(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0056201
(43) 공개일자 2018년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 1/14* (2018.01) *C12G 3/02* (2006.01)
*C12R 1/69* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 1/14* (2013.01)
*C12G 3/02* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0154150
(22) 출원일자 2016년11월18일
심사청구일자 2016년11월18일

(71) 출원인
**경상대학교산학협력단**
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
**노현수**
경상남도 진주시 신안들말길 17, 104동 103호 (신안동, 주공1차아파트)
**김민식**
경상남도 진주시 평거로39번길 17, 107동 1405호 (평거동)
(74) 대리인
**한윤호**

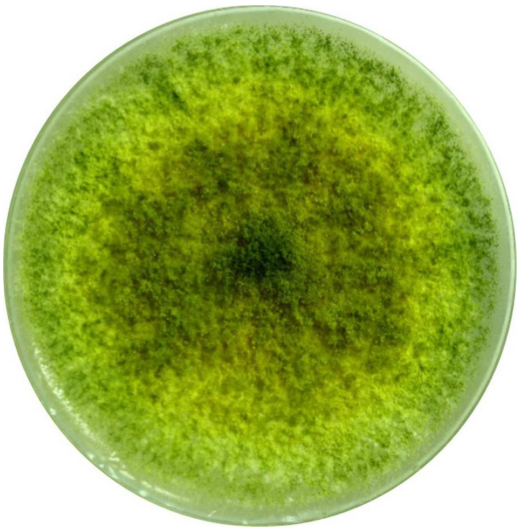
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **당화능이 우수한 신규 미생물 및 그의 용도**

## (57) 요 약

본 발명은 전통누룩에서 분리한 높은 전분 분해활성과 고농도의 알코올에 대한 저항성이 우수한 신규 미생물을 제공한다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*C12R 1/69* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ00999304
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 현장실용화농업기술_농축산물부가가치향상기술개발_농가보급형발효종균개발 및 실용화기술
연구과제명 곰팡이 종균 개량기술 개발 및 배양조건 구명
기 여 율 1/1
주관기관 국립농업과학원
연구기간 2014.02.01 ~ 2016.12.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

기탁번호 KCTC13153BP로 기탁된, 당화능이 강화된 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63 균주.

### 청구항 2

제1항의 균주, 상기 균주의 파쇄액, 상기 균주의 배양상등액 또는 이의 혼합물을 포함하는, 전분 당화용 조성물.

### 청구항 3

누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 및

전분 함유물에 상기 누룩 생성단계에서 생성된 누룩을 접종하여 상기 곡물, 곡물 분말 또는 전분을 당화시키는 당화단계를 포함하는 전분의 당화방법.

### 청구항 4

누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계;

전분 함유물에 상기 누룩 생성단계에서 생성된 누룩을 접종하여 상기 전분 함유물 내의 전분을 당화시키는 당화단계; 및

상기 당화단계에서 생성된 당화물에 알코올 발효균을 접종하여 알코올 발효를 수행하는 알코올 발효단계를 포함하는 발효주의 생산방법.

### 청구항 5

누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 및

전분 함유물에 상기 생성단계에서 생성된 누룩 및 알코올 발효균을 접종하여 당화 및 알코올 발효를 동시에 수행하는 동시발효단계를 포함하는, 발효주의 생산 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 미생물 및 그의 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 전통누룩에서 분리한 전분 분해활성과 당화능이 우수한 신규 미생물 및 그의 용도에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 전분당화는 곡물에 저장되어 있는 전분을 분해하여 생물이 이용할 수 있는 형태로 전환시키는 과정으로 전통주 발효공정에서 누룩을 이용한 전분당화는 전통주의 품질을 결정짓는 가장 중요한 요소들 중 하나이다. 일반적으로 전통누룩은 보리나 밀과 같은 곡류를 파쇄하고 수분을 가하여 단단하게 성형한 후, 자연환경에 노출시켜 다양한 발효 미생물들이 자라게 하여 만들기 때문에, 누룩에 들어있는 미생물들의 다양성과 미생물함량은 제조한 지역, 온도 및 원료의 조성과 같은 지리적, 물리화학적 환경에 의하여 결정된다. 이러한 누룩 미생물의 복잡성은 전통주의 다양화와 지역특화를 가능하게 하는 장점이 있는 반면, 균일한 풍미와 품질을 가진 제품의 지속적 생산을 어렵게 하여 전통주 산업의 경쟁력을 저하시키는 원인이 되기도 한다. 누룩에서 당화기능을 담당하는 곰팡이의 종류와 능력이 특히 중요한데, 당화능이 부족한 누룩을 사용하면, 전분의 당화가 느려져서 전체 발효기간이 길어질 뿐 아니라, 잡균의 증식에 따른 품질의 저하를 가져오기 때문이다. 따라서 우수한 당화능을 가진

