

명세서

발명의 명칭: 모든 종류의 필수 아미노산을 포함하는 군사체를 생성하는 아스퍼질러스 오리제 균주

기술분야

- [1] 본 출원은 신규한 아스퍼질러스 오리제 균주와 이로부터 생성된 군사체에 관한 것이다. 또한, 아스퍼질러스 오리제 균주에서 군사체를 대량 생산하여 군사체를 제조하는 방법, 이 방법에 의해 제조된 군사체를 이용한 식품에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 환경문제와 인구증가로 인한 식량안보에 대한 경각심이 높아지고 있는 상황에서 지속가능성을 고려하여 대체 식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 또한 최근에는 건강에 대한 관심이 높아지면서 고단백, 저열량 또는 저지방의 식품에 대한 요구가 증가하여 육류 대체식품 및 대체단백질에 대한 시장 규모가 더욱 증가할 것으로 예상된다. 이러한 상황에서 축산으로부터 얻은 육류를 대체하는 단백 소재로 식물성 단백질이 사용되고 있다. 그 중에서 단백질이 풍부한 대두를 이용한 식물성 고기가 주로 사용되고 있으나, 대두 식물성 고기는 압출성형공정으로 육류의 외형을 갖추더라도 육류 특유의 조직감을 재현하는 데에는 한계가 있다. 대두 이외의 식물성 단백 소재로서 섬유상 구조를 지닌 버섯의 군사를 사용하는 것이 검토되고 있으나, 버섯 군사체는 대두 단백질에 비해 상대적으로 단백질 함량이 낮다는 한계점이 존재한다. 따라서 단백질 함량이 높은 다른 육류 대체 단백 소재의 개발이 필요한 실정이다.
- [3] 곰팡이는 발효 식품과 알코올 음료를 포함한 다양한 식품 및 음료 생산을 위해 오랫동안 사용되어온 식재료이다. 곰팡이를 액체배지에서 배양하는 경우, 포자를 형성하지 않고 곰팡이가 생성하는 군사체만 획득이 가능하다. 이러한 배양법을 통해 얻은 곰팡이 군사체는 단백질 함량이 높고, 섬유상 구조를 가져 육류의 조직감을 내는데 유리하다. 또한 곰팡이가 생성하는 군사체는 글루탐산의 함량이 높아 감칠맛이 있으면서도 무미(無味)이므로, 식품에 첨가되는 다양한 제품으로 활용될 수 있다. 뿐만 아니라 곰팡이가 생성하는 군사체는 식이섬유가 풍부하고, 혈중 콜레스테롤을 감소하는 효과가 있다고 알려져 있다.
- [4] 대한민국 등록특허 제10-1760184호는 식용 곰팡이 균주인 아스퍼질러스 소제(*Aspergillus sojae*) 균주의 군사체를 콩에 접종하여 배양함으로써 콩의 글리세올린 I 함량을 증가시키는 방법을 제시하고 있고, 대한민국 등록특허 제10-1929346호에는 아스퍼질러스 오리제 균주를 이용하여 쌀알 누룩을 제조하는 방법을 제시하고 있으나, 곰팡이 균주를 배양하여 아미노산 조성이 우수한 군사체를 얻는 방법에 대해서는 개시하고 있지 않다. 이에, 본 출원의 발명자들은 메주에서 유래한 신규한 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 균주가 모든

종류의 필수 아미노산으로 구성된 군사체를 생산함을 확인하고 본 출원을 완성하였다.

[5] [선행기술문헌]

[6] [특허문헌]

[7] (특허문헌 1) 대한민국 등록특허 제10-1760184호

[8] (특허문헌 2) 대한민국 등록특허 제10-1929346호

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 출원은 메티오닌을 포함하는 군사체를 생성하는 신규한 아스퍼질러스 오리제 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[11] 또한, 본 출원은 상기 균주로부터 생성된 군사체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[12] 또한, 본 출원은 상기 균주로부터 군사체를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[13] 또한, 본 출원은 상기 균주로부터 생성된 군사체를 포함하는 식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[14]

과제 해결 수단

[15] 본 출원의 일 양태에 따르면, 메티오닌을 포함하는 아미노산 조성을 가진 군사체를 생성하는 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주 (기탁번호: KCCM13053P)를 제공한다.

[16] 본 출원의 다른 일 양태는, 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주로부터 생성되는 군사체를 제공한다.

[17] 본 출원의 다른 일 양태는, 배지에서 아스퍼질러스 오리제 CJI1100균주를 배양하여 군사체를 생성하는 단계 및 상기 군사체를 회수하는 단계를 포함하는 군사체의 제조방법을 제공한다.

[18] 본 출원의 다른 일 양태는, 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주로부터 생성된 군사체를 포함하는 식품을 제공한다.

[19]

[20] 이하, 본 출원에 대해 상세히 설명한다.

[21]

[22] 본 출원의 일 양태는, 메티오닌을 포함하는 아미노산 조성을 가진 군사체를 생성하는 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주(기탁번호: KCCM13053P)를 제공한다.

