3>**

[0069] **버섯 균사체의 대량배양**

[0070] 본 실험에서는 아까시재목버섯 균사체의 대량배양을 위하여 플라스크 배지 100mL(본 발효의 5%에 해당)를 만들어 진탕배양기(25℃, 200 rpm)에서 11일간 배양한 후, 1.9 L의 MEA 본 배지에 접종하였다. 상기 배양을 위하여 자체 제작한 배양기(Bubble column reactor)를 사용하였다(도 4 참조). 본 배지의 초기 pH는 5.85이고, 배양온도는 25℃로 하였다. 유동층 배양기를 사용하여 배양을 수행하였으며 통기량은 1~2 vvm으로 조절하여 배양하였다. 균사체의 건조 중량은 70℃에서 밤새 일정한 중량이 될 때까지 건조시킨 후 측정하였다.

[0072] **<실시예 4>**

[0073] **아까시재목버섯 배양물의 상등액 및 추출액 제조**

[0075] <4-1> 아까시재목버섯 배양물의 상등액 제조

[0076] 상기 <실시예 3>을 통해 제조된 아까시재목버섯 배양액으로부터 카로티노이드 상등액을 회수하기 위해 균체가 포함된 배양액을 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 사용하였다. 즉, 본 발명에서는 정제된 무세포(cell-free) 샘플을 준비하기 위해 발효액에서 세포를 분리하여 활용하였다.

[0077] 상기 과정을 통해 수득한 본 발명의 아까시재목버섯 배양물의 상등액은 하기 도 5a에서 자세히 나타내었다.

[0079] <4-2> 아까시재목버섯 배양물의 상등액 추출물 제조

[0080] 상기 실시예 <4-1>을 통해 제조된 아까시재목버섯 배양물의 상등액을 원료로 하여, 여기에 에탄올 용매를 가하여 추출물을 제조하였다.

[0081] 참고로, 물리적, 화학적 또는 기계적 수단에 의한 효과적인 세포 파괴는 세포 내 카로티노이드의 효율적인 추출을 위한 전제 조건이다. 세포벽 파괴는 세포 내 카로티노이드를 용해시키기 위해 세포로 용매의 유입을 촉진한다. 효과적인 세포벽 파괴는 카로티노이드 수율을 8~10배 향상시키는 것으로 알려져 있다.

[0082] 본 발명에서는 세포 내 카로티노이드의 효율적인 추출을 위하여 추출온도 20℃, 40분, 94% 에탄올 용매 및 40g/ml의 용매 부피를 사용하여 추출하였다.

[0083] 상기 과정을 통해 수득한 본 발명의 아까시재목버섯 배양물의 상등액 추출액물 하기 도 5b에서 자세히 나타내었다.

[0085] **<실시예 5>**

[0086] **아까시재목버섯 유래 카로티노이드 분석**

[0087] 본 실험에서는 상기 실시예 <4-2>에서 제조한 아까시재목버섯 배양물의 상등액 추출물에서 대표적인 카로티노이드 화합물인 베타-카로틴 화합물을 확인하였다.

[0088] 분석은 LC-20AD SP 펌프, LC 20AC 자동 시료 주입기, CTO-20AC 컬럼 오븐 온도 조절기, Shimadzu DGU-20A5-Degasser 및 UV 검출기가 장착된 HPLC Shimadzu 시스템을 사용하였다. 데이터 수집 및 처리는 Shimadzu 소프트웨어인 LCMS 솔루션을 사용하였다. 카로티노이드는 C30 YMC 컬럼 (5 um, 250×4.6 mm, Waters, DE, USA)에서 MeOH 및 MTBE의 선형구배를 사용하여 95 : 5에서 30분 동안 70:30, 20분 동안은 50:50. 유속은 0.9 mL/min로 설정하고 UV-Vis 스펙트럼은 250~600 nm에서 얻었으며 크로마토그램은 450 nm에서 측정했다.

