



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월03일
 (11) 등록번호 10-1894423
 (24) 등록일자 2018년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A01G 18/00 (2018.01) A23L 1/28 (2006.01)
 A61K 36/06 (2006.01) A61K 8/97 (2017.01)
 (52) CPC특허분류
 A01G 18/00 (2018.02)
 A23L 31/00 (2016.08)
 (21) 출원번호 10-2015-0180873
 (22) 출원일자 2015년12월17일
 심사청구일자 2016년12월09일
 (65) 공개번호 10-2017-0072563
 (43) 공개일자 2017년06월27일
 (56) 선행기술조사문헌
 JP02119786 A*
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
 (72) 발명자
김도만
 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1, 서울대학교 평창캠퍼스 320동 101호
이태경
 경기도 의정부시 동일로466번길 3, 101동 401호 (신곡동, 서해아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김태선

전체 청구항 수 : 총 5 항

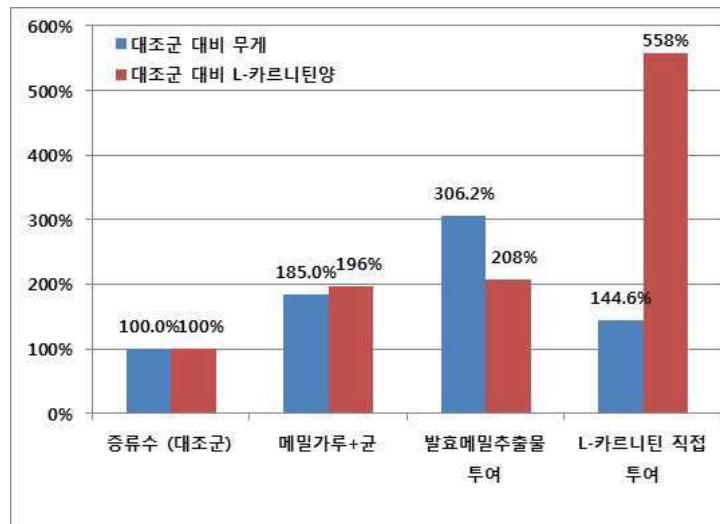
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **L 카르니틴 함유 발효 산물을 이용한 L 카르니틴 함유 버섯의 재배 방법 및 이에 의하여 재배된 L 카르니틴 함유 기능성 버섯**

(57) 요약

본 발명은 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 발효산물, 및 식품, 화장품, 의료 및 버섯 배지로서의 상기 발효산물의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 L-카르니틴이 풍부한 발효산물은 버섯 재배용 배지, 비료 및 식물 재배용 조성물에 사용되어 L-카르니틴 함량이 높은 작물을 경제적이며 간단한 방법으로 제조할 수 있게 한다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
A61K 36/06 (2013.01)
A61K 8/9706 (2017.08)
A23V 2250/0612 (2013.01)
- (72) 발명자
박남현
 경상남도 창원시 마산회원구 양덕옛1길 37, 102동 1302호 (석전동, 이미지퍼렌체)
최상호
 경기도 양평군 양서면 옛재길 59-11
장태수
 경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5411동 3303호(이의동, 자연앤 힐스테이트)
최정원
 강원도 평창군 진부면 청송로 74, 1202호(시대진부아파트)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020040026788 A*
 KR1020110049349 A
 KR1020090093545 A
 JP07170990 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2016939009
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구사업
 연구과제명 난수용성 천연소재의 생물학적 수용화와 강화된 기능 개발 연구
 기 여 율 5/10
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 710002077HD230
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원
 연구사업명 농림축산식품연구센터지원사업
 연구과제명 전통식품 유래 미생물의 생물전환 기능 활용 식품안전 소재 개발 및 생산
 기 여 율 2/10
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 0004833
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 산업통상자원부
 연구사업명 경제협력권산업육성사업지역주도형R&B
 연구과제명 천연물 소재를 활용한 심신안정 및 노인성 질환 완화를 위한 제품개발 및 헬스테인먼트 연
 동 프로그램 개발
 기 여 율 1/10
 주관기관 (주)힐링네이처
 연구기간 2016.10.01 ~ 2017.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2016K2A9A2A08003613
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 국제협력사업
 연구과제명 BCS II 약제의 수용화와 기능성 연구
 기 여 율 2/10
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.04.01 ~ 2017.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

버섯의 성장을 촉진시키고 버섯 내 L-카르니틴의 함량을 증가시키기 위한 발효산물의 제조방법으로, 상기 방법은:

(A) 메밀 또는 이의 부산물, 밀 또는 이의 부산물, 귀노아 또는 이의 부산물, 아마란스 또는 이의 부산물, 및 이들의 혼합물을 포함하는 발효 원료를 물과 혼합하는 단계; 및

(B) 상기 혼합물에 미생물을 접종하여 발효시키는 단계를 포함하고,

상기 미생물은 사카로마이시스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) KCCM-11215, 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*) KCCM11949P 및 리조푸스 올리고 스포러스(*Rhizopus oligosporus*) KCCM11948P로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방법은 (C) 발효된 혼합물로부터 L-카르니틴을 포함하는 발효 물질을 추출하는 단계를 더욱 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 미생물은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 스포로락토바실러스 속(*Sporolactobacillus* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.), 루코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.), 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 엔테로코커스 속(*Enterococcus* sp.) 및 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유산균을 더욱 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 메틸은 쓴메틸인 것인, 방법.

청구항 9

제1항, 제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 발효산물로서,

상기 발효산물은 상기 발효 원료의 중량 1000 g을 기준으로, 0.1 mg 이상, 40 mg 이상, 또는 2000mg 이상의 L-카르니틴을 함유하는 것인, 발효산물.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 발효산물, 및 식품, 화장품, 의료 및 버섯 배지로서의 상기 발효산물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 카르니틴(carnitine)(비타민 B₁₁; 3-히드록시-4-트리메틸암모니오-부타노에이트)는 아미노산중 리신 및 메티오닌으로부터 생성된 제 4급 암모늄 화합물이다[Kienesberger, BMC genomics, 15(1):154, 2014]. 카르니틴은 2가지 입체이성질체(stereoisomers)로 존재한다. 생물학적 활성 형태는 L-카르니틴 (L-3-hydroxy-4-N-trimethylaminobutyrate)이며, 이의 거울상 이성질체인 D-카르니틴은 생물학적으로 불활성이다.