[23] 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주는 전통 메주로부터 분리된 신규한 균주로서, 메티오닌을 포함하여 모든 종류의

- 필수아미노산을 포함하는 균사체를 생성하는 특성을 갖는다.
- [24] 본 출원의 상기 균주는 2021년 10월 05일 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 기탁하여 KCCM13053P호로 기탁 번호를 부여 받았다.
- [25] 일 구현예에서, 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주가 생성하는 균사체의 아미노산 조성은 메티오닌을 포함한다.
- [26] 일 구현예에서, 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주가 생성하는 균사체의 아미노산 조성은 리신, 트레오닌, 발린, 아이소류신, 류신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘으로 이루어지는 균에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 더 포함할 수 있다.
- [27] 일 구현예에서, 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주는 서열번호 1의 18S rRNA 서열을 암호화하는 DNA 서열을 포함한다.
- [28] 일 구현예에서, 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주는 아플라톡신을 생성하지 않는다.
- [29]
- [30] 본 출원의 다른 양태는, 상기 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주로부터 생성된 균사체를 제공한다.
- [31] 본 출원에서 "균사체"는 곰팡이의 균사(hypha)가 촘촘하게 엮힌 상태로 자란 것을 총체적으로 일컫는다. 균사체는 곰팡이의 영양기관으로서, 곰팡이가 생성하는 균사체는 단백질 함량이 높다.
- [32] 일 구현예에서, 상기 균사체는 메티오닌을 포함하는 아미노산 조성을 갖는다.
- [33] 일 구현예에서, 상기 균사체는 메티오닌을 포함하며, 리신, 트레오닌, 발린, 아이소류신, 류신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘으로 이루어지는 균에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 더 포함하는 아미노산 조성을 갖는다.
- [34] 일 구현예에서, 상기 균사체는 메티오닌을 포함하며, 리신, 트레오닌, 발린, 아이소류신, 류신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘으로 이루어지는 균에서 선택되는 둘 이상, 셋 이상, 넷 이상, 다섯 이상, 여섯 이상, 일곱 이상, 또는 여덟 이상의 아미노산을 더 포함하는 아미노산 조성을 갖는다.
- [35] 일 구현예에서, 상기 균사체는 메티오닌, 리신, 트레오닌, 발린, 아이소류신, 류신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘을 포함한 아미노산을 조성을 갖는다.
- [36] 일 구현예에서, 상기 균사체는 100g의 건조 단백질 중량에 대해 0.4g 이상, 0.5g 이상, 0.6g 이상, 0.7g 이상, 0.8g 이상, 0.9g 이상, 1g 이상, 1.1g 이상, 또는 1.2g 이상의 메티오닌(Met) 함량을 갖는다.
- [37] 일 구현예에서, 상기 균사체는 100g의 건조 단백질 중량에 대해 3.5g 이상, 3.6g 이상, 3.7g 이상, 또는 3.8g 이상의 아이소류신(Ile) 함량을 갖는다.
- [38] 일 구현예에서, 상기 균사체는 100g의 건조 단백질 중량에 대해 4g 이상, 4.1g 이상, 4.2g 이상, 또는 4.3g 이상의 글라이신(Gly) 함량을 갖는다.
- [39] 일 구현예에서, 상기 균사체는 100g의 건조 단백질 중량에 대해, 5g 이상 또는

6g 이상의 발린, 0.5g 이상 또는 1g 이상의 메티오닌, 2.5g 이상 또는 3.5g 이상의 아이소류신, 5g 이상 또는 6g 이상의 류신, 3g 이상 또는 4g 이상의 페닐알라닌, 1.6g 이상 또는 1.8g 이상의 히스티딘, 2g 이상 또는 2.3g 이상의 트립토판, 및 3.5g 이상 또는 4g 이상의 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 함량을 갖는다.

- [40] 일 구현예에서, 상기 군사체는 100g의 건조 단백질 중량에 대해 10g 이상, 11g 이상, 12g 이상, 13g 이상, 13.1g 이상, 또는 13.2g 이상의 글루탐산(Glu) 함량을 갖는다
- [41] 일 구현예에서, 상기 군사체의 건조물에서 건조 단백질 함량은 전체 건조물 중량에 대해서 30중량% 내지 70중량%의 함량으로 함유하는 것일 수 있으며, 구체적으로 35중량% 내지 70중량%, 40중량% 내지 60중량%일 수 있다.
- [42] 일 구현예에서, 상기 군사체는 곰팡이 독소인 아플라톡신을 포함하지 않는다.
- [43] 본 출원의 다른 양태는, 배지에서 아스퍼질러스 오리제 CJ1100 균주를 배양하여 군사체를 생성하는 단계, 및 상기 군사체를 회수하는 단계를 포함하는 군사체의 제조방법을 제공한다.
- [44] 상기 아스퍼질러스 오리제 CJ1100 균주를 배양하여 군사체를 생성하는 단계는 아스퍼질러스 오리제 CJ1100 균주를 분리하거나 포자를 배양하여 원균을 얻고, 이를 적절한 배지에 접종하여 배양 증식시켜 준비하는 접종원 준비단계와, 접종원으로부터 목적하는 군사체를 액체 배지에서 대량으로 증식하기 위한 본 배양단계를 포함할 수 있다.
- [45] 상기 원균은 CJ1100 균주의 자실체 조직 또는 포자를 배양한 배양물일 수 있다.
- [46] 상기 원균을 적절한 배지에 배양 증식시켜 접종원을 얻을 수 있다.
- [47]
- [48] 상기 접종원 준비단계에서 본 출원 균주 배양을 위한 배양 배지로 감자 텍스트로스 한천배지, 효모 맥아 포도당 배지 등의 영양배지를 사용할 수 있다.
- [49] 접종원을 제조하여 본 배양함으로써, 미생물학적으로 안정된 조건에서 순수배양한 균을 이용하여 대량의 종균을 준비할 수 있다.
- [50] 본 배양단계는 접종원으로부터 군사체를 배지에서 대량으로 증식시키는 단계이다.
- [51] 본 배양은 고체 배지 또는 액체 배지를 사용하여 배양될 수 있다.
- [52] 액체 배지에서 곰팡이를 배양하면 저비용이며, 잡균번식에 비교적 안전하고, 공정의 조절이 용이하며, 세포 외 효소, 군사체 및 포자 회수가 용이한 장점이 있다.
- [53] 본 출원에서 사용 가능한 액체배지로는 식용으로서 사용되는 군사체 배양에 이용할 수 있는 배지이면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들면, PDB 배지 또는 이와 동등한 성분으로 하는 것을 사용할 수 있다.
- [54] 액체배지의 탄소원으로는 일반적으로 군사체 배양에 이용되고 있는 것이라면

