



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월20일
(11) 등록번호 10-1799400
(24) 등록일자 2017년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2006.01) A01G 1/04 (2006.01)
A01H 15/00 (2017.01) C12P 13/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/14 (2013.01)
A01G 1/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0077292
(22) 출원일자 2017년06월19일
심사청구일자 2017년06월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020070005950 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
신현재
전라남도 화순군 도곡면 원화길 32
조한교
전라남도 여수시 신월로 561-8, 17동 404호 (신월동, 금호아파트단지)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 3 항

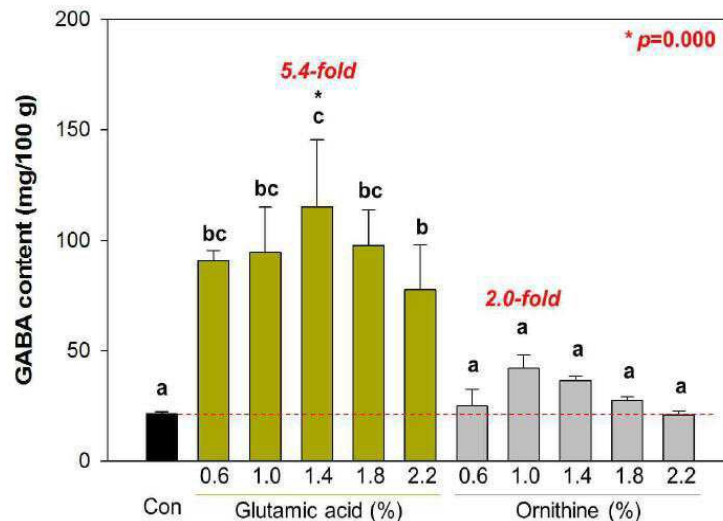
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 아미노산을 포함하는 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산이 증진된 꽃송이버섯 균사체 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물 및 이를 이용한 기능성 물질이 증진된 꽃송이버섯 균사체 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 아미노산의 종류로 글루탐산 또는 오르니틴을 포함하는 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물 및 이를 이용하여 감마-아미노부티르산이 증진된 꽃송이버섯 균사체 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명의 꽃송이버섯의 생산 방법에 의하면 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 아미노산이 0.6 내지 2.2% (w/v)이 첨가하여 배지조성물을 사용함으로써 기존의 방법에 비해 균사체의 생장을 효과적으로 증진시킬 수 있을 뿐 아니라, 기능성 물질로서 GABA의 함량을 두드러지게 증대시킬 수 있는바, 의약품, 건강기능식품 및 화장품 기술 분야에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 고품질의 꽃송이버섯의 재배가 가능해져 농가소득 향상에 크게 기여할 것으로 기대된다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A01H 15/00 (2013.01)

C12P 13/005 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

한국균학회지, 제36권, 1호, 16-21면 (2008)*

연찬회 자료집, 한국임산버섯연구회 등, "꽃송이버섯을 식탁으로"(2009.09.)*

KR 1020120002025 A

KR 101599699 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711051055

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구유형2

연구과제명 생체강화(biofortification)에 기반한 대사조절을 통한 꽃송이버섯의 베타글루칸, GABA 함량 증대와 대량 생산체계 확립

기 여 율 1/2

주관기관 조선대학교산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711032271 (2014H1C3A1000274)

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 여성과학기술인육성지원

연구과제명 γ -aminobutyric acid (GABA) 강화 꽃송이버섯 개발

기 여 율 1/2

주관기관 (재) 한국여성과학기술인지원센터

연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 글루탐산 또는 오르니틴이 1.0 내지 1.4% (w/v) 첨가된, 감마-아미노부티르산 증진용 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 글루탐산 또는 오르니틴이 1.0 내지 1.4% (w/v) 첨가하여 배지조성물을 제조하는 단계; 및

상기 배지조성물에 꽃송이버섯균을 접종한 후 배양하는 단계를 포함하는, 감마-아미노부티르산이 증진된 꽃송이버섯 균사체 생산 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 방법으로 생산된 꽃송이버섯은 감마-아미노부티르산을 100 내지 145 mg/100g으로 포함하는 것을 특징으로 하는 꽃송이버섯 균사체 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물 및 이를 이용한 기능성 물질이 증진된 꽃송이버섯 균사체 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 아미노산의 종류로 글루탐산 또는 오르니틴을 포함하는 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물 및 이를 이용하여 감마-아미노부티르산이 증진된 꽃송이버섯 균사체 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, 이하 간략하게 ‘GABA’로 약칭함)은 억제성 신경전달 물질로서, 혈압상승을 억제하고 시력증진에 효과가 있으며, 불안감, 초조감 등을 진정시키는 작용을 하는 것으로 알려진 물질이다. 동물의 경우 뇌, 심장, 폐, 신장 등에 분포되어 있으며, 식물의 경우 발아 현미, 녹차 등에서 주로 발견되고 있다.

[0003] 스트레스에 시달리는 현대인, 특히 수험생, 알코올 과다 섭취자 등의 경우에는, 뇌와 혈중 GABA 농도가 낮은 것으로 보고되어 있으며, 체내 GABA 농도의 극심한 부족은 발작, 경련, 간질 증세를 일으키는 것으로 알려져 있어서, 이들 증세를 완화 내지는 치료하기 위해서, 체내 GABA 농도를 높이기 위한 목적의 식품 또는 약제 개발이 이루어지고 있다.

[0004] 한편, 꽃송이버섯(*Sparassis latifolia* 혹은 *S. crispa*)은 담자균문, 주름균아문, 주름균강, 구멍장이버섯목, 꽃송이버섯과, 꽃송이버섯속으로 자실체는 백색-밤색으로 꽃양배추 형상을 지닌 버섯이다. 주로 여름철에 발생하며 산림에서 쉽게 발견되지 않는 버섯으로 알려져 있다. 탄수화물이 전체 영양성분의 70%를 이루고 있고, 이중 탄수화물의 절반 이상이 베타글루칸(β -glucan) 성분이며, 그 외에 글리코겐(glycogen), 키토산(chitosan), 에르고스테롤(ergosterol), 트레할로스(trehalos) 등 다양한 성분이 포함되어 있다. 꽃송이버섯의 베타글루칸

함량은 다른 버섯들에 비해 상당히 높은 편으로 (약 43.6%) 면역활성 촉진 및 항암활성에 대한 연구들이 보고되어 있다.