[0089] 그 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 <4-2>에서 제조한 아까시재목버섯 배양물의 상등액 추출물에서 베타-카로틴 화합물을 확인할 수 있었다. 도 6b에서 검은색 그래프는 10ppm의 베타-카로틴에 대한 스펙트럼

이며, 붉은색 그래프는 100ppm의 베타-카로틴에 대한 스펙트럼이고, 파란색은 아까시재목버섯 배양물의 상등액 추출물에 대한 스펙트럼이다.

[0091] **<실시예 6>**

[0092] **아까시재목버섯 배양물 및 이의 추출물의 항산화 효과**

[0093] 본 실험에서는 상기 실시예 <4-1>을 통해 제조된 아까시재목버섯 배양물의 상등액과 이의 에탄올 추출물의 항산화 효과를 확인하였다.

[0094] 자세하게는, UV spectrometer를 이용하여 DPPH(1,1-다이페닐-2-피크릴하이드라질) 라디칼의 소거능을 측정하였다. 분리된 0.2mL 배양액과 1.8 mL DPPH 용액(40 mg/L)를 혼합한 후에 30분 동안 어둠 속에서 반응시킨 후에 515 nm에서 측정된 흡광도의 변화를 측정하여 DPPH 라디칼 소거 활성도를 측정하였다. Control 샘플은 배양액 대신에 메탄올 0.2 mL를 첨가하였다.

[0095] $$\%\,Scavenging\,Activity = \frac{Absorbance\,of\,the\,control - Absorbance\,of\,the\,test\,sample}{Absorbance\,of\,the\,control} \times 100$$

표 5

[0097] DPPH 라디칼 소거활성

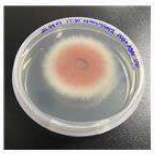
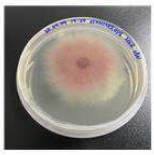
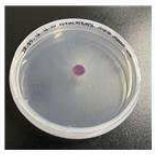
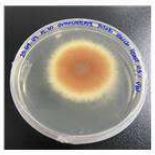
샘플	DPPH 라디칼 소거 활성(%)
배양물의 상등액	35
배양물의 상등액(2배 희석)	20
에탄올 추출물	50
에탄올 추출물(2배 희석)	28
Vitamin C(10 mg/L)	70

[0099] 그 결과 표 5에서 나타낸 바와 같이, 아까시재목버섯 배양물의 상등액과 이의 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성이 증대되는 것을 확인하였다.

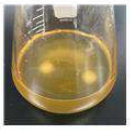
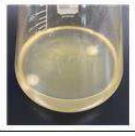
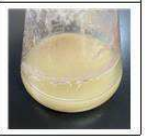
[0101] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