특별히 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들면 단당류나 이당류, 삼당 이상의 다당류, 전분, 또한 자당 제조 시에 부산물로서 발생하는 폐당밀과 같은 혼합 당류 등을 이용할 수 있다. 바람직하게는 글루코스, 말토스, 라미나리비오스, 감자전분, 옥수수전분을 이용할 수 있다.

- [55] 액체배지의 질소원으로는 일반적으로 곰팡이를 액체 배양할 때 첨가되는 성분을 사용할 수 있으며, 예를 들면 황산암모늄, 인산 암모늄, 탄산암모늄, 아세트산 암모늄, 펩톤, 효모 추출물, 콘스티프리카, 카세인 가수분해물, 밀기울, 고기 엑기스 등을 사용할 수 있다. 그 밖에, 액체 배지에 칼륨염, 마그네슘염, 나트륨염, 인산염, 망간염, 철염, 아연염 등의 무기염을 첨가할 수 있으며, 비타민, 또는 아미노산 등을 더 첨가할 수 있다.
- [56] 본 배양 과정 중 진탕 배양하거나 또는 액체배지의 교반을 수행할 수 있다. 상기 교반은 배양용기내의 교반기를 회전시켜 행할 수 있으며, 교반기의 회전수는 적절한 범위로 조절할 수 있으며, 예를 들어 1 - 300 rpm의 범위에서 조절할 수 있다.
- [57] 또한, 액체배지가 담긴 배양 용기 내로 여과된 공기 또는 압축공기를 불어 넣을 수 있으며, 이에 의해 액체배지와 곰팡이 균사체와의 접촉을 균일하게 하고, 정치된 액체상태에서 부족하기 쉬운 산소의 농도를 높일 수 있다.
- [58] 배양 온도는 곰팡이의 배양시 일반적으로 채택되는 온도에서 배양할 수 있고 특별히 제한은 없으나, 예를 들어, 5°C - 45°C, 10°C - 40°C, 20°C - 40°C, 25°C - 35°C의 온도범위에서 적절히 선택하여 배양할 수 있다.
- [59] 배지의 pH는 곰팡이 배양배지의 일반적인 pH 범위를 채택할 수 있고, 예를 들면 pH 3~8범위내에서 적절한 범위의 pH로 조정하여 배양할 수 있다.
- [60] 배양 시간은 균사체가 최대로 얻어질 수 있는 시간으로 조절하여 행할 수 있으며, 예를 들어 1-30일간, 1-25일간, 1-20일간, 1-15일간, 1-10일간, 1-5일간 정도로 배양할 수 있다.
- [61] 상기 균사체를 회수하는 단계에서 배양액에서 곰팡이를 회수하는 방법은 특별히 제한되지 않으며 공지된 분리 방법, 예를 들면 원심 분리, 여과 분리, 압착 분리, 슬라이드 켄처 분리 등을 적절히 이용할 수 있다.
- [62] 상기 회수된 균사체는 그 자체로 대체육으로 이용되거나 건조되어 이용될 수 있다. 예컨대, 회수된 균사체에서 수분함량이 30 내지 90%, 40 내지 80%, 50 내지 70%, 65 내지 70%가 되도록 조절한 뒤, 소량의 조미료, 미네랄, 단백질 보충물 또는 결합물질을 첨가하여 혼합하여 대체육으로 바로 제조할 수 있고, 회수된 균사체를 건조하여 이용할 수도 있다. 상기 건조 방법은 특별히 제한되지 않고 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예컨대, 자연건조, 열풍건조, 냉풍건조, 진공건조, 또는 동결건조를 이용할 수 있다.
- [63] 상기 회수된 균사체는 가공되어 이용될 수 있다. 균사체의 가공 방법은 특별히 제한되지 않으나, 예컨대 압출 성형 방법이 이용될 수 있다.
- [64] 균사체를 압출 성형하는 경우, 상기 제조방법은 균사체를 압출 성형하는

단계를 더 포함할 수 있다. 압출성형시 원료조성비, 원료 투입량, 수분함량, 스크류 회전속도, 바렐가열온도를 조절할 수 있다. 압출성형시 원료의 수분의 함량을 적절한 범위로 조절할 수 있으며, 예컨대, 30%-40% 정도로 수분함량을 높여서 압출성형할 수 있다. 또한, 압출성형시 적절한 온도 범위 및 압력 범위를 선택할 수 있으며, 예컨대, 100-170°C의 온도 조건하에서 100-1000psi의 압력으로 압출성형할 수 있다. 군사체의 단백질을 조직화를 위해 쿨링 다이(cooling die) 또는 서클라 다이(circular die)를 사용할 수 있다.

