



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2018년05월21일  
(11) 등록번호 10-1859417  
(24) 등록일자 2018년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23L 13/70 (2016.01) A23L 27/00 (2016.01)  
C12N 1/14 (2018.01) C12R 1/645 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A23L 13/74 (2016.08)  
A23L 27/88 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2017-0173233  
(22) 출원일자 2017년12월15일  
심사청구일자 2017년12월15일  
(30) 우선권주장  
1020160172448 2016년12월16일 대한민국(KR)  
1020160172440 2016년12월16일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO9728702 A1  
KR1020090036343 A  
JP2009213450 A  
JP05068508 A

(73) 특허권자  
숙명여자대학교산학협력단  
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)  
서울대학교산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
(72) 발명자  
윤요한  
서울특별시 송파구 송파대로8길 10, 1302동 1302호  
오혜민  
대전광역시 유성구 학하남로 10, 212동 901호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
정은열

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김영립

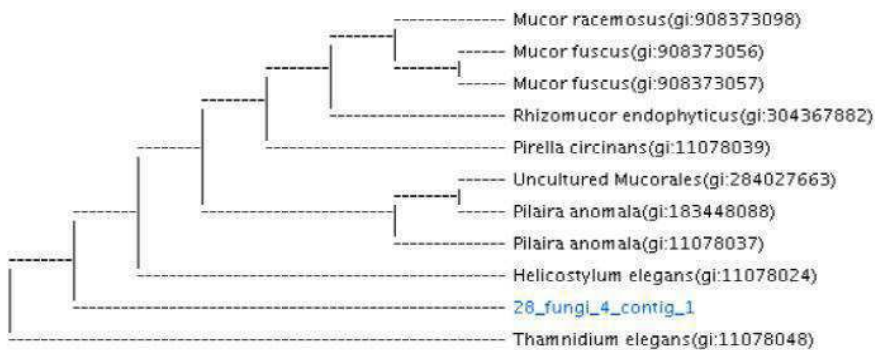
(54) 발명의 명칭 식육 연화 및 풍미 증진용 신규 필라이라 아노말라 smfm201611 균주, 및 이를 이용한 식육 연화 및 풍미 증진 방법

**(57) 요약**

본 발명은 식육 연화 및 풍미 증진용 신규 필라이라 아노말라 균주, 및 이를 이용하여 식육을 연화시키고 풍미를 증진시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 방법을 이용하면, 식육의 숙성 과정에서 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 식육의 이취를 제거하여 풍미를 증대시킴으로써 향상된 식감을 제공할 수 있다.

**대표도 - 도2**



(52) CPC특허분류

**C12N 1/14** (2013.01)  
A23V 2002/00 (2013.01)  
A23V 2200/15 (2013.01)  
A23V 2200/24 (2013.01)  
C12R 1/645 (2013.01)

(72) 발명자

**조철훈**

서울특별시 서초구 서초대로26길 19, 101동 303호

**이지영**

대전광역시 서구 도솔로 272-12

**정건호**

전라북도 전주시 완산구 당산로 11, 601동 1209호

**이현정**

경기도 안양시 만안구 안양로 110, 1605호

**오정민**

경기도 수원시 영통구 영통로200번길 20, 107동 303호

**용해인**

대전광역시 서구 신갈마로211번안길 104, 라동 301호

**최주희**

서울특별시 관악구 양녕로2가길 32-3, 2층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545012399

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발

연구과제명 저 등급·저 지방 식육의 부가가치 증진 프로젝트

기여율 1/1

주관기관 (주)감성고기

연구기간 2016.07.07 ~ 2018.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

식육 연화 및 풍미 증진 능력을 갖는 필라이라 아노말라 smfm201611 균주.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 수탁번호 KCTC18517P로 기탁된 것을 특징으로 하는 균주.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 식육은 우육 또는 돈육인 것을 특징으로 하는 균주.

#### 청구항 4

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물.

#### 청구항 5

(a) 식육 연화 및 풍미 증진 능력을 갖는 필라이라 아노말라 smfm201611 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물을 식육에 처리하는 단계; 및

(b) 상기 조성물이 처리된 식육을 숙성하는 단계;를 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 균주는 수탁번호 KCTC18517P로 기탁된 것을 특징으로 하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법.

#### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기 식육은 우육 또는 돈육인 것을 특징으로 하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법.

#### 청구항 8

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계의 숙성은 건식 숙성(dry aging) 방식인 것을 특징으로 하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법.

#### 청구항 9

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계의 숙성은 1-50일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법.

#### 청구항 10

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계의 숙성은 5 m/s 이하의 풍속 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법.

### 발명의 설명

**기술분야**

[0001] 본 발명은 식육 연화 및 풍미 증진용 신규 필라이라 아노말라 균주, 및 이를 이용하여 식육을 연화시키고 풍미를 증진시키는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 육류에 있어 소비자가 선호하는 품질은 육색, 연도, 풍미 및 다즙성 등으로 알려져 있다. 이에 육질을 개선하기 위한 방법으로 숙성기간을 달리한 방법, 온도를 달리한 방법, 건식방법, 습식방법, 단백질 분해효소 방법 등이 이용되고 있으나, 대부분 기존의 숙성방법을 일상적으로 사용하는 범위에서 머무르고 있다.