[0003] L-카르니틴은 그 영양적 중요성 및 잠재적 가치가 최근에 이르러 광범위하게 밝혀지고 있다. 세포에서 L-카르니틴은 대사에너지의 발생을 위한 지질의 분해 도중에 지방산의 세포기질(cytosol)로부터 미토콘드리아에 지방산의 이동을 가능하게 함으로써 긴 사슬 지방산의 대사를 증가시켜 다이어트에 효과가 있다[Opie L. H., American heart journal, 97(3):375-388]. 또한 고혈압성 심장질환을 비롯한 심장 질환의 예방적 효과가 있으며[Omori Y., Journal of Hypertension, 30(9): 1834-44], 아세틸카르니틴(acetyl carnitine)은 신경 세포의 성장 인자일 뿐만 아니라 중추신경계 뉴런에 항산화 효과가 있다[AssuntaImperato, Neuroscience letters, 107(1):251-255]. 이외에도 L-카르니틴은 심장근육이나 정자 내에서 주요 에너지 공급원인 활성화된 아세틸기의 저장 수단으로 작용하며, 세포내 자유기(free radical) 및 철이온의 착화에 의한 항산화제로 작용함으로써, 세포의 노화를 방지하며, 체내에서의 아세틸화 과정을 통해 아세틸-L-카르니틴으로 전변되어 뇌 세포 등에서 중요한 신경전달물질로서 작용한다. 특히 심장근육의 지속적인 운동성을 위해 요구되는 에너지의 60 내지 80%는 심장근육 세포내 지방산의 산화에 의해 공급되기 때문에 L-카르니틴은 심장마비 예방제로서의 기능도 의학적 측면에서 인정되고 있다. 이밖에도 L-카르니틴은 간에서의 지방대사를 촉진시킴으로써 간경화증 및 지방간 예방 효과도 보고되고 있다.

[0004] 이러한 기능을 가지는 L-카르니틴은 의약, 식품, 사료 첨가제, 화장품 등과 같은 산업 분야에 널리 적용할 수 있어 유럽 및 북미지역에서는 가장 보편화되어 있는 특수 목적용 기능성 건강 보조제 중의 하나로 자리잡고 있다.

[0005] L-카르니틴의 영양적 기능적 중요성은 오래 전부터 인식되었으나 L-카르니틴의 상업적 대량생산이 이루어지지 않고 있다. L-카르니틴을 산업적으로 생산하기 위한 방법이 많이 연구되었으며 화학적 방법과 생물공학적 방법이 사용되고 있다. 화학적 방법으로는 대부분 비대칭 합성법에 의해 여러 단계에 걸쳐 화학적으로 생산되는 방법이며, 생물공학적 방법은 효소와 미생물을 이용하는 방법으로 산업 폐기물(D-carnitine, crotonobetaine, γ-butyrobetaine)을 기질로 사용하는 것이 특징이다[Vicente Bernal., Microbial cell factories, 6:31, 2007].

[0006] 현재 주 생산업체로는 Lonza(스위스), Sigma Tau(이탈리아), 교와하코(일본)등이 있고, 현재 생산되는 L-카르니틴은 대개 화학합성법을 이용하고 일부 연구에서 최종 단계에서 γ-butyrobetaine으로부터 효소를 이용하여 L-카르니틴의 생산만을 유도하는 조합화학(combinatorial chemistry) 기법을 도입해 노력하고 있으나 이런 방법에

의한 합성은 높은 전구체(precursor) 가격 등으로 L-카르니틴의 가격의 경쟁력을 갖기 어려우며 효소와 미생물을 이용한 생물학적 방법 중 대표적인 방법은 크로토노베타인(crotonobetaine)을 수화(hydration)하는 방법 [Sigma tau, US patent 4906568, 1990; SeitetsuChem, JP61271995, 1987]과 γ -butyrobetaine을 사용하는 생물 전환공정 [Lonza, Chimia 45, 81-85, 1991; Kyowahakko, JP 1222796, 1989]이 있다.

[0007] 국내에서는 삼성정밀화학 등이 한국등록 특허10-0255039호등 화학 합성법에 대한 기술을 보유하고 있으나, 이성질체인 D-카르니틴(D-carnitine)과 L-카르니틴(L-carnitine)중 L-카르니틴만을 합성 또는 분리하는 과정이 매우 복잡하다는 단점이 있으며, 실제로 인체 내에서 D-카르니틴은 L-카르니틴의 작용을 방해하여 도리어 유해한 물질로 작용하는 것으로 보고되어 있어 L-카르니틴의 순수 분리는 필수적인데 이는 전체 제조 공정의 효율 및 경제성을 심각하게 감소시키는 단점이 있다.

[0008] 한국등록특허 10-0713103호는 뉴로스포라크라사 유래 L-카르니틴 생합성 관련 유전자를 포함하는 엔테로박테리아세속(*Enterobacteriaceae* genus) 미생물 및 이를 이용한 L-카르니틴의 제조방법에 관한 것으로, 제조합균을 만들어 2mM 라이신을 포함하는 LB 배지 (IPTG 유도)를 이용하여 19.81mg/L를 생산한 연구 결과를 제시하고 있다. 그러나 이러한 생물공학적인 방법은 상온에서 조업이 가능하며, 순수한 L-카르니틴만을 생산할 수 있으나 이 원료물질의 높은 가격 때문에 경쟁력을 가지지 못한다는 단점이 있다.

[0009] 버섯은 섬유질의 공급원으로 100 g 당 불용성 섬유질이 1.5-6 g정도 함유되며 적당량의 비타민 A, B, 및 D 및 칼륨, 철, 아연 및 셀레늄 등 각종 미네랄이 함유되어 있는 것으로 알려져 있고, 저칼로리 식품으로서 많은 사람들의 선택을 받는 식품의 하나이다. 또한 버섯은 카르니틴 함량 역시 동물성 식품의 카르니틴 함량과 비슷한 수준인 2.77~7.02mg/100g이 함유된 것으로 알려져있다. 이러한 점에서 그 자체로서 외에도 육류 대체품으로도 기능이 가능하며 버섯을 이용한 식물성 고기제품인 Quorn의 경우 햄버거 패티, 소시지 등으로 이용되고, 2014년 Acosta Sales and Marketing사(社)가 미국에서 행한 설문에서 육류 대체품 구매자의 8%가 Quorn을 구매한 것으로 조사되었다. 이러한 점에서 L-카르니틴이 강화된 버섯은 다양한 분야에서 강점을 갖게 될 수 있다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 발효산물, 및 식품, 화장품, 의료 및 버섯 배지로서의 상기 발효산물의 용도를 제공하고자 한다.

