



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월21일
(11) 등록번호 10-2156219
(24) 등록일자 2020년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/16 (2006.01) A23L 13/70 (2016.01)
A23L 31/10 (2016.01) C12R 1/645 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/16 (2013.01)
A23L 13/74 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0042706
(22) 출원일자 2018년04월12일
심사청구일자 2018년04월12일
(65) 공개번호 10-2019-0119360
(43) 공개일자 2019년10월22일
(56) 선행기술조사문헌
JP08205821 A*
Yeast, 23권, 415-437면(2006) 1부.*
JP10179089 A
KR101859417 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
숙명여자대학교산학협력단
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
윤요한
서울특별시 송파구 송파대로8길 10, 1302동 1302호 (장지동, 송파파인타운13단지)
오혜민
대전광역시 유성구 학하남로 10, 212동 901호 (계산동, 오뚜그란데 미학)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 1 항

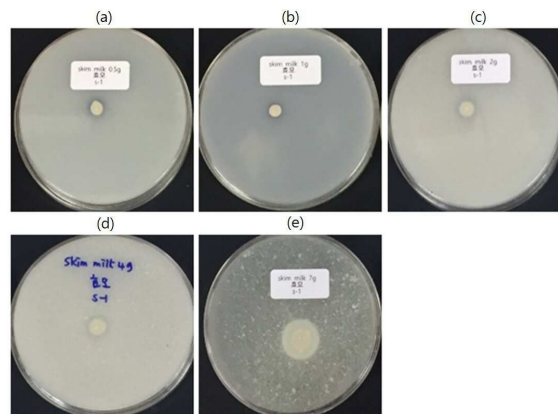
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 식육 연화 및 풍미 증진용 데바리오마이세스 한세니 smfm201707 균주 및 이를 이용한 식육 연화 및 풍미 증진 방법

(57) 요약

본 발명은 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 갖는 데바리오마이세스 한세니 smfm201707(*Debaryomyces hansenii* smfm201707) 균주와, 이를 이용하여 식육을 연화시키고 풍미를 증진시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 31/10 (2020.05)
 A23V 2002/00 (2013.01)
 A23V 2250/218 (2013.01)
 C12R 1/645 (2013.01)

(72) 발명자

이지영

대전광역시 서구 도솔로 272-12 (내동)

정건호

전라북도 전주시 완산구 당산로 11, 601동 1209호
 (서신동, 쌍용서신아파트)

조철훈

서울특별시 서초구 서초대로26길 19, 101동 303호
 (방배동, 브라운스톤방배)

이현정

경기도 수원시 권선구 서수원로 99 (오목천동)

윤지원

서울특별시 관악구 호암로 572-1 (신림동)

김민수

전라북도 무주군 무주읍 교동1길 10

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|-------------|----------------------------|
| 과제고유번호 | 316048 |
| 부처명 | 농림축산식품부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 농림수산식품기술기획평가원 |
| 연구사업명 | 고부가가치식품기술개발 |
| 연구과제명 | 저 등급·저 지방 식육의 부가가치 증진 프로젝트 |
| 기여율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 감성고기 |
| 연구기간 | 2016.07.07 ~ 2018.12.31 |

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

(a) 2.5 내지 5 m/s의 풍속으로 숙성시킨 건조숙성육에서 분리되고, 수탁번호 KCTC18601P로 기탁된, 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 갖는 데바리오마이세스 한세니 smfm201707(Debaryomyces hansenii smfm201707) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물을 식육에 처리하는 단계; 및

(b) 상기 조성물이 처리된 식육을 숙성하는 단계;를 포함하고,

상기 단계(b)에서는 2.5 내지 5 m/s의 풍속이 공급되는 조건에서 5 내지 28일동안 건식 숙성 방법(dry aging)을 이용해 상기 식육을 숙성하는 것을 특징으로 하는 식육 연화 및 풍미 증진 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 갖는 데바리오마이세스 한세니 smfm201707(Debaryomyces hansenii smfm201707) 균주와, 이를 이용하여 식육을 연화시키고 풍미를 증진시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식생활이 서구화됨에 따라 육류 소비량도 크게 증가하고 있으며, 기존의 탕또는 국 등의 조리 형태에서, 최근에는 얇게 썬 식육을 이용하여 등심구이나 삼겹살 구이 등의 구이 음식 형태로 육류를 섭취하고 있어 주된 조리방법 또한 변화하고 있다. 이에 따라, 국내에서는 육류가공품의 소비가 일반화되어 있는 서양과는 달리 신선육의 소비가 육가공품의 소비에 비하여 소비 비율이 훨씬 높은 것으로 알려져 있다.