[0003] 숙성은 풍미나 조직이 불충분한 것을 일정 조건하에서 얼마간 방치하여 목표로 하는 풍미와 조직을 갖게 하는 조작을 말한다. 숙성을 거치는 동안 미생물이나 효소의 작용 또는 성분 간의 상호작용에 의한 향미성분의 생성 및 조직변화 등이 일어나 바람직한 식품이 된다.

[0004] 가축은 도살한 직후 일정기간에 걸쳐 사후경직이 일어난다. 사후경직이란 생물이 죽은 후에 근육이나 관절 등이 뻣뻣해지는 상태를 말한다. 경직 중인 고기는 딱딱하고 맛이 떨어지며 배어나오는 수분이 많아 먹을 수가 없다.

[0005] 그러나 최대 경직이 지난 근육은 단백질 분해효소 등에 의해 자기소화가 시작되고 육질이 부드러워진다. 또한, 자기소화가 시작되면 근육의 pH가 약간 회복되고 보수성이 증가하며 효소가 작용하여 아미노산과 불포화지방산인 올레인산 등의 물질이 생성되면서 풍미도 좋아진다. 이와 같이 맛있는 고기로 되는 현상을 '숙성'이라고 한다.

[0006] 소고기 숙성 방법으로는 습식숙성(wet aging)과 건식숙성(dry aging)의 두 가지 방법이 사용되고 있는데, 건조숙성 방법은 소고기를 포장지로 포장하지 않고 통풍이 잘되는 숙성실에 저장하여 숙성시킨다.

[0007] 건식숙성, 즉 드라이 에이징(dry-aging)은 일반적인 고기 숙성 방식인 습식숙성, 즉 웨트 에이징(wetaging)과 달리 기술 발달 이전 전통적인 고기숙성 방식을 이용해 자연적인 고기의 수분을 증발시키며 숙성시키는 방식이다.

[0008] 즉, 웨트 에이징은 고기의 수분을 그대로 유지한 상태에서 비닐 팩이나 밀봉된 플라스틱 통에 넣어 숙성시키는 반면, 드라이 에이징은 팬 또는 자연바람을 이용해 고기의 수분을 공기에 그대로 노출하면서 2주 내지 4주 정도 까지 숙성하게 된다.

[0009] 통상, 드라이 에이징은 도축을 하고 나서 커팅하기 전, 10일 내지 28일 정도를 통제된 온도와 습도 안에서 고기를 숙성하는 방법으로, 그 온도는 1도 내지 3도, 습도는 50% 내지 85%가 적당하다.

[0010] 종래 소고기의 육질을 개선하여 가격 경쟁력을 향상시키기 위하여 다양한 숙성방법이 제시되고 있는데, 예를 들어 특허 제10-0459858호 "육류 숙성 보관방법"은 0℃±2℃의 온도로 냉각하는 제1 과정, 냉각 후 보관되는 육류를 살균장치를 통해 살균 처리하여 숙성시키는 제2 과정 및 숙성된 육류에 대하여 -5℃±2℃의 온도로 보관하는 제3과정을 구비한다.

[0011] 그러나 종래 기술에 따른 소고기 건조숙성 방법은 저온에서 일정시간 동안 숙성하면, 소고기의 겉이 마르고 겹질이 딱딱하게 된다. 그러면 숙성 초기에 영향을 주던 미생물이 더이상 영향을 줄 수 없게 되므로 숙성 기간이 길어져도 소고기의 심부까지 숙성되지 못할 뿐만 아니라 소비자가 만족할 수 있는 우수한 관능 특성을 제공할 수 없다는 문제점이 있다.

[0012] 따라서 육류의 육질을 개선함과 동시에 육류의 관능적인 특성(마블링, 육색, 조직감, 다즙성, 풍미, 기호도 등)을 높일 수 있는 숙성 기술에 대한 개발이 필요한 실정이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0013] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명에서는 식육을 연화시키고 풍미를 증진시키는 능력이 뛰어난 신규 균주, 및 이를 이용하여 식육을 연화시키고 풍미를 증진시키는 방법을 제공하고자 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0014] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0015] 식육 연화 및 풍미 증진 능력을 갖는 필라이라 아노말라(*Pilaira anomala*) smfm201611 균주를 제공한다.
- [0016] 본 발명에 따르면, 상기 균주는 수탁번호 KCTC18517P로 기탁된 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따르면, 상기 식육은 우육 또는 돈육일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 (a) 식육 연화 및 풍미 증진 능력을 갖는 필라이라 아노말라(*Pilaira anomala*) smfm201611 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물을 식육에 처리하는 단계; 및 (b) 상기 조성물이 처리된 식육을 숙성하는 단계;를 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명에 따르면, 상기 균주는 수탁번호 KCTC18517P로 기탁된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따르면, 상기 식육은 우육 또는 돈육일 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따르면, 상기 (b) 단계의 숙성은 건식 숙성(dry aging) 방식일 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따르면, 상기 (b) 단계의 숙성은 1-50일 동안 수행될 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따르면, 상기 (b) 단계의 숙성은 5 m/s 이하의 풍속 하에서 수행될 수 있다.