[0005] 꽃송이버섯의 일반성분을 분석한 연구에 따르면 건조 자실체 100 g 기준 자유아미노산의 함량은 3,224 mg/100g 으로 다른 버섯(양송이버섯 3,785 mg, 소나무잔나비버섯 68.67 mg, 상황 2378.3 mg, 민자주방망이버섯 220.86 mg)들에 비해 비교적 다량의 자유아미노산을 함유하고 있는 것으로 보고되었다. 비타민의 경우에도 다른 버섯들 보다 훨씬 많은 양의 비타민을 포함하고 있어 이를 이용한 의약품, 건강기능성 식품을 개발하고자하는 시도가 있었고, 이와 동시에 식용·약용으로써 가치가 높게 평가되었으며, 인공 재배법에 대한 연구 또한 꾸준히 진행되었다. 최근에는 각종 TV 광고와 프로그램에서 소개되면서 소비자들에게 일반적으로 알려진 팽이버섯, 느타리버섯, 표고버섯 등과 함께 식용 버섯으로 인식되고 있다.

[0006] 다만, 상기와 같이 다양한 생리활성 물질을 포함하는 꽃송이버섯에서 GABA 대사에 대한 연구는 전무한 실정이며, 특히 꽃송이버섯의 생장과 GABA 함량 증진을 위한 배양법에 대한 연구는 전혀 이루어진바 없다.

[0007] 이에, 본 발명자는 다양한 생리활성 물질을 포함하는 꽃송이버섯의 생장 증진 및 기능성 물질로서 GABA 함량을 증대시키기 위해 특정 아미노산을 배지에 첨가하여 꽃송이버섯균을 배양하였으며, 배양된 꽃송이버섯 균사체의 GABA 함량을 분석하였다. 그 결과, PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 글루탐산 또는 오르니틴을 첨가하여 배양한 균사체의 생장이 우수하며, 특히, 글루탐산을 첨가하여 배양한 균사체의 경우 GABA 함량이 두드러지게 증대되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1199763호
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2014-0020470호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 감마-아미노부티르산을 증진시킬 수 있는 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 감마-아미노부티르산이 증진된 꽃송이버섯 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0012] 본 발명은 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 아미노산이 0.6 내지 2.2% (w/v)가 첨가된 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아미노산은 글루탐산 또는 오르니틴일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 아미노산이 0.6 내지 2.2% (w/v) 첨가하여 배지조성물을 제조하는 단계; 및 상기 배지조성물에 꽃송이버섯균을 접종한 후 배양하는 단계를 포함하는, 감마-아미노부티르산이 증진된 꽃송이버섯 생산 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아미노산은 글루탐산 또는 오르니틴일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법으로 생산된 꽃송이버섯은 감마-아미노부티르산을 100 내지 145 mg/100g으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 꽃송이버섯의 생산 방법에 의하면 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 아미노산을 0.6 내지 2.2% (w/v) 첨가하여 배지조성물을 사용함으로써 기존의 방법에 비해 균사체의 생장을 효과적으로 증진시킬 수 있을

뿐만 아니라, 기능성 물질로서 GABA의 함량을 두드러지게 증대시킬 수 있는바, 의약품 및 건강기능식품 기술 분야에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 고품질의 꽃송이버섯의 재배가 가능해져 농가소득 향상에 크게 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 꽃송이버섯 자실체 및 균사체를 나타낸 사진이다.

도 2는 본 실험의 설계를 계략적으로 나타낸 모식도이다.

도 3은 아미노산의 종류별 첨가량에 따른 꽃송이버섯 균사체의 건조 중량을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 HPLC에서 이용하는 GABA 결정을 위한 검정곡선 및 피크를 나타낸 것이다.

도 5는 글루탐산 첨가 배지(PDBG)에서 배양한 꽃송이버섯 균사체 추출물의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 6은 오르니틴 첨가 배지(PDBO)에서 배양한 꽃송이버섯 균사체 추출물의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 7은 아미노산의 종류별 첨가량에 따른 꽃송이버섯 균사체의 GABA 생산량을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 아미노산의 종류별 첨가량에 따른 꽃송이버섯 균사체의 베타-글루칸 생산량을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 아미노산이 0.6 내지 2.2% (w/v)이 첨가된 꽃송이버섯 균사체의 배양배지 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

본 명세서에서 언급하는 ‘꽃송이버섯’은 학명이 *Sparasis crispa* (Wulf.) Fr.이며 담자균문, 주름균아문, 주름균강, 구멍장이버섯목, 꽃송이버섯과, 꽃송이버섯속으로 자실체는 백색-밤색으로 꽃양배추 형상을 지닌다. 이러한 꽃송이버섯은 한국, 일본, 중국, 북미, 유럽, 호주 등에 분포하는 식용버섯이다. 자실체는 주로 여름부터 가을까지 살아있는 나무의 뿌리근처 줄기나 그루터기에 뭉쳐서 양배추처럼 발생하며 베타 글루칸(β -glucan)을 다량 함유(건조 자실체 100g당 43.6g 함유, 일본식품분석센터 성분분석 결과)하고 있는 것이 알려지면서 인공재배 및 기능성물질 추출에 관한 연구가 급격히 진행되고 있다.

본 명세서에서 언급하는 ‘균사체(mycelium)’는 진균(眞菌)의 기본적 형태의 한가지로서 균사가 서로 얹혀서 집합된 것을 균사체라고 한다(균사가 자라거나 분기하여 집단을 이룸). 포자를 형성하지 않는 세대 또는 부위에서 균류의 무성세대는 기본적 구조이다. 일반적으로 버섯이라고 하는 균류의 자실체도, 자실체 외의 부분은 모두 균사체로 구성되어 있다.