- [65] 본 출원의 다른 일 양태는, 상기 군사체가 포함된 식품을 제공한다.
- [66] 상기 식품은 예를 들어, 육류, 식물성 고기인 대체육, 상기 육류 또는 대체육을 가공한 육류가공품, 균류 단백질(mycoprotein), 향미제 또는 단백질 보충제일 수 있고, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [67] 상기 대체육은 상기 제조방법에 의해 제조된 군사체에 미네랄, 단백질 보충물 또는 결합물질을 첨가하여 혼합하여 제조될 수 있다. 미네랄은 칼슘, 마그네슘, 인산염 등이 바람직하다. 단백질 보충물로는 대두 단백질, 곡류 단백질 등의 가수분해 식물성 단백질(hydrolyzed vegetable protein, HVP)과 같은 종래 육류 대체식품의 소재가 이용될 수도 있고, 소고기나 닭고기 등의 육류나 어류 또는 채소류나 견과류 등이 이용될 수도 있다. 결합물질로는 난백 알부민(egg albumin) 등이 이용될 수 있다. 상기 단백질 보충물과 상기 결합물질 이외에 칼슘, 글루칸, 뉴클레오티드, 황 함유 아미노산, 글루탐산, 전분, 지방, 식이섬유 등이 혼합될 수 있고, 추가로 향료 및 발색제 등 공지의 부제료를 혼합할 수도 있다.
- [68] 상기 육류는 상기 제조방법에 의해 제조된 군사체를 이용하여, 공지의 육류 생산방법에 의해 제조될 수 있다.
- [69] 상기 육류가공품은 육류 또는 대체육을 가공한 햄류, 소세지류, 베이컨류, 건조저장육류, 양념육류, 식육추출가공품, 식육함유가공품, 포장육일 수 있다.
- [70] 상기 향미제는 상기 제조방법에 의해 제조된 군사체를 이용하여, 공지의 향미제 생산방법에 의해 제조할 수 있다.
- [71] 상기 단백질보충제는 상기 제조방법에 의해 제조된 군사체를 이용하여, 공지의 단백질 보충제 생산방법에 의해 제조할 수 있다.
- [72]
- [73] 본 출원의 다른 일 양태는, 아스퍼질러스 오리제 CJII100 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 접종원 조성물을 제공한다.
- [74] 본 출원에서 사용되는 용어 "접종원 조성물"은 본 배양의 시작을 위하여 배양 대상물에 인위적으로 적용되는 제제 또는 조성물을 의미하고, 배양되는 미생물과 상기 미생물의 생육에 필수적인 성분을 제공해 줄 수 있는 성분을 포함할 수 있다. 접종원 조성물에 포함된 미생물은 배양 대상물에서 지배적으로 성장하는 미생물이 될 수 있다.
- [75] 본 출원의 접종원 조성물에서 아스퍼질러스 오리제 CJII100 균주는 상기 균주의 파쇄된 세포벽, 생균, 포자, 건조균 또는 동결건조균의 형태로 포함할 수

있다.

- [76] 일 구현예에서, 상기 접종원 조성물은 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주의 포자를 1×10^2 포자/ml 이상의 농도로 포함할 수 있으며, 구체적으로 1×10^2 - 1×10^{15} 포자/ml의 농도, 1×10^2 - 1×10^{13} 포자/ml의 농도, 1×10^2 - 1×10^{12} 포자/ml의 농도 1×10^3 - 10^{10} 포자/ml의 농도 또는 1×10^3 - 10^9 포자/ml의 농도로 포함할 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니고 상기 포자의 농도는 조성물의 용도 및 제형에 따라 달라질 수 있다.
- [77]
- [78] 상기 균주의 배양물은 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주를 배지에 접종하여 배양한 결과물을 의미한다. 구체적으로, 본 출원의 배양물은 본 출원의 균주를 배지에서 배양한 배양물 자체, 상기 배양물을 여과 또는 원심분리하여 균주를 제거한 여액 또는 이의 농축물을 포함할 수 있다. 또한, 본 출원의 배양물은 액상 또는 분말일 수 있으며, 상기 분말은 배양물을 건조 또는 동결건조한 후 분말화한 것을 포함할 수 있다. 상기 배양물 자체에는 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주 자체, 이의 포자, 이의 대사산물, 이의 균사체, 또는 배지가 포함될 수 있다.
- [79] 상기 배지는 공지의 곰팡이용 배지 예를 들어 포테이토 텍스트로스 한천 배지 또는 tryptic soy 한천배지 등 제한없이 사용할 수 있으며, 비타민과 같은 보조성분을 더 포함할 수 있다. 상기 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주로부터 균사체를 제조하는 방법 중 배양하는 단계를 설명하면서 서술된 배지의 내용과 동일하므로, 상술한 내용을 인용하며 중복하여 설명하지 않는다.
- [80] 본 출원의 접종원 조성물은 액상 또는 분말의 형태일 수 있다. 분말의 형태로 유통하는 경우 공급, 품질 유지 및 사용이 용이하다는 장점이 있다. 접종원 조성물을 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태로 제형화할 경우, 식품제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 동결보호제, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [81] 본 출원의 일 구현예에 따르면, 본 출원의 접종원 조성물은 동결보호제를 추가로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 글리세롤, 트레할로스, 말토덱스트린, 탈지분유 및 전분으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 동결보호제를 추가로 포함할 수 있다. 본 출원의 동결보호제는 본 출원의 접종원 총 중량에 대하여 0.01 중량% 내지 20 중량%, 0.01 중량% 내지 10 중량% 포함될 수 있고, 구체적으로 글리세롤은 5 중량% 내지 20 중량%, 트레할로스는 2 중량% 내지 10 중량%, 말토덱스트린은 2 중량% 내지 10 중량%, 탈지분유는 0.5 중량% 내지 2 중량%, 전분은 0.1 중량% 내지 1 중량%로 접종원 조성물에 포함될 수 있다.
- [82] 본 출원의 접종원 조성물은 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 부형제는 포도당, 덱스트린 및 탈지우유로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 보다 구체적으로 부형제는 접종원 조성물 총 중량에 대하여 75

중량% 내지 95 중량% 또는 85 중량% 내지 95 중량%로 포함할 수 있다.

