

명세서

발명의 명칭: 바실러스 서브틸리스 균주를 이용한 대두발효물의 제조방법 및 대두발효물의 이취 저감방법

기술분야

- [1] 본 출원은 2018년 11월 30일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2018-0152738호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] 본 발명은 바실러스 서브틸리스 균주를 이용한 대두발효물의 제조방법 및 대두발효물의 이취 저감방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 대두발효물의 특유 이취 성분에 해당하는 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물을 유의성 있게 저감시키고, 1-데옥시노지리마이신의 함량을 증대시킬 수 있는 대두발효물의 제조방법과, 대두발효물의 이취 저감방법에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 대두는 부족하기 쉬운 라이신(lysine)과 같은 필수 아미노산이 풍부하고 소화율이 높아 양질의 단백질 공급원으로 널리 이용되고 있다. 대두는 전통 발효 식품인 간장, 고추장, 된장, 청국장 제조의 기본원료이며, 두부, 콩우유 등의 다양한 식품의 원료로 이용되고 있다.
- [4] 대두의 조 단백질 함량은 대두 건조 분말의 20~45%에 달해 과거에는 대두가 주요 단백질 공급원으로서 연구되었으나, 현재는 식생활의 질적 수준 향상으로 인해 단백질 부족현상이 감소하면서 오히려 대두의 다양한 유용 생리활성 물질에 대한 연구가 집중되고 있다.
- [5] 대두발효물에는 대두의 영양성분 뿐 아니라 미생물이 생산한 아밀라제, 프로테아제, 리파아제 및 혈전용해 효소 등의 효소와 이들 효소가 분해해서 생성된 펩타이드, 아미노산, 올리고당, 지방산, 활성이소플라본 등이 포함되어 있으며 그 외에 피토스테롤, 레시틴, 사포닌 등의 생리활성물질을 많이 포함하고 있다.
- [6] 대두발효물을 이용한 식품은 미생물의 효소 활성에 의하여 원료보다 더 바람직한 식품으로 전환한 것이며 영양가와 저장성을 더 좋게 한 것으로, 최근에는 이소플라본(isoflavone)을 포함한 대두 유리 물질들이 항암, 항지혈, 항산화 효과를 나타내어 심혈관계 질환 및 골다공증에 효과적임이 보고되면서, 한국, 일본, 중국 등에서는 발효식품(된장, 청국장, 고추장 등), 비발효 가공품(두부, 두유, 식용류), 발아제품(콩나물)의 형태로 대량 소비되어 지고 있으며, 미국 등에서 비만 인구의 증가와 건강 관심의 증대 등으로 소이버거(soy burger), 콩아이스크림, 콩단백 스낵(health bar), 콩기름 등 다양한 콩제품이 만들어지고 있으며 그 소비가 빠르게 증가되고 있는 실정이다.
- [7] 한편, 다중 수산화된 알칼로이드인 1-데옥시노지리마이신 (1-Deoxynojirimycin; DNJ)는 피라노오스 고리의 산소 원자가 NH 그룹으로 치환된 글루코오스

유사체이다. DNJ는 항당뇨성, 항암성 및 항바이러스성과 같은 중요한 생물학적 활성을 나타내며 α -글루코시다아제를 저해하는 것으로 알려졌다. 이런 다양한 잠재적인 활성으로 인하여 기능성 식품 및 약학 산업에서 DNJ 및 유사체의 생산 개발이 진행되어 왔으며 최근 *Bacillus* 및 *Streptomyces* 종을 포함하는 미생물에 의한 발효를 이용하여 DNJ를 생산하는 것에 대한 연구가 이루어지고 있다.

[8] 선행기술문헌

[9] 특허문헌 대한민국 공개특허 특2002-0057851

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명은 대두발효물의 특유 이취 성분에 해당하는 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물을 유의성 있게 저감시키고, 1-데옥시노지리마이신의 함량을 증대시킬 수 있는 대두발효물의 제조방법과 대두발효물의 이취 저감방법을 제공한다.

과제 해결 수단

[11] 본 발명은, 대두분을 포함하는 배양액에 바실러스 서브틸리스 균주를 접종 후 배양하여 대두발효액을 제조하는 단계(단계 a); 상기 대두발효액에 음이온교환수지를 넣고 교반 후, 여과하여 여과액을 얻는 단계(단계 b); 상기 여과액을 농축 또는 건조시켜 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 대두발효분말을 제조하는 단계(단계 c)를 포함하는 대두발효물의 제조방법을 제공한다.