본 명세서에서 언급하는 ‘PDB(Potato dextrose broth)’는 감자추출배지로서 감자 및 텍스트로스를 포함하는 액체배지이다. 이러한 PDB 액체배지는 시중에서 판매되는 것을 구입하여 사용할 수 있으며, 또는 본 기술 분야에서 통용되는 방법으로 제조하여 사용될 수도 있다.

본 발명에서 상기 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 첨가되는 아미노산은 글루탐산 또는 오르니틴 단독, 또는 이들의 조합일 수 있다. 한편, 아미노산 첨가량은 액체배지를 기준으로 0.6 내지 2.2% (w/v)일 수 있으며, 바람직하게는 1.4%일 수 있다.

PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 아미노산이 0.6 내지 2.2% (w/v)가 첨가된 배지조성물은 꽃송이버섯 균사체의 배양에 유용하게 사용될 수 있다.

특히, 상기 배지조성물에 꽃송이버섯균을 접종하여 배양하는 경우, 종래 PDB 액체배지에 배양하는 경우와 비교하여, 꽃송이버섯 균사체의 생장이 우수할 뿐 아니라, 기능성 물질로서 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA) 생산을 효과적으로 증대시킬 수 있다.

본 명세서에서 언급하는 ‘GABA’는 비단백태 아미노산의 일종으로 식물과 미생물 대사 생성물으로써 가장 먼저 발견되었고 알려져 왔다. 포유류의 중추신경계에서 GABA는 억제성 신경전달물질로 작용하고, 인체에 작용하여 숙취해소, 불안감해소, 고혈압강하, 인슐린 효과의 증대, 우울증 해소 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 한편, 식물에서는 그 역할이 정확히 밝혀진 바가 없으나 외부 환경에 대한 반응 산물로 작용한다고 알려져

있다.

[0027] 또한, 본 발명은 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 아미노산을 0.6 내지 2.2% (w/v) 첨가하여 배지조성물을 제조하는 단계; 및 상기 배지조성물에 꽃송이버섯균을 접종한 후 배양하는 단계를 포함하는, 감마-아미노부티르산(Gamma-amino butyric acid, GABA)이 증진된 꽃송이버섯 균사체 생산 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 배지조성물 제조 단계는 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에 아미노산을 0.6 내지 2.2% (w/v) 첨가하여 배지조성물을 제조하는 단계로서, 자세하게는 PDB 액체배지에 아미노산으로 글루탐산 또는 오르니틴 단독, 또는 이들의 조합을 첨가하여 제조될 수 있다.

[0029] 본 발명의 배양 단계는 상기 배지조성물에 꽃송이버섯균을 접종한 후 배양하는 단계로서, 자세하게는 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지 표면에 꽃송이버섯균을 접종한 다음 24 ~ 27℃에서 60 ~ 80시간 반응시켜 암배양하고, 이후 동일조건에서 60 ~ 80시간 진탕배양하는 단계일 수 있다.

[0030] 이러한 단계를 거쳐 생산되는 꽃송이버섯 균사체는 기능성 물질로서 GABA를 100 내지 145 mg/100g 함량으로 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 GABA 고함유 꽃송이버섯 균사체 생산 방법은 기존의 방법에 비해 균사체의 생장을 효과적으로 증진시킬 수 있을 뿐 아니라, 기능성 물질로서 GABA의 함량을 두드러지게 증대시킬 수 있다. 따라서 이러한 생산 방법으로 제조된 꽃송이버섯 균사체는 기존 균사체 대비 높은 수준의 GABA를 함유하고 있는바, 의약품, 건강식품, 화장품 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0033] 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.

[0035] <실시예>

[0037] 재료준비

[0039] 1. 공시균주 준비

[0040] 하기 실험에서 사용한 꽃송이버섯 균주는 전남산림자원연구소가 채집 및 선발한 JF02-06 균주로, PDA 배지에 계대하여 분양받아 사용하였다.

[0042] 2. 접종원(균사) 전배양

[0043] 꽃송이버섯 균체 분리 및 배양 시에는 clean bench (HB-402SM, HANBAEK, Korea)에서 진행하였으며 액체배지는 Potato dextrose broth(PDB, BD Difco™, catalog num: 254920)를 사용하였다. 고체배지인 Potato dextrose agar는 PDB에 agar(BD Bacto™ Agar, catalog num: 214010)를 2% (w/v)으로 첨가하여 제조하였다.

표 1

배지 제조

	PDA	PDB
PDB	24 g	24 g
Agar	20 g	-
Water	0.96 L	0.98 L

[0047] 국내·외의 꽃송이버섯 균사 생장의 최적 조건에 대한 연구 결과(25℃ 항온, 암배양, 초기 pH 5±1)를 토대로 진균류 기본 배양 배지인 PDA 배지를 이용하여 꽃송이버섯 균주를 전배양하였다.

[0048] 기본 균주 보관 배지는 PDA(Potato dextrose agar)배지를 사용하였고, 25±1℃ 인큐베이터 (JSSI-300CL, JSR, Korea)에서 암배양하였다. 균사의 면적이 페트리-디쉬 전체 면적의 90-95% 정도가 되었을 때 실험 배지에 계대하여 사용하였고, 분리된 원균은 4℃에 보관하며 3-4개월마다 새로운 PDA에 계대하였다.

[0050] 3. 아미노산 첨가 배지 제조

[0051] PDB(Potato dextrose broth) 배지를 대조군으로 하여 오르니틴 과 글루탐산 두 가지의 아미노산을 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2% (w/v)가 되도록 첨가하였다. 첨가한 아미노산으로 글루탐산(Sigma aldrich, USA, CAS Number 142-47-2)과 오르니틴(Sigma aldrich, USA, CAS Number 3184-13-2)은 reagent grade를 사용하였다. 각각 만들

어진 배지를 300 mL의 삼각플라스크에 100 mL 씩 넣고 121℃에서 15 min 동안 autoclave (HB-506, HANBAEK, Korea)로 가압멸균하여 균 접종에 사용하였다.

[0052] 본 발명에서 PDB 배지에 오르니틴을 첨가한 배지와 PDB 배지에 글루탐산을 첨가한 배지는 각각 ‘PDBO’ 및 ‘PDBG’ 로 약칭하였다.