[0011] 일 측면에 따르면,

[0012] 메틸 또는 이의 부산물, 밀 또는 이의 부산물, 퀴노아 또는 이의 부산물, 아마란스 또는 이의 부산물, 및 이들의 혼합물을 포함하는 발효 원료를 물과 혼합하는 단계;

[0013] 상기 혼합물에 미생물을 접종하여 발효시키는 단계; 및

[0014] 상기 발효된 혼합물로부터 L-카르니틴을 포함하는 발효 물질을 추출하는 단계; 를 포함하는 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법이 제공된다.

[0015] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 미생물은 효모, 곰팡이 또는 유산균 일 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 효모는 사카로마이시스(*Saccharomyces*)속, 토룰롭스포라(*Torulopsispora*)속, 야마디지마(*Yamadazyma*)속, 자이코사카로마이시스(*Zygosaccharomyces*)속, 칸디다(*Candida*)속, 아시디아(*Asidia*)속, 클루이베로마이시스(*Kluyveromyces*)속, 토룰라스포라(*Torulasporea*)속 또는 데바리오마이시스(*Debaryomyces*)속을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 실시예에서는 사카로마이시스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) KCCM-11215가 사용되었다.

[0017] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 곰팡이는 리조푸스(*Rhizopus*)속, 아스페르길루스(*Aspergillus*)속, 뉴로스포라(*Neurospora*)속, 압시디아(*Absidia*)속, 모나스쿠스(*Monascus*)속, 뮤코르(*Mucor*)속, 마이코클라드스(*Mycocladius*)속, 페니실리움(*Penicillium*)속 또는 리조뮤코르(*Rhizomucor*)속을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 실시예에서는 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*) KCCM11949P 및 리조푸스 올리고 스포러스(*Rhizopus oligosporus*) KCCM11948P가 사용되었다.

[0018] 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법에 있어서, 발효에 사용되는 미생물은 상기 효모 또는 곰팡이의 균류계 외에 유산균을 더 포함할 수 있다. 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 스포로락토바실러스 속

(*Sporolactobacillus* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.), 루코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.), 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 엔테로코커스 속(*Enterococcus* sp.) 및 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 속을 포함할 수 있다.

- [0019] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 발효 원료와 물의 혼합물 전체 중량부 100 중량부당 상기 물은 25 내지 70 중량부, 바람직하게는 45 내지 55 중량부의 비율로 혼합되는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 발효단계는 16℃ 내지 40℃에서 2일 내지 21일, 바람직하게는 28℃에서 7일 내지 10일 동안 수행될 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 혼합물에 미생물을 접종하여 발효시키는 단계 이후 발효 산물을 추출하는 단계를 더 포함하는 것이 가능하다. 발효 산물로부터 L-카르니틴을 추가적으로 추출할 수 있으며, 추출 방법은 특별히 한정되지 않는다.
- [0022] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 발효 원료는 메밀과 메일 부산물을 포함하고, 상기 메일 부산물은 전체 발효 원료 100 중량부당 20 내지 40 중량부의 비율로 포함되는 것이 가능하다.
- [0023] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 발효 원료는 메밀과 밀기울을 포함하는 것이 가능하다
- [0024] 다른 측면에 따르면, 상기 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 의해 제조된 발효산물이 제공된다.
- [0025] 본 발명에 따른 발효산물에 있어서, 상기 발효산물은 상기 발효 원료의 중량 1000 g을 기준으로, 0.1 mg 이상, 바람직하게는 40 mg 이상, 더욱 바람직하게는 2000mg 이상의 L-카르니틴을 함유할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 발효산물에 있어서, 상기 발효산물은 버섯 재배용 배지, 비료 및 식물 재배용 조성물에 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물이 함유된 버섯 재배용 배지 조성물 제조방법과 상기 조성물은 버섯 재배용 배지, 비료 및 식물 재배용 조성물에 활용 가능한 L-카르니틴을 경제적이며 간단한 방법으로 제조할 수 있게 한다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 일반배지와 발효산물을 첨가한 배지에서 버섯의 L-카르니틴 함량 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명은 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 발효산물, 및 상기 발효산물의 용도를 제공하고자 한다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 용어 "L-카르니틴"은 아민의 일종으로 라이신과 메티오닌, 암모늄을 포함하는 비타민 복합체인 카르니틴의 이성질체를 의미한다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 용어 "발효산물"은 미생물의 발효 과정을 통해 생성되는 대사산물을 의미한다.
- [0032] 제1구현예에 따르면,
- [0033] 본 발명은 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법을 제공하고자 하는 것으로, 상기 방법은:
 - [0034] i) 메밀 또는 이의 부산물, 밀기울 또는 이의 부산물, 퀴노아 또는 이의 부산물, 아마란스 또는 이의 부산물, 및 이들의 혼합물을 포함하는 발효 원료를 물과 혼합하는 단계; 및
 - [0035] ii) 상기 발효 원료와 물의 혼합물에 미생물을 접종하여 발효시키는 단계; 를 포함할 수 있다.
- [0036] i) 발효 원료와 물을 혼합하는 단계
- [0037] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서 사용되는 발효 원료는 메밀 또는 이의 부산물, 밀기울 또는 이의 부산물, 퀴노아 또는 이의 부산물, 아마란스 또는 이의 부산물, 및 이들의 혼합물을 포함한다.