누룩을 사용하는 것이 전통주 생산에서 필수적인 과정이나, 전통적인 방식의 자연누룩 제조공정으로는 우수한 당화능을 가진 곰팡이균만을 일정한 함량으로 유지하기 힘든 치명적 단점이 있다. 국내의 양조장에서는 이러한 누룩의 불확실한 당화능을 보충하고자 별도로 아밀라아제(amylase) 효소를 첨가하거나, 일본주의 제조에 사용되는 입국을 사용하기 때문에누룩 유래의 곰팡이균 중 우수한 당화능을 가진 곰팡이균을 선별하고, 전통주 발효공정에 적합한 균으로 개량하는 연구가 전통주 산업의 발전을 위하여 필요하다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허공보 제10-2016-0111621호는 높은 알파-아밀라아제, 글루코아밀라아제 활성을 갖는 신규의 아스퍼질러스 오리재 MBF378 균주에 대해 개시하고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0003] 그러나 상기 선행기술의 경우, 비록 알파-아밀라아제 및 글루코아밀라아제의 활성은 매우 높으나, 결국 배지 중 포도당 농도가 높아지면 아밀라아제 생합성이 억제되기 때문에, 전분당화가 일정정도 진행된 후에는 아밀라아제 생산이 억제되어 당화 속도가 느려지는 단점을 여전히 가지고 있다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 높은 전분 분해활성을 나타내고, 고농도의 알코올에 대한 저항성이 우수한 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

### 과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 기탁번호 KCTC13153BP로 기탁된, 당화능이 강화된 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63 균주가 제공된다.

[0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 균주, 상기 균주의 파쇄액, 상기 균주의 배양상등액 또는 이의 혼합물을 포함하는, 전분 당화용 조성물이 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 및 전분 함유물에 상기 누룩 생성단계에서 생성된 누룩을 접종하여 상기 전분 함유물 내의 전분을 당화시키는 당화단계를 포함하는 전분의 당화방법이 제공된다.

[0008] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 전분 함유물에 상기 누룩 생성단계에서 생성된 누룩을 접종하여 상기 전분 함유물 내의 전분을 당화시키는 당화단계; 및 상기 당화단계에서 생성된 당화물에 알코올 발효균을 접종하여 알코올 발효를 수행하는 알코올 발효단계를 포함하는 발효주의 생산방법이 제공된다.

[0009] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 및 전분 함유물에 상기 생성단계에서 생성된 누룩 및 알코올 발효균을 접종하여 당화 및 알코올 발효를 동시에 수행하는 동시발효단계를 포함하는, 발효주의 생산 방법이 제공된다.

[0010] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63 (KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 전분 함유물에 상기 생성단계에서 생성된 누룩을 접종하여 상기 전분 함유물 내의 전분을 당화시키는 당화단계; 상기 당화단계에서 생성된 당화물에 알코올 발효균을 접종하여 알코올 발효를 수행하는 알코올 발효단계; 및 상기 알코올 발효단계에서 생성된 알코올 발효물로부터 주정을 추출하는 주정 추출단계를 포함하는 주정의 생산방법이 제공된다.

[0011] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 전분 함유물에 상기 누룩 생성단계에서 생성된 누룩 및 알코올 발효균을 접종하여 당화 및 알코올 발효를 동시에 수행하는 동시발효단계; 및상기 동시발효단계에서 생성된 알코올 발효물로부터 주정을 추출하는 주정 추출단계를 포함하는, 주정의 생산방법이 제공된다.

### 발명의 효과

[0012] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 고농도 포도당 및 전분 조건에서 높은 전분 분해활성을 나타내는 균주 생산효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

## 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 모균주에 저농도의 돌연변이 유도제를 처리하여 높은 전분분해활성을 나타내는 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63 균주의 모습을 나타내는 사진이다.

도2는 본 발명의 일 실시예에 따라 실험실 진화기법을 이용한 고당화능 *A. oryzae* 균주를 아밀라아제 활성을 기준으로 선별한 공정을 나타내는 개요도이다.

도3은 본 발명의 일 실시예에 따라 실험실 진화단계별 고당화능 균주의 아밀라아제 활성을 분석한 그래프이다.

도4는 본 발명의 일 실시예에 따라 M63 균주의 아밀라아제 생산 안정성을 분석한 그래프이다.

도5는 본 발명의 일 실시예에 따라 M63 균주의 온도 및 pH 특성을 모균주(MS2-12) 및 대조균주(Rib40)와 비교하여 분석한 그래프이다.

도6은 본 발명의 일 실시예에 따라 M63균주와 모균주(MS2-12) 및 대조균주(Rib40)의 당화능을 비교 분석한 그래프이다.

