



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월26일  
(11) 등록번호 10-2548494  
(24) 등록일자 2023년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/16 (2006.01) A23L 5/46 (2016.01)  
C12R 1/685 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 1/16 (2013.01)  
A23L 5/46 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2021-0013143  
(22) 출원일자 2021년01월29일  
심사청구일자 2021년01월29일  
(65) 공개번호 10-2022-0109750  
(43) 공개일자 2022년08월05일  
(56) 선행기술조사문헌  
CN102197847 A  
한국콩연구회지, 제11권, 2호, 33-41면(1994) 1부.\*  
CN100418440 C  
KR1020020019801 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
세종대학교산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)  
(72) 발명자  
신학동  
서울특별시 관악구 관악로 304, 102동 104호  
정윤선  
경기도 군포시 용호2로 11, 208동 2104호  
(74) 대리인  
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

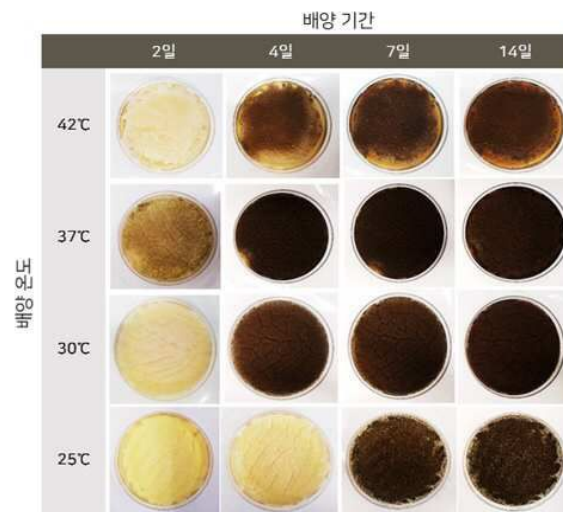
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 비지를 주성분으로 포함하는 흑국균 배양용 배지 및 이를 이용한 흑국 제조방법

(57) 요약

본 발명은 비지를 주성분으로 포함하는 흑국균 배양용 배지 및 이를 이용한 흑국 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)를 비지에 접종하여 배양함으로써 고농도의 흑색소를 함유하는 흑국(black koji)을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 비지를 주성분으로 한 배지에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406를 접종함으로써 고농도의 흑색소를 고르고 넓게 발현할 수 있는 흑국 제조방법을 제공할 수 있다. 또한, 이로부터 생산된 흑색소는 안전하고 기존 상업화된 타르계 및 오징어먹물 유래 흑색소를 대체하며, 비건(vegan) 식품에 적용하기 위한 천연 흑식품색소로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류  
*C12R 2001/685* (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545021332
과제번호	119025021HD040
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	맞춤형혁신식품및천연안심소재기술개발(R&D)
연구과제명	흑국균의 경제적 대량배양 기술 개발 및 흑국(black koji) 제조
기여율	1/1
과제수행기관명	세종대학교산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31
공지예외적용	: 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

비지에 증류수를 첨가하여 제조된 배지에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406 (ATCC 16513)를 접종하는 단계 (a); 및

상기 단계 (a) 후, 상기 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406 (ATCC 16513)가 접종된 배지를 배양하는 단계 (b);를 포함하는 것을 특징으로 하는 천연 식용흑색소의 제조방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

상기 배지는,

비지에, 비지 대비 0.1~4배 부피로 증류수를 첨가하는 단계 (가); 및

상기 단계 (가) 후, 15~25℃에서 0.5~1.5시간 반응시킨 후, 멸균하여 반고형 형태로 제조하는 단계 (나);를 포함하는 과정으로부터 제조된 것임을 특징으로 하는 천연 식용흑색소의 제조방법.