[0003] 신선육은 가축을 갖 도살한 상태에서 수득한 식육을 상온 또는 저온에서 보관하여 단시간 내에 섭취하는 도살 직후의 육류를 의미하는 것으로, 신선육의 경우 육질이 신선하다는 장점이 있으나, 가축의 도축 후 일정기간 동안은 근육의 사후경직 등이 발생해 육질이 질기고, 맛이나, 향, 식감 등이 떨어지게 되는 단점이 있다. 특히,

장기간 보관하는 냉동육의 경우 운반과정이나 구매 시 제대로 냉동이 되지 않아 세균들의 번식에 의한 품질저하는 물론 심할 경우 식중독 등의 위생상의 문제점이 발생하는 문제가 있다.

[0004] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서, 최근에는 식육을 일정 조건하에서 얼마간 방치하여 미생물이나 효소의 작용 또는 성분 간의 상호작용을 통해 숙성시킨 숙성육에 대한 수요가 증가하고 있으며, 숙성육은 유리지방산의 함량이 증가하면서 풍미가 향상되고, 가축 고유의 냄새가 제거되어 섭취자의 기호를 충족시켜 줄 수 있으며, 신선육에 비해 소화가 쉽다는 장점을 갖는다.

[0005] 기존에는 식육을 숙성시키기 위한 방법으로 숙성기간 또는 온도를 달리하거나, 건식 또는 습식방법, 단백질 분해효소를 처리하는 방법 등을 이용하여 숙성육을 제조하고 있으나, 육류를 숙성시키는 가공 방법에 대한 연구가 미흡하여 대부분 기존의 숙성방법을 일상적으로 사용하는 범위에서 머무르고 있는 실정이다.

[0006] 이에, 저품질의 식육을 숙성을 통하여 고품질 육질을 갖는 숙성육을 제공할 수 있도록 식육을 숙성시키는 방법에 대한 연구가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) (문헌 01) 한국등록특허 제10-1464546호 (공개일 : 2014.11.25)
- (특허문헌 0002) (문헌 02) 한국등록특허 제10-1731783호 (공개일 : 2017.05.02)
- (특허문헌 0003) (문헌 03) 한국공개특허 제10-2015-0092874호 (공개일 : 2015.08.17)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 발명자들은 효모 유래 신균주인 데바리오마이세스 한세니 smfm201707(*Debaryomyces hansenii* smfm201707)가 식육 연화 및 풍미 증진 능력이 우수하여, 식육을 숙성시켜 고품질 특성을 갖는 숙성육을 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0009] 이에 본 발명에서는, 식육 연화 및 풍미 증진용 데바리오마이세스 한세니 smfm201707 균주 및 이를 이용한 식육 연화 및 풍미 증진 방법에 대한 기술 내용을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 바와 같은 기술적 과제를 달성하기 위해서 본 발명은, 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 갖는 데바리오마이세스 한세니 smfm201707(*Debaryomyces hansenii* smfm201707) 균주를 제공하며, 상기 균주는 수탁번호 KCTC18601P로 기탁된 것일 수 있다.

[0011] 또한, 상기 식육은 우육 또는 돈육일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은, 상기에 기재된 균주 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은, (a) 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 갖는 데바리오마이세스 한세니 smfm201707(*Debaryomyces hansenii* smfm201707) 균주 또는 상기 균주의 배양액을 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.

[0014] 또한, 상기 단계(b)에서는, 건식 숙성 방법(dry aging)을 이용해 상기 식육을 숙성할 수 있으며, 1 내지 50일 동안 상기 식육을 숙성할 수 있고, 0 초과 20 m/s 이하의 풍속이 공급되는 조건에서 상기 식육을 숙성할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 신균주 *Debaryomyces hansenii* smfm201707는 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 가지고 있어 식육

의 숙성을 위해 용이하게 활용될 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명에 따른 식육 연화 및 풍미 증진 방법에 따르면, 상기 신균주를 식육 숙성을 위해 활용하여 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 맛과 향이 우수한 숙성육을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명에 따른 신균주 *Debaryomyces hansenii* smfm201707의 기탁증(KCTC18601P)이다.