**발명의 효과**

- [0025] 본 발명에 따른 식육 연화 및 풍미 증진 능력을 갖는 필라이라 아노말라 smfm201611 균주를 이용하면, 식육의 숙성 과정에서 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 식육의 이취를 제거하여 풍미를 증대시킴으로써 향상된 식감을 제공할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0026] 도 1은 본 발명에 따른 필라이라 아노말라 smfm201611 균주의 18s rRNA 염기서열을 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 필라이라 아노말라 smfm201611 균주의 계통도를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 필라이라 아노말라 smfm201611 균주의 전자현미경 이미지이다.
- 도 4는 건식 숙성된 식육(풍속: 0, 2.5, 5 m/s)의 곰팡이 및 효모 분포를 genus level에서 측정된 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 필라이라 아노말라 smfm201611 균주를 식육에 접종 및 건식숙성 28일 후 식육 내 미세구조 변화를 관찰한 결과이다.
- 도 6은 건조 숙성육으로부터 분리한 *P. nomala*의 안전성을 확인하기 위해 aflatoxin 생성능을 분석한 결과를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0027] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0028] 종래의 소고기 건조숙성 방법은 저온에서 일정시간 동안 자연 숙성을 하는 것으로, 장시간 숙성시 소고기의 겉이 마르고 껍질이 딱딱하게 되어 숙성 초기에 육질 연화에 영향을 주던 미생물이 더이상 영향을 줄 수 없게 되기 때문에 숙성 기간이 길어져도 소고기의 심부까지 숙성되지 못할 뿐만 아니라 소비자가 만족할 수 있는 우수한 관능 특성을 제공할 수 없다는 문제점이 있었다.
- [0029] 이에, 본 발명에서는 식육에 처리될 경우 숙성 기간 내내 식육에 영향을 미쳐 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 식육의 이취를 제거하여 풍미를 증대시킴으로써 향상된 식감을 제공할 수 있는 신규 균주, 즉 식육 연화 및 풍미 증진 능력을 갖는 필라이라 아노말라 smfm201611 균주를 제공한다.
- [0030] 상기 필라이라 아노말라 smfm201611 균주는 대한민국 대전광역시 유성구에 위치한 한국생명공학 연구원 생물자원센터에 2016년 11월 23일자로 기탁하였으며 기탁번호 KCTC18517P를 부여받았다.

- [0031] 본 발명의 식육은 신선육, 냉장 또는 냉동 유통되고 있는 모든 소비형태의 육류를 의미하는 것으로, 우육 또는 돈육과 같이 연도가 증가함에 따라 품질관능의 향상을 가져올 수 있는 육류가 이에 해당할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물을 제공한다.
- [0033] 이때, 상기 조성물은 통상적인 방법으로 식육 연화 및 풍미 증진용으로 제형화할 수 있으며, 예를 들어 용액, 분말 또는 과립 형태로 제조될 수 있으나 그 제형에 특별히 한정되지는 않는다.
- [0034] 또한, 상기 조성물은 숙성 대상이 되는 식육에 살포(예를 들면 분무, 미스팅, 분말 살포, 과립 살포 등), 표면 도포등을 통해 상기 식육에 처리될 수 있으며, 상기 조성물은 식육의 숙성 전에 처리되거나 숙성 후 일정한 시점 후에 처리될 수 있다. 또한, 그 사용량은 처리 대상이 되는 식육의 부위, 중량, 숙성 장소 등에 따라 적절히 결정할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명에서는 (a) 식육 연화 및 풍미 증진 능력을 갖는 필라이라 아노말라 smfm201611 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물을 식육에 처리하는 단계; 및 (b) 상기 조성물이 처리된 식육을 숙성하는 단계;를 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법을 제공한다.
- [0036] 이때, 상기 필라이라 아노말라 smfm201611 균주는 식육에 처리될 경우 숙성 기간 내내 식육에 영향을 미쳐 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 식육의 이취를 제거하여 풍미를 증대시킴으로써 향상된 식감을 제공할 수 있는 신규 균주로서, 상기 필라이라 아노말라 smfm201611 균주는 대한민국 대전광역시 유성구에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2016년 11월 23일자로 기탁하였으며 기탁번호 KCTC18517P를 부여받았다.
- [0037] 본 발명의 식육은 신선육, 냉장 또는 냉동 유통되고 있는 모든 소비형태의 육류를 의미하는 것으로, 우육 또는 돈육과 같이 연도가 증가함에 따라 품질관능의 향상을 가져올 수 있는 육류가 이에 해당할 수 있다.
- [0038] 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물은 통상적인 방법으로 식육 연화 및 풍미 증진용으로 제형화할 수 있으며, 예를 들어 용액, 분말 또는 과립 형태로 제조될 수 있으나 그 제형에 특별히 한정되지는 않는다.
- [0039] 또한, 상기 조성물은 숙성 대상이 되는 식육에 살포(예를 들면 분무, 미스팅, 분말 살포, 과립 살포 등), 표면 도포등을 통해 상기 식육에 처리될 수 있으며, 상기 조성물은 식육의 숙성 전에 처리되거나 숙성 후 일정한 시점 후에 처리될 수 있다. 또한, 그 사용량은 처리 대상이 되는 식육의 부위, 중량, 숙성 장소 등에 따라 적절히 결정할 수 있다.
- [0040] 상기 (b) 단계의 숙성은 종래 당업계에서 공지되어 있는 일반적인 방식이라면 반드시 이에 제한되는 것은 아니지만, 식육의 연도와 풍미 향상 측면을 고려할 때, 건식 숙성(dry aging) 방식을 따르는 것이 바람직할 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 (b) 단계의 숙성은 1-50일 동안 수행되는 것이 바람직하다.
- [0042] 또한, 상기 (b) 단계의 숙성은 5 m/s 이하의 풍속 조건 하에서 수행되는 것이 바람직할 수 있으며, 식육의 연도와 풍미, 기호도 등을 종합적으로 고려할 때 풍속 0 m/s 즉 공기의 흐름이 차단된 장소에서 수행되는 것이 더욱 바람직할 수 있다.
- [0044] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0046] **실시예 1. 필라이라 아노말라 smfm201611 균주의 분리 및 배양**
- [0047] 28일 건조 숙성된 육제품으로부터 육질연화, 풍미증진의 효과를 나타내는 Mucoraceae 과(Family) 균주를 분리 및 배양하였다.
- [0048] 곰팡이 분리를 위하여, i) 건조숙성육 표면에 피어있는 필라이라 아노말라(*Pilaira anomala*) 균주의 단일포자를 감자 한천 배지(PDA; Potato Dextrose Agar, 4g potato, 20g dextrose, 15g agar per 1L)에 옮겨 배양하기 위해 1.2% agar를 1 × 1 cm로 잘라 slide glass에 올려놓고 agar film 모서리에 단포자를 접종하였다. 접종된 agar film이 올려져 있는 PDA 배지는 4-5 °C에서 4-5일 배양을 통하여 균주를 분리하였다. ii) 또한, 건조숙성육 25g에 0.1% 펩톤수(peptone water)를 50 ml 가하여 pummeler로 교반시킨 후 PDA 배지에 도말하여 4-5 °C에