**청구항 3**

삭제

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 비지를 주성분으로 포함하는 흑국균 배양용 배지 및 이를 이용한 흑국 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)를 비지에 접종하여 배양함으로써 고농도의 흑색소를 함유하는 흑국(black koji)을 제조하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 기존 식품업계에서 활용하는 오징어먹물 유래 흑색소는 다양한 블랙푸드(black food)에 사용되고 있다. 하지만, 오징어먹물 유래 흑색소는 높은 가격(30,000원/kg)을 형성하고 있고, 정제가 불충분한 경우 비린내와 같은 특유의 이취가 존재하며, 오징어의 생산량에 따라 생산 및 공급이 불안정하다는 문제가 있다. 또한, 동물성 원료로부터 생산되기 때문에 현재 성장하고 있는 비건(vegan) 제품에는 적용이 불가능하다는 단점을 가지고 있다.

[0003] 한편, 타르계 흑색소는 석탄 타르로부터 합성된 인공색소로 독성이 강해 엄격한 기준규격에 따라 사용되고, 캐러멜 색소는 제조 시 설탕, 암모니아 및 유허의 화학작용으로 생산되며 암모니아의 첨가로 인해 발암물질인 4-메틸이미다졸(methylimidazole)을 함유하고 있을 가능성이 있어 안전성에 대한 문제가 있다.

[0004] 국내 건강식품에 대한 소비자들의 수요가 급격히 증가함에 따라 천연 색소의 국내 시장이 확대되고 있으며, 국내 천연 식용색소의 생산량은 2014년 5,070 MT에서 2017년 6,058 MT 수준으로 증가하여 연평균 4.6% 이상의 성장세를 보이고 있다. 하지만, 국내 식용색소 생산의 80% 이상 비중은 캐러멜 색소에 치우쳐져 있으며, 그 외 식용색소 생산 증가는 미비한 수준으로 천연색소 생산 원천 기술 확보는 국내 천연 식용색소 생산 확대를 위해 절실히 필요한 실정이다(식품의약품안전처, 식품 및 식품 첨가물 생산실적 통계집, 2014~2017).

[0005] 식품, 사료 및 의약품에서 활용 가능한 새로운 유용 균주를 확보하기 위해 인체내 분변, 특이 환경(고온 미생물 등) 등에서부터 GRAS(Generally Recognized As Safe) 인증을 통한 용이한 획득을 위해 전통발효식품에서 확보하고자하는 시도로 진행되고 있다. 그 중 섬유성 곰팡이는 화학적으로 다양한 착색제를 쉽게 얻을 수 있는 자원으로 보고되며, 새로운 곰팡이 생산 균주에서 유래된 색소 및 안트라퀴노이드 착색제, 향상된 기능성 천연 식품

착색제 등에 대한 연구가 진행되고 있다. 합성 첨가물을 대체하기 위한 소비자의 요구가 증가함에 따라 식품 내 활용할 수 있는 색소 및 천연 착색제 자원으로 사상 균류를 사용하는 현재의 가능성과 잠재력이 유망하다. 이에 따라 새로운 식품 색소 및 천연 착색제 자원을 개발하는 것이 필요한 실정이다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2009-0092557호 (공개일자: 2009.09.01)에는, (1)원재료인 딸기를 열매 단독 혹은 꼭지, 잎, 줄기를 혼합시킨 상태에서 세척한 후 분쇄하는 단계, (2)원재료에 흑국 (*Aspergillus s p.*)을 원재료의 5-20분지 1의 비율로 접종하는 단계, (3)원활한 발효를 위하여 쌀겨, 포도당, 과당, 또는 증자한 곡물 등과 같은 당류를 중량비 10-20%를 첨가하는 단계, (4)접종한 원재료를 발효 상자나 발효기에 넣어 실온 25-35℃에서 48-72시간 발효하며 때때로 흔들여 산소 공급을 원활히 하는 단계, (5)발효된 원재료의 물을 거즈나 압착기 등을 이용하여 고형분만을 제거하여 발효원액을 얻는 단계를 포함한 딸기발효액 제조방법이 기재되어 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명은 비지를 주성분으로 배지를 제조하였고, 상기 배지에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)을 접종하고 이를 배양함으로써 고농도의 흑색소가 넓고 고르게 발현하는 흑국(black koji) 제조 방법을 구축하여 제공하고자 한다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 본 발명은 비지에 증류수를 첨가하여 제조된 배지에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)를 접종하는 단계 (a); 및 상기 단계 (a) 후, 상기 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)가 접종된 배지를 배양하는 단계 (b);를 포함하는 것을 특징으로 하는 흑국의 제조방법을 제공한다.