도 2는 본 발명에 따른 신균주 *Debaryomyces hansenii* smfm201707의 단백질 분해활성을 확인하기 위해서, 스킵 밀크에 (a) 0.5%, (b) 1%, (c) 2%, (d) 4%, (e) 7% 농도로 신균주를 접종하여 평판 배양하여 단백질 분해활성 분석 결과를 촬영한 실제 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명하도록 한다.

[0020] 본 발명은 식육에 처리하여 숙성시킬 경우 식육에 영향을 미쳐 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 맛과 풍미를 증대시킴으로써 기호성이 우수한 숙성육을 제공할 수 있는 신규한 균주인 식육 연화 및/또는 풍미 증진 기능을 갖는 식육 숙성용 테바리오마이세스 한세니 smfm201707(*Debaryomyces hansenii* smfm201707) 균주를 제공한다.

[0021] 특히, 상기 *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주는 23s rRNA를 분석한 결과, *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426 28s rRNA strain의 1337-bp의 염기서열과 95%의 일치율을 나타내었다.

[0022] 이에 따라, 본 발명에 따른 신균주인 *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주를 대한민국 대전광역시 유성구에 위치한 한국생명공학 연구원 생물자원센터에 2017년 08월 23일자로 기탁하여 2017년 08월 30일자에 기탁번호 KCTC18601P를 부여받았으며, 상기 신규한 균주인 *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주는 하기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 26S rRNA를 포함한다(도 1 참조).

[0023] [서열번호 1]

```

tgcattatca aaagcggagg aaaagaaacc aacagggatt gccttagtaa cggcgagtga      60
agcggcaaaa gctcaaattt gaaatctggc gccttcggtg tccgagttgt aatttgaaga      120
aggtaaacttt ggaattggct ctgtctatg ttccttgtaa caggacgtca cagaggggtga      180
gaatcccgtg cgatgagatg cccaattcca tgtaaagtgc tticgaagag tggagttgtt      240
tgggaatgca gctctaagtg ggtggtaaat tccatctaaa gctaaatatt ggcgagagac      300
cgatagcgaa caagtacagt gatgaaaga tgaaaagaac ttgaaaaga gaggtaaaaa      360
gtacgtgaaa ttgttgaaag ggaaggcctt gagatcagac ttggtatatt gcgatccttt      420
cctttttggt ttggttctcc gcagcttact gggccagcat cggtttggac ggtaggataa      480
tgattaagga atgtggctct acttcggtgg agtgttatag ccttggttga tgctgcctgt      540
ctagaccgag gactgcgtct ttgactagg atgctggcat aatgatccta agccaccct      600
cttgaccccc gggacc
    
```

[0024]

[0025] 상기 *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주는 신선육, 냉장육 또는 냉동육 등과 같이 시중에서 유통되고 있는 소비가 가능한 모든 형태의 육류를 숙성시켜 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 맛과 풍미를 증대시킴으로써 기호성이 우수한 숙성육을 제조할 수 있다.

[0026] 특히, 상기 균주는 소, 돼지, 말, 양, 염소, 토끼 등과 같은 육상 동물 뿐만 아니라, 닭 등과 같은 조류에서 유래하는 다양한 식육을 연화시키고, 풍미(맛과 향)를 증진시키기 위한 용도로 활용할 수 있으며, 바람직하게는, 우육 또는 돈육을 포함하는 식육을 숙성시킬 수 있고, 보다 바람직하게는 우육 숙성을 위해 활용될 수 있다.

[0028] 한편, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식육 연화 및/또는 풍미 증진용 조성물을 제공한다.

[0029] 상기 조성물은 통상적인 방법을 통해서 식육 연화를 연화시키고, 풍미를 증진시키기 위한 용도로 제형화할 수 있으며, 예를 들어, 용액, 분말 또는 과립 등의 형태로 제형화될 수 있으나 이에 제한받지 않고, 다양한 제형을 갖도록 제형화될 수 있다.