도7은 본 발명의 일 실시예에 따라 M63균주와 모균주(MS2-12) 및 대조균주(Rib40)를 이용한 알코올발효 시 아밀라아제 활성(1), 배지내 포도당(2) 및 최종 알코올농도(3)을 비교 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] **용어의 정의:**

[0015] 본 문서에서 사용되는 용어 "누룩(nuruk)"은 우리나라 대표적인 전통주인 막걸리와 약주 등을 빚는 발효제로서 누룩 속 다양한 곰팡이균들이 전통주의 원료가 되는 곡물 내부의 전분당화와 알코올발효를 담당하고 있다. 따라서 전통주 발효공정에서 전통주의 품질을 결정짓는 가장 중요한 요소들 중 하나이다. 누룩에 들어 있는 곰팡이로는 *Rhizopus oryzae*, *Absidia corymbifera*(*Lichtheimia corymbifera*), *Lichtheimia ramosa*, *Mucor indicus* 등 접합균류(Zygomycota)들과 *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. luchuensis* 등 당화능이 높은 *Aspergillus* 속 균들이 있다. 이들 중 특히, *A. oryzae*는 누룩에서 가장 많이 분리되는 균사상 곰팡이로서, alpha-amylase, glucoamylase 등 여러가지 amylase 효소들을 분비 생산함으로써, 누룩의 전분당화 기능에 중요한 역할을 한다.

[0016] 본 문서에서 사용되는 용어 "전분 함유물(starch containing substance)"은 당화 대상으로 사용되는 쌀, 밀, 보리, 귀리, 메밀, 수수, 옥수수, 호밀, 조, 기장 등의 곡물, 상기 곡물의 분말은 물론 전분을 포함하는 비곡물성 작물인 고구마, 감자, 카사바(cassava), 애로우루트(arrowroot), 사고야자, 토란(taro), 도토리, 밤, 녹두, 적두, 바나나 및 마(yam)도 포함된다.

[0017] **발명의 상세한 설명:**

[0018] 본 발명의 일 관점에 따르면, 기탁번호 KCTC13153BP로 기탁된, 당화능이 강화된 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63 균주가 제공된다.

[0019] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 균주, 상기 균주의 파쇄액, 상기 균주의 배양상등액 또는 이의 혼합물을 포함하는, 전분 당화용 조성물이 제공된다.

[0020] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 및 전분 함유물에 상기 누룩 생성단계에서 생성된 누룩을 접종하여 상기 곡물, 곡물 분말 또는 전분을 당화시키는 당화단계를 포함하는 전분의 당화방법이 제공된다.

[0021] 상기 전분의 당화방법에 있어서, 상기 전분 함유물은 곡물, 상기 곡물의 분말, 또는 전분을 포함하는 비곡물성 작물일 수 있으며, 상기 곡물은 쌀, 밀, 보리, 귀리, 메밀, 수수, 옥수수, 호밀, 조, 또는 기장일 수 있고, 상기 전분을 포함하는 비곡물성 작물은 고구마, 감자, 카사바(cassava), 애로우루트(arrowroot), 사고야자, 토란

(taro), 도토리, 밤, 녹두, 적두, 바나나 또는 마(yam)일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 전분 함유물에 상기 누룩 생성단계에서 생성된 누룩을 접종하여 상기 전분 함유물 내의 전분을 당화시키는 당화단계; 및 상기 당화단계에서 생성된 당화물에 알코올 발효균을 접종하여 알코올 발효를 수행하는 알코올 발효단계를 포함하는 발효주의 생산방법이 제공된다.

[0023] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 및 전분 함유물에 상기 생성단계에서 생성된 누룩 및 알코올 발효균을 접종하여 당화 및 알코올 발효를 동시에 수행하는 동시발효단계를 포함하는, 발효주의 생산 방법이 제공된다.

[0024] 상기 발효주의 생산방법에 있어서, 상기 전분 함유물은 곡물, 상기 곡물의 분말, 또는 전분을 포함하는 비곡물성 작물일 수 있으며, 상기 곡물은 쌀, 밀, 보리, 귀리, 메밀, 수수, 옥수수, 호밀, 조, 또는 기장일 수 있고, 상기 전분을 포함하는 비곡물성 작물은 고구마, 감자, 카사바(cassava), 애로우루트(arrowroot), 사고야자, 토란(taro), 도토리, 밤, 녹두, 적두, 바나나 또는 마(yam)일 수 있다.

[0025] 상기 발효주의 생산방법에 있어서, 상기 알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있으나, 에탄올인 것이 바람직하고, 상기 알코올 발효균은 진균 또는 세균일 수 있고, 상기 진균은 효모 특히 *Saccharomyces* 속, *Brettanamyces* 속, *Zygosaccharomyces* 속 또는 *Schizosaccharomyces* 속의 효모일 수 있으며, 상기 세균은 *Zymomonas mobilis*일 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63 (KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 전분 함유물에 상기 생성단계에서 생성된 누룩을 접종하여 상기 전분 함유물 내의 전분을 당화시키는 당화단계; 상기 당화단계에서 생성된 당화물에 알코올 발효균을 접종하여 알코올 발효를 수행하는 알코올 발효단계; 및 상기 알코올 발효단계에서 생성된 알코올 발효물로부터 주정을 추출하는 주정 추출단계를 포함하는 주정의 생산방법이 제공된다.

[0027] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 누룩용 고체배지에 제1항의 신규 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) M63(KCTC13153BP) 균주를 접종하여 누룩을 생성하는 누룩 생성단계; 전분 함유물에 상기 누룩 생성단계에서 생성된 누룩 및 알코올 발효균을 접종하여 당화 및 알코올 발효를 동시에 수행하는 동시발효단계; 및상기 동시발효단계에서 생성된 알코올 발효물로부터 주정을 추출하는 주정 추출단계를 포함하는, 주정의 생산방법이 제공된다.