표 2

[0054] 아미노산 첨가 배지 제조

	PDB	PDBO/PDBG				
		0.6%	1.0%	1.4%	1.8%	2.2%
PDB	2.4 g	2.4 g	2.4 g	2.4 g	2.4 g	2.4 g
오르니틴/글루탐산	-	0.6 g	1 g	1.4 g	1.8 g	2.2 g
물	98 mL	97 mL	97 mL	96 mL	95 mL	95 mL

[0056] 4. 균체 배양

[0057] 미리 배양된 PDA 배지상의 균사를 액체배지에 접종하기 위해 mess를 이용하여 agar plate 중앙으로부터 같은 거리에 위치한 gel을 8 mm×8 mm 크기로 세절하였고, 이후 핀셋으로 떼어내어 멸균된 PDB(Potato dextrose broth) 액체배지 표면에 접종하였다. 3일 동안 정지 배양으로 25℃ 인큐베이터에서 암배양하고 3일 후 동일 조건에서 100 rpm으로 진탕배양하였다. 배양 중 플라스크 내면에 부착하는 균사는 배양액으로 떨어뜨리며 배양하였다.

[0059] 5. 균사 성장 및 균체량 측정

[0060] PDA(Potato dextrose agar) 고체배지에서의 균사 생장은 페트리-디쉬 중앙에 균사체를 접종하고 동일 간격의 일 수 마다 균사 선단부를 표시하였다. 수직으로 교차하는 지름의 길이를 측정하여 평균값을 성장 길이로 하였고 배양일 수에 따라 신장한 양을 기록하였다.

[0061] PDB(Potato dextrose broth) 액체배지에서의 균체량은 배양이 모두 종료된 후 측정하였다. 미리 무게를 측정한 여과지를 여과장치에 놓은 다음 배양액 전량을 넣고 여과하였다. 여과액은 받아서 20℃에 보관하면서 다음 분석에 사용하였다. 남은 균체는 여과지와 함께 80℃의 dry oven (AT-S13, ISUZU, Japan)에 넣어 건조 후 중량을 측정하였고, 미리 측정한 여과지의 무게를 제외하여 균체 건조중량으로 하였다.

[0063] 6. 균사체 분말 및 시료 준비

[0064] 각 배양액(대조군(PDB), PDBG(PDB+글루탐산), PDBO(PDB+오르니틴))에서 배양된 꽃송이버섯 균사체는 건조 중량을 측정한 후 막자사발로 분쇄하여 사용하였고, 분말은 모아 4° C에 보관하며 다음 분석에 사용하였다. 균사체 분말에 10배 부피의 0.1 N HCl을 넣어 24시간 동안 rotary shaker에서 추출하였고, 추출액은 0.45 mm 필터로 여과 후 120℃의 freeze dryer (FDCE-12003, OPERON, Korea)로 동결건조하여 시료로 사용하였다.

[0066] 7. 통계처리

[0067] 균사체 성장량, GABA 함량, b-glucan 함량 등 모든 결과는 3회 이상 반복 실험을 통하여 평균값과 표준편차를 계산하였다. 실험결과는 IBM SPSS Statistics version23을 이용하여 통계분석을 실시하였으며, 일원분산분석법(one-way ANOVA)과 사후검정(Duncan's multiple range test)을 통하여 group간의 유의적 차이를 검정하였다. ANOVA 검정에서 유의성이 확인되지 않은 결과는 사후검정을 실시하지 않았다. 모든 결과의 분석은 신뢰도 95% 구간에서 실시되었다.

[0069] <실시예 1>

[0070] 꽃송이버섯 성장에 아미노산이 미치는 영향

[0071] 본 실험에서는 균사의 성장에 아미노산이 미치는 영향에 대해 확인하고자 하였고, 아미노산을 첨가하지 않은 PDB 배지와 글루탐산을 첨가한 PDBG 배지, 오르니틴을 첨가한 PDBO 배지에 꽃송이버섯 균주(JF02-06 균주)를 접종하여 배양하였다. 총 21일 배양 후 균사체의 건조 중량을 측정하여 성장을 확인하였고, one-way ANOVA (F(10)=3.672, p<0.01)를 수행하였다.

[0072] 그 결과 도 3에서 나타난 바와 같이, 대조군인 PDB 배지에서의 균사체 성장량은 0.9±0.00 g/L로 가장 낮은 생

장량을 보였고, PDBG 1.4%(w/v) 배지와 PDBO 1.4%(w/v) 배지에서 각각 2.2 ± 0.16 g/L, 1.93 ± 0.34 g/L로 우수한 성장을 보였다. 전반적으로 아미노산을 첨가한 배지에서 아미노산을 첨가하지 않은 배지보다 높은 성장량이 관측되었으며, PDBG 1.4%(w/v) 배지의 성장량은 PDB 배지의 2.4배, PDBO 1.4%(w/v) 배지의 성장량은 PDB 배지의 2.1배로 나타났다. 아미노산의 종류로서 글루탐산을 첨가한 배지와 오르니틴을 첨가한 배지는 모두 첨가하지 않은 배지보다 효과적이었으나 두 개의 아미노산에 대한 효과의 차이는 없는 것으로 확인되었다.

[0074] <실시예 2>

[0075] 아미노산 첨가에 따른 꽃송이버섯 균사체의 GABA 생산에 미치는 영향

[0076] 상기 실시예 1을 통해 아미노산(글루탐산, 오르니틴)이 균사 성장에 대한 긍정적인 영향을 미치는 것으로 확인하였는바, 본 실험에서는 이러한 균사 성장에 GABA의 생성, 분해와 연관성을 살펴보기 위하여, 각 배양 배지(대조군(PDB), PDBG(PDB+글루탐산), PDBO(PDB+오르니틴))에서 배양된 꽃송이버섯 균사체 시료별 GABA 함량을 관찰하였다.

[0077] 각 배양 배지(대조군(PDB), PDBG(PDB+글루탐산), PDBO(PDB+오르니틴))에서 배양된 꽃송이버섯의 건조된 균사체에서 0.1 N HCl을 이용하여 GABA를 추출하였으며, HPLC 장비를 이용하여 GABA 함량을 측정하였다. GABA 함량 분석 후 one-way ANOVA ($F(10)=20.183$, $p<0.001$)를 수행하였다.