[0030] 또한, 상기 조성물은 숙성 대상이 되는 식육에 코팅 또는 도포하여 식육을 숙성시킬 수 있으며, 이를 위해, 상

기 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 용액에 식육을 침지시키거나, 용액, 분말, 과립 등의 제형을 코팅 또는 도포(예를 들면, 분무, 미스팅, 분말 살포, 과립 살포 등)하는 방법으로 상기 식육에 처리될 수 있다.

[0031] 그리고, 상기 조성물은 식육의 숙성 전에 처리되거나 숙성 후 일정한 시점 후에 처리될 수 있으며, 그 사용량과 균주의 농도 등은 처리 대상이 되는 식육의 부위, 중량, 숙성 장소 등에 따라 적절히 조절할 수 있다.

[0033] 상기한 바와 같은 본 발명에 따른 신규주 *Debaryomyces hansenii* smfm201707는 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 가지고 있어 다양한 가축 유래의 식육의 숙성을 위해 용이하게 활용될 수 있다.

[0035] 한편, 본 발명은, (a) 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 갖는 *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주 또는 상기 균주의 배양액을 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.

[0037] 상기 단계(a)는, 식육 연화 및 풍미 증진 기능을 갖는 *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 식육 연화 및 풍미 증진용 조성물을 식육에 처리하는 단계이다.

[0038] 상기 조성물은 통상적인 방법으로 식육 연화 및/또는 풍미 증진용으로 제형화된 것을 사용할 수 있으며, 용액, 분말 또는 과립 등의 형태로 제형화된 것을 사용할 수 있고, 이에 제한받는 것은 아니다.

[0039] 본 단계에서는, 상기 조성물을 숙성 대상이 되는 식육에 코팅 또는 도포하여 식육을 숙성시킬 수 있으며, 이를 위해, 상기 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 용액 제형의 조성물에 식육을 침지시키거나, 용액, 분말, 과립 등의 제형을 갖는 조성물을 코팅 또는 도포(예를 들면, 분무, 미스팅, 분말 살포, 과립 살포 등)하는 방법으로 식육에 처리할 수 있다.

[0040] 또한, 본 단계에서는, 숙성 대상이 되는 식육의 부위, 중량, 숙성 장소 등에 따라 조성물에 포함된 신규주의 농도를 조절할 수도 있다.

[0042] 상기 단계(b)는, 상기 조성물이 처리된 식육을 숙성하는 단계로서, 상기 *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주로 처리한 식육을 숙성할 경우, *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주가 숙성 기간 내내 식육에 영향을 미쳐 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 식육의 풍미를 증대시킴으로써 향상된 기호성을 제공할 수 있는 숙성육을 제조할 수 있다.

[0043] 또한, 상기 (b) 단계의 숙성은 숙성육 제조를 위해 통상적으로 활용되는 다양한 숙성방법으로 조성물이 처리된 식육을 숙성시킬 수 있으나, 식육의 연도와 풍미 향상 측면을 고려할 때, 건식 숙성(dry aging) 방식을 따르는 것이 바람직하다.

[0044] 특히, 본 단계에서는, 상기 숙성을 1 내지 50일 동안 수행할 수 있으며, 0 초과 20 m/s 이하의 풍속이 공급되는 조건에서 수행할 수도 있다.

[0045] 바람직하게는, 상기 숙성은 상기 조성물로 식육을 처리한 후 2.5 내지 5 m/s의 풍속으로 바람이 공급되는 조건의 건식 숙성방법을 이용해 5 내지 28일 동안 수행할 수 있으며, 본 발명에 따른 신규주가 갖는 단백질 분해활성으로 인해 식육을 연화시킬 수 있고, 맛과 향을 증진시켜 기호도가 높은 건조숙성육을 제조할 수 있다.

[0047] 상기한 바와 같은 본 발명에 따른 식육 연화 및 풍미 증진 방법에 따르면, 신규주 *Debaryomyces hansenii* smfm201707를 식육 숙성을 위해 활용하여 식육의 연도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 맛과 향이 우수한 숙성육을 제조할 수 있다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하도록 한다.

[0050] 제시된 실시예는 본 발명의 구체적인 예시일 뿐이며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다.