[0028] 상기 주정의 생산방법에 있어서, 상기 전분 함유물은 곡물, 상기 곡물의 분말, 또는 전분을 포함하는 비곡물성 작물일 수 있으며, 상기 곡물은 쌀, 밀, 보리, 귀리, 메밀, 수수, 옥수수, 호밀, 조, 또는 기장일 수 있고, 상기 전분을 포함하는 비곡물성 작물은 고구마, 감자, 카사바(cassava), 애로우루트(arrowroot), 사고야자, 토란(taro), 도토리, 밤, 녹두, 적두, 바나나 또는 마(yam)일 수 있다.

[0029] 상기 주정의 생산방법에 있어서, 상기 알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있으나, 에탄올인 것이 바람직하고, 상기 알코올 발효균은 진균 또는 세균일 수 있고, 상기 진균은 효모 특히 *Saccharomyces* 속, *Brettanamyces* 속, *Zygosaccharomyces* 속 또는 *Schizosaccharomyces* 속의 효모일 수 있으며, 상기 세균은 *Zymomonas mobilis*일 수 있다.

[0030] 본 발명자들은 우수한 당화능을 가진 누룩을 사용하는 것이 전통주 생산에서 필수적인 과정이나, 전통적인 방식의 자연누룩 제조공정으로는 우수한 당화능을 가진 곰팡이균만을 일정한 함량으로 유지하기 힘든 문제점이 있고 누룩에 있는 대표적인 곰팡이인 *Aspergillus oryzae* 균주는 배지 중 포도당 농도가 높아지면 아밀라아제 생합성이 억제(repression)되기 때문에, 전분당화가 어느정도 진행된 후에는 아밀라아제 생산이 억제되어 당화 속도가 느려지는 단점이 있음에 주목하고 고농도의 포도당이 존재할 때에도 아밀라아제 생합성 능력이 유지되는 *A. oryzae* 균을 실험실진화(lab evolution) 기법을 통하여 제작하고자 하였다. 실험실진화 기법은 최근 활발히 사용되는 세균 등 세포분열속도가 빠른 단세포 미생물 균주의 개량방법이다. 그러나, 균사상 곰팡이의 경우 단세포로 키울 수 없고 세포분열속도가 느리기 때문에, 세균에서 적용되는 실험실 진화 기법을 곰팡이 개량에 바로 적용하기는 어렵다. 따라서 본 발명자들은 균사상 곰팡이의 생활사에서 유일하게 단세포의 형태로 존재하는 포자단계에 저농도 돌연변이유도제를 처리하여 실험실 진화속도를 빠르게 하고, 전분배지+고농도 포도당조건에서 전분분해능이 우수한 개량균주를 반복적으로 스크리닝하는 방법으로 고당화능 *Aspergillus oryzae*를 개발하는

전략으로 곰팡이균을 개량하였다(도 1).

[0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0032] **실시예 1: *Aspergillus oryzae* 균주의 실험실 진화**

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따라 누룩에서 분리한 MS2-12 균주를 모균주로 하여 실험실진화(lab evolution) 기법을 통해 균주를 개량하였다.

[0034] 구체적으로, MS2-12 균주를 감자-포도당 배지(potato-dextrose agar, PDA)에서 1주일간 배양하여 포자를 회수하였다. 상기 회수된 포자를 감자-포도당 액체배지(potato-dextrose broth, PDB)에 1 ml 당 $10^7$ 개의 농도로 현탁하고, 25℃에서 5시간 배양하여 팽윤시켰다. 이후 돌연변이 유도제인 methylmethanesulfonate(MMS) 0.1%(v/v)를 상온에서 30분간 처리하고 원심분리 후 멸균증류수로 3회 세척하였다. MMS가 처리된 곰팡이 포자액을 전분-포도당 액체배지(전분 10 g/L, 포도당 10 g/L, beef extract 3 g/L)로 96 well plate의 한 웰(well) 당 10개 내외의 포자가 들어가게 희석하여 분주한 후 30℃, 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 배양액내 알파-아밀라아제(α-amylase) 활성을 측정하여 활성이 우수한 곰팡이균이 포함된 well의 배양액을 PDA 배지에 도말하여 단일 콜로니(single colony)를 분리하였다. 이후 상기 분리된 각 곰팡이균의 아밀라아제 활성을 측정하여 활성이 우수한 균주를 선발하였다. 상기 아밀라아제 활성 측정은 상기 각 곰팡이 균주들을 전분(starch)과 쇠고기 추출물(beef extract)이 각각 10 g/L, 3 g/L 포함된 5 mL 전분액체배지에 30℃의 조건으로, 48시간동안 배양하였다. 이후 상기 배양액을 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리를 하여 잔여 전분과 균사를 가라앉히고 상등액을 취하였다. 상기 상등액 20 mL에 물 180 mL를 첨가한 후 30 mM PBS(pH=6.0)에 녹인 전분(1 g/L) 200 mL를 혼합하고 30℃에서 20분간 반응시켰고 반응 후 유리된 환원당을 DNS(dinitrosalicylic acid)방법으로 정량하여 아밀라아제 활성을 측정하였다. 효소의 활성 1 unit은 1분당 1 micromole의 포도당을 만드는데 필요한 효소량으로 정의하여 선택한 아밀라아제 활성이 우수한 균주는 다시 PDA 배지에 접종 후 1주일간 배양하여 포자를 회수하였고, 상기 포자에 상기 돌연변이-스크리닝 과정을 5회 반복하여 가장 높은 아밀라아제 활성을 보이는 균주를 최종적으로 선별하였다(도 2).