[0078] 먼저, GABA 및 아미노산 검출을 위해 DNFB(2,4-dinitrofluorobenzene)를 사용하여 컬럼 전 유도체화(pre-column derivatization)을 하였다. DNFB solution은 아세트니트릴에 10 mg/mL (w/v)로 희석하여 4℃에 보관하며 사용하였다. 유도체화(Derivatization)는 1.5 mL EP 튜브에서 진행하였으며, 균사체 추출물 180 mL, 100mL DNFB solution, 100 mL NaHCO_3 (0.5 M, pH 9.0), 20 mL DW를 넣고 볼텍싱하여 60℃ heating block에서 60분 동안 암반응시켰다. 반응이 끝난 후 실온으로 냉각하여 400 mL KH_2PO_4 (0.01 M, pH 7.0)를 넣고 볼텍싱하였으며, 15분 동안 빛을 차단시켜 반응하였다. GABA standard solution도 동일한 방법으로 유도체화(Derivatization)하였다.

[0079] 이후, GABA 분석은 고성능액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 측정하였으며 Li et al. (2016)의 방법을 변형하여 진행하였다([Li N, Liu Y, Zhao Y, Zheng X, Lu J, Liang Y. Simultaneous HPLC Determination of Amino Acids in Tea Infusion Coupled to Pre-column Derivatization with 2,4-Dinitrofluorobenzene. Food Anal. Methods 2016;9:1307-1314.]). HPLC는 Shimadzu LC-20 series (Pump: LC-20AD, Degassor: DGU-20A5R, Column oven: CTO-20A, UV/VIS detector: SPD-20A, Japan)로 구성되었으며 분석 조건은 하기 표 3과 같다. GABA standard solution은 0.0001-0.125 mg/mL 범위의 표준용액을 조제하여 사용하였다. 유도체화(Derivatization) 시킨 반응액은 0.45 mm 필터로 여과하여 분석에 사용하였다.

표 3

GABA 분석을 위한 HPLC 조건

HPLC equipment	Shimadzu LC-20 series						
Mobile phase	(A) 5 mM CH_3COONa (pH 5.7):THF=95:5 (v/v)						
	(B) 0.05% TFA in 80% Methanol						
Column	Shim-pack GIS, ODS (250×4.6 mm, 5.0 μm particle size)						
Gradient program	Time [min]	0.01	35.00	90	100	102	110
	Sol A	90	70	0	0	90	90
	Sol B	10	30	100	100	10	10
Oven temperature	35℃						
UV wavelength	360 nm						
Injection volume	20 mL						
Flow rate	1.0 mL/min						

표 4

아미노산 첨가에 따른 꽃송이버섯 균사체의 GABA 생산량

	1	2	3	Average Content of GABA in dried mycelia [mg/100 g]
PDB	20.5	22.3	21.2	21.3 ± 0.9

글루타민 0.6%	95.6	86.4	90.0	90.7±4.7
글루타민 1.0%	74.1	115.1	94.3	94.5±20.5
글루타민 1.4%	85.1	145.5	115.7	115.4±30.2
글루타민 1.8%	81.8	113.8	97.8	97.8±16
글루타민 2.2%	56.7	98.1	77.6	77.5±20.7
오르니틴 0.6%	17.6	32.6	25.2	25.1±7.5
오르니틴 1.0%	35.9	47.9	41.1	41.6±6
오르니틴 1.4%	38.3	34.7	36.1	36.4±1.8
오르니틴 1.8%	25.9	29.0	27.8	27.6±1.6
오르니틴 2.2%	22.6	18.9	20.5	20.7±1.9

[0085] 그 결과 도 7 및 상기 표 4에서 나타낸 바와 같이, 대조군인 PDB 배지에서의 GABA 함량은 21.3 ± 0.9 mg/100 g으로 가장 낮은 GABA 함량을 보였고, 글루탐산 첨가군인 PDBG 1.4%(w/v) 배지에서 115.4 ± 30.2 mg/100g으로 가장 우수한 GABA 함량을 보였다. 반면에 오르니틴 첨가군인 PDBO 배지의 경우 PDBO 1.0%(w/v) 배지에서 41.6 ± 6 mg/100 g으로 나타났다.

[0087] <실시예 3>

[0088] 아미노산 첨가에 따른 꽃송이버섯 균사체의 베타-글루칸 생산에 미치는 영향

[0089] 본 실험에서는 배양시 글루탐산 또는 오르니틴 첨가에 따른 꽃송이버섯 균사체의 베타-글루칸 생산에 미치는 영향을 살펴보았다. 균사체의 베타-글루칸 함량은 Megazyme 사의 Yeast and Mushroom b-glucan assay kit를 사용하여 측정하였다. 모든 실험 결과는 IBM SPSS statistics 23버전 프로그램을 사용하여 통계적으로 유의성 검정을 실시하였다.

[0090] 베타-글루칸 정량은 Yeast and Mushroom b-glucan assay kit (Megazyme)를 사용하여 측정하였다. 키트는 총 글루칸과 알파-글루칸, D-글루칸, 수크로오스, 유리 D-글루코오스를 측정하여 Megazyme사에서 제공하는 베타-글루칸 함량 계산 프로그램 (K-YBGL_0501_CALC1.xls)에 대입하여 각각 함량 (mg/100 mg) 값으로 계산하였다.

[0092] <3-1> 총 글루칸 에세이 - D-글루코오스, 수크로오스, 유리 D-글루코오스

[0093] 100 mg의 샘플을 글래스 튜브에 넣고 37% HCl 1.5 mL를 첨가 후 볼텍싱하였다. 30℃ 항온조에서 45분간 반응하며 반응 중간 15분마다 볼텍싱하였다. 10 mL의 3차 증류수를 가하고 튜브 뚜껑을 느슨하게 하여 100℃ 항온조에서 5분간 방치하였다. 뚜껑을 닫고 2시간 동안 반응하고 튜브를 꺼내어 상온까지 식힌 후 10 mL의 2N KOH를 넣고 볼텍싱하였다. 여기에 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)를 더하여 100 mL 부피플라스크로 부피를 맞추고 후 1500×g, 10분 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 0.1 mL에 exo-1,3-b-glucanase (20 U/mL) + b-glucosidase (4 U/mL) 0.1 mL를 넣고 40℃ 항온조에서 60분간 반응 후 GOPOD (glucose oxidase/peroxidase mixture) 3.0 mL를 넣고 40℃ 항온조에서 20분간 반응시켰다. 510nm 파장에서 흡광도를 측정하여 총 글루칸 함량의 계산에 사용하였다.