서 4-5일 배양을 통하여 콜로니를 선별하여 분리하였다.

[0049] 상기 균주를 통하여 단백질 분해능을 확인하기 위하여 PDA 배지에 skim milk를 첨가하여 균을 접종하고 4-5 °C 에서 4-5일간 배양하였다. 균주의 단백질 분해능은 균 주변에 형성되는 clear zone을 통하여 확인하였다.

[0051] **실시예 2. 필라이라 아노말라 smfm201611 균주의 동정**

[0052] 육질연화, 풍미증진의 효과를 나타내는 필라이라 아노말라 균주의 동정을 위하여 18s rRNA 유전자 염기서열 분석을 실시하였다(도 1).

[0053] 샘플은 상기 실시예 1을 통해 분리된 신규한 균주의 균락이 있는 평판 배지 상태로 마크로젠(주)에 의뢰하였으며, 18s rRNA region의 whole sequencing을 통하여 나온 sequence를 NCBI (National Center for Biotechnology Information: 미국 국립생물정보센터)에서 Blast 검색을 통하여 상동성을 조사한 결과를 확인하였다.

[0054] 또한, 18s rRNA 유전자 증폭을 위한 프라이머는 하기에 기재하였다.

[0055] 정방향 프라이머 : NS1 (5'-GTAGTCATATGCTGTGCTC-3')

[0056] 역방향 프라이머 : NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3')

[0057] 본 발명에 따른 필라이라 아노말라 smfm201611 균주의 18s rRNA 유전자 염기서열 분석 결과, 본 균주는 필라이라 아노말라 strain IUE 573 균주와 96% 이상의 상동성을 보임을 확인하였는바, 상기 분리된 미생물은 필라이라 아노말라 균주에 해당함을 확인하였다. 아울러, 상기 분리한 균주를 전자현미경을 이용하여 관찰하였으며 이를 도 3에 나타내었다.

[0058] 이에, 본 발명에 따른 신규한 균주를 필라이라 아노말라 smfm201611으로 명명하고, 2016년 11월 23일 한국생명공학연구원 생명자원센터에 등록하여 기탁번호 KCTC18517P를 부여받았다.

[0060] **실험예 1. pH 및 전단력 측정**

[0061] pH 측정은 1 g의 시료에 9 mL의 증류수를 첨가한 후 균질기(T10 basic, Ika Works, Staufen, Germany)를 이용하여 1,130 ×g로 1분간 균질을 한 후 여과한 액을 pH meter(SevenGo, Mettler-Toledo international Inc. Seitzerland)를 이용하여 측정하였다.

[0062] 전단력은 식육 내 심부온도가 72° C에 도달할 때까지 중탕 가열한 다음 상온에서 방냉 후, 직육면체(5.0 × 2.0 × 1.2 cm, length × width × height)로 정형하여 사용하였다. Warner-Bratzler shear를 장착한 texture analyzer(CT3 10K, Brookfield Engineering Laboratories., USA)를 사용하여 근섬유방향과 수직이 되게 하여 시료가 완전히 절단될 때까지 측정하였으며, 측정조건은 maximum cell load, 10 kg; probe test speed, 2.0 mm/s; distance, 30 mm; trigger load, 10 g이었다.