- [0038] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서 사용되는 발효 원료는 메밀, 밀기울, 퀴노아, 아마란스를 가공하는 과정에서 발생하는 부산물도 사용 가능하다. 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서 사용되는 발효 원료는 라이신, 메티오닌이 풍부한 원료를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0039] 메밀은 마디풀과의 일년생 쌍떡잎 식물이다. 메밀 식물체는 생육기간이 60-80일로 짧고 서늘한 기후에 알맞으며, 재배시 많은 양의 화학비료와 농약을 사용할 필요가 없기 때문에 무공해 작물로 알려졌다. 메밀은 식물분류학적으로 보통메밀(*Fugopyrum esculentum*)과 달단메밀(*Fugopyrum tataricum*)로 나누어진다. 보통메밀은 자가불화합성 타가수정작물이고, 달단메밀은 자가화합성 자가수정작물이다. 우리나라에서는 보통메밀이 재배되고 있으며, 달단메밀은 중국, 네팔을 비롯한 히말라야 고산지대에서 재배되고 있다. 보통메밀은 주로 메밀국수, 빵, 묵, 수제비, 부침, 전병, 떡 등을 만드는 데 사용되며, 달단메밀은 메밀죽, 빵을 만드는데 주로 이용되고 있다.
- [0040] 메밀은 강력한 항산화 물질인 루틴을 다량 함유하고 있고 균형잡힌 아미노산 조성으로 인해 영양학적으로 매우 가치 있는 곡물로 알려져 있다. 메밀은 양질의 단백질과 필수 아미노산을 고루 함유하고 있고, 특히 곡류 식량 작물에서 결핍되어 있는 라이신 함량이 높으며 여러 종류의 비타민과 필수 미량 요소를 많이 함유하고 있다.
- [0041] 메밀의 주성분은 전분으로 약 70%를 차지하고, 단백질은 약 10%를 함유하고 있다. 보통메밀과 달단메밀은 양질의 단백질과 필수 아미노산을 고루 함유하고 있고, 특히 화곡류 식량 작물에서 결핍되어 있는 라이신 함량이 높다. 또한 여러종류의 비타민과 필수 미량 요소를 많이 함유하고 있다. 특히 달단메밀의 경우에 보통메밀에 비하여 성인병 예방과 치료에 효과가 좋은 것으로 알려진 루틴이 상당히 많이 함유되어 있다.
- [0042] 메밀에 포함된 플라보노이드(flavonoid)계 물질인 루틴은 당뇨병, 각종 혈관계 질환 및 치근막염의 예방과 치료에 효능이 있으며, 퀘세틴(querctetin)을 비롯한 각종 페놀성 물질은 천연의 항산화제는 물론 각종 의약품의 원료로서 유용한 것으로 알려졌다. 메밀에는 거의 대부분 루틴만 존재하며, 퀘세틴은 가공과정에서 극소량 생성되는 것으로 알려져 있다. 또한 식품업계에 있어서도 루틴은 각종 음료 및 주류의 색소안정 첨가제로 개발의 여지가 있을 뿐만 아니라 메밀에 함유된 티로신 억제제(tyrosine inhibitor)는 각종 야채 및 과일의 갈변을 방지하는 천연의 선도 유지제로 개발이 유망하다(최병한 등, Korean J. Crop. Sci. 41(s):69-93, 1996)
- [0043] 메밀은 메밀 가루 등의 가공품 제조시 메밀 껍질, 메밀대 등의 부산물이 다량 발생한다. 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서 상기 메밀 부산물은 메밀 수확 후 발생하는 부산물을 의미한다. 본 발명의 제조 방법에 있어서 상기 메밀 부산물은 메밀 가루, 메밀대, 메밀껍질 또는 메밀짚을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 밀기울 부산물은 제분공정과정 중 밀가루 생산시 발생하는 부산물을 나타낸다. 상기 퀴노아 부산물은 퀴노아 수확후 발생하는 부산물을 의미한다. 상기 퀴노아 부산물은 퀴노아 가루, 퀴노아 껍질, 퀴노아 잎, 퀴노아대, 퀴노아 꽃 또는 퀴노아짚을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 아마란스 부산물은 아마란스 씨앗 수확 후 발생하는 부산물을 의미한다. 상기 아마란스 부산물은 아마란스 열매 외에, 아마란스 가루, 아마란스대, 아마란스 알곡 껍질, 아마란스 잎 또는 아마란스 짚을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 메밀 또는 이의 부산물, 밀기울 또는 이의 부산물, 퀴노아 또는 이의 부산물, 아마란스 또는 이의 부산물, 및 이들의 혼합물을 포함하는 발효 원료와 물을 혼합하는 단계에서, 물은 100중량부당 25 내지 70 중량부, 바람직하게는 45 내지 55 중량부의 비율로 혼합될 수 있다.
- [0046] ii) 발효 원료와 물의 혼합물에 에 미생물을 접종하여 발효시키는 단계
- [0047] 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법에 있어서, 발효에 사용되는 미생물은 균류계 생물로 효모, 곰팡이 또는 유산균을 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 효모는 사카로마이스스(*Saccharomyces*)속, 토룰롭스포라(*Torulopsora*)속, 야마디지마(*Yamadazyma*)속, 자이코사카로마이스스(*Zygosaccharomyces*)속, 칸디다(*Candida*)속, 아시디아(*Asidia*)속, 클루이베로마이스스(*Kluyveromyces*)속, 토룰라스포라(*Torulasporea*)속 또는 데바리오마이스스(*Debaryomyces*)속을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 실시예에서는 사카로마이스스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) KCCM-11215가 사용되었다.
- [0049] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법에 있어서, 상기 곰팡이는 상기 곰팡이는 리조푸스

(*Rhizopus*)속, 아스페르길루스(*Aspergillus*)속, 뉴로스포과(*Neurospora*)속, 압시디아(*Absidia*)속, 모나스쿠스(*Monascus*)속, 뮤코르(*Mucor*)속, 마이코클라드스(*Mycocladus*)속, 페니실리움(*Penicillium*)속 또는 리조뮤코르(*Rhizomucor*)속을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 실시예에서는 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*) KCCM11949P 및 리조푸스 올리고 스포러스(*Rhizopus oligosporus*) KCCM11948P가 사용되었다.

[0050] 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 스포로락토바실러스 속(*Sporolactobacillus* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.), 루코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.), 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 엔테로코커스 속(*Enterococcus* sp.) 및 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 속을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법에 있어서, 발효에 사용되는 미생물의 접종 방법은 스미어링(smearing) 또는 스프레딩(spreading)으로도 불리는 평판도말법, 획선도말법(streaking), 피킹법(peaking), 주입법(pouring), 희석법(dilution) 또는 천자법(stabbing)이 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 실시예에서는 천자법 및 희석법이 이용되었다.

[0052] 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법에 있어서, 발효에 사용되는 미생물은 기 발효 원료와 물의 혼합물에 접종시킨후 발효하게 되며, 구체적으로 16℃ 내지 40℃에서 2일 내지 21일 동안, 바람직하게는 28℃에서 7일 내지 10일 동안 발효될 수 있다.