[83]

[84] 본 출원의 다른 일 양태는, 상기 접종원 조성물을 사용하여 제조된 식품을 제공할 수 있다. 상기 식품은 접종원 조성물에 포함된 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주 또는 이 균주로부터 생성된 군사체를 포함할 수 있다. 상기 식품은 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주로부터 생산된 군사체를 포함하는 식품을 설명하면서 서술된 내용과 동일하므로, 상술한 내용을 원용하며 중복하여 설명하지 않는다.

[85]

발명의 효과

[86] 본 출원의 신규한 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주는 9종의 필수 아미노산을 포함하는 군사체를 생성할 수 있어, 이를 배양하면 필수 아미노산을 모두 포함하는 군사체를 대량 생산할 수 있다. 또한 상기 균주를 배양하여 얻어진 군사체는 대체육 또는 대체단백 소재를 포함한 다양한 식품 소재로 활용할 수 있다.

[87] 또한, 본 출원의 균주가 생산한 군사체는 감칠맛을 내는 글루탐산이 풍부하여 이를 이용한 대체육 제조시 종래의 식물성 단백질 또는 화학 조미료의 사용량을 줄일 수 있는 효과가 있다.

[88] 다만, 본 출원의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

[89]

도면의 간단한 설명

[90] 도 1은 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주의 18s rRNA 서열 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 1에서 시퀀싱 프라이머(sequencing primer)와 PCR 프라이머(PCR primer)인 NS1의 염기서열은 서열번호 2, NS8의 염기서열은 서열번호 3으로 각각 나타내었다.

[91] 도 2는 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주의 아플라톡신 생합성유전자 군의 *NorBCypA* 유전자 서열 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 2에서 Contig Sequence는 서열번호 4로 나타내었다.

[92] 도 3은 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주의 아플라톡신 생합성유전자 군의 *aflR* 유전자 서열 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 3에서 Contig Sequence는 서열번호 5로 나타내었다.

[93]

발명의 실시를 위한 형태

[94] 이하, 본 출원을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[95] 단, 하기 실시예는 본 출원을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 출원의 내용이

하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[96]

[97] [실시예 1] 아스퍼질러스 오리제 균주의 분리 및 동정

[98] 본 출원의 곰팡이 균주는 전통 메주로부터 분리된 것이다. 곰팡이 분리 배지로는 20 μ g/ml 클로람페니콜을 첨가한 감자 덱스트로스 한천배지(PDA, Difco)를 사용하여 곰팡이 균주를 분리하였다.

[99] 분리된 곰팡이 균주의 분자생물학적인 동정은 18S rRNA 분석 및 아플라톡신 생성 유전자인 *NorBCypA* 유전자와 *aflR* 유전자의 서열 상동성을 조사하여 분석하였다.

[100]

[101] 도 1에 도시된 바와 같이, 분리된 균주는 18S rRNA 분석 결과 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)와 99% 일치함을 확인하였다.

[102] 또한 도 2 및 도 3에 도시된 바와 같이, 분리된 균주의 아플라톡신 생합성유전자군의 *NorBCypA* 유전자와 *aflR* 유전자 서열 분석 결과, 아플라톡신을 생성하는 균주로 알려진 아스퍼질러스 플라버스(*Aspergillus flavus*)가 아닌 아스퍼질러스 오리제와 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 *NorBCypA* 유전자의 길이가 아플라톡신을 생성하는 균주인 아스퍼질러스 플라버스에서는 800bp의 길이를 나타내나 아스퍼질러스 오리제에서는 300-400bp의 길이를 보인다. 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주의 *NorBCypA*는 319bp 길이임을 확인하였다. 따라서 본 출원 곰팡이 균주에서 아플라톡신 생합성유전자군이 아플라톡신을 생성할 수 있는 완전한 구조가 아님을 확인하였다.

[103] 동정 결과, 본 출원의 곰팡이 균주는 *Aspergillus* 속의 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주로 명명하였다. 상기 균주는 2021년 10월 05 일 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 기탁하여 KCCM13053P호로 기탁 번호를 부여 받았다.

[104]

[105] [실시예 2] 아스퍼질러스 오리제 균주의 안전성 검토

[106] 위의 분자생물학적 동정 결과로부터 본 출원의 곰팡이 균주는 아플라톡신을 생성할 수 없는 아플라톡신 생합성유전자군을 갖는 *Aspergillus oryzae*임을 확인하였으나 안전성 확보를 위하여 실제 아플라톡신 생성여부를 통해 재차 검증하였다. -80°C에서 글리세롤 스타크 상태로 보존한 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주의 포자를 PDA 배지에 도말하고 30°C에서 5일간 배양한 다음, 포자를 0.05% Tween 80을 함유하는 생리식염수로 세척하여 회수하였다. 대두는 121°C, 15분 동안 멸균하여 준비하여 이에 포자를 접종 후 30°C에서 5일간 배양하였다. 이렇게 얻어진 대두 배양물을 45°C에서 48시간 건조 후 분쇄하여 분석시료를 준비하였다. 분석시료에서 아플라톡신을 추출하고 정제한 후, 액체 크로마토그래피를 통하여 총 아플라톡신의 함량을 측정하였다.