[0009] 한편, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 배지는, 바람직하게 비지에, 비지 대비 0.1~4배 부피로 증류수를 첨가하는 단계 (가); 및 상기 단계 (가) 후, 15~25℃에서 0.5~1.5시간 반응시킨 후, 멸균하여 반고형 형태로 제조하는 단계 (나);를 포함하는 과정으로부터 제조된 것일 수 있다.

[0010] 한편, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)는, 일례로 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406 (ATCC 16513)인 것일 수 있다.

**발명의 효과**

[0011] 본 발명은 비지를 주성분으로 한 배지에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406를 접종함으로써 고농도의 흑색소를 고르고 넓게 발현할 수 있는 흑국 제조방법을 제공할 수 있다. 또한, 이로부터 생산된 흑색소는 안전하고 기존 상업화된 타르계 및 오징어먹물 유래 흑색소를 대체하며, 비건(vegan) 식품에 적용하기 위한 천연 흑식품색소로 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0012] 도 1은 배양 온도 및 배양기간에 따른 본 발명 흑국균 DBD-0406 균주의 흑색소 발현 정도를 비교한 결과이다.  
 도 2는 비지를 주성분으로 한 현탁 배지 배양 방법에서 증류수 첨가량 및 배양 기간에 따른 본 발명 흑국균 DBD-0406 균주의 흑색소 발현 정도를 비교한 결과이다.  
 도 3은 비지를 주성분으로 한 현탁 배지 배양 방법으로 확보한 흑국의 에탄올 색소 추출물 흡광도 분석 결과 그래프이다.  
 도 4는 본 발명 DBD-0406 균주 유전체 정보와 기존 표준 유전체 등록 균주(CBS 513.88) 정보와의 비교 결과 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

