



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0090855
(43) 공개일자 2009년08월26일

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0016373

(22) 출원일자 2008년02월22일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

(주)큐젠바이오텍

경기도 시흥시 정왕동 시화공단3가 101-1블럭
한국생산기술연구원창업보육센터 본부동 403호

전북대학교산학협력단

전라북도 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14 본부
별관 3층

(72) 발명자

송성기

경기도 부천시 소사구 송내동 345-12 수성빌라
202호

전계택

강원도 춘천시 효자2동 동보아파트 101동 513동
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이승현

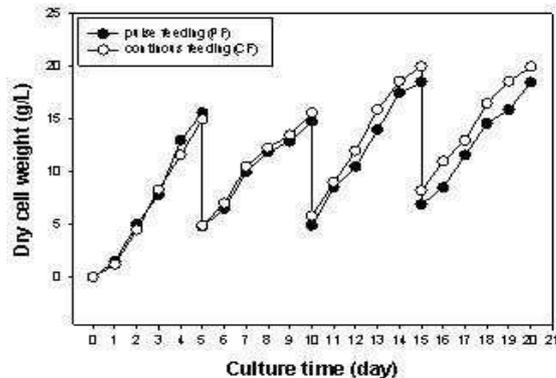
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 베타-글루칸 고 함량 꽃송이버섯 균사체의 반연속식액상배양 방법

(57) 요약

본 발명은 버섯 균사체의 액상 배양 방법에 관한 것으로서, 특히 베타-글루칸 고 함량 꽃송이버섯 균사체를 이용하여 반연속식 액상배양을 통하여 균사체의 대량생산 방법 개발에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

장용만

강원도 원주시 명륜1동 성원아파트 102동 808호

안현정

강원도 원주시 단구동 대림아파트 104동 504호

정용섭

전라북도 전주시 완산구 서신동 현대아파트 106동
1304호

특허청구의 범위

청구항 1

꽃송이버섯 균사체의 액상배양에 있어서,

포도당 0.01~3.0%, 효모추출물 0.01~0.5%, 맥아추출물 0.01~0.2%, 일인산칼륨 0.01~1%, 황산철 0.01~0.04% pH는 3.5~7.5로 조정된 배지에서 꽃송이버섯 균사체를 배양하는 방법

청구항 2

제 1항에 있어서,

배양 부피의 0.1%~99.9%(v/v)의 배지를 교환하는 배지단회교환 반연속식배양을 통한 꽃송이버섯 균사체 배양법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

배양 부피의 0.1%~99.9%(v/v)의 배지를 교환하는 배지간헐주입식 반연속식배양을 통한 꽃송이버섯 균사체 배양법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

배양 부피의 0.1%~99.9%(v/v)의 배지를 교환하는 배지연속주입식 반연속식배양을 통한 꽃송이버섯 균사체 배양법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 버섯 균사체 배양 방법에 관한 것으로서, 그 중 꽃송이 버섯 균사체의 액상배양 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 통상적으로 꽃송이 버섯(학명 : *Sparassis crispa* Wulf. ex Fr.)은 담자균문 민주름버섯목 꽃송이 버섯과의 버섯으로서 전세계에 1과 1속 2종이 보고되어 있다. 영어로는 cauliflower mushroom 또는 crested sparassis, 일본명은 하나비라타케(ハナビラタケ), 중국명은 수구심(球)이라고 부른다.

<3> 상기 꽃송이 버섯은 자실체가 성숙하면 전체는 95-225x110-285mm로 크고, 다소 둥글며, 작은 꽃잎모양의 갓이 모여 꽃양배추-해초 모양을 이룬다. 대는 25-55x 28-46mm로 짧고 뚱뚱하며, 단단하고, 위쪽으로 반복하여 갈라져 짧은 분지를 수없이 형성하고, 분지는 편평하게 되며, 얇고 파상 꽃잎형의 갓으로 된다. 갓의 상면은 평활하고, 백색-담황색이나 성장 후에는 황토색을 띤다. 자실층은 각각의 작은 갓의 뒷면(하면) 또는 외쪽에 있고, 평활하며, 초기에는 담황색이나 성장하면 황토색으로 되고 노숙되면 갈색으로 된다. 조직은 얇고, 탄력성이 있고, 유연하며, 육질형이고, 백색이다.