[12] 대두발효액 제조(단계 a)

[13] 상기 방법은 대두분을 포함하는 배양액에 바실러스 서브틸리스 균주를 접종 후 배양하여 대두발효액을 제조하는 단계를 포함한다.

[14] 상기 배양액은 함수결정포도당을 더 포함할 수 있다.

[15] 상기 대두분과 함수결정포도당은 각각 1~50 중량부, 1~15 중량부로 첨가될 수 있다.

[16] 상기 바실러스 서브틸리스 균주는, 바실러스 서브틸리스 모리 균주(*Bacillus subtilis* MORI, KCCM 10450) 균주일 수 있다.

[17] 상기 단계 a에서 바실러스 서브틸리스 균주는 배양액 부피의 0.1 ~ 20 (v/v)%로 접종되어 20 ~ 50 °C에서 배양될 수 있다. 이때 배양은 2 내지 10일 수행될 수 있다.

[18] 대두발효분말 제조(단계 b 및 단계 c)

[19] 상기 방법은 단계 a의 대두발효액에 음이온교환수지를 넣고 교반 후 여과하여 여과액을 얻는 단계 및 상기 여과액을 농축 또는 건조시켜 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 대두발효분말을 제조하는 단계를 포함한다.

[20] 상기 음이온 교환 수지는 4차 암모늄 관능기를 가지며, OH⁻ 또는 Cl⁻를 교환이온으로 가질 수 있다.

- [21] 상기 음이온 교환 수지는 강염기성 이온교환수지일 수 있다.
- [22] 본 발명은 상기와 같은 음이온교환수지를 적용하여 여과 공정을 수행함으로써, 제조되는 대두 발효물의 이취를 저감시키고, 1-데옥시노지리마이신의 함량을 증대시킬 수 있다. 더욱 구체적으로 특유 이취 성분에 해당하는 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물을 유의성 있게 저감시킬 수 있다.
- [23] 상기 저급 지방산은 탄소수 1 내지 6으로 구성된 지방산 또는 이들의 염으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [24] 더욱 구체적으로, 상기 저급 지방산은 뷰티르산, 이소뷰티르산, 2-메틸 뷰티르산, 3-메틸 뷰티르산, 프로피온산, 2-메틸 크로톤산 및 4-메틸발레르산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [25] 상기 음이온교환수지는 대두발효액 100 중량부에 대하여 3 ~ 30 중량부로 첨가될 수 있다. 이온교환수지의 양이 3 중량부 미만 시에는 이취 제거가 확인되지 않으며, 30 중량부 초과 시에는 상업적 활용성이 낮은 문제가 있다.
- [26] 상기 교반은 음이온교환수지를 넣고 20 ~ 80°C, 10 ~ 180분 동안 수행할 수 있고, 더욱 바람직하게는 50-60°C에서 120분 ~ 180분 동안 수행할 수 있다. 교반 시간 및 온도가, 20°C 및 10분 미만 시에서는 이취 제거가 확인되지 않으며, 80°C 및 180분 초과 교반시 수득률이 매우 낮을 수 있다.
- [27] 상기 농축은 감압농축일 수 있고, 상기 건조는 동결건조일 수 있다.
- [28] 상기 방법은, 단계 c 이후 실리카 겔 컬럼을 이용하여 정제하는 단계 및 에탄올을 첨가하여 결정화하는 단계를 더 포함할 수 있다. 정제 및 결정화 단계를 통해 97% 이상의 1-데옥시노지리마이신을 수득할 수 있다.
- [29] 상기 방법에 따르면 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물이 저감된 대두발효물을 제조할 수 있다. 더욱 구체적으로 대두 발효물의 특유 이취 성분에 해당하는 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물을 유의성 있게 저감시키고 1- 데옥시노지리마이신의 함량을 증대시킬 수 있다. 이에 따라 이취가 감소된 식품 또는 건강 기능 식품 원료를 제공할 수 있다.
- [30] 또한 본 발명은, 대두분을 포함하는 배양액에 바실러스 서브틸리스 균주를 접종 후 배양하여 대두발효액을 제조하는 단계; 상기 대두발효액에 음이온교환수지를 넣고 교반 후, 여과시켜 여과액을 얻는 단계; 및 상기 여과액을 감압농축하여 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 대두발효분말을 제조하는 단계를 포함하는, 대두발효물의 이취 저감방법을 제공한다.