[0035] 그 결과, 최종적으로 알파-아밀라아제(α-amylase) 활성이 3,890 unit/L인 아스퍼질러스 오리재 M63 균주를 선별하였다(도 3).

[0036] **실시예 2: 개량 M63균주의 안정성**

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 실시예 1에서 선별한 아밀라아제 활성이 우수한 개량균주 M63의 안전성을 조사하였다.

[0038] 구체적으로, 개량균주 M63을 고체배지상에서 연속적으로 계배배양 후 아밀라아제 활성을 조사하기 위하여 1% 전분이 포함된 최소 배지(전분 10 g/L, $K_2HPO_4$ 1.74 g/L, $KH_2PO_4$ 1.36 g/L, NaCl 0.14 g/L, $MgSO_4 \circ 7H_2O$ 0.492 g/L, $CaCl_2$ 0.077 g/L, $FeSO_4 \circ 7H_2O$ 0.0025 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.528 g/L, YNB 1 g/L, pH 6.5)에 곰팡이 균을 접종하고, 30℃에서 5일간 배양하였고 배양이 끝난 후 agar block을 고체배지의 가장자리에서 채취하여 새로운 배지에 옮기는 방식으로 50회 계대배양하였다. 균주의 안정성 시험을 위하여 각 계대회차에서 발생한 곰팡이균을 agar를 뺀 액체최소배지에 2일간 배양하였고 이후 배양액내 아밀라아제 활성을 측정하였다.

[0039] 그 결과, 개량균주 M63의 아밀라아제 생산능력이 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다(도 4).

[0040] **실시예 3: 개량 M63균주의 배양조건에 따른 성장 특성**

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 개량 M63균주의 배양조건에 따른 성장 특성을 조사하기 위하여 전분 고체배지에 미리 배양된 곰팡이균이 포함된 일정한 크기의 agar block을 올린 후, 15℃, 23℃, 30℃ 및 40℃ 온도에서 2-5일간 배양하였고 모균주인 MS2-12와 대조균인 RiB40 균주와 비교하였다. 곰팡이의 성장은 아가(agar) 배지상 균사의 직경으로 측정하였고 pH의 영향은 배지의 pH를 4.5, 5.5, 6.5으로 조절한 전분 아가(starch agar)배지에 미리 배양된 곰팡이균이 포함된 agar block을 올린 후, 30℃에서 2-5일간 배양하였고 곰팡이의 성장은 agar 배지 상 균사의 직경으로 측정하였다.

[0042] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, 개량균주 M63의 최적온도는 30℃으로 나타났고, 도 5B에 나타난 바와 같이 개량균주 M63의 최적 pH는 5.5로 나타났는데 이는, 모균주인 MS2-12나 대조균인 RiB40 균주와 동일한 결과이다.

[0043] **실시예 4: 개량 M63균주의 아밀라아제 생산특성**

[0044] 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 개량 M63균주의 아밀라아제 생산특성을 조사하기 위하여 전분액체배지(전분 10 g/L, 쇠고기 추출물 3 g/L)에 30℃에서 60시간 배양하여 배지 내 M63균주의 아밀라아제 활성을 모균주인 MS2-12와 대조균인 RiB40 균주와 비교하였다. 또한, 배양 24시간 후 아밀라아제 활성이 감소하는 현상을 관찰하기 위하여 배지내 pH를 조사하였고 배지내 pH 감소는 곰팡이가 생산하는 acidic protease를 활성화하여 배지내에 존재하는 단백질을 분해한다는 보고를 바탕으로, 전분액체배지에 50 mM phosphate buffer를 첨가하여 pH를 6.5로 조절한 후 배양하여 아밀라아제 활성을 조사하였다.