<4> 상기 꽃송이 버섯은 2001년 3월 동경약과대학 약학부 면역학 교실의 꽃송이버섯 성분분석 결과 건조 꽃송이 버섯에 베타-글루칸이 43.6% (100g 중 43.6g) 함유되어 있는 것으로 조사되었다. 이러한 꽃송이 버섯은 베타-글루칸 덩어리라고 해도 좋을 정도인데, 상기 베타-글루칸은 인체의 면역력을 높여주는 핵심 성분으로서 신체의 면역 체계를 바로잡아, 암 및 고혈압, 당뇨병 등을 다스리는 것으로 밝혀졌다.

<5> 또한, 상기 꽃송이 버섯은 뛰어난 항암 효과 이외에도 혈압을 낮추거나 혈당치를 정상으로 돌려줄 뿐만 아니라 조혈 작용도 있는 것으로 알려져 있으나, 자연 상태에서 포획할 수 있는 양이 극히 적어 이를 인공 재배하기 위한 노력이 계속되어 왔다.

- <6> 한편, 일본국 특개평11-56098호에는 낙엽송을 열수 추출하여 수가용 성분을 제거한 후 영양원을 첨가한 배지를 이용하여 꽃송이 버섯을 재배하는 방법이 개시되었고 대한민국 특허공개번호 제2002-48337호 ‘꽃송이 버섯의 인공재배법’에는 낙엽송과 광엽수를 혼합한 배지에 활성탄 및 활성칼슘을 첨가하고, 통상적으로 사용되는 질소원을 첨가한 배지를 고온고압으로 살균한 후, 꽃송이 버섯 균사를 배양할 때의 온도 변화를 이용하는 꽃송이 버섯의 인공 재배법이 개시된 바 있다.
- <7> 또한 상기와 같은 꽃송이 버섯의 인공재배 배양방법 뿐만이 아니라 대한민국 특허공개번호 제2004-0071926호 ‘꽃송이 버섯 균사체의 배양 방법’에는 꽃송이 버섯의 자실체를 생산하기 위한 인공재배가 아니라 꽃송이 버섯의 균사체를 이용한 단순 액상 배양 방법이 개시된 바 있다.
- <8> 그러나 상술한 바와 같은 꽃송이 버섯의 인공 재배 방법은 배양 기간 중 다수의 균사가 자실체 원기나 자실체로 발전 되지 못하고, 자실체 비대 성장 시 적절한 조건을 이루지 못해 생산되는 자실체의 크기가 작은 문제점이 있고 또한, 꽃송이 버섯의 균사체를 이용한 단순 액상배양 방법은 성장배양부터 생산배양까지의 배양 기간이 길기 때문에 1회 배양 시 얻을 수 있는 꽃송이 버섯 균사체의 최종 생산성이 매우 낮은 문제가 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <9> 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명의 목적은 꽃송이 버섯의 균사체를 대량 생산하기 위하여 기존의 꽃송이 버섯 인공 재배법 및 꽃송이 버섯 균사체의 회분식 배양에 비해 총 배양기간을 획기적으로 단축하면서도 꽃송이 버섯 균사체의 생산성이 3배 이상 증가된 반연속식 배양공정을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <10> 앞서 상술한 바와 같이 꽃송이 버섯의 인공 재배 방법은 배양 기간 중 다수의 균사가 자실체 원기나 자실체로 발전 되지 못하고, 자실체 비대 성장 시 적절한 조건을 이루지 못해 생산되는 자실체의 크기가 작은 문제점이 있고 또한, 꽃송이 버섯의 균사체를 이용한 단순 액상배양 방법은 성장배양부터 생산배양까지의 배양 기간이 길기 때문에 1회 배양 시 얻을 수 있는 꽃송이 버섯 균사체의 최종 생산성이 매우 낮은 문제가 있다.