발명의 효과

- [31] 본 발명에 따르면, 대두발효물의 특유 이취 성분에 해당하는 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물을 유의성 있게 저감시키고, 1-데옥시노지리마이신의 함량을 증대시킬 수 있다. 이에 따라 이취가 감소된 식품 또는 건강 기능 식품 원료를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 1-데옥시노지리마이신의 정제 공정도이다.
 [33] 도 2는 다양한 이온교환수지를 적용하여 수득한 1-데옥시노지리마이신의 함량 분석 결과를 나타내는 그래프이다.
 [34] 도 3은 종래 기술에 따른, 1-데옥시노지리마이신의 정제 공정도이다.
 [35] 도 4는 레진(수지) 처리 전/후의 결과를 비교한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예를 통하여 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명하는 실시예에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 이하의 실시예에 의해 본 발명이 제한되어서는 안 된다.

[37]

[38] <실시예>

[39] 대두발효액 제조

- [40] 바실러스 서브틸리스 균주(*Bacillus subtilis* MORI, KCCM-10450, 대한민국등록특허 제10-0477039호)는 트립톤 10g, 염화나트륨 10g, 효모추출물 5g을 물 0.975L에 용해하여 조제된 배지에서 37°C에서 1-2일간 진탕배양하여 종균으로 사용하였다.

- [41] 이후, 50ℓ의 발효기에 2.5(w/v)% 탈지대두분, 3(w/v)% 함수결정포도당의 조성으로 30ℓ의 배양액을 제조한 후, 멸균하여 종균 0.3ℓ를 접종하여 37°C에서 5일간 배양하였다. 배양 완료 후, 회수된 배양액을 원심분리(10,000rpm × 20분)하여 균체 및 단백질 성분을 제거하여 약 10(w/v)% 이상의 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 대두발효액을 제조하였다.

[42]

[43] 대두발효액의 여과

- [44] 제조된 대두발효액에 8%(w/v)에 해당하는 2.4kg의 SAR 10 음이온교환수지를 넣고 50-60°C에서 2-3시간 동안 교반 진행한 다음, 100 mesh 여과망을 통과시켰다. 여과액을 감압농축하여 특유 이취가 감소됨과 동시에 약 20(w/v)% 이상의 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 대두발효분말을 약 180g 수득하였다.

[45]

[46] 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)의 정제

- [47] 이온교환수지 적용 대두발효분말 180g을 약 2920g의 실리카겔(silica gel) 컬럼에 이동상 프로판올:메탄올:물 (propanol:methanol:water)= 4:1:0.5(v/v)을 흘려주어 일정한 분획을 수집한 후, 감압 농축하여 1-데옥시노지리마이신 약 72% 이상의 고함유 분획물 53g을 수득하였다.

[48]

[49] 결정화 단계

[50] 수득된 53g의 1-데옥시노지리마이신 고함유 분획에 100~150배 부피의 99.9% 에탄올(ethanol)을 첨가하여 교반하면서 0°C에서 4시간 이상 냉각시켰다. 결정이 형성되면 구멍 크기 0.22 um 이하의 여과장치를 통과시켜 여과되지 않은 백색 파우더 형태의 1-데옥시노지리마이신을 수득하였고, 이를 열 또는 동결 건조하여 용매를 완전히 제거하였다. 그 결과, 7.38g의 1-데옥시노지리마이신이 수득되었으며, HPLC 분석 결과 97.2% 이상의 순도를 나타내었다.

[51]

[52] <실험예>

[53] 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물 평가

[54] 상기 실시예에 따라 수득한 대두발효분말의 음이온교환수지 적용 유무에 따른 저급 지방산 화합물의 변화를 HS-SPME-GC/MS를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 음이온교환수지 적용 대두발효물에서 특유 이취 성분에 해당하는 저급 지방산 화합물, 특히 2-메틸 뷰티르산(2-Methyl butyric acid), 이소 뷰티르산(Isobutyric acid), 3-메틸 뷰티르산(3-Methyl butyric acid), 뷰티르산(Butyric acid)의 제거가 확인됨에 따라 이취 감소를 확인하였다.

