



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0102982
(43) 공개일자 2025년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 29/00 (2025.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0195243
(22) 출원일자 2023년12월28일
심사청구일자 2023년12월28일

(71) 출원인
농업회사법인 블루바이오팜 주식회사
부산광역시 강서구 평강로229번길 83 ,2층(대연
1동)
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연
동)
(72) 발명자
김세진
부산광역시 수영구 수영로 712, 1509호
양지영
부산광역시 남구 수영로 345, 106동 1701호(대연
힐스테이트푸르지오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
심경식, 홍성욱

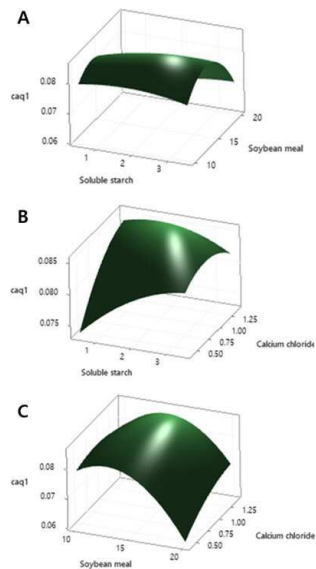
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 바실러스 리케니포미스를 이용한 대두박 발효방법

(57) 요약

탈지대두박, 수용성 전분(soluble starch), CaCl_2 , 및 물을 혼합하고, 상기 혼합물에 바실러스 리케니포미스 균주를 접종하여 발효시키는 탈지대두박 발효 방법, 이를 이용하여 제조한 탈지대두박 발효물, 탈지대두박 발효물을 함유한 식품 조성물이 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2250/5118 (2013.01)

(72) 발명자

신지영

부산광역시 남구 유엔로 46, 102동 106호(우암중앙
하이츠아파트)

양준호

부산광역시 남구 수영로 276-1, 901호(제이캐슬)

심이강

부산광역시 남구 유엔평화로29번길 127, 303호(오
렌지하우스)

이소라

부산광역시 기장군 정관읍 월평2길 68

강석원

부산광역시 남구 용소로13번길 107-4, 205호(대연
동, 킹덤빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711178126

과제번호 2022-BS-RD-0051-01

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 (재단)연구개발특구진흥재단

연구사업명 연구개발특구육성

연구과제명 생물전환 공정을 활용한 아미노산 함량이 증가된 대두박 단백질 추출 및 이를 이용
한 기능성 단백질 파우더 및 음료 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 농업회사법인 블루바이오팜 주식회사

연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

바실러스 리케니포미스 균주로 이용한 탈지대두박 발효 방법으로써,
상기 탈지대두박, 수용성 전분(soluble starch), CaCl_2 , 및 물을 혼합하고,
상기 혼합물에 균주를 접종하여 발효시키는 것인,
탈지대두박 발효 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 혼합물의 성분비는,
탈지대두박 10 내지 16% w/v, 수용성 전분(soluble starch) 1 내지 3% w/v, CaCl_2 0.6 내지 1.4% w/v인,
탈지대두박 발효 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 혼합물의 성분비는,
탈지대두박 12 내지 15% w/v, 수용성 전분(soluble starch) 1.5 내지 2.5 % w/v, CaCl_2 0.8 내지 1.2% w/v인,
탈지대두박 발효 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 발효는 40 내지 50℃에서 3 내지 9시간 발효시키는 것인,
탈지대두박 발효 방법.

청구항 5

제1항의 방법으로 제조된 탈지대두박 발효물.

청구항 6

제5항의 탈지대두박 발효물을 포함하는 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바실러스 리케니포미스를 이용한 대두박 발효방법 및 이를 이용하여 제조한 대두박 발효물 및 식품 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 종래 단백질 보충제는 운동을 통한 근육량 증가 목적으로 사용되었으나 최근에는 부족한 영양을 보충하는 보조

식으로 널리 활용되고 있다. 또한 동물성 단백질보다 식물성 단백질을 원료로 하는 제품에 대한 수요가 증가하고 있다.

[0003] 식물성 단백질은 동물성 단백질 보다 소화흡수율이 느린 단점이 있다. 그러나 기존 식물성 단백질 보충제 제품들은 단백질 함량을 증가시키거나 분지아미노산(Branched-Chain amino acid, BCAA)와 같은 특수 아미노산을 첨가하는 형태로 개량이 이루어지고 있을 뿐 소화흡수율을 개선한 제품이 부족한 실정이다.