**표 1**

[0063]

	Con	Wet	Dry 0	Dry 2.5	Dry 5	SEM <sup>1</sup>
pH	5.63 <sup>b</sup>	5.45 <sup>c</sup>	5.96 <sup>a</sup>	5.60 <sup>b</sup>	5.63 <sup>b</sup>	0.030
Shear force (N)	81.45 <sup>a</sup>	48.36 <sup>bc</sup>	<b>42.17<sup>c</sup></b>	58.86 <sup>b</sup>	53.34 <sup>bc</sup>	3.381

[0064] <sup>1</sup>Standard errors of mean (n=15).

[0065] <sup>a-d</sup>Different letters within same row differ significantly (p<0.05).

[0066] Abbreviation: Non-aged and obtained at 2 days postmortem, Con; wet-aged for 28 days, Wet; dry-aged for 28 days with 0, 2.5, and 5 m/s of wind velocity, Dry 0, Dry 2.5, and Dry 5, respectively.

[0067] 습식 및 건식숙성 후 육우 보섭의 육질은 상기 표 1와 같다. 습식숙성 시 pH는 대조구에 비해 감소하는 경향을 보였고 건식숙성 시 pH 값은 모두 증가하였다(p<0.05). 특히, 0 m/s 건식숙성 처리군의 pH가 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다. 전단력은 숙성 후 유의적 감소를 보였으며 0 m/s에서 가장 낮은 전단력 수치를 보였다 (p<0.05).

[0069] **실험예 2. 관능평가**

[0070] 소비자 기호도 및 순위법을 이용해 시료간 관능적 차이를 평가하였다. 관능평가를 위해 소비자 패널 8명을 선발하였으며, 시료는 일정한 크기(5.0 × 2.0 × 1.2 cm, length × width × height)로 세절하여 식육 내 심부 온도가 72 °C에 도달될 때까지 조리한 다음 각 패널에게 제시하였다. 소비자 기호도는 9점 척도법을 이용하여 평가하였고 건식숙성속 2.5 m/s를 standard control로 설정하여 건식숙성속의 향 및 풍미에 대해 관능 패널들이 숙지하게 한 뒤 시료간 건식숙성 향 및 풍미의 강도를 1-4순위로 측정하였다.

**표 2**

[0071]

		Wet	Dry 0	Dry 2.5	Dry 5	SEM <sup>1</sup>
Consumer test	Overall acceptance	5.38 <sup>c</sup>	6.75 <sup>a</sup>	6.25 <sup>ab</sup>	6.00 <sup>b</sup>	0.199
Ranking test <sup>2</sup>	Odor	4	2	3	1	-
	Flavor (taste+odor)	4	3	2	1	-

[0072] <sup>1</sup>Standard errors of mean (n=32).

[0073] <sup>2</sup>Sensory panelists ranked the odor and flavor intensity of samples after comparing the sample of Dry 2.5 m/s.

[0074] <sup>a-c</sup>Different letters within same row differ significantly (p<0.05).

[0075] Abbreviation: wet-aged for 28 days, Wet; dry-aged for 28 days with 0, 2.5, and 5 m/s of wind velocity, Dry 0, Dry 2.5, and Dry 5, respectively.

[0076] 습식 및 건식숙성 후 보섭의 관능평가는 상기 표 2과 같다. 습식숙성속에 비해 건식숙성속 모두 유의적으로 높은 기호도 결과를 보였다. 또한, 건식숙성속 2.5 m/s를 standard control로 설정하여 건식숙성속의 풍미에 대해 관능검사요원이 숙지하게 하고 건식숙성 강도를 1-4순위로 측정하여 비교해본 결과, 5 m/s에서 건식숙성 향 및 풍미가 가장 강했으나 기호도는 가장 낮은 결과를 보였다. 기호도는 0 m/s에서 가장 높았으며 건식숙성 향 및 풍미는 각각 2위, 3위로 나타났다.

[0078] **실험예 3. 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing, NGS)**

[0079] 28일 동안 숙성방법(0, 2.5, 5 m/s)에 따라 숙성을 진행한 시료를 각각 2개씩 (1 × 1 cm) 분석에 활용하였으며, DNA를 추출하여 QC (Quality control)을 진행하였다. 추출된 DNA로 미생물 분포를 확인하기 위하여 sequencing을 진행하였고, 이는 Illumina SBS 기술을 활용하였다. 분석된 기본 데이터를 활용하여 Illumina Miseq 의 소프트웨어를 통한 통계적 분석을 진행하였고, 각 그룹간의 미생물 분포를 비교하여 하기 도 4 및 표 3에 나타내었다.

**표 3**

[0080]

	Dry 0 m/s	Dry 2.5 m/s	Dry 5 m/s
Mucoraceae	99.8	81.0	86.0

[0081] 곰팡이는 건식숙성 0 m/s에서 가장 많이 존재(99.6%)했으며, 존재하는 곰팡이는 Mucoraceae family로 확인되었으며 필라이라 아노말라 또한 Mucoraceae family로 분류된다.