[0053] iii) L-카르니틴을 포함하는 발효 물질을 추출하는 단계

[0054] 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법은 상기 미생물의 접종에 의해 발효된 발효산물로부터 L-카르니틴을 포함하는 발효 물질을 추출하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0055] 다른 구현 예에 따르면, 본 발명은 상기 구현 예에 따른 발효산물의 제조 방법에 의해 제조된 발효산물을 제공하고자 한다. 본 발명의 제조 방법에 의하여 제조된 상기 발효산물은 상기 발효 원료 중량 1000 g을 기준으로, 0.1 mg 이상, 바람직하기는 40 mg 이상, 더욱 바람직하기는 2000mg 이상의 L-카르니틴을 함유할 수 있다. 따라서, 본 발명에 의한 L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조방법은 식품, 의약품, 화장품, 사료 첨가제에 활용 가능한 L-카르니틴을 메밀, 퀴노아, 아마란스, 그리고 이들의 가공 중 생산되는 부산물을 이용하여 생합성할 수 있고, 경제적이며 간단한 방법으로 제조할 수 있게 한다.

[0056] 본 발명에 따른 L-카르니틴이 풍부한 발효산물은 에 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명의 제조 방법에 의하여 제조된 L-카르니틴을 함유하는 발효산물은 닭, 소, 돼지 등의 사료로 사용될 수 있다. 본 발명의 제조 방법에 의하여 제조된 L-카르니틴이 풍부한 발효산물은 버섯 재배용 배지, 비료 및 식물 재배용 조성물에 L-카르니틴이 강화된 버섯, 채소, 과일 및 각종 식물성 제품을 생산할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 발효산물을 버섯의 배지로 제공하는 경우 버섯에서 L-카르니틴의 증가를 확인 하였다.

[0058] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] <실시예>

[0060] 실시예 1. 곰팡이를 이용한 메밀 및 밀기울의 발효

[0061] (1) 곰팡이를 이용한 발효

[0062] 밀기울 15 g, 메밀 가루 15 g, 밀기울과 메밀가루 혼합물 15 g을 칭량하여 각각 250 ml 삼각플라스크에 넣어 멸균(121℃, 15 분)한 뒤 Dry oven(60 ℃)에서 3 시간 동안 건조하였다. 건조한 시료에 멸균 증류수 20 ml를 넣고 하기의 표 1에서와 같이 균주를 각각 접종 한 후, 30 ℃에서 3일간 발효시켰다.

표 1

발효 원료	사용 균주	사용 균주	사용 균주
밀기울	-	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oligosporus</i>
밀기울 + 메밀 가루	-	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oligosporus</i>
메밀 가루	-	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oligosporus</i>

[0064] 사용된 균주인 리조푸스 오리제(*Rhizopusoryzae* KCCM11949P) 및 리조푸스 올리고스포러스(*Rhizopusoligosporus* KCCM11948P)를 감자 텍스트로스 한천(potato dextrose agar; PDA) 배지에 도말 하여 30 °C에서 3 일간 배양하였다.

[0065] (2) 발효산물의 L-카르니틴 함량 측정

[0066] 발효된 시료의 L-카르니틴 함량은 L-carnitine assay kit (Biovision)를 이용하여 효소법으로 정량 분석하였다. 발효된 시료에 멸균증류수를 20 내지 55 ml 넣고 교반 시킨 후, 원심분리(3000x g, 30 분)하여 상등액을 얻고, 증류수를 이용하여 5배 희석 한 후 5 l의 시료를 45 l buffer와 혼합한 후 reaction mix 50 l를 넣고 fluorometric assay를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다 (L-카르니틴 함량 mM (mg/100 g)).

표 2

	균주 없음	<i>R. oryzae</i> (mg/100 g)	<i>R. oligosporus</i> (mg/100 g)
밀기울	-	1.4	1.1
밀기울 + 메밀 가루	-	1.5	4.3
메밀 가루	-	3.4	3.6

[0068] 상기 표 2에서 *R. oryzae* 균주로 메밀 가루를 발효시키는 경우 밀기울 단독 또는 밀기울과 메밀 가루를 혼합하는 경우보다 L-카르니틴 생성이 2배 이상 많이 되었고, *R. oligosporus* 의 경우에는 밀기울과 메밀 가루를 혼합하는 경우 L-카르니틴이 가장 많이 생성되었다.

[0069] 실시예 2. 효모를 이용한 메밀 발효

[0070] (1) 액체발효

[0071] 실험에 사용된 효모로는 사카로마이시스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae* KCCM-11215)를 사용하였고, 유산균으로 락토바실러스 GG(*Lactobacillus* GG ATCC-53103)를 사용하였다. 하기의 표 3에 나타난 바와 같이, 메밀 5 g을 칭량하여 100 ml 비커에 넣고 과인애플 주스, 물, 프로바이오틱, 이스트를 각각 첨가하였다. 물 또는 과인애플 주스는 7 ml을 넣었고, 프로바이오틱스는 1 캡슐, 이스트는 1 g 칭량하여 첨가한 후 교반하였다. 시료는 상온에서 1 일 발효 한 후 같은 양의 시료를 더 첨가하여 1 일 발효하고 이 과정을 한 번 더 반복하였다.

표 3

	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp. + <i>S. cerevisiae</i>	균주 없음
메밀+과인애플 주스	A	-	D
메밀+물	C	B	-

[0073] (2) 발효산물의 L-카르니틴 함량 측정

[0074] 발효된 시료의 L-카르니틴 함량은 L-carnitine assay kit (Biovision)를 이용하여 정량 분석하였다. 3 일 동안 발효시킨 반죽 0.1 g을 칭량한 후 증류수를 900 µl 넣고 교반한 후 원심분리 (12,000 rpm, 10 분)하여 상등액을 L-카르니틴 분석에 사용하였다. 시료를 증류수를 이용하여 5배 희석 한 후 5 µl의 시료를 45 µl buffer와 혼합한 후 reaction mix 50 µl를 넣고 fluorometric assay를 이용하여 측정하였다. Ex/Em은 각각 535/587 nm에서 측정하였으며, 결과 값을 표준곡선에 대입하여 L-카르니틴 함량을 계산하고, 그 결과를 하기의 표 4에 나타내었다 (L-카르니틴 함량 (mg/100 g)).