[0095] <3-2> 알파-글루칸, D-글루칸, 수크로오스, 유리 D-글루코오스 에세이

[0096] 100 mg의 샘플을 글래스 튜브에 넣고 2 N KOH 2mL를 첨가 후 ice bucket 에 튜브를 꽂아 교반기 (Select BioProducts, SBS300-D-2)에 놓고 20분간 교반하였다. 이후 8 mL의 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8)를 첨가 후 곧바로 0.2 mL의 amyloglucosidase(1630 U/mL) + invertase (500 U/mL)를 넣고 볼텍싱하여 40℃ 항온조에서 30분간 반응을 진행하였다. 곧바로 1500 ×g, 10분 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 0.1 mL에 0.1 mL의 sodium acetate buffer (200 mM, pH 5.0)와 3.0mL의 GOPOD를 넣고 40℃ 항온조에서 20분간 반응시킨 후 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 알파-글루칸 함량의 계산에 사용하였다.

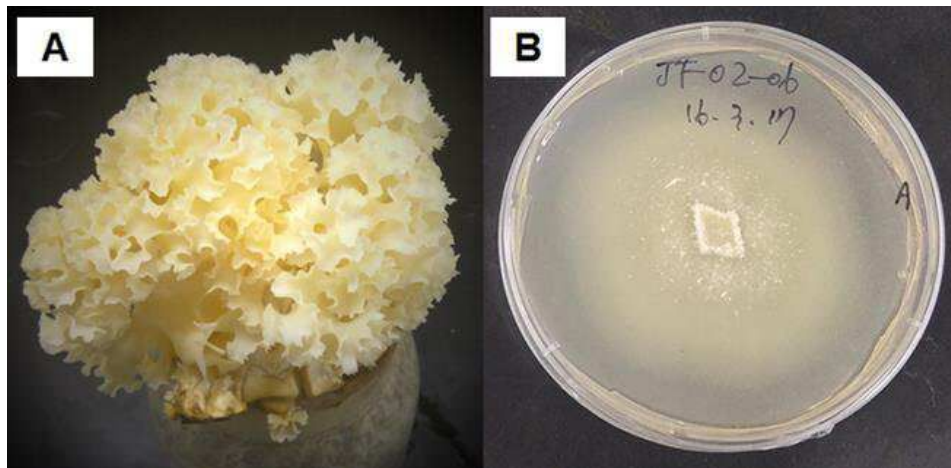
[0098] 그 결과 도 8에서 나타낸 바와 같이, PDB 배지에서의 베타-글루칸 함량과 아미노산 첨가배지에서의 베타-글루칸 함량에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다(PDB 배지 39.7 ± 1.4 mg/100 mg). 유의적인 차이는 없었으나 아미노산을 첨가하였을 때 약간 감소하는 경향을 보였다(PDBG 2.0%(w/v) 34.4 ± 0.2 mg/100 mg, PDBO 35.2 ± 9.2 mg/100 mg).

[0100] 결론적으로, 꽃송이버섯 균사체의 성장량은 대조군인 PDB 배지(0.9 ± 0.00 g/L)에 비해 글루탐산 또는 오르니틴을 첨가한 배지에서 모두 증가하였으며, 특히, 글루탐산과 오르니틴을 각각 1.4%(w/v) 첨가한 배지에서 가장 높은 성장을 보였다(각각 2.2 ± 0.16 g/L, 1.93 ± 0.34 g/L).

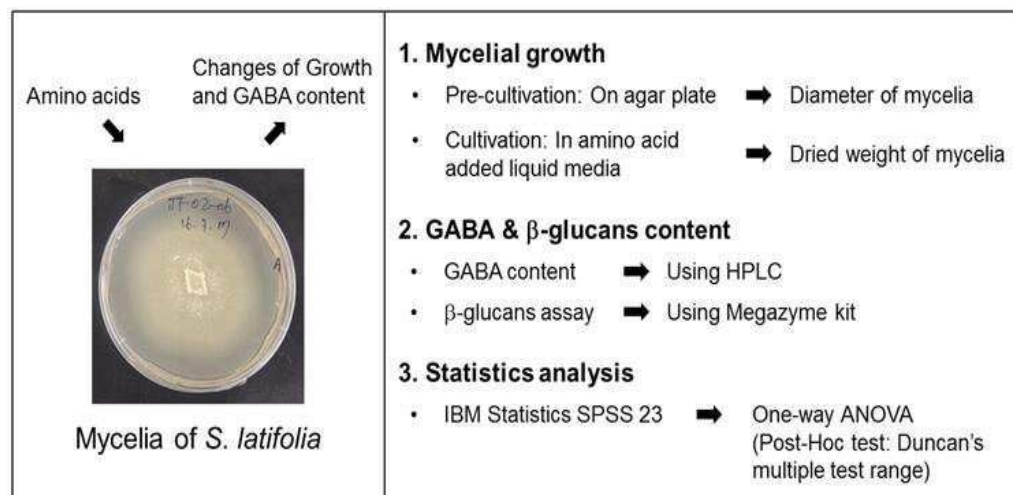
- [0101] 한편, 꽃송이버섯 균사체의 GABA 생산량은 대조군인 PDB 배지에서 배양한 균사체의 경우 GABA 함량이 21.3 ± 0.9 mg/100 g로 나타난 반면, 글루탐산이 첨가된 PDBG 1.4%(w/v) 배지에서는 115.4 ± 30.2 mg/100 g로 나타나 대조군 대비 두드러지게 증대된 GABA 함량을 보여주었다. 한편, 오르니틴이 첨가된 PDBO 1.0%(w/v) 배지에서 GABA 함량은 41.6 ± 6 mg/100 g으로 나타났다.
- [0102] 꽃송이버섯 균사체의 베타-글루칸 함량은 대조군인 PDB 배지의 베타-글루칸 함량과 아미노산 첨가배지에서의 베타-글루칸 함량에는 유의적인 차이가 없었으며, 각각 PDB 39.7 ± 1.4 mg/100 mg), PDBG 2.0%(w/v) 34.4 ± 0.2 mg/100 mg, PDBO 35.2 ± 9.2 mg/100 mg의 베타-글루칸 함량이 확인되었다.
- [0104] 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