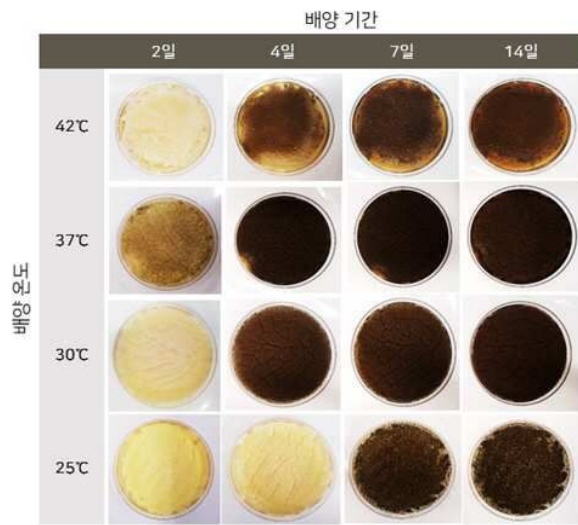
- [0013] 기존 식품업계에서 활용하는 오징어먹물 유래 흑색소는 다양한 블랙푸드(black food)에 사용되고 있지만, 높은 가격, 특유의 이취 및 생산, 공급의 불안정성 등의 여러 문제가 있다. 또한, 동물성 원료로부터 생산되기 때문에 현재 성장하고 있는 비건(vegan) 제품에는 적용이 불가능하다는 단점을 가지고 있다. 한편, 그외 사용되는 타르계 흑색소나 캐러멜 색소는 독성과 발암물질 함유 등의 안정성에 대한 문제를 가지고 있다. 이에 따라 식용 색소로 사용하기 위한 안전한 천연색소 생산 기술을 확보하는 것이 필요한 실정이다.
- [0014] 한편, 종래에 곡물에 흑국균을 접종하여 흑국을 제조할 시, 흑국(또는 흑색)이 국소적으로만 발현되거나, 흑색의 발현이 고르지 않게 나타나는 한계가 존재하였다. 이에 본 발명에서는 이러한 문제를 해결하고자 예의 노력하였고, 비지를 첨가하여 제조된 배지에 아스퍼질러스 나이거를 접종하여 배양하되, 여러 번의 실험을 시도한 끝에 흑색이 넓게 발현되면서, 색의 발현이 고르게 나타나는 흑국 제조 방법을 완성하였다.
- [0015] 본 발명은 비지에 증류수를 첨가하여 제조된 배지에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)를 접종하는 단계 (a); 및 상기 단계 (a) 후, 상기 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)가 접종된 배지를 배양하는 단계 (b);를 포함하는 것을 특징으로 하는 흑국의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 한편, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 배지는, 바람직하게 비지에, 비지 대비 0.1~4배 부피로 증류수를 첨가하는 단계 (가); 및 상기 단계 (가) 후, 15~25℃에서 0.5~1.5시간 반응시킨 후, 멸균하여 반고형 형태로 제조하는 단계 (나);를 포함하는 과정으로부터 제조된 것일 수 있다. 더 바람직하게는, 상기 단계 (가)에서, 비지 대비 0.1~1.5배 부피로 증류수를 첨가하는 것이 좋다. 상기 조건을 포함함으로써 제조된 반고형 배지를 사용함으로써 흑색이 넓게 발현되면서, 색의 발현이 고르게 나타나는 흑국을 제조할 수 있었다.
- [0017] 한편, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 (a)는, 비지에 증류수를 첨가하여 제조된 배지에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)를 접종하는 것이 어느 것에든 제한되어 있지는 않으나, 바람직하게는  $10^7 \sim 10^9$  cell/ml로 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)를 접종하는 것이 좋다.
- [0018] 한편, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)는 어느 것에든 제한되지는 않으나, 일례로 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406 (ATCC 16513)일 수 있다.
- [0019] 한편, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 (b)는, 바람직하게 상기 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)가 접종된 배지를 25~42℃에서 2~14일간 배양하는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 30~40℃에서 4~9일간 배양하는 것이 좋다. 이러한 조건에서 배양함으로써 넓은 범위에서, 흑색의 발현이 고르게 나타나는 데 최적의 조건을 성립할 수 있었다.
- [0020] 한편, 하기 실험에 의하면, 본 발명은 비지에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406를 접종하고 배양함으로써, 고농도의 흑색소를 발현하는 목적의 흑국을 생성하는데 적합함을 확인할 수 있었다. 특히, 기존 기술의 한계를 극복하여 흑색소를 넓게 발현하면서, 색의 발현이 고르게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 본 발명에서 사용한 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406은 기존 흑국균 표준 균주와 동일한 크로모솜을 가지며, 유전체 크기는 상회하되, 독소 관련 요소들이 검출되지 않아 안전한 균주임을 확인할 수 있었다.
- [0021] 즉, 본 발명은 비지를 주성분으로 포함하는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) DBD-0406 배양용 배지 및 이를 이용한 흑국 제조방법을 통해 고농도의 흑색소를 넓은 범위로, 색의 발현 정도가 고르게 발현하여 천연 식용색소로서의 활용성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.
- [0022] 한편, 본 발명에서 제조한 흑국은 색소로 활용하기 위한 방법이 당업계에 공지된 기술이라면 어느 것에든 제한되지 않으나, 일례로 분말 등의 형태로 분쇄하고 이를 채취하여 색소로 활용할 수 있다.
- [0024] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예 또는 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0026] **[실시예 1: 비지를 주성분으로 한 흑국균 배양용 배지 제조 및 배양]**
- [0027] 본 실시예에서는 비지(대두가공부산물)를 주성분으로 한 흑국균 배양용 배지를 제조하고 흑국균을 배양하여 최적 조건을 규명하였다.
- [0029] **1) 일반 평판 한천 배지에서 흑국균의 흑색소 발현 정도 비교**