[0004] 대두는 오랜기간동안 단백질, 지질, 식이섬유의 영양 공급원으로서 높은 단백질과 동물성 단백질이 가지지 못하는 황함유 단백질을 가지고 있다. 대두와 그로부터 생산된 제품들은 전세계적으로 유통되고 있으며 특히 동아시아 지역에서 많이 소비되고 있다. 대두는 보통 발효제품을 많이 사용되고 있으며 그 이유는 맛, 향, 소화율을 높일 수 있기 때문이다.

[0005] 한편 효소를 이용하여 대두박 단백질을 분해하면 소화흡수율을 높일 수 있으나, 맛이 좋지 않게 변하여 선호도가 낮아지는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개공보 제 10-2008-0030733호 (2008.04.07)

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은, 바실러스 리케니포미스 균주로 이용한 탈지대두박 발효 방법으로써, 상기 탈지대두박, 수용성 전분(soluble starch), CaCl_2 , 및 물을 혼합하고, 상기 혼합물에 균주를 접종하여 발효시키는 것인, 탈지대두박 발효 방법을 제공한다.

[0008] 상기 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주는 그람 양성, 중온성 박테리아로, 최적의 성장온도는 약 50°C 로 알려져 있다. 알칼리성 세린 프로테아제 분비 능력이 우수하여 산업용 효소 생산에 이용되는 균주이다.

[0009] 상기 바실러스 리케니포미스 균주는 기탁번호 KACC 91618P로 기탁된 바실러스 리케니포미스 SF5-1 균주일 수 있다.

[0010] 일 실시예에 따르면, 탈지대두박에 바실러스 리케니포미스 균주를 접종하여 발효시키는 것보다, 수용성 전분과 CaCl_2 을 첨가하여 발효시키는 것이 더 단백질 분해를 촉진시키는 것으로 나타났다. 탈지대두박, 수용성 전분, CaCl_2 의 첨가 비율은 바실러스 리케니포미스 균주의 단백질 분해 효소 분비를 증가시키거나, 분비된 효소의 활성을 증가시킴으로써 발효 효율에 영향을 미치는 것일 수 있다.

[0011] 상기 혼합물의 성분비는, 탈지대두박 10 내지 16% w/v, 수용성 전분(soluble starch) 1 내지 3% w/v, CaCl_2 0.6 내지 1.4% w/v일 수 있다.

[0012] 상기 혼합물의 성분비는, 탈지대두박 12 내지 15% w/v, 수용성 전분(soluble starch) 1.5 내지 2.5 % w/v, CaCl_2 0.8 내지 1.2% w/v일 수 있다.

[0013] 상기 혼합물의 성분비는, 탈지대두박 13 내지 14% w/v 또는 13.5 내지 14% w/v, 수용성 전분(soluble starch) 1.8 내지 2.2 % w/v 또는 1.9 내지 2.1 % w/v, CaCl_2 0.9 내지 1.2% w/v, 1 내지 1.1% w/v, 또는 1.05 내지 1.10% w/v일 수 있다.

[0014] 상기 발효는 40 내지 50°C , 41 내지 49°C , 42 내지 48°C , 43 내지 47°C , 44 내지 47°C , 43 내지 46°C , 44 내지 46°C , 44.5 내지 45.5°C , 또는 45°C 에서 발효시키는 것일 수 있다.

[0015] 상기 발효는 3 내지 9시간, 4 내지 9시간, 5 내지 9시간, 6 내지 9시간, 3 내지 8시간, 4 내지 8시간, 5 내지 8시간, 6 내지 8시간, 3 내지 7시간, 4 내지 7시간, 5 내지 7시간, 6 내지 7시간, 3 내지 6시간, 4 내지 6시간,

5 내지 6시간, 5시간 30분 내지 6시간 30분, 5시간 40분 내지 6시간 20분, 5시간 50분 내지 6시간 10분, 또는 6시간 발효시키는 것일 수 있다.

[0016] 상기 발효 온도와 시간은 조합될 수 있다.

[0017] 기존에 알려진 바에 따르면 바실러스 리케니포미스 균주의 생육 및 동물성 단백질 발효에 적합한 온도는 55℃였다. 그러나, 본 발명자는 바실러스 리케니포미스 균주를 대두박에 접종하여 55℃로 발효시킨 결과 불쾌한 냄새가 발생함을 발견하고, 생산성이 높으면서도 풍미가 우수한 최적의 발효 조건을 연구한 결과 45℃에서 6시간 발효하는 것이 최적임을 발견하였다.