[0052] <실시예 1> *Debaryomyces hansenii* smfm201707 균주의 분리 및 동정

[0053] (1) 숙성육의 관능평가

[0054] 습식숙성 방법과 건조숙성 방법을 이용하여 3등급 육우의 보섭부위를 28일 동안 숙성시켜 감성고기를 제조하였으며, 건조숙성 방법은 특정 풍속(0, 2.5, 5 m/s)의 바람을 공급하여 수행하였다.

[0055] 감성고기에 대한 소비자의 기호도 평가와 순위법을 이용해 각각의 방법으로 숙성시킨 감성고기 시료간 관능적 차이를 평가하였고, 관능 평가는 소비자 패널 8명을 선발하여 수행하였다. 이를 위해, 각각의 감성고기 시료는 일정한 크기(5.0 × 2.0 × 1.2 cm, length × width × height)로 세절하여 시료 내 심부 온도가 72 °C에 도

달할 때까지 조리한 다음 패널 각각이 섭취하도록 하였으며, 섭취 후 소비자 기호도를 9점 척도법(consumer test)을 이용하여 전체적인 기호도를 평가하였다.

[0056] 또한, 2.5 m/s의 풍속을 공급하여 숙성시킨 건식숙성육을 표준 대조군(standard control)으로 설정하여 건식숙성육의 냄새와 향미에 대해 관능 패널들이 숙지하게 한 뒤 각각의 감성고기 시료들 간에 냄새와 향미의 강도를 순위별(1 내지 4)로 분류(ranking test)하였으며, 그 결과를 하기의 표 1에 나타내었다.

표 1

| | | Wet | Dry 0 | Dry 2.5 | Dry 5 | SEM ¹ |
|---------------------------|-----------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| Consumer test | 전체적인 기호도 | 5.38 ^c | 6.75 ^a | 6.25 ^{ab} | 6.00 ^b | 0.199 |
| Ranking test ² | 냄새 | 4 | 2 | 3 | 1 | - |
| | 향미 (맛+냄새) | 4 | 3 | 2 | 1 | - |

[0057] 단, 상기 표 1에 표기된 표시는 다음과 같은 의미를 갖는 것이다.

[0059] ¹Standard errors of mean (n = 32).

[0060] ²Sensory panelists ranked the odor and flavor intensity of samples after comparing the sample of Dry 2.5 m/s.

[0061] ^{a-c}Different letters within same row differ significantly (p < 0.05).

[0062] 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.

[0063] 습식 및 건식숙성 후 감성고기 시료의 관능평가 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, 습식숙성육에 비해 건식숙성육은 모두 유의적으로 높은 기호도 결과를 나타낸다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0064] 또한, 향과 풍미의 강도를 순위별(1 내지 4)로 분류(ranking test)한 결과, 5 m/s 풍속에서 숙성시킨 건식숙성육(효모가 높게 분포했던 실험군)의 향과 풍미가 가장 강하게 나타나는 것으로 확인되었으며, 2.5 m/s 풍속에서 숙성시킨 건식숙성육 또한 기호도가 높게 나타났다.

[0066] (2) 차세대 염기서열 분석

[0067] 28일 동안 각각의 풍속(0, 2.5, 5 m/s)으로 건조 숙성시킨 건조숙성육(1 × 1 cm)를 각각 2개씩 활용하여 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)에 활용하였으며, 각각의 시료에서 분리한 미생물의 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 Miseq의 소프트웨어를 통한 통계적 분석을 진행하였고, 각 그룹간의 미생물 분포를 비교하였으며, 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

표 2

| | Dry 0 m/s | Dry 2.5 m/s | Dry 5 m/s |
|---------------------|-----------|-------------|-----------|
| <i>Debaryomyces</i> | 0.2 | 15.9 | 14.7 |

[0068] NGS 분석 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 0 m/s의 풍속으로 숙성시킨 건조숙성육에서는 본원발명의 신규주인

데바리오마이세스 속(*Debaryomyces Genus*)의 효모 균주는 거의 검출되지 않는 것으로 확인된 반면에, 2.5 m/s와 5 m/s의 풍속으로 숙성시킨 건조숙성육에서는 데바리오마이세스 속(*Debaryomyces Genus*)의 효모 균주가 각각 15.9%, 14.7%의 비율로 분포하는 것으로 확인되었다.