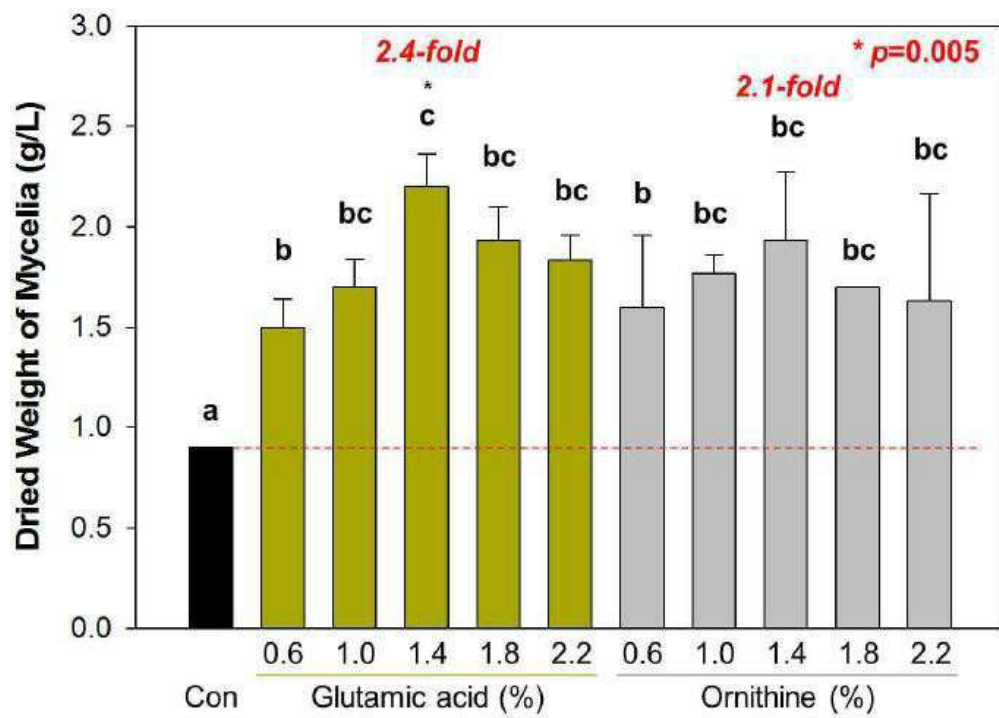
도면1



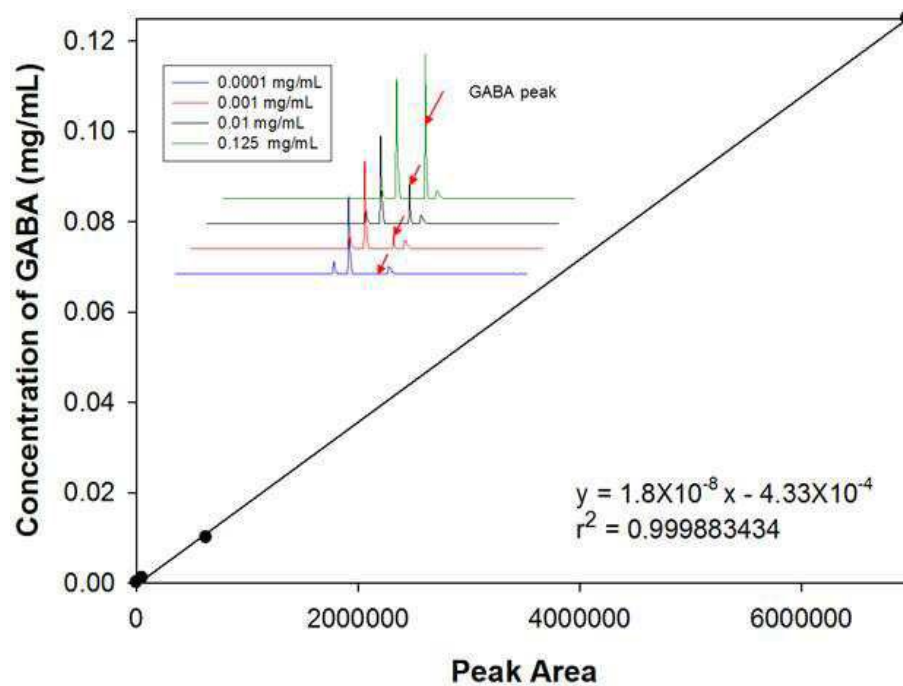
도면2



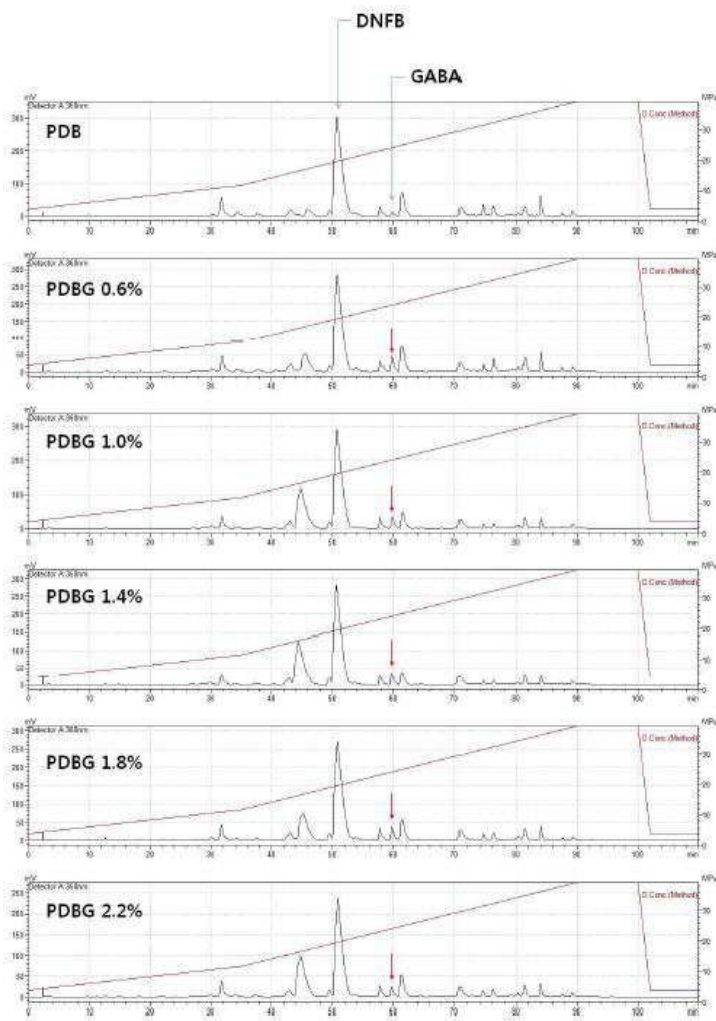