[0019] 다른 양상은 상기 발효 방법으로 제조된 탈지대두박 발효물을 제공한다.

[0021] 또 다른 양상은 상기 탈지대두박 발효물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등 모든 형태의 식품 조성물을 포함할 수 있다. 상기 유형의 식품 조성물은 당해 기술 분야에 공지된 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0023] 상기 식품 조성물은 건강기능식품 형태로 제공될 수 있다.

[0024] 상기 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다. 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연 첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.

[0025] 상기 식품 조성물은 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제, 단백질 파우더 등에 사용될 수 있다.

[0026] 상기 식품은 단백질 파우더일 수 있다.

[0027] 상기 건강기능식품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 의미한다.

[0028] 상기 건강기능식품은 항산화용 건강기능식품일 수 있다. 항산화는 활성산소를 제거하여 체내에서 일어나는 여러 산화작용을 방지함으로써 생체를 산화적 손상으로부터 보호하는 것을 의미하며, 식품의약품안전처에서 인정하는 건강기능식품의 기능성 중 하나이다.

[0029] 특히 뇌세포, 혈관세포, 피부세포는 활성산소로부터 손상받기 쉬운 부위로 알려져 있으며, 항산화 물질은 피부 노화방지, 심혈관 질환 예방, 퇴행성 뇌질환 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그 외에 항산화 물질은 피부염, 인후염, 류마티스 관절염 등 각종 염증성 질환 예방 효과, 각종 암 질환을 예방 효과, 피로 회복 효과가 있다고 알려져 있다.

[0030] 상기 건강기능식품은 혈당 조절 개선용 건강기능식품일 수 있다. 혈당조절 개선은 식품의약품안전처에서 인정하는 기능성 중 하나이다. 일 실시예에 따르면, 탄수화물 분해 효소인 α -글루코시다제를 억제할 수 있으므로 식후의 급격한 혈당 상승을 억제하여 정상적인 혈당 유지에 도움을 줄 수 있다.

[0031] 상기 건강기능식품은 상술한 식품 조성물에 대한 설명을 참고하여 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0032] 일 구체예에 따른 발효 방법은 바실러스 리케니포미스 균주의 단백질분해효소 분비 또는 효소 활성을 증가시켜 대두박 단백질을 신속하고 높은 수율로 분해시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1 및 도 2는 최적의 대두박 발효를 위한 성분 조성을 모델링 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 실시예 1: 탈지대두박 분말 및 *Bacillus licheniformis* SF-1 균주 준비

[0037] 1-1. 탈지대두박 분말 준비

[0038] 본 실험에서 사용한 탈지대두박(지방함량이 15% 이하)은 저온압착방식으로 착유하고 남은 부산물이며, 증안리약초마을(Gyeonggi, Korea)으로부터 구입하였다. 탈지대두박을 동결건조 후 food mixer (FM-681C, Hanil, Incheon, Korea)를 사용하여 마쇄하고 45 mesh (입자 크기 약 0.2 ~ 0.5mm)로 체질하여 분말화하였다. 제조된 탈지대두박 분말은 멸균하고 실험 전까지 -30℃의 deep freezer (MDF, Sanyo, Tokyo, Japan)에 보관하였다. (도 1 참고)

[0039] 1-2. *Bacillus licheniformis* SF5-1(KACC 91618P) 균주 준비

[0040] *Bacillus licheniformis* SF5-1(KACC 91618P) 균주를 국립농업과학원에서 분양받았다. 화염 멸균된 백금이를 이용하여 멸균된 tryptic soy agar (TSA, Bacto™, Becton, Dickinson and company, Sparks, MD, USA)에 균주를 접종한 뒤, 35, 45, 55℃의 incubator (WIF-105, Wisecube®, Seoul, Korea)에서 24시간 배양하였다. 이 후 균주의 단일 colony를 취해 멸균된 tryptic soy broth (TSB, Bacto™, Becton, Dickinson and company, Sparks, MD, USA)에 접종하고 35, 45, 55℃의 incubator에서 다시 24시간 배양하였다. 실험에는 TSB 배지에서 3회 이상 계대 배양하여 활성화된 정지기의 균을 사용하였다. 균주는 stock culture하여 실험 전까지 -70℃의 초저온 냉동고(MDF-U53V, Sanyo, Osaka, Japan)에 보관하였다.

[0041] *Bacillus licheniformis* SF5-1(KACC 91618P) 균주의 생육이 가장 활발한 온도는 55℃였다.