[107]

[108] 균주의 안전성 검토를 위해 총 아플라톡신을 측정된 결과, 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100균주는 아플라톡신이 검출되지 않아 곰팡이 독소를 생성하지 않음을 확인할 수 있었다.

[109]

[110] [표1]

검사 항목	검사 결과
총 아플라톡신 ($\mu\text{g/kg}$)	불검출

[111] [실시예 3] 액체 배양한 곰팡이 균사체의 비교 실험

[112] [3-1] 접종원의 준비

[113] -80°C 에서 글리세롤 스타크상태로 보존한 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주 및 자사 보유 균주 (CJI1130, CJI1140, CJI1333, CJT1105, CJI1126, CJT1050)의 포자를 PDA 배지에 각각 도말하여 30°C 에서 5일간 배양한 다음, 포자를 0.05% Tween 80을 함유하는 생리식염수로 회수하였다. 또한 비교 균주로서 곰팡이 균사체를 생성하는 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*) ATCC20334 균주를 사용하였다. 회수한 상기 포자 용액을 적정 희석하여 현미경을 통하여 포자를 계수하였다.

[114] [3-2] 본배양

[115] 곰팡이 액체 배양은 500ml 삼각 플라스크를 사용하여 실시하였다. 곰팡이 액체 배양을 위해 500ml 삼각 플라스크에 200ml의 감자 덩스트로스 배지(PDB, Difco)를 넣은 후, 121°C 에서 15분간 멸균하여 준비하였다. 실시예 [3-1]에서 계수한 각 균주의 곰팡이 포자를 1×10^4 - 10^5 포자/ml의 농도가 되도록 상기 PDB배지에 접종하여 30°C 에서 120rpm으로 5일간 배양하였다. 상기 곰팡이 배양액을 필터팩(Nasco)으로 여과한 후, 생성된 균사체를 회수하여 생리식염수로 3회 세척함으로써 배지 유래 성분을 제거한 곰팡이 균사체를 수득하였다.

[116] [3-3] 균사체의 단백질 함량 측정

[117] 단백질 함량을 측정하기 위해 총 질소 함량을 측정하였다. 총 질소 함량의 측정은 킬달 방법(Kjeldahl Method)을 사용하였다. 상기 실시예 3-2에서 수득한 곰팡이 균사체에 황산을 가해 가열농축하여 유기성 질소가 암모늄염으로 분해되면, 알칼리 용액을 투입하여 유리된 NH_3 를 산성용액에 포집한다. 산성용액에 흡수된 NH_3 를 적정하여 총 질소 함량을 측정하였다. 측정된 총 질소 값에 질소계수 6.25를 곱하여 조단백질 함량을 산출하였다.

[118]

[119] 본 출원의 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주와 자사 보유 6개의 아스퍼질러스 오리제 비교균주 (CJI1130, CJI1140, CJI1333, CJT1105, CJI1126, CJT1050) 및 비교균주 푸사리움 베네나툼 ATCC20334 균주가 생성하는

균사체의 단백질 함량 평가를 실시하였다. 결과는 표 2에 나타내었다.

[120]

[121] [표2]

균주	건조 조단백질 함량(중량%)
아스퍼질러스 오리제 CJI1130	44.6
아스퍼질러스 오리제 CJI1140	49.4
아스퍼질러스 오리제 CJI1333	56.3
아스퍼질러스 오리제 CJT1105	43.6
아스퍼질러스 오리제 CJI1100	40.1
아스퍼질러스 오리제 CJI1126	46.0
아스퍼질러스 오리제 CJT1050	47.2
푸사리움 베네나툼 ATCC20334	58.7

[122] 측정 결과, 곰팡이 균주가 생성하는 균사체의 건조물은 약 40-60중량%의 단백질 함량을 함유하는 것을 확인할 수 있었다. [3-4] 균사체의 아미노산 조성 측정

[123] 회수된 곰팡이 균사체를 산가수분해 후 아미노산 분석기를 통해 균사체의 구성 아미노산 조성을 측정하였다. 측정된 각 아미노산 값을 g/건조 단백질 100g으로 환산하여 함량을 비교하였다.

[124]

[125] 본 출원의 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주와 동속동종인 6종류의 아스퍼질러스 오리제 비교균주 (CJI1130, CJI1140, CJI1333, CJT1105, CJI1126, CJT1050) 및 비교균주 푸사리움 베네나툼 ATCC20334 균주가 생성하는 균사체의 아미노산 조성 평가를 실시하였다.

[126]

[127] 표 3에 나타난 바와 같이, 본 출원의 CJI1100 균주가 생성하는 균사체는 모든 필수 아미노산을 포함하는 아미노산 조성을 갖는 것이 확인되었다. 비교 균주인 6종의 아스퍼질러스 오리제 균주와 비교했을 때 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주의 균사체에서만 필수 아미노산인 메티오닌을 포함하는 것을 확인하였다. 푸사리움 베네나툼 ATCC20334와 비교했을 때에도 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주로부터 생성된 균사체에서 필수 아미노산인 발린, 메티오닌, 아이소류신, 류신, 페닐알라닌, 히스티딘, 트립토판, 트레오닌 함량이 더 높은 것을 확인하였다.