효과

- <11> 본 발명은 버섯 균사체의 액상 배양 방법에 관한 것으로서, 특히 베타-글루칸 고 함량 꽃송이버섯 균사체를 이용하여 반연속식 액상배양을 통하여 균사체의 대량생산 방법 개발에 관한 것이다. 반연속식 액상배양 결과 기존 제조법에 비해 약 235% 증가한 생산성을 나타냈다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <12> 본 발명은 베타-글루칸 고 함량 꽃송이 버섯을 고농도로 생산하는 반연속식 균사체 액상배양법 개발에 관한 것으로 구성되어 있다. 발명의 내용은 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 다만 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<13> <실시예 1> 꽃송이 버섯 균사체 액상배양법

<14> (1) 꽃송이 버섯의 포자를 받아서켜 균사체를 얻는 단계;

<15> 꽃송이 버섯의 균사체는 야생에서 채취한 꽃송이 버섯의 자실체로부터 수득한 포자를 받아하여 획득한 균사체를 이용하였다. 효모-감자전분-포도당 한천배지(효모추출물 3g, 감자전분 10g 포도당 10g, 한천 15g, 증류수 1ℓ)에 도말하여 23 °C 온도에서 15일간 배양하여 얻는다. 한편, 균사체는 효모-감자전분-포도당 한천배지가 든 시험관에 사면 배양하여 4 °C에 보관하고, 1개월마다 계대 배양하여 사용한다.

<16> (2) 균사체를 액체배지에 배양하는 단계;

<17> 상기의 사면배지에서 성장한 균사체를 무균적으로 수거한 후, 이를 액체배지에 10%(v/v)되게 접종한다. 액체배지로는 포도당 3%, 효모추출물 0.5%, 맥아추출물 0.2%, 일인산칼륨 1%, 황산철 0.04% pH는 4.5로 조정된 배지를 사용할 때 균사체 생산성이 양호하다. 균사체의 액체배양은 발효조 내에서 23 °C, 교반속도 200 rpm, 통

기량 1vvm의 조건으로 7일간 배양한다.

<18> (3) 꽃송이 버섯 균사체에서 베타-글루칸 회수 단계;

<19> 꽃송이 버섯 균사체가 배양된 배양액을 10min, 8000rpm에서 원심 분리하여 균체만을 수거한 후 90 °C, 12hr동안 건조시켜 수분이 제거된 균체를 얻는다. 그 후 균체를 150 °C, 2hr동안 열수 추출하여 분획분자량이 30K인 한외여과막을 이용하여 베타-글루칸을 농축시켜 최종 3배 부피의 에탄올을 첨가해 베타-글루칸을 회수하였다. 회수한 베타-글루칸을 열풍 건조시켜 에탄올 성분을 휘발 시킨 후 -70°C에서 동결시키고 동결건조기를 이용하여 건조한다. 건조된 베타-글루칸은 분쇄기로 분쇄하여 분말시료를 제조한다.