[0071] (3) 효모 균주의 분리 및 동정

[0072] 건조숙성한 건조숙성육에서 효모 균주를 분리하기 위해서, 잡균의 생장을 억제하는 용도의 10% 타타르산(tartaric acid)이 첨가된 PDA 배지를 사용하였고, PDA 배지에 미생물 균주를 접종하여 20 °C에서 7일 동안 배양한 후, 성장한 미생물 균주를 분리하였다. 1차적으로 분리된 미생물 균주를 순수분리하기 위해서, 형태 차이가 있는 각각의 클러스터에서 단일 집락을 화염 멸균한 백금으로 1 루프(loop) 취하여 멸균한 PDB 배지 10 mL에 접종하였으며, 뿌연게 자랄 때까지 20 °C에서 4일 동안 배양하였다. 그 다음, 배양액을 화염 멸균한 백금을 이용하여 1-loop 취하여 멸균한 PDA 배지에 희석 도말하여 20 °C에서 7 일 동안 배양하여 순수분리된 미생물 균주를 수득하였다.

[0073] 순수 분리한 미생물의 동정을 위해서 23s rRNA 분석을 수행하였고, 염기서열 분석을 위한 프라이머(primer)는 정방향 프라이머(forward primer)로 NS1(5-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3), 역방향 프라이머(reverse primer)로 NS24(5-AAA CCT TGT TAC GAC TTT TA-3)를 사용하였다.

[0074] 분리된 균주의 23s rRNA를 분석한 결과, 분리된 균주는 효모의 일종인 데바리오마이세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*) 균주로 확인되었다. 이 효모는 2.5 m/s 및 5 m/s의 풍속에서 건조숙성시킨 건조숙성육에서 미생물 분포를 확인한 NGS 분석결과에서 각각 15.9%, 14.7%로 높게 관찰되었던 효모이다.

[0075] 또한, 숙성 조건별 시료를 PDA에 도말하여 형성된 집락에서 막걸리와 같은 발효과정에서 형성되는 냄새가 확인되었으며, 하기 표 3에 속하는 균주인 것으로 확인되었다.

표 3

| Phylum (문) | Subphylum (아문) | Order (목) | Family (과) | Genus (속) | Species (종) |
|-------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Ascomycota</i> | <i>Saccharomycetes</i> | <i>Saccharomycetales</i> | <i>Saccharomycetaceae</i> | <i>Debaryomyces</i> | <i>D. hansenii</i> |

[0076]

[0077] 또한, 분리된 효모 균주의 26S rRNA 분석 결과, 하기 서열번호 1에 나타난 바와 같은 염기서열을 갖는 균주임을 확인할 수 있었고, *D. hansenii* NRRL Y-7426 28s rRNA strain과 1337 bp를 비교한 결과 95%의 일치율을 나타내었다.

[0078] [서열번호 1]

```

tgcatattca aaagcggagg aaaagaacc aacagggatt gccttagtaa cggcagagtga 60
agcggcaaaa gctcaaattt gaaatctggc gccttcggtg tccgagttgt aattgaaga 120
aggtaacttt ggaattggct ctgtctatg ttccttgaa caggacgtea cagagggtga 180
gaatcccgtg cgatgagatg cccaattcca tgtaaagtgc tttcgaagag tcgagttgtt 240
tggaatgca gctctaagtg ggtggtaaat tccatctaaa gctaaatatt ggcgagagac 300
cgatagcgaa caagtacagt gatgaaaga tgaaaagaac ttgaaaaga gattgaaaaa 360
gtacgtgaaa ttgttgaaag ggaaggcctt gagatcagac ttggtatatt ggatecctt 420
ccttttgggt ttggttctcc gcagcttact gggccagcat cggtttggac ggtaggataa 480
tgattaagga atgtggctct acttcggtgg agtgttatag ccttggttga tgctgctgt 540
ctagaccgag gactgcgtct ttgactagg atgetggcat aatgatccta agccaccgt 600
cttgaccccc gggacc
    
```

[0079]

[0080] 이에, 본 발명에 따른 신규한 균주를 *Debaryomyces hansenii* smfm201707로 명명하고, 2017년 08월 23일 한국생명공학연구원 생명자원센터에 등록하여 2017년 08월 30일에 기탁번호 KCTC18601P를 부여받았다(도 1 참조).