[128]

[129] [표3]

g/100g 건조 단백 질	A. oryzaeC JI1130	A. oryzaeC JI1140	A. oryzaeC JI1333	A. oryzaeC JT1105	A. oryzaeC JI1100	A. oryzaeC JI1126	A. oryzaeC JT1050	F. venenatumA TCC20334
Asp	7.1	6.3	2.9	6.9	7.9	5.9	6.5	6.1
Thr	3.2	0.0	0.0	4.6	4.6	3.6	3.3	3.5
Ser	2.6	0.0	0.0	5.4	3.6	3.5	3.3	3.3
Glu	13.0	13.6	6.7	11.6	13.2	11.2	11.5	9.3
Gly	4.0	3.9	3.0	3.5	4.3	2.7	3.0	2.9
Ala	5.7	4.6	4.0	6.3	6.0	3.6	4.1	3.4
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Val	6.6	4.6	5.1	5.5	6.4	3.9	4.1	3.2
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.2
Ile	3.5	2.2	2.1	2.8	3.8	2.9	2.8	2.0
Leu	7.8	6.1	6.1	7.3	6.4	5.9	5.2	4.4
Tyr	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	2.6
Phe	7.7	4.6	5.7	9.4	4.2	5.9	5.7	2.4
Lys	5.1	4.6	3.4	5.6	5.4	3.9	3.8	5.1
His	2.3	1.8	0.9	3.5	2.1	0.9	2.0	1.5
Arg	4.0	1.9	2.0	3.0	4.0	3.1	3.0	3.6
Pro	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4
Trp	3.4	3.0	2.4	2.8	2.5	2.2	2.2	0.5

[130] 또한 단백질 품질 평가를 위해 곰팡이 균사체 단백질 g당 각 필수 아미노산의 함량(mg)을 기준 단백질 g 당 동일한 필수 아미노산의 함량(mg)으로 나눈 아미노산 스코어(Amino acid score, AAS) 값을 산출하였다. 아미노산 스코어는 $AAS = (\text{mg of AA in 1g protein}) / (\text{mg of AA in requirement pattern})$ 의 식으로 계산하였다. 기준 단백질에서 단백질 g당 각 필수 아미노산의 함량(mg)을 필수 아미노산의 요구 패턴(Amino acid requirement pattern)이라고 하며, 기준단백질은 달걀 단백질일 수 있고, 기준단백질 g당 필수아미노산의 함량은 WHO에서 제시된 값을 이용할 수 있다. 필수 아미노산의 요구 패턴은 WHO 2007 기준을 참조하였다. 아미노산 스코어 값은 1.0을 기준으로 하며 1.0 미만의 아미노산의 경우 제한 아미노산으로 정의한다.

[131] 아스퍼질러스 오리제 CJI1100과 푸사리움 베네나툼 ATCC20334가 생성하는 균사체의 아미노산 스코어(Amino acid score) 산출 결과는 하기 표 4과 같다.

[132] [표4]

아미노산	아스퍼질러스 오리제CJI1100아미노 산 스코어	푸사리움 베네나툼ATCC20334 아미노산 스코어	아미노산 요구 패턴*WHO 2007 (mg/g)
His	1.2	0.8	18
Ile	1.2	0.6	31
Leu	1.0	0.7	63
Lys	1.0	1.0	52
Met+Cys	0.5	0.1	26
Phe+Tyr	1.4	1.1	46
Thr	1.7	1.3	27
Trp	3.3	0.7	7.4
Val	1.5	0.8	42

[133] 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주가 생성한 균사체의 아미노산 조성 중 메티오닌과 시토신(Met+Cys)은 아미노산 스코어 값이 1.0 미만으로 제한아미노산이 되지만 이를 제외한 모든 필수 아미노산의 아미노산 스코어 값이 1.0을 넘어 기준에 충족하는 것을 확인할 수 있었다. 아스퍼질러스 오리제 CJI1100 균주로부터 생성된 균사체는 모든 종류의 필수 아미노산을 함유하고 있기 때문에 배지 및 배양 조건 최적화를 통해 완전 단백질로 개선할 수 있다.

[134] [실시예 4] 균사체의 압출성형

[135] 상기 실시예 3-2에서 수득한 본 출원의 균주의 균사체의 수분함량이 40%가 되도록 수분 함량을 조정한 후에, 100-170°C의 온도 조건하에서 100-1000psi의 압력으로 쿨링다이를 이용하여 압출성형하여, 식용으로 사용할 수 있는 균사체를 제조하였다.

[136] [실시예 5] 균사체를 이용한 대체육의 제조

[137] 본 출원의 균사체에 소량의 소금, 설탕 및 후추, 쌀가루 등을 첨가하여 대체육을 제조하였다.

[138] 구체적으로 상기 실시예 3-2에서 수득한 본 출원의 균주의 균사체의 수분함량이 65 내지 70%가 되도록 수분 함량을 조정한 후에, 소금 0.81%, 후추 0.1%, 갈릭 파우더 0.51%, 백설탕 1.52%, 캐놀라유 0.81%, 육향 0.3%, 쌀가루 5.87%를 첨가하여 대체육을 제조하였다.

[139] [실시예 6] 균사체를 이용한 베이컨의 제조

[140] 상기 실시예 5에서 제조한 대체육을 이용하여 베이컨을 제조하였다.