<20>

<21> <실시에 2> 단순 회분식 배양을 통한 꽃송이 버섯 균사체의 최적 생산조건 및 반연속 배양 시 배양액과 새로운 배지 교환 시기 결정

<22> 일반적으로 균류는 액체 배양 시 균사 및 펠렛 형태로 성장하며 펠렛 형태로 성장할 경우 배양액의 접도가 감소하여 균사체로의 산소 및 영양분 전달이 원활히 이루어진다. 따라서 원활한 균사체 성장을 위해서는 펠렛 형태의 성장이 이루어지도록 해야 한다. 펠렛 형태의 성장에 영향을 미치는 요소 중 하나인 접종량은 세포의 배양초기 성장속도 증가 및 목적산물의 생산량 증가를 위한 중요한 인자로 작용하며, 펠렛 크기에도 영향을 미쳐 배양 형태학적 특성을 변화시킨다. 또한 배지의 초기 pH는 세포막의 기능, 세포의 형태 및 구조, 배지내의 각종 염류의 용해도, 배지내의 영양분 섭취속도에 영향을 미친다. 일반적으로 균사체 성장 및 목적산물의 생산은 특정한 pH 범위내에서 일어나며 균사체 성장을 위한 최적 pH와 목적산물 생산을 위한 최적 pH가 다른 경우도 있다. 이처럼 균사체 성장 및 목적산물의 생산에 있어서 pH는 중요한 인자로 작용하므로 최적의 pH를 밝히는 일은 무엇보다 중요하다. 따라서 본 실시예에서는 5L 상부형 발효기를 이용하여 단순 회분식 배양을 통하여 접종량과 배양 초기 pH의 최적 조건을 결정하고자 접종량은 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%로 각각 변화시켜 조사하였고 배지의 초기 pH는 3에서 8까지 변화시켜 균사체 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 도 1과 도 2에 나타낸 바와 같이 접종량은 10%에서 가장 원활한 균사체 성장을 보였으며, 균사체 생산량은 pH가 증가할수록 증가하여 초기 pH 5에서 가장 높은 생산량을 보였다. 따라서 꽃송이 버섯 균사체의 회분식 배양을 통한 최적의 생산조건은 접종량 10%, 배지의 초기 pH5로 각각 결정하였다. 또한 상기의 최적조건에서 꽃송이 버섯 균사체를 이용하여 반연속식 배양 시 새로운 공급배지의 공급 시기를 결정하기 위하여 회분식 배양을 통해서 꽃송이 버섯 균사체의 성장곡선 및 탄소원 소모도를 5L 상부형 발효기를 사용하여 배양함으로써 조사하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이 배양 5일째까지 균사체 성장이 왕성하였고 그 이후에는 탄소원의 농도가 급격히 감소되어 균사체에 스트레스로 작용하여 균사체 성장이 느려진 것으로 나타났다. 따라서 꽃송이 버섯의 반연속식 배양을 위한 새로운 공급배지의 교환시기는 배양 5일째로 결정하였다.

<23> <실시에 3> 꽃송이 버섯 균사체의 반연속식 배양을 위한 배양액과 새로운 공급배지의 교환량 결정

<24> 꽃송이 버섯 균사체의 생산성을 최대 높이기 위하여 반연속식 배양방법을 개발하였다. 반연속식 배양은 배양 기간 중 생물반응기로부터 배양액(배지+균체)의 일부를 제거하고 새로운 배지를 다시 주입하는 과정을 수 회에 걸쳐 되풀이 하는 생산 배양 시스템이다. 이러한 반연속식 배양은 생산 배양 이전 단계인 성장 배양 단계를 거치지 않고 장기간의 생산 배양을 통해 지속적인 유용 대사산물을 얻을 수 있는 것이 장점이자 특징이라 할 수 있다. 따라서 반연속식 배양의 성공은 짧은 배양 기간 동안 높은 대사산물의 생산성을 얻을 수 있고 더 나아가 규모 확장 시 배양일수의 감소에 따른 비용 절감을 기대 할 수 있다. 본 실시예에서는 반연속식 배양을 위하여 5L 발효기(조업부피: 3L)를 이용하였다. 1차 회분식 배양은 일간 수행하였으며, 5일 경과 후 배양액의 일정 비율 (70%, 80%, 90%)을 정량펌프로 가능한 빠른 시간 내에 제거하고 새로운 배지를 제거한 비율만큼 각각 주입하였다(배지단회교환 반연속배양이라 칭함). 2차, 3차, 4차 회분식 배양모두 5일간 수행하여 총 20일간 생산 배양을 하였고 24시간 간격으로 시료를 회수 하였다. 배지를 교환하는 시점에서는 교환 전과 후에 각각의 시료를 회수 하여 비교하였다. 반연속식 배양의 실험결과를 도 2에 제시하였다. 그 결과 배양액과 새로운 공급배지의 교환량이 70%인 조건에서 꽃송이 버섯 균사체의 생산성이 4차 회분식 배양 종료 후에도 1차 회분식 배양과 같은 생산성을 보였다. 반면 80%와 90%인 조건에서는 꽃송이 버섯 균사체의 생산성이 1차와 2차 회분식 배양에서는 같았지만 3차와 4차 회분식 배양에서는 균사체 생산농도가 점차 감소되었다. 따라서 최종 꽃송이 버섯 균사체의 반연속식 배양을 위한 배양액과 새로운 공급배지의 교환량을 70%로 결정하였다.