[0043] 실시예 2: 대두박 발효물 제조

[0044] 총 100mL의 물에 수용성 전분(soluble starch) 2.0152% (2.0152 g), 실시예 1의 대두박 분말 13.7374% (13.7374 g), CaCl₂ 1.0768% (1.0768 g)를첨가하고 혼합하였다. 혼합물에 0.1% 펩톤수를 이용하여 1x10⁶ CFU/mL 이 되도록 희석한 *Bacillus licheniformis* SF5-1 1 mL(1% v/v)를 접종하였다.

[0045] 이후 45℃ incubator에서 6시간 배양하고, 균의 활성을 정지시키기 위해 121℃의 autoclave (VS-1221, Vision, Seoul, Korea)에서 17분간 멸균하였다. 멸균 후 동결건조하고 재분쇄하여 발효대두박 분말을 제조하였다.

[0047] 실시예 3: 발효를 위한 최적의 배지 조성

[0048] 바실러스 리케니포미스 균주에 의한 대두박 발효에 있어서, 수용성 전분 및 CaCl₂의 최적의 첨가 비율을 탐색하였다.

[0049] 2-1. 실험방법

[0050] Box-Begnen Design을 이용하여 배지의 주성분인 대두박 (10 ~ 20%; w/v), 수용성 전분(soluble starch) (0.5 ~ 3.5%; w/v), CaCl₂ (0.4 ~ 1.4%; w/v)을 각각의 농도 범위 내에서 조절하여 15 가지 배지 조성을 설계하였다.

[0051] 15개 배지 조성으로 실제 발효를 수행하여 protease activity를 최대화할 수 있는 결과값을 얻었다. 결과값은 Minitab 19 program을 이용한 반응표면분석을 통해 최적화시켰다. 최적화 과정을 통해 얻어진 모델링 값에 대한 검증을 실시하였고, 각각의 수치가 모델링에 적합한지 확인하였다. 모델링을 통하여 단백질분해효소의 활성을 최대화할 수 있는 최적 조성 비율에 대한 예측치를 얻었다. 예측이 정확한지 확인하기 위하여 검증을 실시하였다. 검증을 위하여 최적 조건으로 배지를 조성하고 발효를 실시하였으며 발효 후에는 단백질 분해효소의 활성을

측정하고, 예측치와의 차이를 비교하였다. (도 1 및 도 2 참고)

[0052] 단백질의 사이즈는 SDS-PAGE로 확인하였으며, 구체적으로 stacking gel 5%, separation gel 12%의 조성으로 단백질을 분자량별 분리하여 확인하였다.

[0053] 단백질분해효소 활성은 카제인을 기질로 하는 시그마사의 non-specific protease activity assay를 이용하여 측정하였다. 조효소액을 추출한 뒤에 가제인 용액과 반응을 시키고 TCA 용액으로 반응을 종결시킨 뒤, Folin 시약으로 발색시켜 활성을 확인하였다.

[0055] 2-2. 연구결과

[0056] 상술한 실험방법에 따라 발효에 최적화된 배지 조건은 하기 표 1과 같다. (도 1 및 도 2 참고)

표 1

[0057]

Optimal condition	
Soluble starch (w/v %)	2.0152
Soybean meal (w/v %)	13.7374
Calcium chloride (w/v %)	1.0768

[0058] 최적화된 조건은 총 100mL의 물에 수용성 전분(soluble starch) 2.0152g (2.0152 %), 대두박 13.7374 g (13.7374%), CaCl₂ 1.0768 g (1.0768%)가 최적화된 배지 조건이고 균주 접종량은 1% (L/L) (즉, 1 mL), 발효온도는 45도씨, 발효시간은 6시간이다.

[0060] SDS-PAGE를 통하여 단백질의 사이즈를 확인한 결과, 초기 대두박의 단백질 사이즈는 75kDa였으나, 상기 최적화된 조건에서 발효된 단백질 사이즈는 35kDa 이하로 감소하였다.

[0061] 최적화된 조건에서 예상 최대 단백질분해효소 활성은 0.0859 $\mu\text{mol/g min}$ 이었고, 실제 발효 후 검증한 단백질 분해효소 활성은 $0.0882 \pm 0.023 \mu\text{mol/g min}$ 로 확인되었으며, 실제 활성이 예상보다 약간 더 높았다.

[0063] 실시예 4: 대두박 발효물의 항산화 활성 확인

[0064] 항산화활성은 DPPH radical scavenging activity와 ABTS radical scavenging activity를 측정하여 확인하였다.