표 4

	A	B	C	D
함량	-	0.3	-	-

[0076] 상기 표 4로부터 알 수 있듯이, 메밀 가루 반죽에 *Lactobacillus* spp. 유산균만을 넣고 발효시킨 경우 3일간 발효 후에도 L-카르니틴이 생성되지 않음이 확인되었다. 반면, 효모를 넣고 발효시킨 경우, 반죽 100 g당 L-카르니틴 0.3 mg가 생성되었다.

[0077] 실시예 3. 메밀 발효 시 발효기간에 따른 카르니틴 함량 변화

[0078] (1) 곰팡이를 이용한 고체 발효

[0079] 메밀 가루 10 g을 칭량하여 100 ml 삼각플라스크에 넣어 멸균(121 °C, 15 분)한 뒤 Dry oven(60 °C)에서 3 시간 동안 건조하였다. 표 5와 같이 건조한 시료에 멸균 증류수 12 ml를 넣고 균주를 각각 접종 한 후, 30 °C에서 1 일 내지 5일간 고체 발효시켰다.

표 5

[0080]

메밀 가루	사용 균주	
	-	<i>R. oryzae</i>

[0081] (2) 발효산물의 L-카르니틴 함량 변화 측정

[0082] 발효된 시료에 멸균증류수를 20 ml을 넣고 교반 시킨 후, 원심분리(3000x g, 30 분)하여 상등액을 얻어 L-카르니틴 함량을 분석에 사용하였다. 발효된 시료의 L-카르니틴 함량은 L-carnitine assay kit (Biovision)를 이용하여 정량 분석하였다. 시료를 증류수를 이용하여 5배 희석 한 후 5 µl의 시료를 45 µl buffer와 혼합한 후 reaction mix 50 µl를 넣고 fluorometric assay를 이용하여 측정하였다. Ex/Em은 각각 535/587 nm에서 측정하였으며, 결과 값을 표준곡선에 대입하여 L-카르니틴 함량을 계산하고, 그 결과를 하기의 표 6 및 도 3 에 나타내었다 (L-카르니틴 함량 (mg/100 g)).

표 6

[0083]

	control	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oligosporus</i>
1일	0	0	0
2일	0	0	0
3일	0	0	0.8
4일	0	0.6	0.8
5일	0	0.9	1.3

[0084] 상기 표 6에서 메밀가루에 *R. oryzae*, *R. oligosporus* 를 넣고 1-5 일간 발효시키면서 생성되는 L-카르니틴 함량을 확인 한 결과, *R. oligosporus*의 경우 발효 시작 2일 후부터 L-카르니틴이 생성된다는 것이 확인되었다.

[0085] 실시예 4. 발효시 수분 함량에 따른 카르니틴 생성량 변화

[0086] (1) 곰팡이를 이용한 고체발효

[0087] 국내 시판 중인 메밀 가루(봉평 농협)를 구입하여 실험에 사용하였다. *R. oligosprus*는 Potato dextrose broth (PD) 배지에 계대배양하여 28°C에서 4일간 배양하였다. 메밀가루 100 g을 칭량하여 500 ml 삼각플라스크에 넣고, 증류수를 각각 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80% 비율이 되도록 첨가하고 교반하였다. 증류수를 비율에 맞추어 혼합하여 교반시킨 메밀을 멸균(121 °C, 15 분)한 뒤 균주를 각각 10%씩 접종하고, 28 °C에서 10일간 고체 발효시켰다.

[0088] (2) 곰팡이를 이용한 발효산물의 L-카르니틴 함량 측정

[0089] 1일차에 발효된 시료를 채취하여 증류수를 2배 넣고 한 시간 동안 교반추출 후, 원심분리(3000 rpm, 30 분)하여 상등액을 얻어 L-카르니틴 분석에 사용하였다. L-카르니틴 함량분석을 위해 표 7의 조건하에 UPLC/MS/MS를 이용하였다. 추출한 샘플 및 농도가 정해진 표준 용액을 1 ml 채취하여, 50 mM KH₂PO₄와 100% ACN을 각 4 ml씩을 처리하여 전처리를 하여준 후, 0.2 µm syringe filter로 필터를 하여준 후 1 µl를 injection하여 분석해 L-카르니틴 함량을 측정한 결과를 표 8에 나타내었다.

표 7

[0090]

LC/MS/MS condition			
· 칼럼: Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μ m, 2.1 x 100mm			
· 이동상: A: 15 mM ammonium formate (0.1% formic acid) B: ACN(0.1%formicacid)			
· Injection volume: 1 μ l			
· Column temperature: 30 $^{\circ}$ C			
· Sample temperature: 20 $^{\circ}$ C			
· Gradient (8min)			
Time(min)	Flow rate	A(%)	B(%)
0	0.4	12.5	87.5
3.5	0.4	12.5	87.5
3.6	0.4	20	80
4.5	0.4	20	80
4.6	0.4	12.5	87.5
8	0.4	12.5	87.5

표 8

[0091]

물비율	1일차 카르니틴 (mg/1 kg)	2일차 카르니틴 (mg/1 kg)	3일차 카르니틴 (mg/1 kg)	5일차 카르니틴 (mg/1 kg)	7일차 카르니틴 (mg/1 kg)	10일차 카르니틴 (mg/1 kg)
25%	0.92	4.46	6.08	3.64	5.49	13.72
30%	0.28	2.00	5.39	1.74	0.71	18.86
35%	0.43	1.47	0.64	3.56	1.48	13.14
40%	0.20	0.83	4.12	4.35	6.83	12.99
45%	0.25	5.04	10.16	3.41	4.56	7.66
50%	0.19	6.73	11.65	4.83	4.09	11.20
55%	0.15	5.67	9.03	4.73	7.45	15.48
60%	0.07	6.70	6.79	4.15	5.66	0.02
65%	0.15	6.73	0.23	0.40	7.27	1.45
70%	0.91	6.73	2.40	1.66	2.93	0.65
75%	0.45	3.59	3.15	4.16	7.58	11.08
80%	0.01	1.20	0.86	10.80	0.02	0.26
90%	3.04	5.17	0.99	6.53	1.19	1.72
100%	0.20	0.24	0.15	6.51	1.67	0.03

[0092]

표 8과 같이 UPLC/MS/MS를 이용하여 분석한 결과는 효소적 분석 방법에 비해서 적은 양이 확인이 되었지만, 발효 원료와 혼합되는 물의 양에 따라 차이가 있고, 발효 시간이 증가할수록 생성되는 L-카르니틴 양이 증가 됨을 확인할 수 있다. 발효 원료와 혼합되는 물이 전체 혼합물의 30% 일 때 생성되는 L-카르니틴 양은 10일째에 18.86 mg/kg을 확인할 수 있다.