<25> <실시에 4> 꽃송이 버섯 균사체의 반연속식 배양을 위한 새로운 배지의 공급속도 결정

<26> 반연속식 배양은 배양액 및 세포의 회수와 새로운 배지의 주입이 장기간 동안 반복적으로 일어나게 되

는 배양 방법으로 베타 글루칸의 생산성이 불안정한 균주이거나 세포 활성 변화가 쉬운 균주일 경우 배양 후반에 가까워질수록 고생산 균주 보다 성장속도가 빠른 저생산 균주나 세포 활성이 적은 균주 또는 역돌연변이들이 세포의 대부분을 차지하게 되어 결과적으로 배양 말기에 생산성이 감소하는 현상이 발생하게 된다. 따라서 본 실시예에서는 새로운 배지의 주입시 발생하는 배양액의 화학적 환경변화를 늦추기 위하여 일정량(70% V/V)의 배양액을 제거 후 소량의 배지를 하루에 걸쳐 간헐적으로 주입하는 간헐주입식 반연속배양(pulse feeding(PF))과 미량의 배지를 지속적으로 주입하는 배지연속주입식 반연속배양(continuous feeding(CF))을 이용하여 수행하였으며 주입된 최종 부피는 동량이 되게 조절하였다. 발효기 조건과 batch 횟수는 실시예 3의 반연속식 배양조건과 동일하게 하였다. 이에 대한 실험결과를 도면3에 나타내었다. 그 결과 위의 두 가지 주입 방법 모두 기존의 반연속식 배양 방법 보다 꽃송이 버섯의 균사체 생산농도가 배지를 교환할 때마다 증가하였고, 특히 배지연속주입식 반연속배양법 (continuous feeding; CF)을 이용하였을 경우 균사체농도가 최대 20g/L로 나타났다. 결과적으로 본 연구진이 개발한 배지연속주입식 반연속식 생산배양은 기존의 회분식 배양에 비해 배양시간을 크게 단축시킬 수 있었다. 성장 배양 기간을 10일, 생산 배양 기간을 5일로 하였을 때 30일동안 반연속식 생산배양에서 얻은 총생산량을 회분식 배양을 통해 얻고자 한다면 총 60일이 소요되게 된다. 결과적으로 30일이라는 배양 시간을 단축하여 같은 결과를 얻을 수 있게 되는 것이다. 또한 표 1에 단순 회분식 배양과 배지연속주입식 반연속 배양을 통하여 월간 얻을 수 있는 꽃송이 버섯 균사체의 생산량을 비교한 결과 배지연속주입식 반연속배양이 회분식 배양보다 2배 이상 높은 생산량을 보였다.

<27> [표 1]

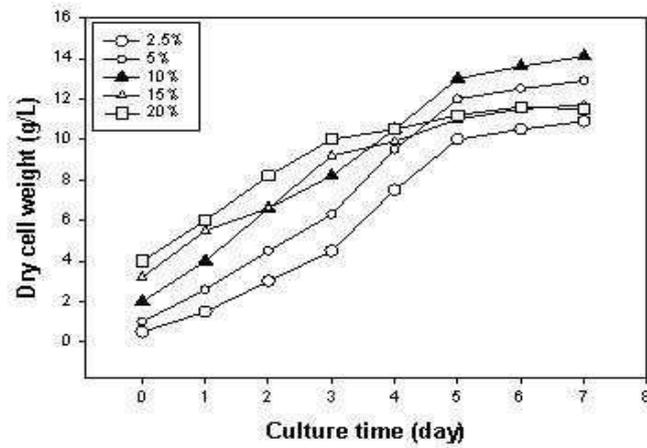
<500L 기준>	월간 균사체 생산량 (kg)	생산성 향상률 (%)
단순 회분식 배양	15 kg	100 %
배지연속주입식 반연속배양	35.3 kg	235 %