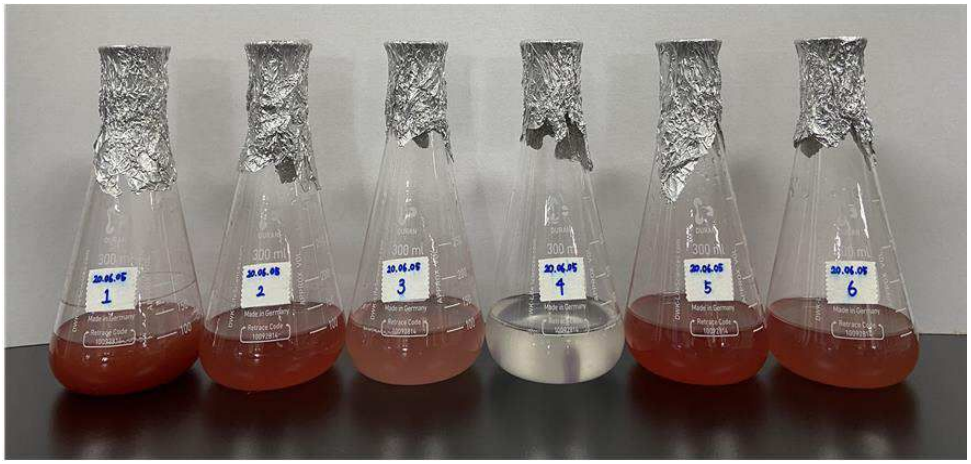
도면1

	PDB	MEA	PDA	PDYA	PPYA
플레이트 후면					
플레이트 전면					
성장 직경 (mm)	56	61	54	52	63

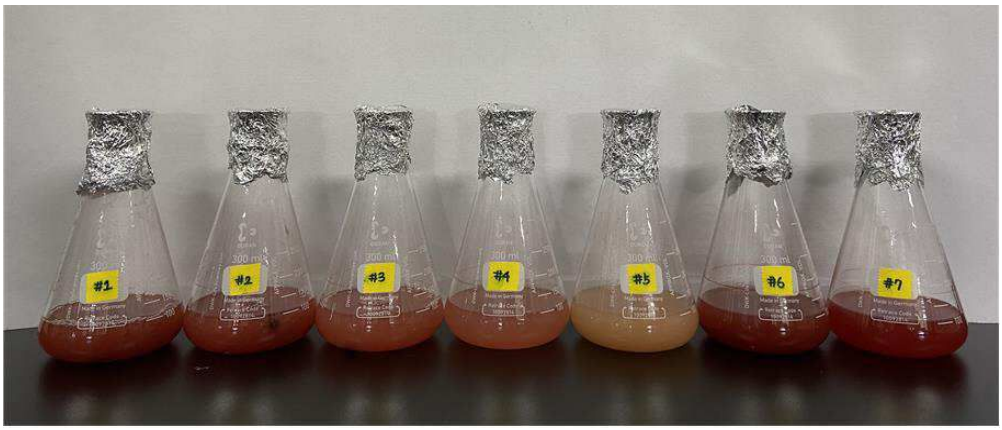
도면2

	1일	3일	5일	7일	9일	11일
PDB						
MEB						
PDY						

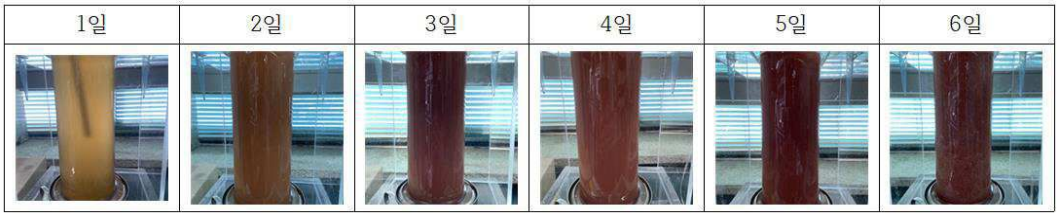
도면3a



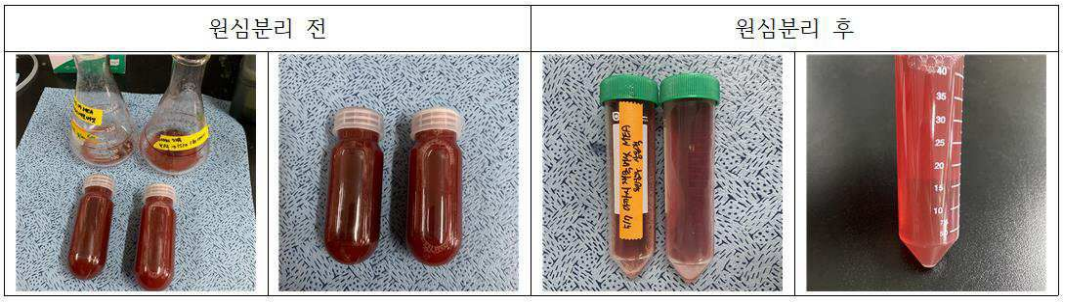
도면3b



도면4



도면5a



도면5b



도면6a


uV
Time 39.626 Inten. 785
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
-200
-300
-400
0.0 5.0 10.0 15.0 20.0 25.0 30.0 35.0 40.0 45.0 50.0 55.0 60.0 65.0 min

도면6b


uV
Time 40.833 Inten. 3,395
3250
3000
2750
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
-250
-500
-750
0.0 5.0 10.0 15.0 20.0 25.0 30.0 35.0 40.0 45.0 50.0 55.0 60.0 65.0 min