[55] [표 1]

Peak #	Compound	MF	MW	Area (Area%)	
				처리전	처리후
8	Isobutyric acid	C4H8O2	88	3,648,029 (21.27%)	N.D.
9	Butyric acid	C4H8O2	88	156,161 (0.91%)	N.D.
14	3-Methyl butyric acid	C5H10O2	102	1,826,523 (10.65%)	N.D.
16	2-Methyl butyric acid	C5H10O2	102	8,168,718 (47.61%)	126,746 (1.54%)
Total				13,799,431 (80.44%)	126,746 (1.54%)

[57] 1-데옥시노지리마이신 함량 및 이취 관능평가

[58] 실시예에 따라 제조된 대두발효액의 10%(w/v)에 해당하는 부피의 이온교환수지로서 TRILITE AW90, TRILIT SAR10, Amberlite CG50, Dowex 1x2, 합성흡착제로 DIAION HP20, 합성 filter agent로써 Celite 545 (규조토), Active carbon(활성탄)을 각각 적용하였다. 적용된 발효액은 25°C에서 1시간 동안 교반하고 여과하여 1-데옥시노지리마이신의 함량 변화를 HPLC를 이용하여 분석하고 그 결과를 도 2에 나타내었다. 이후, 제조된 각각의 시료에 대한 관능검사는 20~50세 성인 남녀 각각 15명씩을 무작위로 추출하여 5점 등급제(1은 냄새가 가장 강한 시료부터 5는 냄새가 가장 약한 시료)를 적용하여 5점 만점 점수제를 채택하여 관능검사를 실시하여 그 결과를 표 2에 나타내었다. 관능검사 총계에서 50점 이하인 발효액, AW90, HP20, 규조토는 냄새의 정도를 +++로 나타내었으며, 69~70점에 해당하는 Amberlite, Dowex는 ++로, 104점에 해당하는 활성탄은 +로, 150점 만점 중 141점인 SAR10의 경우 백분율로 94% 정도 개선된 것으로 -로 나타내었다(표 3).

[59] [표 2]

[60]

평가자	발효액	AW90	HP20	규조토	Amberlite	Dowex	활성탄	SAR10
1	1	1	2	1	2	3	4	4
2	1	1	1	1	3	2	3	5
3	1	1	1	1	2	2	3	5
4	1	1	1	1	2	4	3	5
5	1	2	1	1	3	3	4	5
6	1	1	1	1	3	2	3	5
7	1	2	1	3	2	2	3	4
8	1	1	1	1	3	2	4	5
9	1	2	1	2	2	3	3	5
10	1	1	1	1	3	2	3	5
11	1	1	1	1	2	3	3	5
12	1	1	2	1	4	2	3	5
13	1	1	2	1	2	3	4	3
14	1	1	2	1	2	2	4	4
15	1	1	1	2	2	2	4	4
16	1	1	1	1	3	2	3	4
17	1	1	1	2	2	2	2	5
18	1	2	1	1	2	2	3	5
19	1	1	1	1	2	2	3	5
20	1	1	1	1	2	2	4	5
21	1	1	2	1	2	2	4	5
22	1	1	1	2	2	2	4	5
23	1	2	1	1	2	2	4	5
24	1	2	1	1	2	2	3	4
25	1	1	1	1	2	3	4	5
26	1	1	1	1	2	2	4	4
27	1	1	1	1	3	2	4	5
28	1	1	1	1	2	3	4	5
29	1	1	2	1	2	3	4	5
30	1	1	2	1	2	2	3	5
총계	30	36	37	36	69	70	104	141

[61] 도 2, 표 2 및 표 3에서 나타내는 바와 같이, TRILITE SAR10 레진을 적용하였을 때, 1-테옥시노지리마이신의 함량이 가장 많이 증대되고 이와 동시에 이취도 감소되는 것으로 확인되었다.