[0082] 효소 활성 확인을 위하여 skim milk를 혼합한 PDA 배지에 필라이라 아노말라를 배양하였다. 배양 결과를 배양액을 접종한 부위 주변에 투명한 환을 형성하여 skim milk로 인한 단백질을 분해하는 단백질 분해능(protease)을 확인하였다. 이 단백질 분해능에 의해 숙성기간 동안 건조숙성속 특유의 관능상의 특성이 나타나는 것으로 사료된다.

[0084] **실험예 4. 필라이라 아노말라 접종균의 변화 관찰**

[0085] (1) 식육에 필라이라 아노말라 smfm201611를 접종한 군과, 접종하지 않은 군(대조군)의 건조숙성 기간에 따른 전단력 변화를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다. 전단력은 육 내 심부온도가 72° C에 도달할



때까지 증탕 가열한 다음 상온에서 방냉 후, 코어(1.54 × 4.0 cm<sup>2</sup>)로 정형하여 사용하였다. Warner-Bratzler shear를 장착한 texture analyzer(CT3 10K, Brookfield Engineering Laboratories., USA)를 사용하여 근섬유방향과 수직이 되게 하여 시료가 완전히 절단될 때까지 측정하였으며, 측정조건은 maximum cell load, 10 kg; probe test speed, 2.0 mm/s; distance, 30 mm; trigger load, 0.1 N 이었다.

표 4

[0086]	건식숙성 기간(일)				SEM <sup>1</sup>
	0	14	21	28	
대조군	35.91 <sup>a</sup>	18.62 <sup>c</sup>	16.28 <sup>cx</sup>	24.53 <sup>by</sup>	0.920
곰팡이	35.91 <sup>a</sup>	19.00 <sup>c</sup>	12.59 <sup>dy</sup>	27.60 <sup>bx</sup>	0.815

[0087] <sup>1</sup>Standard error of means (n= 15),

[0088] <sup>a-d</sup>The letters within the same row were significantly different (P<0.05).

[0089] <sup>x,y</sup>The letters within the same column were significantly different (P<0.05).

[0090] 측정 결과, 식육에 필라이라 아노말라 smfm201611를 접종한 군과, 접종하지 않은 군(대조군) 모두 건조숙성 21일까지 전단력이 감소하는 경향을 보였으며, 본 발명에 따라 식육에 필라이라 아노말라 smfm201611를 접종한 군의 경우 건조숙성 21일 후에는 대조군에 비하여 전단력이 낮게 나타나, 연도가 더 좋은 것을 확인할 수 있었다.

[0092] (2) 식육에 필라이라 아노말라 smfm201611를 접종한 군과, 접종하지 않은 군(대조군)의 건조숙성 28일 후 식육 내 미세구조 변화를 투과전자현미경(TEM) 이미지로 관찰하였으며, 그 결과를 하기 도 5에 나타내었다. 숙성 후 시료를 1 mm 로 절단하여 고정시킨 후 3차 증류수로 세척하여 0.5% uranyl acetate로 염색하고 탈수하였다. 탈수가 끝난 조직은 propylene oxide로 치환하여 spurr's resin 혼합액에 포매한 다음, 70℃ 드라이오븐에서 24시간 동안 중합반응 시켰다. 포매된 조직은 미세절단한 후 절편을 투과전자현미경으로 관찰하였다.

[0093] 측정 결과, 대조군에 비해 식육에 필라이라 아노말라 smfm201611를 접종한 군 내 z-disk의 붕괴가 더 많이 일어났음을 관찰하였고, z-disk의 붕괴는 육질의 연화를 의미하며 필라이라 아노말라의 proteolytic activity 로 인하여 근육단백질이 분해되는 것으로 판단된다.

[0095] (3) 식육에 필라이라 아노말라 smfm201611를 접종한 군과, 접종하지 않은 군(대조군)의 건조숙성 기간에 따른 환원당 함량 변화를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다. 환원당의 정량은 시료 1 g에 80% EtOH(50 ℃)를 첨가하여 원심분리로 2회 추출하여 여과한 후 질소 농축하였다. 농축된 시료에 증류수를 첨가하여 원심분리해서 육 내 당 성분을 추출하였다. 추출시료에 DNS 시약을 첨가한 후 90 ℃에서 가열 후 냉각한 다음 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하여 환원당 함량을 정량하였다. 이때 표준물질로 glucose (Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 비교하였다.

표 5

[0096]	건식숙성 기간(일)				SEM <sup>1</sup>
	0	14	21	28	
대조군	9.93 <sup>c</sup>	17.67 <sup>ax</sup>	15.35 <sup>bx</sup>	17.31 <sup>ax</sup>	0.235
곰팡이	9.93 <sup>d</sup>	14.46 <sup>ay</sup>	11.63 <sup>cy</sup>	13.30 <sup>by</sup>	0.221

[0097] <sup>1</sup>Standard error of means (n= 16).

[0098] <sup>a-d</sup>The letters within the same row were significantly different (P<0.05).

[0099] <sup>x,y</sup>The letters within the same column were significantly different (P<0.05).