구체적으로, 상기 제조한 대체육을 두께 2인치의 넓은 판 모양으로 성형하였다. 이후 베이컨으로 가공하기 좋은 크기로 얇게 슬라이스 하였다. 상기 슬라이스한 균사체 조각을 염도 1 내지 5%의 소금물에 절인 뒤, 소금, 설탕, 코코넛 오일, 비트 주스로 색을 입히고 액체 연기를 추가하여 스모키하고 감칠맛이 우수한 베이컨을 제조하였다.

[141] [실시예 7] 균류 단백질의 제조

[142] 통상의 식물성 단백질 제조방법(한국식품개발연구원, 고등균류를 이용한 신기능 식품소재 개발 및 응용 연구, 최종연구보고서, 농림부, 2002년 11월 18일)에 따라 실시하였으며, 상기 실시예 3-2에서 제조한 균사체 40%, 옥수수수피(corn hull) 30%, 난백 30%의 비율로 혼합한 뒤, 상기 실시예 4와 같은 방법으로 쿨링다이를 이용하여 압출성형하여, 균류 단백질(mycoprotein)을 제조하였다.

[143] [실시예 8] 균류 단백질을 이용한 대체육의 제조

[144] 또한, 본 출원의 균류 단백질을 이용하여 단백질 소재에 전분, 물, 검, 유화제 등을 첨가하여 고온 고압에서 압출성형하여 섬유상 조직을 얻는 통상적인 대체육(인조육) 제조방법에 따라 대체육을 제조하였다. 구체적으로, 상기 실시예 5에서 제조한 본 출원의 균류 단백질 50중량%를 첨가하고, 소량의 조미료, 향신료, 색소 등을 가하여 대체육을 제조하였다.

[145] [실시예 9] 균사체로부터 천연 육고기향 향미제의 제조

[146] 상기 실시예 3-2에서 제조한 균사체를 건조시켜 분말화하고, 내장을 제거한 멸치, 세척하여 절단한 다시마와 미역을 준비하여 물 100중량%에 대해 멸치 20중량%, 다시마 20중량%, 미역 20중량%를 넣고 100°C에서 가열하여 물의 양이 1/2이 될 때까지 추출하여 열수 추출물을 얻었다. 상기 열수 추출물에 멸치, 다시마, 미역을 12시간 동안 침지한 후 이를 건조하여 분말화하였다. 상기 분말화된 균사체 65중량%, 멸치분말 10중량%, 다시마분말 10중량%, 미역분말 5중량%를 혼합하여 천연 육고기향 향미제를 제조하였다.

[147]

[148] 상기에서는 본 출원의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 출원의 범위는 상기와 같은 특정 실시예만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

[149] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터

[150] 수탁번호 : KCCM13053P

[151] 수탁일자 : 20211005

청구범위

- [청구항 1] 메티오닌을 포함하는 아미노산 조성을 가진 균사체를 생성하는 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주 (기탁번호: KCCM13053P).
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주는 서열번호 1의 18S rRNA 서열을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 것인,
아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주 (기탁번호: KCCM13053P).
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 아미노산 조성은 리신, 트레오닌, 발린, 아이소류신, 류신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 더 포함하는 것인, 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주 (기탁번호: KCCM13053P).
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주는 아플라톡신을 생성하지 않는 것인, 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주 (기탁번호: KCCM13053P).
- [청구항 5] 청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주(기탁번호: KCCM13053P)로부터 생성된 균사체.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서,
상기 균사체는 메티오닌을 포함하는 아미노산 조성을 갖는 것인, 균사체.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서,
상기 아미노산 조성은 리신, 트레오닌, 발린, 아이소류신, 류신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 더 포함하는 것인, 균사체.
- [청구항 8] 청구항 5에 있어서,
상기 균사체는 아플라톡신을 포함하지 않는 것인, 균사체.
- [청구항 9] 청구항 5에 있어서,
상기 균사체를 건조한 건조물에서 단백질의 함량은 전체 건조물 중량에 대해서 30중량% 내지 70중량%인 것인, 균사체.
- [청구항 10] 배지에서 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주 (기탁번호: KCCM13053P)를 배양하여 균사체를 생성하는 단계; 및
상기 생성된 균사체를 회수하는 단계;를 포함하는 균사체의 제조방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서,
상기 균사체를 회수하는 단계는 상기 균주의 배양액을 여과하는 단계를 포함하는 것인, 균사체의 제조방법.

- [청구항 12] 청구항 10에 있어서,
상기 회수한 군사체를 압출 및 성형하는 단계를 더 포함하는 군사체의
제조방법.
- [청구항 13] 청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus
oryzae*) CJI1100 균주로부터 생성된 군사체를 포함하는 식품.
- [청구항 14] 청구항 13에 있어서, 상기 식품은 대체육, 상기 대체육을 가공한
육류가공품, 균류 단백질(mycoprotein), 향미제 또는 단백질 보충제인
것인 식품.
- [청구항 15] 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*) CJI1100 균주(기탁번호:
KCCM13053P) 또는 이의 배양물을 포함하는 접종원 조성물.
- [청구항 16] 청구항 15에 있어서,
상기 접종원 조성물은 상기 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*)
CJI1100 균주(기탁번호: KCCM13053P)의 포자를 10^2 포자/ml의 농도 이상
포함하는, 접종원 조성물.
- [청구항 17] 청구항 15에 있어서,
상기 접종원 조성물은 글리세롤, 트레할로스, 말토덱스트린, 탈지분유 및
전분으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 동결보호제를
추가로 포함하는, 접종원 조성물.