[62] [표 3]

[63]

샘플명	발효액	AW90	HP20	규조토	Amberlite	Dowex	활성탄	SAR10
DNJ 함량(%)	16.43	20.77	19.81	17.96	10.41	22.14	19.63	35.24
이취평가	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-

[64]

1-데옥시노지리마이신(DNJ) 정제 비용 및 소요시간 비교

[65]

본 발명의 일 실시예에 따른 방법(신규, 도 1)과 종래기술(대한민국 등록특허 10-0477039 참조)에 따른 방법(기존, 도 3)을 적용하여

1-데옥시노지리마이신(DNJ)를 정제하고, 각 방법에 따른 정제 비용 및 정제 소요 시간을 분석하여 표 4에 나타내었다. 분석 결과, 본 발명의 일 실시예에 따른 방법이 비용 및 시간 면에서 훨씬 경제적인 것으로 확인되었다.

[66]

[표 4]

[67]

DNJ 정제(30L 발효액 기준)						
	기존			신규		
	구분	비용	시간	구분	비용	시간
발효액	30L	-	120hr	30L	-	120hr
이온교환수지(SAR10)	-	-	-	2.4kg	19,680	3hr
공정비용 (A)	1,609,000			1,999,000		
정제	엠버리스트	3,000,000	6hr	Silica gel	420,847	5hr
	도엑스	880,000	6hr			
	엠버라이트	2,000,000	6hr	결정화	89,064	5hr
	도엑스	880,000	6hr			
정제비용 (B)	99% DNJ	6,760,000	24hr	97% DNJ	509,911	10hr
수득량 (총 단가=A+B/수득량)	99% 이상 1.8g (4,649,000/g)			99% 이상 7.38g (339,960/g)		

청구범위

- [청구항 1] 대두분을 포함하는 배양액에 바실러스 서브틸리스 균주를 접종 후 배양하여 대두발효액을 제조하는 단계(단계 a);
상기 대두발효액에 음이온교환수지를 넣고 교반 후, 여과하여 여과액을 얻는 단계(단계 b); 및
상기 여과액을 농축 또는 건조시켜 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 대두발효분말을 제조하는 단계(단계 c)를 포함하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 방법은, 대두 발효물의 이취를 저감시키고, 1-데옥시노지리마이신의 함량을 증대시키는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 방법은, 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물을 저감시키는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 저급 지방산은 탄소수 1 내지 6으로 구성된 지방산 또는 이들의 염으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 5] 청구항 3에 있어서,
상기 저급 지방산은 뷰티르산, 이소뷰티르산, 2-메틸 뷰티르산, 3-메틸 뷰티르산, 프로피온산, 2-메틸 크로톤산 및 4-메틸발레르산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 배양액은 함수결정포도당을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 바실러스 서브틸리스 균주는, 바실러스 서브틸리스 모리 균주(KCCM 10450)인 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 단계 a에서 바실러스 서브틸리스 균주는, 상기 배양액 부피의 0.1 ~ 20 (v/v)%로 접종되어 20 ~ 50 °C에서 배양되는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서,
상기 음이온 교환 수지는 4차 암모늄 관능기를 가지며, OH 또는 Cl⁻를 교환이온으로 가지는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서,

상기 음이온 교환 수지는 강염기성 이온교환수지인 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.