[0093]

실시에 5. 메밀과 메밀부산물을 이용한 발효

[0094]

(1) 곰팡이를 이용한 고체발효

[0095]

메밀가루 50 g을 칭량하여 250 ml 삼각플라스크에 넣고, 메밀에 대한 메밀부산물의 비율을 표 9에서와 같은 비율이 되도록 메밀 부산물을 첨가하였다. 혼합시 물은 50%의 비율로 첨가한 후 교반시켰다. 각 비율에 맞추어 혼합된 메밀 및 메밀 부산물을 교반시키고, 멸균(121 $^{\circ}$ C, 15 분)한 뒤 균주를 각각 10%씩 접종한 후, 28 $^{\circ}$ C에서 14일간 고체발효시켰다. 사용된 균주인 리조푸스 올리고스포러스(*Rhizopus oligosporus* KCCM11948P)를 감자 텍스트로스 한천(potato dextrose agar; PDA) 배지에 도말 하여 28 $^{\circ}$ C에서 4 일간 배양하였다.

표 9

[0096]

메밀부산물비율	비율
0%	10:0
10%	9:1
20%	8:2
30%	7:3
40%	6:4
50%	5:5
60%	4:6
70%	3:7
80%	2:8
90%	1:9
100%	0:10

[0097]

(2) 발효산물의 L-카르니틴 함량의 측정

[0098]

1일, 2일, 3일차, 5일차, 7일차 및 10일차에 발효된 시료를 채취하여 칭량 후 2배 부피의 증류수를 넣고 1시간 동안 교반 시킨 후, 원심분리(3000x g, 30 분)하여 상등액을 얻어 UPLC/MS/MS를 이용하여 카르니틴 분석하였다. 14일차에는 발효된 시료에 증류수를 200ml-300ml 넣고 한 시간 동안 교반 추출후 원심분리(3000x g, 30분)하여 상등액을 얻어 L-카르니틴 분석에 사용하였다. L-카르니틴 함량분석을 위해 UPLC/MS/MS를 이용하였다. 추출한 샘플 및 농도가 정해진 표준 용액을 1 ml 채취하여, 50 mM KH₂PO₄와 100% ACN을 각 4 ml씩을 처리하여 전처리를 하여준 후, 0.2 μm syringe filter로 필터를 하여준 후 1 μl를 injection하여 분석해 표 10에 나타내었다.

표 10

[0099]

부산물 비율	1일차 카르니틴 (mg/1 Kg)	2일차 카르니틴 (mg/1 Kg)	3일차 카르니틴 (mg/1 Kg)	5일차 카르니틴 (mg/1 Kg)	7일차 카르니틴 (mg/1 Kg)	10일차 카르니틴 (mg/1 Kg)	14일차 카르니틴 (mg/1 Kg)
10%	0.21	1.25	1.54	4.28	0.76	1.33	0.30
20%	0.44	2.12	3.36	6.95	7.96	5.51	1.05
30%	0.96	1.88	3.41	13.24	6.15	8.64	8.83
40%	1.02	1.77	5.73	17.31	22.00	23.29	22.48
50%	1.45	2.17	9.38	16.89	14.10	10.29	6.45
60%	1.76	2.29	11.36	16.04	19.81	0.88	0.30
70%	1.99	2.88	8.13	25.14	44.43	26.02	10.67
80%	2.02	2.68	9.93	17.66	21.95	14.92	0.74
90%	2.45	4.23	12.31	22.41	31.49	33.54	44.12
100%	3.06	3.80	11.31	16.42	28.20	35.08	33.66

[0100]

상기 표 11로부터 UPLC/MS/MS를 이용하여 분석한 결과는 메밀 가공시 발생하는 부산물의 혼합 비율에 따라 차이가 있고, 발효 시간이 갈수록 양이 증가 됨을 확인하였다. 메밀 가공시 발생하는 부산물의 혼합 비율이 90% 에서 L-카르니틴이 가장 많이 생산되어 14일째에는 44.12 mg/kg을 확인하였고, 100% 부산물만을 사용한 경우도 L-카르니틴이 14일째에 33.66 mg/kg 생산되었다.

[0101]

실시예 6. 곰팡이를 이용한 아마란스와 퀴노아의 발효

[0102]

(1) 곰팡이를 이용한 고체발효

[0103]

아마란스 및 퀴노아 50g을 각각 칭량하고, 증류수 20ml를 넣어 수분함량을 40%로 맞춘 후, 250ml 삼각플라스크에 교반시켰다. 교반시킨 아마란스를 멸균(121 °C, 15 분)한 뒤 균을 각각 10%씩 접종한 후, 28°C에서 5일간 고체발효시켰다. 사용된 균주인 리조푸스 올리고스포러스(*Rhizopus oligosporus* KCCM11948P)를 감자 텍스트로스 한천(potato dextrose agar; PDA) 배지에 도말 하여 28 °C에서 4 일간 배양하였다. 발효된 시료에 멸균 증류수를 100 ml 넣고 교반시킨 후, 원심분리(3000 x g, 30 분)하여 상등액을 얻어 L-카르니틴 분석에 사용하였다. 각각 아마란스와 퀴노아를 5일간 발효시킨 반죽의 L-카르니틴 함량을 분석한 결과를 하기의 표 11에 나타내었다.

표 11

[0104]

원료	카르니틴 함량
아마란스	3.4
퀴노아	0.9

[0105]

상기 표 11에 나타낸 바와 같이 아마란스의 L-카르니틴 함량은 3.4mg/ 100g 및 퀴노아의 L-카르니틴 함량은 0.9mg/ 100g으로 확인되었다.