[0100] 측정 결과, 식육에 필라이라 아노말라 smfm201611를 접종한 군과, 접종하지 않은 군(대조군) 모두 건조숙성 수

14일까지 환원당 함량이 큰 쪽으로 증가하였다가 21일까지 감소, 다시 28일에는 증가하는 경향을 보임을 확인하였다. 대조군에 비하여 낮은 환원당 함량을 나타냈으나, 숙성 전(0일차)에 비하여 숙성을 통하여 환원당이 증가하는 것으로 확인되었다. 필라이라 아노말라 smfm201611이 육에 분포하여 성장하면서 당을 소비하기 때문에 환원당 함량은 낮으나, 연도와 풍미에는 긍정적인 영향을 주는 것으로 확인되었다(data not shown).

[0102] **실례 6. 필라이라 아노말라 균주의 안정성 확인**

[0103] 건조 숙성육으로부터 분리한 필라이라 아노말라 smfm201611 균주의 안전성을 확인하기 위해 aflatoxin 생성능을 분석하였고, 그 결과를 하기 도 6에 나타내었다. 아플라톡신은 70% 메탄올로 추출한 후 면역친화성칼럼으로 정제하여 트리플루오로초산(trifluoroacetic acid)으로 유도체화 시킨 것을 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석하였다. 곰팡이 독소는 아플라톡신(aflatoxin), 오크라톡신(ochratoxin), 푸모니신(fumonisin)등으로 곰팡이에 의하여 생성되는 2차 대사산물이며 지금까지 400여 종이 알려져 있으며, 그 중 아플라톡신은 WHO의 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서 group 1의 발암물질로 분류하고 있어 독소의 위해성이 강조되고 있다. 측정 결과, 본 발명에 따라 분리된 필라이라 아노말라 smfm201611 균주로부터 aflatoxin(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>)이 검출되지 않았는바, 독소에 대한 안정성이 높음을 확인하였다.

**수탁번호**

[0104]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18517P

수탁일자 : 20161123

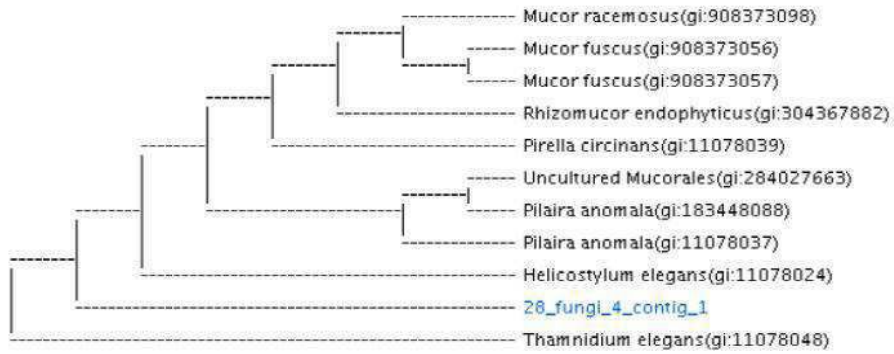
**도면**

**도면1**

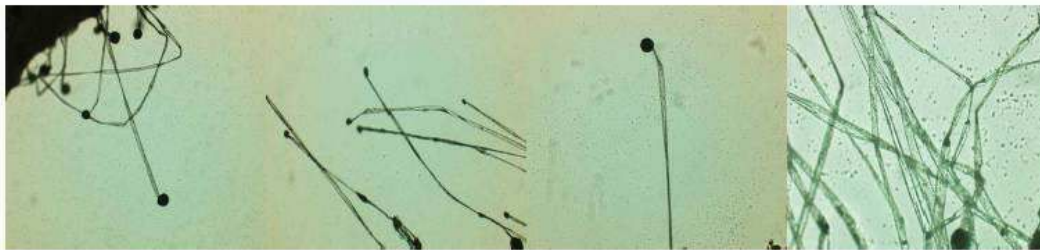
```

TTATATTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATGATCTACGTGACATATTTCTTTACTACTTGG
.ATAACCGTGGTAATTTCTAGAGCTAATACATGCAAAAAAGCCCTGACTTCGGAAAGGGGTGCACCTATTAGAT
AAAGCCAACGCTGGGTAAACCAAGTTTTTCCTTGGTGATTCATAATAATTTAGCGGATCGCATGGCCTTGTG
CTAGCGACGGTCCACTCGATTTTCTGCCCTATCATGGTTGAGATTGTAAGATAGAGGCTTACAATGCCATC
AACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCCACATCCAAGGAA
GGCAGCAGCGCGCAAAATTACCCAATCCCAGACCGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCAGGGCCCT
TTAAGGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGT
GCCAGCAGCCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAACGTCGTAAGTCA
AATTTTAGTCTTTAGCGAAGTGGCCTGGTCTTCATTGATCAAGCTCGTTTCTGCCGAGACTTTTTTTTTG
GTTATGCTATGAGTGGCTTCGGTCAATTTGTAGTCTCTAGCCAAATAATTACCATGAGCAAAATCAGAGTGT
TAAAGCAGGCTTTAAGCTTGAATGTGTTAGCATGGAATAATGAAATAGACTTCAGTCCCTATTTTCGTTG
GTTCAAGGAAC TAGAGTAATGATGAATAGAAACGGTTGGGGGCATTTGTATTTGGTCGCTAGAGGTGAAATT
CTTGATTTGACCGAAGACAACTACTGCGAAAGCATTGACCCAGGACGTTTTCATTGATCAAGGTCTAAA
GTTAAGGGATCGAAGACGATTAGATACCGTCGTACTTAACCACAACTATGCCGACTAGAGATTGGGCC
TGTTTATTATGACTGGCTCAGCATCTTAGCGAAAGTAAAGTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGGACGCA
AGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAAGGCACCCAGGAGTGGAGCCTGCGCTTAATTTGACTCAAC
ACGGGGAACCTACCAAGTCCAGACATAGTAAGGATTGACAGATTGAAAGCTCTTTCTAGATTCTATGGGT
GGTGGTGATGGCCGTTCTTAGTTCGTGGAAGTATTGTTCTGGTTAATTCOGATAACGAAACGAGACCTTAT
TCTGCTAAATAGGCAGGTCAACTTTTTAGTTGATTAATTTATTTATAAATCTGGCTTCTTAGAGAGACTAT
CGGCTTCAAGCCGAAAGGAGTTTAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGC
GCCTACACTGATGAAATCAGCGAGTTATAACCTTGGCCGGAAGTCTGGGTAACCTTTGAAATTTTCAT
CGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCT
TGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTATAGTGAGC
ATATGGGATCAGTAGGATTAGACTGGCAACAGTCTTCCCTGCAGAG
    
```