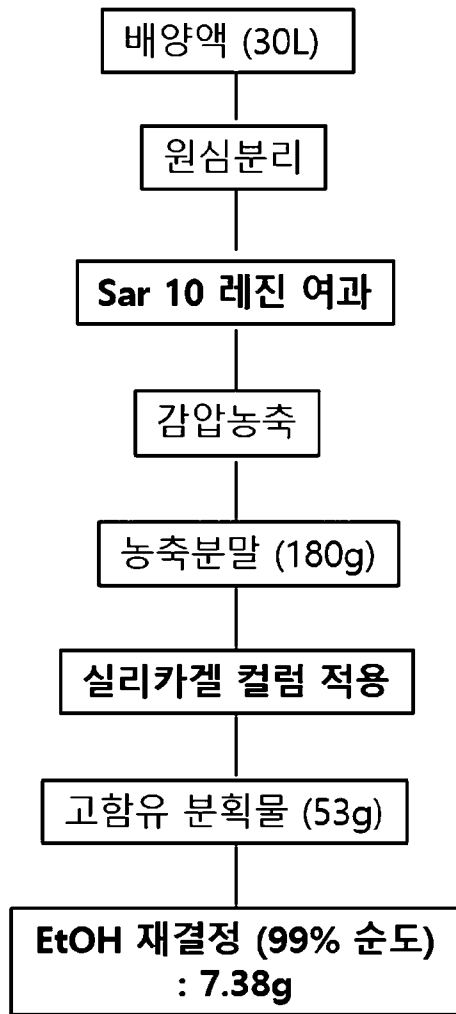
- [청구항 11] 청구항 1에 있어서,
상기 음이온교환수지는 대두발효액 100 중량부에 대하여 3 ~ 30 중량부로 첨가되는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 12] 청구항 1에 있어서,
상기 단계 b의 교반은 음이온교환수지를 넣고 20-80°C에서 10~180분 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 13] 청구항 1에 있어서,
상기 단계 c 이후, 실리카 겔 컬럼을 이용하여 정제하는 단계 및 에탄올을 첨가하여 결정화하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 대두발효물의 제조방법.
- [청구항 14] 대두분을 포함하는 배양액에 바실러스 서브틸리스 균주를 접종 후 배양하여 대두발효액을 제조하는 단계;
상기 대두발효액에 음이온교환수지를 넣고 교반 후 여과하여 여과액을 얻는 단계; 및
상기 여과액을 농축 또는 건조시켜 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 대두발효분말을 제조하는 단계를 포함하는, 대두발효물의 이취 저감방법.

요약서

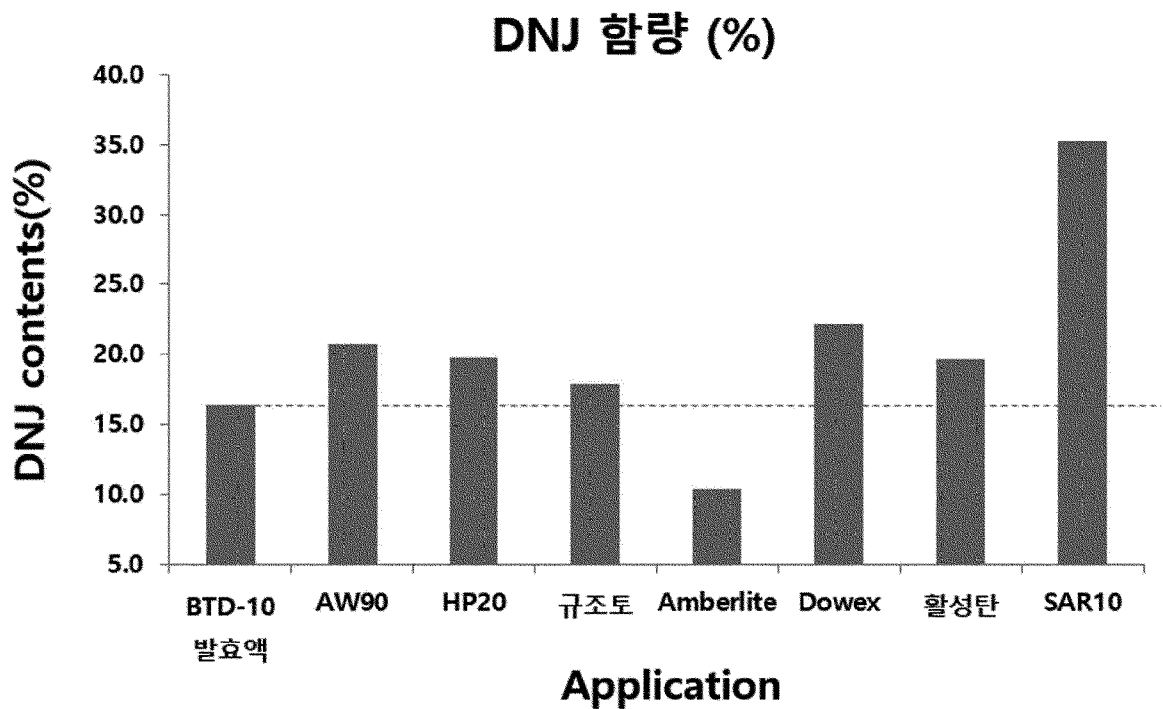
본 발명은 바실러스 서브틸리스 균주를 이용한 대두발효물의 제조방법과 대두발효물의 이취 저감방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 대두발효물의 특유 이취 성분에 해당하는 저급 지방산(short chain fatty acids) 화합물을 유의성 있게 저감시킬 수 있고 1-데옥시노지리마이신의 함량을 증대시킬 수 있다. 이에 따라 이취가 감소된 식품 또는 건강 기능 식품 원료를 제공할 수 있다.