[0106]

실시예 7. 곰팡이를 이용한 다량 발효

[0107]

(1) 곰팡이를 이용한 고체발효

[0108]

메밀 가루 1 kg을 각각 칭량하여 총 5 kg의 메밀을 준비하여 증류수의 비율을 40%(w/v), 60%(w/v) 및 70%(w/v)가 되도록 혼합한 뒤 고압 멸균(121 °C, 15 분)하였다. 멸균한 시료에 균주 배양액 10 ml을 접종한 후, 28 °C에서 8일간 고체 발효하였다. 사용된 균주인 리조푸스 올리고스포러스(*Rhizopus oligosporus* KCCM11948P)를 감자 텍스트로스 한천(potato dextrose agar; PDA) 배지에 도말 하여 28 °C에서 4 일간 배양하였다.

[0109]

(2) 곰팡이를 이용한 발효산물의 L-카르니틴 함량 측정

[0110]

발효된 시료 중량의 2배에 해당하는 증류수를 넣고 바이오리액터를 이용하여 1시간동안 추출 시킨 후, 원심분리(6000 x g, 30 분)하여 상등액을 얻어 carnitine 분석에 사용하였다. 상기 실험은 5회 반복을 수행했다. 발효된 시료의 L-카르니틴 함량은 L-carnitine assay kit (Biovision)를 이용하여 정량 분석하였다. 시료를 증류수를 이용하여 2, 5, 10, 20, 30 배 희석 한 후 5 µl의 시료를 45 µl buffer와 혼합한 후 reaction mix 50 µl를 넣고 fluorometric assay를 이용하여 측정하였다. 증류수의 함량이 40%(w/v) 일 때의 결과를 하기의 표 12에 나타내었다 (L-카르니틴 함량 µm(mg/100 g)). fluorometric assay에서 Ex/Em은 각각 535/587 nm에서 측정하였으며, 결과값을 표준 곡선에 대입하여 생성되는 L-카르니틴 함량을 계산하였다.

표 12

[0111]

	0 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day
L-카르니틴 함량 (mg/ 메밀 100g)	0	1.6	5.2	9.7	14.7	19.4	16.8	17.2

[0112]

상기 표 12로부터 알 수 있듯이, *R. oligosporus*를 이용하여 발효시킨 메밀의 L-카르니틴 양은 6일째에 평균 19.4 mg/메밀 100g을 함유하고 있었다. 발효 기간에 따라서 L-카르니틴의 양은 증가하였으며 최대 19.4 mg/메밀 100g(6일째)의 L-카르니틴이 생산되어 생산량은 발효기간에 따라서 증가한다는 것을 확인하였다.

[0113]

<실험예>

[0114]

실험예 1. 발효 산물을 이용한 버섯의 L-카르니틴 함량 비교

[0115]

발효산물에 의한 실제 버섯의 함량 비교를 위해 느타리버섯을 재배해 L-카르니틴 함량을 비교하였다. 850ml 병에 폐면, 폐면 펠렛, 면실박, 밀기울, 팽화왕겨, 옥수수이삭속 (콘코브) 등이 혼합된 동일한 배지를 510g씩 채우고 무균상태에서 노랑느타리버섯 종균을 동일하게 seeding 했다. 종균이 투입된 배양병은 다음 [표 13]과 같이 10ml씩 첨가물을 처리한 후 직사광선이 들지 않는 상태에서 온도를 20 내지 22°C로 조절하고, 습도 역시 65~75%로 조절된 환경에서 배양하였으며, 기타 사항은 농촌진흥청 원클릭 농업기술에 기반하여 재배하였다.

표 13

[0116]

Group	첨가물 (총 10ml)
A	증류수 10mL
B	메밀가루+균 혼합물 10ml
C	발효메밀추출물 2g + 증류수(remain)
D	L-카르니틴 20mg + 증류수(remain)

[0117]

배양 종료 후 효소 분석법을 통해 L-카르니틴 함량을 측정했다. 각 샘플을 적당히 희석한 후 reaction mix 50

μl에 시료 10 μl 와 buffer 40 μl 를 넣어 준다. 이 때, blank는 증류수 10 μl에 buffer 40 μl를 넣어주고 reaction mix를 넣어준다. 동일한 조건으로 다른 well에 reaction mix에서 enzyme만 제거한 후 50 μl를 넣어 샘플 속의 L-카르니틴 양을 측정하였다.

표 14

[0118]

	노랑느타리버섯			
	무게 (g)	A비례 무게 (%)	건조시료 200mg당 L-카르니틴양 (μg)	A 대비 L-카르니틴양 (%)
A	16.35	100	104.5	100
B	30.25	185.0	204.7	195.9
C	50.06	306.2	217.4	208.0
D	23.64	144.6	582.6	557.5

[0119]

[표 14] 및 [도 1]과 같이 일반배지에 비해서 메밀과 발효 균을 섞어준 (B)의 경우 버섯의 성장이 85% 더 촉진되었으며, 버섯 중 L-카르니틴 양도 약 96% 증가했다. 발효메밀의 추출물이 첨가된 (C)는 성장을 200% 이상 촉진하였으며, L-카르니틴의 양도 200% 이상 증가 되었다. 이는 카르니틴을 직접 투여한 (D)에서도 확인 되어 무게는 약 45% 증가되는데 그쳤으나, 버섯 중의 카르니틴의 양은 500% 이상으로 증가 되어 버섯의 배지에 메밀+발효균, L-카르니틴 함유 발효 메밀 추출물 및 L-카르니틴 직접 투여를 통해 버섯의 L-카르니틴의 함량이 증가된 것을 확인할 수 있다.

실험예 2. 쓴메밀 발효를 통한 곡물의 L-카르니틴 생산

통곡물 상태의 쓴메밀을 물에 6시간 동안 불린 후 25분간 고압 멸균하였다. 통곡물을 물에서 건져내 상온에서 충분히 식힌 다음 *R. oligosporus*를 접종시켰다. 발효는 30℃, 습도 90%RH 이상 조건에서 76시간 동안 진행하였다. 발효가 완료된 곡물은 동결건조하여 분쇄한 후 크로마토 그래피 방법을 이용하여 카르니틴 함량을 분석하였다. 그 결과를 하기의 표 15에 나타내었다.

표 15

Group	L-carnitine (μg/100 g)	백분율
쓴메밀	6.21	100.0%
발효 쓴메밀	38.44	618.7%

상기 표 13으로부터 알 수 있듯이, 발효 쓴메밀을 이용하는 경우 곡물내 총 카르니틴 함량이 600% 이상 증가함이 확인되었다.

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11948P

수탁일자 : 20161120

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11949P

수탁일자 : 20161120

도면

도면1