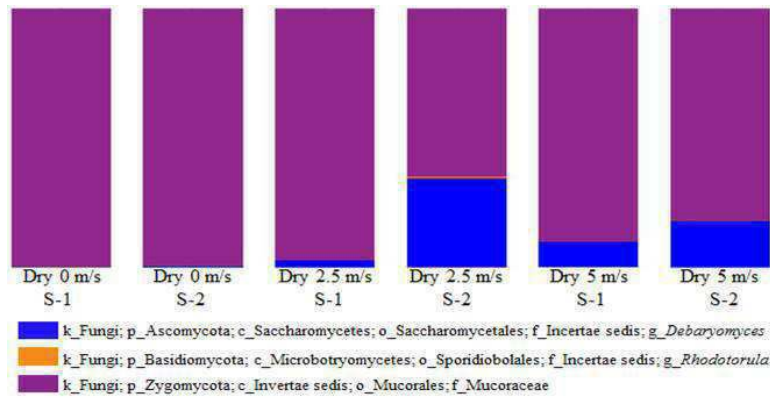
도면2



도면3



도면4



도면5

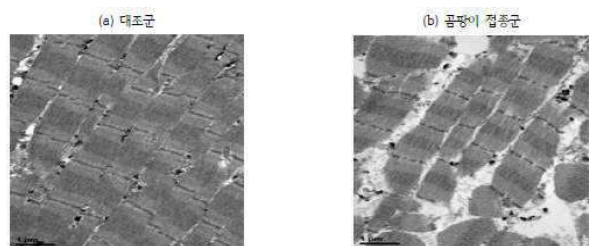


그림1. 지너지스트 잠종 28일 후 근육 내 미세구조 변화

도면6

 <b>시험 성적서 (Test Certificate)</b>		접수번호 : PCAM - 1703 - T010 페이지 : ( 1 ) / ( 총 1 )								
유 34036 대경공업사 유성구 테크노 11호 12 (합동동 867) / 전화: (042)823-8680~1 / 전송: (042)823-8682										
<b>1. 시료내용</b>										
기관명	숙명여자대학교 산학협력단	의뢰일자	2017년 3월 22일							
의뢰자	숙명여자대학교 식품미생물학연구소									
생산지 / 주소	서울특별시 용산구 경파로47길 100									
시료명	Pilaira anomala SMFM201611	시험장소	분석실							
시험기간	2017년 3월 22일 ~ 2017년 3월 30일	분석장비	LC-MS/MS							
용도	참고용	시험환경온도	(22 ~ 24) °C							
		시험환경습도	(35 ~ 40) %							
<b>2. 곰팡이독소 검사결과</b>										
검사결과										
단위 : µg/kg										
<table border="1"> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">검사항목</td> </tr> <tr> <td rowspan="4" style="text-align: center;">Aflatoxin</td> <td style="text-align: center;">B<sub>1</sub></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B<sub>2</sub></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">G<sub>1</sub></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">G<sub>2</sub></td> </tr> </table>				검사항목		Aflatoxin	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
검사항목										
Aflatoxin	B <sub>1</sub>									
	B <sub>2</sub>									
	G <sub>1</sub>									
	G <sub>2</sub>									
결과 ( µg/kg ) : 상기항목 불검출										
작성자 (시험자) 성명 : 김현영 (서명)		승인자 (기술책임자) 성명 : 최성민 (서명)								
※ 본 검사결과에 변경, 고지, 소송 등 법적요건으로 사용될 수 없습니다. ※ 위의 내용은 신청인이 제공한 시료에 대한 결과이며, 시료의 모함은 신청인이 표시할 것입니다. ※ 이 시험결과서는 무료 이외의 사용불 가능합니다.										
2017년 3월 30일 주식회사 피캠코리아 (인)										

서적P-A-210-02  
(11-02-21 승인)

A4(210x297)