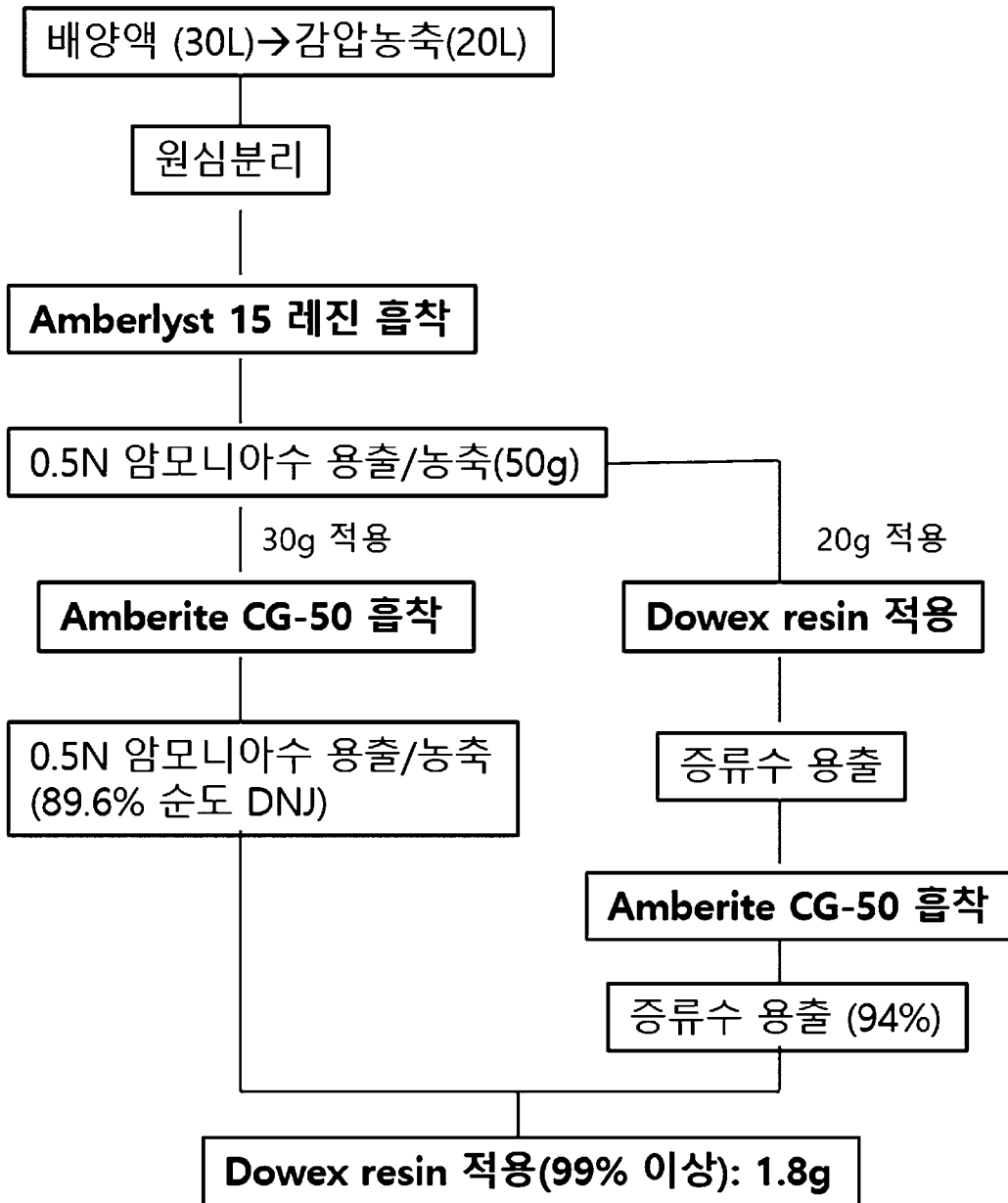
[도1]



[도2]



[도3]



[도4]