[0045] 그 결과, 상기 실험군 균주 모두 배양시작 24시간 후 가장 높은 아밀라아제 활성을 나타내었고 이후 배양이 진행됨에 따라 점차 감소하였다. 24시간 배양 시 M63 균주가 약 3,899 units/L의 아밀라아제 활성을 나타내었으며, MS2-12와 RiB40 균주는 각각 2,770 및 1,868 units/L로 개량균주에 비하여 낮은 활성을 나타내어, 개량균주가 가장 높은 나타냄을 확인하였고(도 6A) 배지내 pH는 배양이 진행됨에 따라 선행적으로 감소하여 36시간 후에는 배지의 pH가 3.1로 감소한 것을 확인하였다(도 6C). 또한, pH를 6.5로 조절한 후 배양하여 아밀라아제 활성을 조사한 결과, 배지내 pH는 36시간까지 일정하게 유지되었으며, 아밀라아제 활성도 배양 24시간 만에 최고치에 도달한 후 36시간 까지 유지되었다. 이후 버퍼능력이 떨어짐에 따라 pH가 감소하기 시작하였고 동시에 아밀라아제 활성도 감소하였다(도 6B 및 D). 상기 결과를 바탕으로 전분배지에서의 아밀라아제 활성감소는 pH 감소에 따른 acidic protease의 활성화에 기인한 것으로 추정하였다.

[0046] **실시예 5: 개량 M63균주의 알코올발효 특성**

[0047] 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 개량 M63균주의 알코올발효 특성을 조사하기 위하여 M63과 RiB40 균주를 각각 고두밥 400g에 접종하여 24시간 고체발효 시킨 후, 50℃에서 24시간 건조시켜 각 균주별 입국을 제조하였다. 상기 제조된 각 입국 400g에 고두밥 600g, 효모 0.25 g, 물 1.5 L를 첨가하여 전분당화와 알코올발효실험을 진행하였다.

[0048] 그 결과, 발효시작 하루만에 M63 균주가 포함된 배지 내 아밀라아제 활성은 최대치에 도달하였으며(도 7A), 전분의 분해에서 나오는 포도당의 농도도 100 g/L로 최대값에 도달하였다(도 7B). 이후 아밀라아제 활성과 포도당 농도는 급락하였으며 이와 동시에 알코올농도는 급격히 증가하여 발효 5일 후에는 알코올농도 18.5%에 도달하였다(도 7C). 한편 대조균의 경우에는 전분당화능이 현격히 떨어졌으며, 최대 알코올농도도 13.4%로 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 M63 균주가 월등한 성능을 나타냄을 확인하였다.

[0049] 결론적으로, 국내 양조용 누룩에서 분리된 *Aspergillus oryzae* MS2-12균주를 실험실 진화 기법으로 개량한 M63 균주는 아밀라아제 생산능력이 우수하기 때문에 전분의 당화능력이 탁월하여, 전통주의 발효공정에서 별도의 전분당화 효소 첨가 없이도 전분을 당화시킬 수 있고 M63균주의 우수한 당화능은 기존 공정에 비하여 짧은 시간에 고농도의 포도당을 축적하여 전통주 공정의 문제점인 잡균의 오염을 최소화하고 이를 바탕으로 알코올발효를 완성할 수 있기 때문에, 전통주 공정의 문제점인 잡균의 오염을 최소화 할 수 있는 장점이 있다. 특히 전분의 당화는 전통주 생산 뿐 아니라, 바이오 에너지 생산에서도 중요한 공정이기 때문에 본 발명의 M63 균주는 산업적 활용성이 높은 균주이다.

[0050] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

## *수탁번호*

[0051]

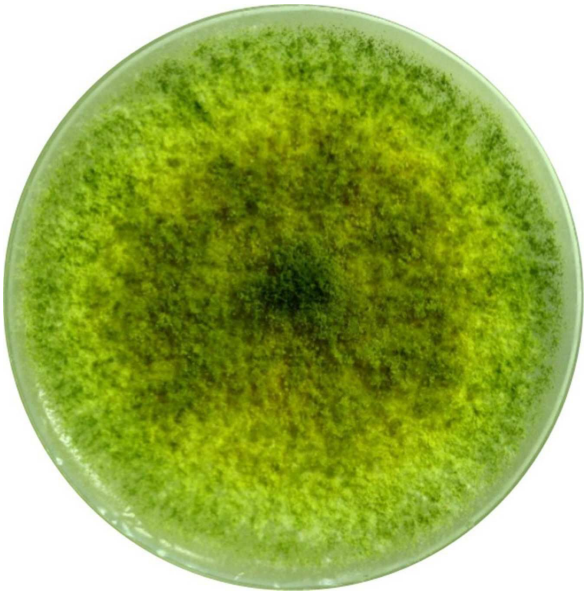
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 유전자원센터