도면3



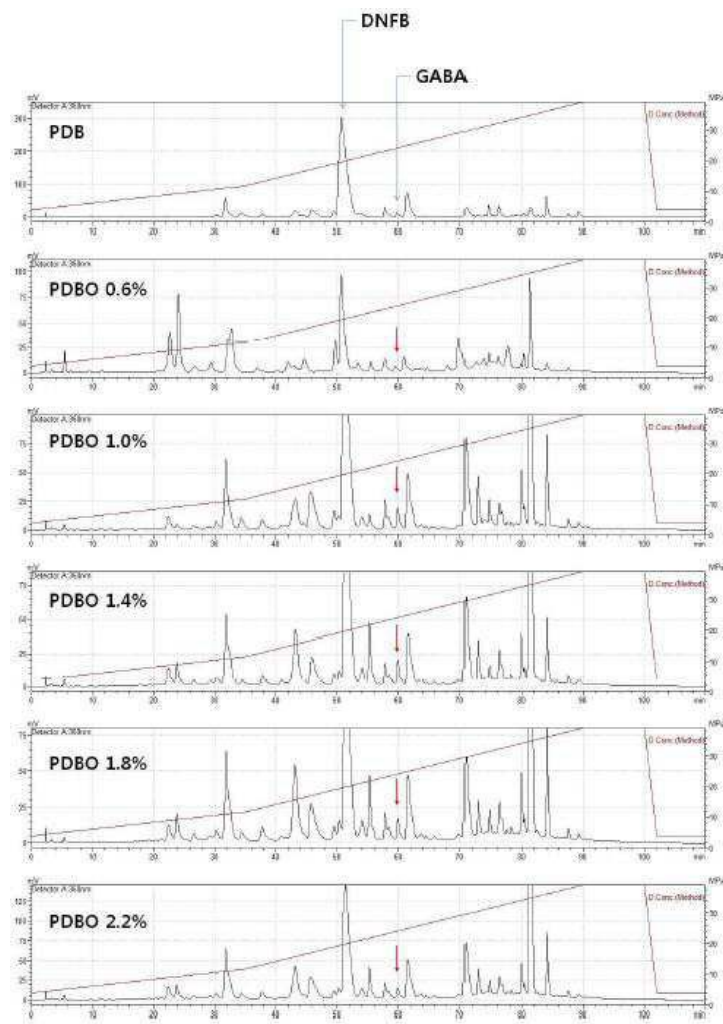
도면4



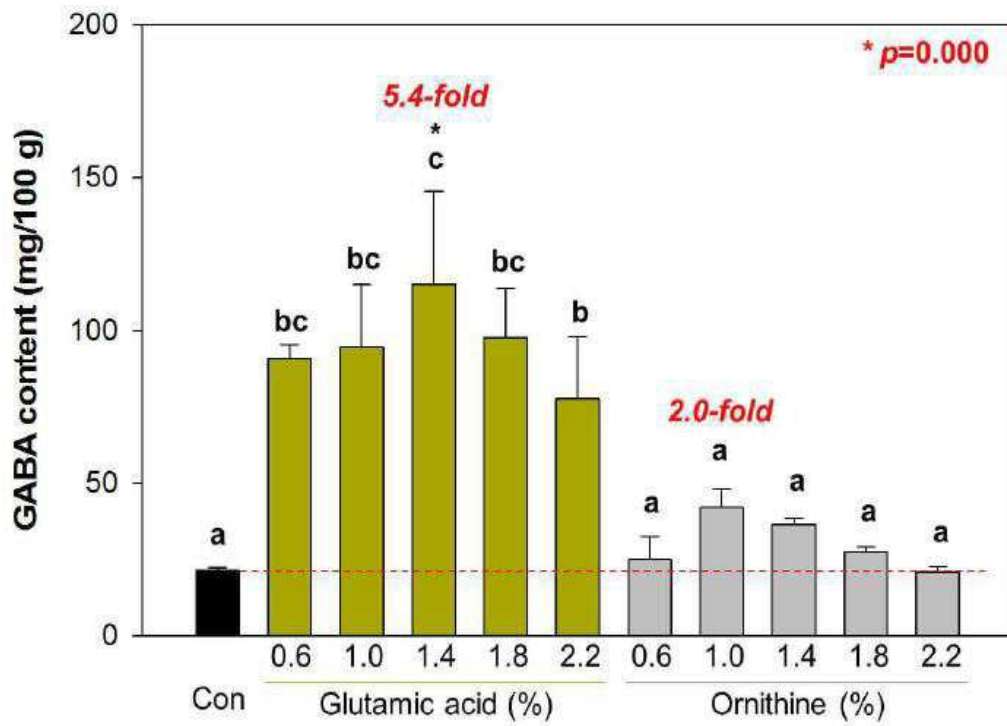
도면5



도면6



도면7



도면8