도면의 간단한 설명

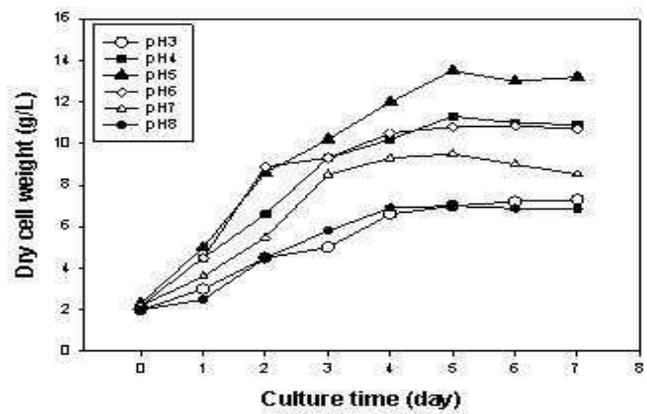
- <29> 도 1은 단순 회분식 배양을 통하여 접종량에 따른 꽃송이 버섯 균사체의 생산농도를 나타낸 그래프,
- <30> 도 2는 단순 회분식 배양을 통하여 배지의 초기 pH에 따른 꽃송이 버섯 균사체의 생산농도를 나타낸 그래프,
- <31> 도 3은 단순 회분식 배양 방법에 의한 꽃송이 버섯 균사체의 농도와 탄소원의 소모도를 나타낸 그래프,
- <32> 도 4는 반연속식 배양 중 배양액과 새로운 배지의 교환량에 꽃송이 버섯 균사체의 생산농도를 나타낸 그래프,
- <33> 도 5은 반연속식 배양 중 배양액과 새로운 배지를 교환 시 새로운 배지의 공급속도에 따른 꽃송이 버섯 균사체의 생산농도를 나타낸 그래프,
- <34> 표 1은 단순 회분식과 반연속식 배양 방법에 따른 꽃송이 버섯 균사체의 월간 생산성을 비교한 표이다.

도면

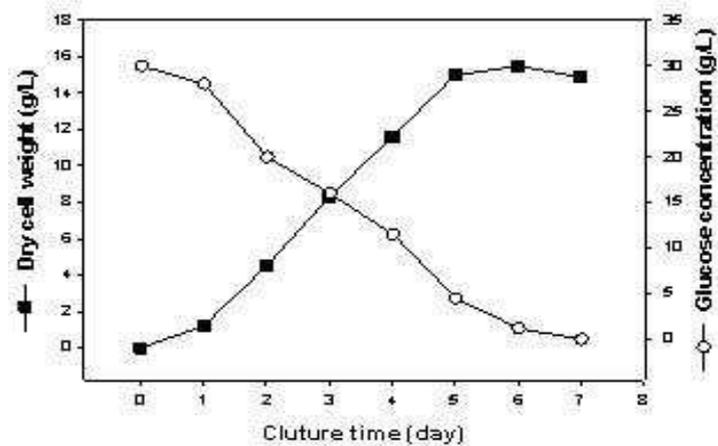
도면1



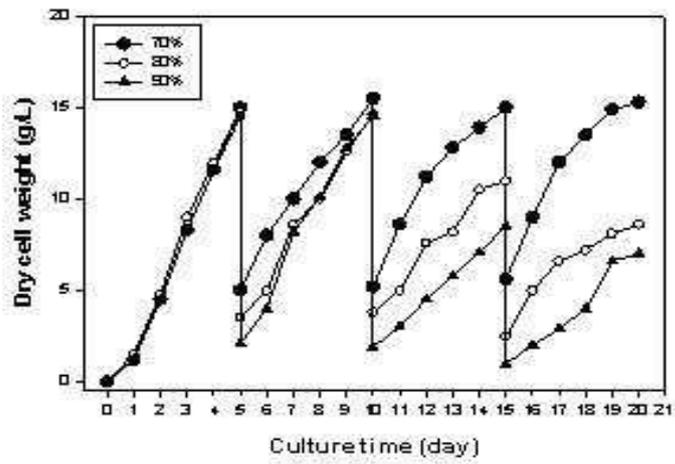
도면2



도면3



도면4



도면5