- [0030] 흑국균(*Aspergillus niger* var. *macrosporus* Koaze DBD-0406 (ATCC 16513), KCCM으로부터 분양받음) 균주를 Yeast Malt(YM) 평판 한천 배지에서 37℃에서 일주일 이상 배양하고 분생포자를 채집하여 10 ml 멸균 증류수에 현탁하여 추후 종균(농도  $10^8$  cell/ml)으로 활용하였다. 상기 방법으로 얻어진 종균 100  $\mu$ l를 배양 온도(25~42℃) 및 배양 기간(2~14일)에 따라 배양한 뒤, 이의 흑색소 발현정도를 비교관찰하였다. 그 결과, 도 1과 같이 37℃에서 배양 시작 후, 4일 이후부터 뚜렷한 흑색을 나타내기 시작했다. 특히, 37℃에서 7일간 배양하였을 때 가장 효과적으로 흑색소를 발현함을 확인하였고, 이 조건이 흑색 발현 목적의 흑국 생성에 적합함을 확인할 수 있었다.
- [0032] **2) 비지를 주성분으로 한 배지에서 흑국균의 흑색소 발현 정도 비교**
- [0033] 기존 상용 배양배지에 비하여 경제적인 측면의 산업 활용도를 높이기 위해 비지를 주성분으로 하는 배지 및 배양방법을 구축하고자 했다. 비지에 증류수를 0.1~4배 부피로 첨가하고, 실온에서 1시간 반응시킨 후, 멸균하여 반고형 형태로 만든 배지에 상기 흑국균(*Aspergillus niger*) DBD-0406 종균을  $10^8$  cell/ml으로 접종하여 37℃에서 190 rpm으로 현탁 배양을 4일~7일간 진행하였다.
- [0034] 배지 내 증류수 첨가량 및 배양 기간에 따른 흑색소 발현 정도를 비교한 결과, 도 2와 같이 37℃에서 190 rpm으로 7일간 배양하였을 때, 증류수를 비지 대비 1배 첨가한 배지 조건에서 가장 효과적으로 흑색소를 발현함을 확인하였고, 이 조건이 흑색 발현 목적의 흑국 생성에 적합함을 확인할 수 있었다.
- [0036] **3) 비지를 주성분으로 한 흑국균 배양용 배지 배양을 통한 흑국 에탄올 추출물의 자외선-가시광선 흡광도 분석**
- [0037] 비지를 주성분으로 한 흑국균 배양용 배지 배양을 통한 흑국 에탄올 추출물의 자외선-가시광선 흡광도를 분석하였다. 이를 위해 주사 자외선-가시광선 흡광도기(Scanning UV-Vis spectrophotometer)를 이용하였다.
- [0038] 비지에 증류수를 0.1~4배 부피로 첨가한 뒤, 멸균하여 반고형 형태로 만든 배지에 상기 흑국균(*Aspergillus niger*) DBD-0406 종균을  $10^7$  cell/ml으로 접종하여 37℃에서 190 rpm으로 현탁 배양을 7일간 진행하였다. 이를 통해 확보된 흑국에 100% 에탄올 20 ml을 첨가한 후 상층액을 이용하여 흡광도 분석을 수행하였다. 비지를 주성분으로 한 배지에서 확보된 흑국 에탄올 추출물의 흡광도값을 배지 내 증류수 첨가량에 따라 비교한 결과, 도 3과 같이 비지 대비 1배로 증류수를 첨가한 조건에서의 흑국 에탄올 추출물이 자외선-가시광선 파장범위에 고르게 흡광도를 보임으로써 고른 흑색을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 400 nm에서도 가장 높은 흡광도 값을 보임으로써, 흑색 색소 목적의 흑국 배양에 대두가공부산물 대비 1배의 증류수 첨가 배양 조건이 가장 적합함을 확인할 수 있었다.
- [0040] **[실험예 1: 본 발명에 사용된 흑국균의 유전체 분석]**
- [0041] 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 사용된 흑국균(*Aspergillus niger*) DBD-0406의 유전체 분석을 통해 안정성을 규명하고자 하였다.
- [0042] 본 발명에서 사용된 흑국균(*Aspergillus niger*) DBD-0406은 산업적으로 시트르산(citric acid, E330)이나 글루콘산(gluconic acid, E574) 등의 유기산 및 다양한 효소를 생산하는 발효미생물로 활용되어 안전성이 검증되었다. 다만, 최근 식품 내 미생물에 대한 유전체 기반 안전성 검증이 강조되고 있어 본 균주의 전장 유전체 확보를 위하여 Pacbio사의 Sequel 장비로 차세대염기서열분석을 수행하였다.
- [0043] 기존 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)에 등록된 표준 유전체(genome) 균주인 흑국균(*Aspergillus niger*) CBS 513.88은 총 8개의 크로모솜(chromosome)을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 본 발명에서 사용된 흑국균(*Aspergillus niger* var. *macrosporus* Koaze DBD-0406)의 유전체 분석 결과 표준 유전체 균주(CBS 531.88)와 동일한 8개의 크로모솜(chromosome)을 규명하였으며, 도 4와 같이 전체 유전체 크기가 기존 표준 균주보다 커지는 것으로 파악되었다. 또한, 흑국균(*Aspergillus niger*) DBD-0406의 상세 유전체 분석 결과 총 10902개의 유전자를 규명하였으며, 기존 흑국균(*Aspergillus niger*) 균주가 가질 수 있는 것으로 보고된 독소 관련 요소(말포민(malfomin), 나프토-감마-피론(naphtho- $\gamma$ -pyrone), 니제라자인(nigerazaine), 니그라길린(nigragillin), 오크라톡신(ochratoxin) A, 옥살산(oxalic acid)은 모두 검출되지 않아서 안전한 균주임을 유전체 수준에서 확인하였다.