[0065] 측정결과는 하기 표 2 및 표 3과 같다. 대두박 발효물은 대두박보다 크게 향상된 항산화 활성을 나타내으며, 갈산과 대응한 수준이므로 항산화용 기능성 식품으로 활용될 수 있다.

표 2

[0066]

Sample	DPPH radical scavenging activity (%)
SBM (대두박) (50 $\mu\text{g/L}$)	11.76 ± 1.39
FSBM (발효대두박) (50 $\mu\text{g/L}$)	14.02 ± 1.07
40 $\mu\text{g/L}$ gallic acid	15.22 ± 0.66

표 3

[0067]

Sample	ABTS radical scavenging activity (%)
SBM (대두박) (50 $\mu\text{g/L}$)	12.27 ± 0.64^a
FSBM (발효대두박) (50 $\mu\text{g/L}$)	17.49 ± 0.66^b
40 $\mu\text{g/L}$ gallic acid	15.22 ± 0.66

[0068] a,b : Different letter indicate significantly different ($p < 0.01$)

[0070] 실시예 5: 대두박 발효물의 항당뇨 효과 확인

[0071] 항당뇨활성은 α -glycosidase inhibitory activity를 측정하여 확인하였다. 실험결과 바실러스 리케니포미스 균주로 발효시킨 대두박 발효물은 대두박보다 α -글루코시다제 억제 효과가 3배 이상 크게 상승하여 혈당조절용 기능성 식품으로 활용될 수 있다.

표 4

[0072]

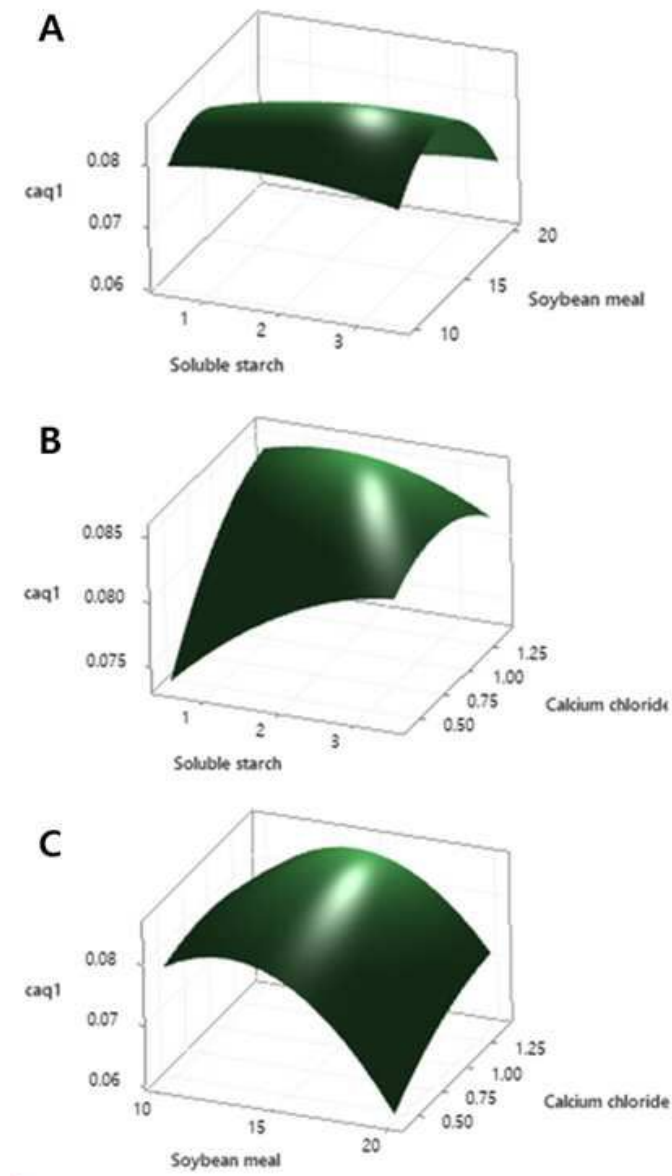
Sample	concentration of extract (mg/mL)	
	5	10
FSBM (발효대두박)	$32.1 \pm 0.5^{1)a2)}$	79.2 ± 0.2^b
SBM (대두박)	3.5 ± 0.5^c	22.8 ± 0.8^d
1) Values are mean $\pm$ SD. Values are mean of triplicates.		
2) Same letters are not significantly different at the 5% level. ($p < 0.05$)		

수탁번호

[0074] 기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)
수탁번호 : KACC91618P
수탁일자 : 20101216

도면

도면1



도면2