수탁번호 : KCTC13153BP

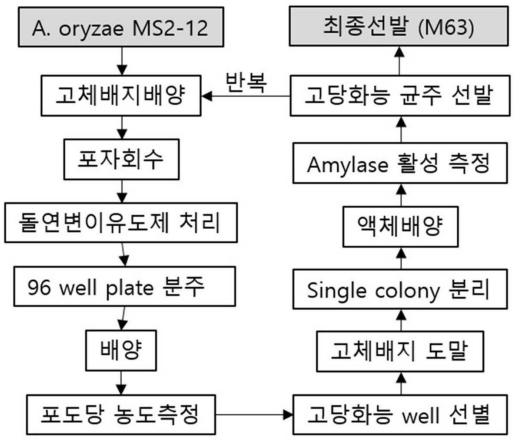
수탁일자 : 20161115

## 도면

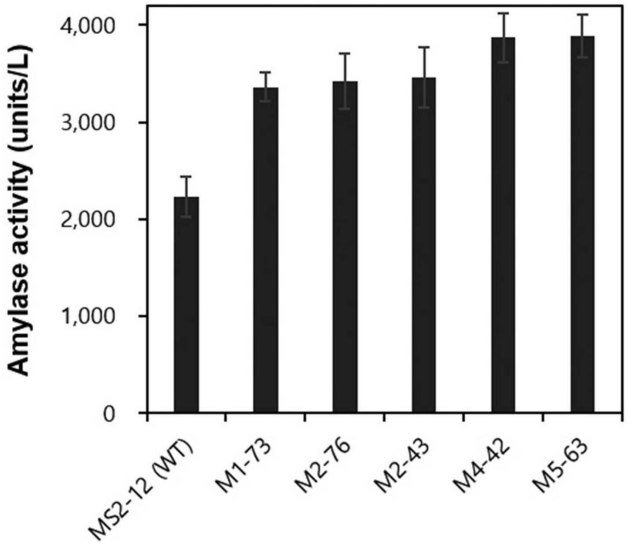
### 도면1



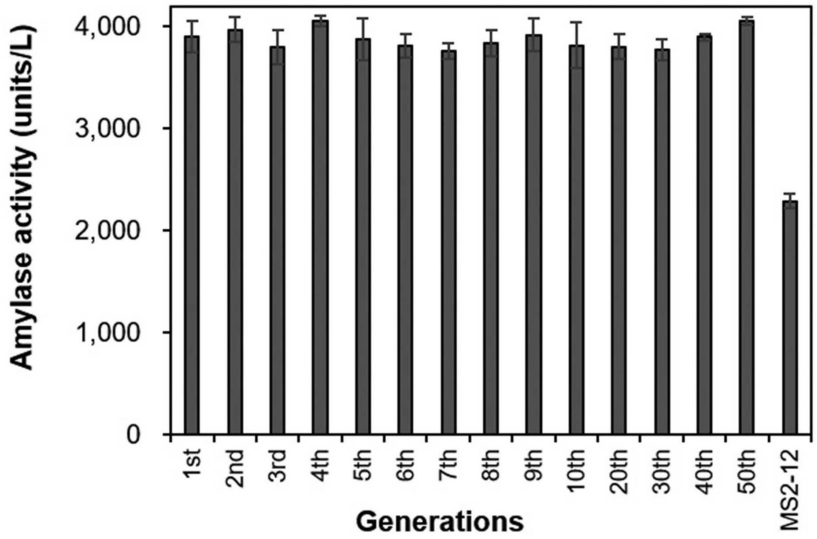
### 도면2


A. oryzae MS2-12
고체배지배양
포자회수
돌연변이유도제 처리
96 well plate 분주
배양
포도당 농도측정
반복
최종선발 (M63)
고당화능 균주 선발
Amylase 활성 측정
액체배양
Single colony 분리
고체배지 도말
고당화능 well 선별

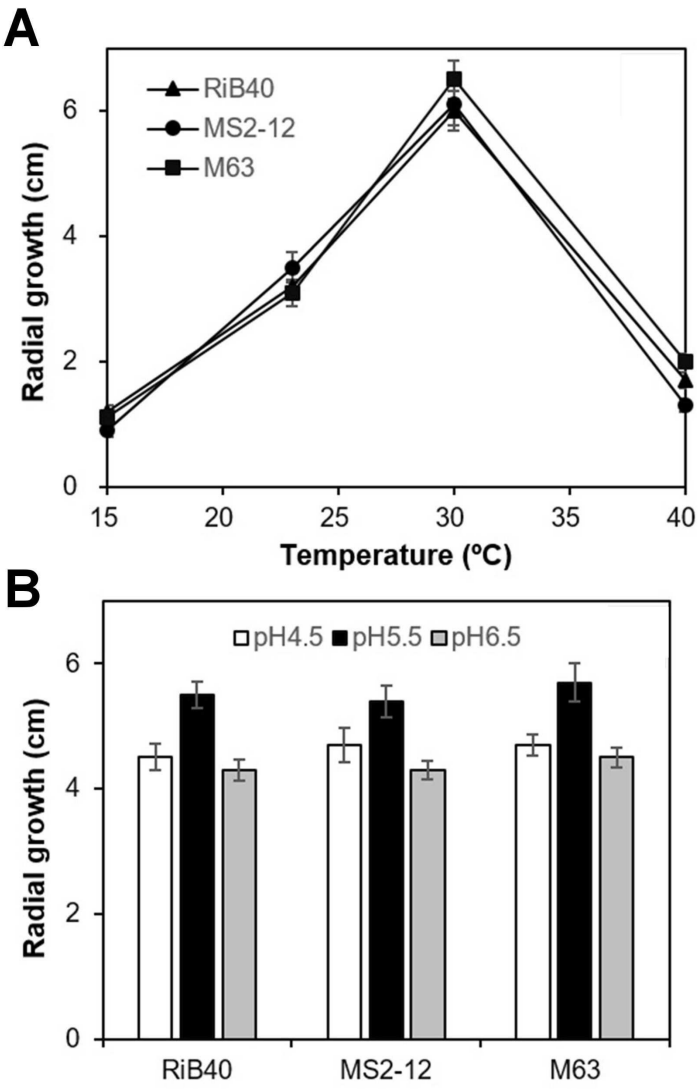
도면3


Amylase activity (units/L)
4,000
3,000
2,000
1,000
0
MS2-12 (WT)
M1-73
M2-76
M2-43
M4-42
M5-63