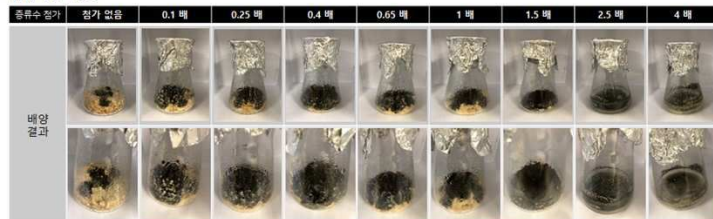
도면

도면1

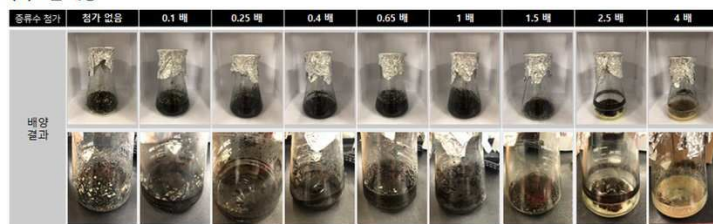


도면2

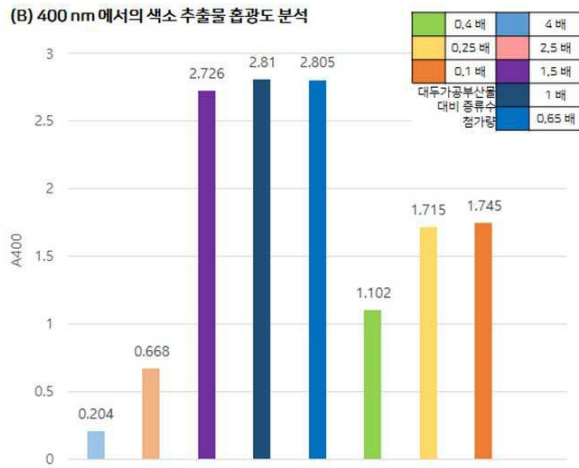
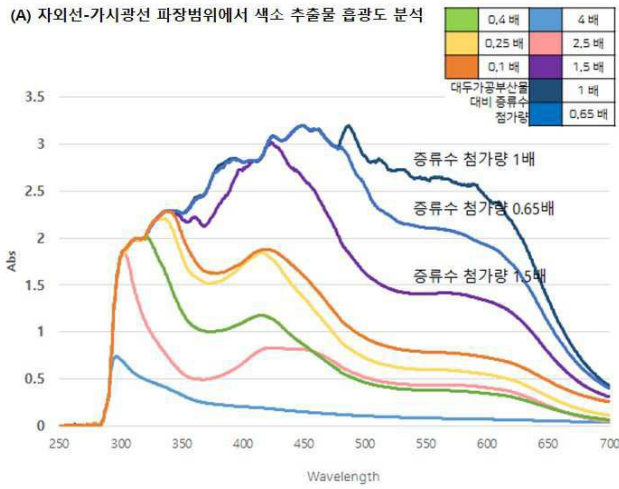
(A) 4일 배양



(B) 7일 배양



도면3



도면4