[0082] <실시예 2> 신규주의 특성분석

[0083] (1) 신규주의 단백질 분해능 측정

[0084] 신균주가 갖는 단백질 분해효소(protease) 분비능을 평가하기 위해서, PDA 배지에 스킴밀크(skim milk, Becton, Dickinson and Company)를 농도별(0.5%, 1%, 2%, 4%, 7%)로 첨가하여 제조된 배지를 각각 준비하였고, 신균주를 상기 배지에 각각 접종하여 20 °C에서 7일 동안 배양하여 클리어 존(clear zone)의 생성 여부와, 균사체의 성장률을 비교하여 단백질 분해효소의 분비능을 확인하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0085] 도 2에 나타난 바와 같이, 신균주 배양액을 접종한 부위 주변에 투명한 환이 형성되었고, 접종 농도가 높을수록 클리어 존의 크기가 크다는 사실을 확인할 수 있었으며, 이를 통해, 신균주는 skim milk에 포함된 단백질을 분해하는 단백질 분해 활성을 가지며, 이와 같은 신균주가 갖는 단백질 분해 활성에 의해 육고기의 숙성기간 동안 건조속성용 특유의 관능 특성이 나타나는 것으로 사료되었다.

[0087] (2) 건조속성 기간별 균주의 성장특성 분석

[0088] 육류를 숙성시키기 위해서, 신균주인 효모 균주(*Debaryomyces hansenii* smfm201707)를 단독으로 3등급 육우에 spot으로 접종하였고, 숙성기간별로 차이를 확인하였으며, 하기에 나타난 바와 같은 방법으로 배양하여 접종하였다.

[0090] 1) 효모 균주 시료 준비

[0091] 10 mL의 PDB 배지에 화염으로 멸균한 백금으로 효모 균주(*Debaryomyces hansenii*) 단일집락을 1 루프(loop) 따서 접종하고 뿌옇게 효모 균주가 성장할 때 까지 20 °C에서 4일간 배양하여 배양액의 100 µL을 10 mL의 PDB 배지에 첨가한 뒤, 20 °C에서 4일 동안 배양하였다. 최종 농도가 10⁶ CFU/mL이 되도록 효모 배양액을 9 mL의 PBS를 이용하여 단계별로 2회 희석하고, 희석액을 최종적으로 미생물 시너지스트로서의 효모 균주(*Debaryomyces hansenii* smfm201707)를 시험액으로 사용하였다. 이때, 효모수 계수는 시험 원액을 0.1% PW 용액을 이용하여 단계별로 희석한 후 PDA 배지에 분주해 도말하고, 10 °C에서 7 일 동안 배양한 후 확인하였다.

[0093] 2) 숙성기간별 효모 변화 확인

[0094] 상기와 같은 방법으로 준비한 *D. hansenii* smfm201707 신균주 시험액을 단독으로 육우에 접종하여 28일 동안의 숙성과정 중 *D. hansenii* 균주의 효모 세포수 변화(Unit : Log CFU/g, mean±를 관찰하였으며, 그 결과를 하기의 표 4에 나타내었다. 이때, PBS를 육우에 처리한 실험군을 대조군으로 설정하여 세포수 변화를 같이 확인하였다.

표 4

| | 건식숙성 기간(일) | | | |
|-------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0 | 14 | 21 | 28 |
| smfm201707 접종군 | 1.1±0.8 ^b | 7.6±0.3 ^{ax} | 7.7±0.3 ^{ax} | 7.4±0.3 ^{ax} |
| 대조군 | 1.1±0.8 ^a | <0.48 ^{ay} | 1.4±1.8 ^{ay} | <0.48 ^{ay} |

[0095] 단, 상기 표 4에 표기된 표시는 다음과 같은 의미를 갖는 것이다.

[0097] ¹⁾ Below detection limit

[0098] ^{a-c} The letters within the same row were significantly different (P < 0.05).

[0099] ^{x-z} The letters within the same column were significantly different (P < 0.05).

[0100] 표 4에 나타난 바와 같이, 신균주(smfm201707) 및 대조군으로 처리한 각각의 육우에서 효모 세포수 변화를 분석한 결과, 대조군으로 처리한 육우에서는 세포수가 증가하지 않는다는 사실을 확인할 수 있는 반면에, 신균주인 *D. hansenii* 균주로 처리한 육우에서는 초기 접종 세포수 1.1 Log CFU/g에 비하여 숙성기간이 지날수록 세포수가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 건식숙성 기간이 28일인 시점에서도 신균주의 세포수가 증가한다는 사실

을 확인할 수 있었다.