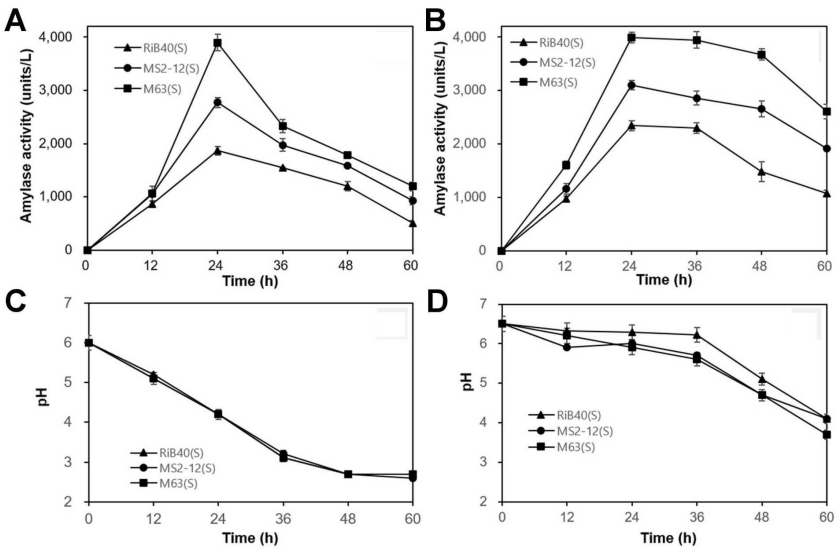
도면4


Amylase activity (units/L)
4,000
3,000
2,000
1,000
0
1st
2nd
3rd
4th
5th
6th
7th
8th
9th
10th
20th
30th
40th
50th
MS2-12
Generations

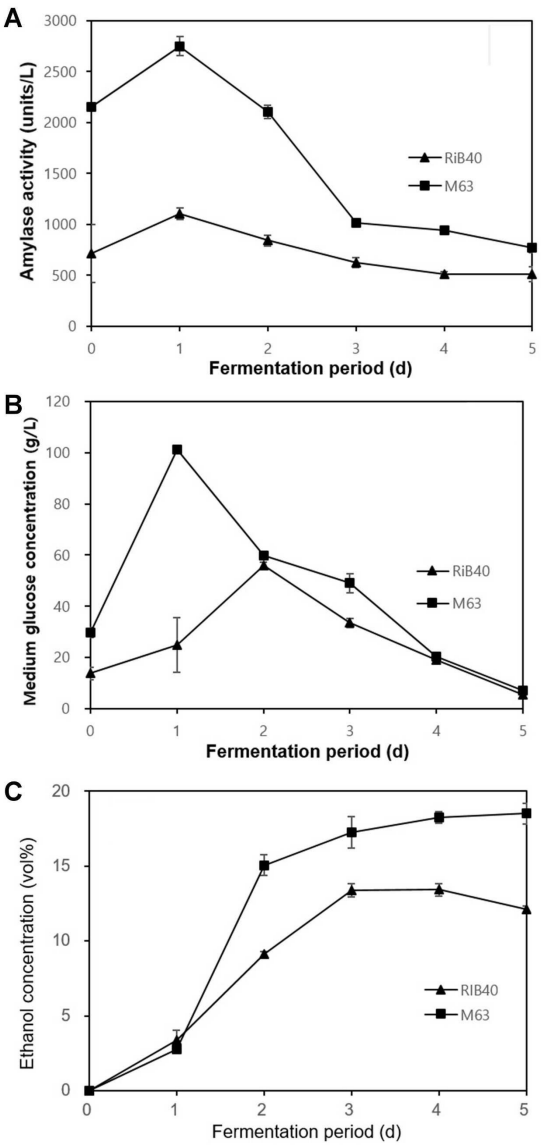
도면5


A
RiB40
MS2-12
M63
Radial growth (cm)
Temperature (°C)
B
pH4.5
pH5.5
pH6.5
Radial growth (cm)
RiB40
MS2-12
M63

도면6


A
B
C
D
RiB40(S)
MS2-12(S)
M63(S)
Amylase activity (units/L)
pH
Time (h)

도면7


A
Amylase activity (units/L)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
1
2
3
4
5
Fermentation period (d)
RiB40
M63
B
Medium glucose concentration (g/L)
120
100
80
60
40
20
0
Fermentation period (d)
RiB40
M63
C
Ethanol concentration (vol%)
20
15
10
5
0
Fermentation period (d)
RIB40
M63