[0102] (3) 신균주로 숙성시킨 숙성육의 육질 평가

[0103] 전단력은 숙성육 시료의 심부온도가 72 °C가 될 때까지 중탕 가열한 다음 상온에서 방냉시키고, 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 되도록 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 g로 설정하여 전단력을 측정하였으며, 전단력 측정결과를 하기의 표 5에 나타내었다.

표 5

| | 건식숙성 기간(일) | | | | SEM ¹ |
|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| | 0 | 14 | 21 | 28 | |
| 대조군 | 35.91 ^a | 18.62 ^{cy} | 16.28 ^{cy} | 24.53 ^{by} | 0.920 |
| smfm201707 | 35.91 ^a | 22.46 ^{bx} | 22.81 ^{bx} | 17.09 ^{cz} | 0.719 |
| SEM ² | 0.908 | 0.847 | 0.706 | 0.815 | |

[0104] 단, 상기 표 5에 표기된 표시는 다음과 같은 의미를 갖는 것이다.

[0105] ¹Standard error of means (n = 15), ²(n = 6).

[0106] ^{a-d}The letters within the same row were significantly different (P < 0.05).

[0107] ^{x,y}The letters within the same column were significantly different (P < 0.05).

[0108] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 신균주(smfm201707)를 접종한 접종군 모두에서 전단력은 건조숙성 기간 21일까지 감소하여 육질이 연해지는 경향을 보였다. 또한, 전단력 수치는 본 발명의 신균주(smfm201707)를 접종한 접종군에서 꾸준히 감소하는 경향을 보이는 것으로 확인되었다. 반면에, 대조군은 건조숙성 기간이 21일을 경과한 시점에서 오히려 전단력이 증가하는 경향을 보여 본 발명의 신균주는 장시간 숙성시에도 숙성효율이 감소하지 않아 우수한 숙성 활성을 갖는다는 사실을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0109] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18601P

수탁일자 : 20170830

도면

도면1

특허미생물 기탁증

2017년 08월 30일

숙명여자대학교 신학협력단 귀하

서울특별시 중산구 정파로 47길 100 숙명여자대학교

2017년 08월 23일 제 5915호 귀하가 보관 기탁 신청

한 특허미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 기탁번호를 통지합니다.

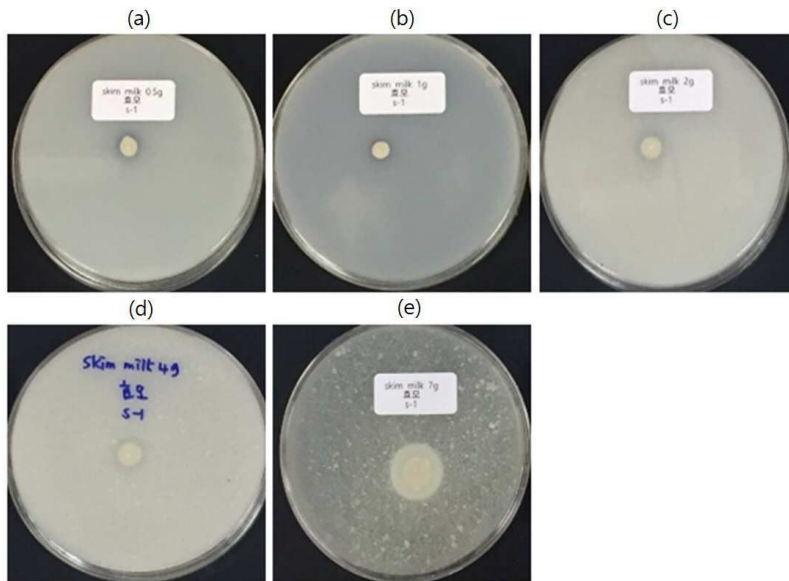
— 다음 —

1. 미생물 기탁번호 : KCTC18601P

2. 미생물의 명칭 : *Debaryomyces hansenii* smim201707

한국생명공학연구원 생물자원센터장 (인)

도면2



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 5의 제6항

【변경전】

2,5 내지 5 m/s

【변경후】

2.5 내지 5 m/s