

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001325-01

**기능성 미생물을 이용한 고기능성 저가 발효 육제품
제조기술 개발**

Development of a new technique for highly functional
semi-dried sausage process using by functional
microorganism

(주)농협목우촌

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능성 미생물을 이용한 고기능성 저가 발효 육제품 제조기술 개발” 과제(제 1 세부과제 “한국형 기능성 육제품의 제조와 기능성 조사 및 판매”, 제 1 협동과제 “전통식품으로부터 고기능성 미생물의 발굴”, 제 2 협동과제 “오징어와 발효 진피를 이용한 장기저장 소시지 제조”)의 보고서로 제출합니다.

2012 년 04 월 09 일

주관연구기관명 : (주)농협목우촌

주관연구책임자 : 강 성 철

세부연구책임자 : 강 성 철

연 구 원 : 한 성 구

연 구 원 : 노 채 영

연 구 원 : 최 경 임

연 구 원 : 김 영 미

협동연구기관명 : 한동대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 신 현 길

협동연구기관명 : (주)경우식품

협동연구책임자 : 정 상 규

요 약 문

I. 제 목

기능성 미생물을 이용한 고기능성 저가 발효 육제품 제조기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

고지방 및 고염 식품의 섭취는 비만, 동맥경화, 고혈압을 유발시킬 수 있다. 발효소시지는 가열처리를 하지 않고 발효 및 건조를 통해 제조되기 때문에 지방과 식염의 함량이 다른 육가공품들에 비해 상대적으로 높다는 문제점을 안고 있다. 이러한 이유로, 발효소시지 자체의 지방 함량을 낮추는 노력이 계속되고 있는 한편, 발효소시지를 통한 육류의 섭취가 주는 이점을 강화하기 위해 starter culture로 이용되는 유산균의 probiotic 효과가 주목받고 있다. 김치는 유산균들의 젖산발효를 통해 만들어지는 한국의 전통발효 야채식품인데, 훌륭한 probiotic pool로서 많은 연구가 진행되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 김치로부터 유산균들을 선별하여 potential probiotics로서 그 특성들을 검증하고 이들 균주로부터 meat fermentation 적합성이 가장 높으면서 탁월한 콜레스테롤 저하 효과를 가진 균주를 선별해내어 콜레스테롤 저하 기능을 가진 발효소시지 제조기술을 개발하고 기능성 probiotic starter culture를 얻고자 하였다. 선별된 *L. sakei* NR28 균주는 일반적인 발효소시지의 제조 조건(온도, 염도, pH 등)에서 24시간 이내 생장활성과 산 생성능력이 가장 뛰어난 것으로 증명되었으며, 콜레스테롤 저하 효과는 in vivo를 통해 추가적으로 검증되었다. 더불어 장 부착능력, 향미생물 효과, 항 비만효과 등을 추가적으로 검증하여 해당 균주의 활용가능성과 가치를 높이고, 오징어와 발효진피를 통해 발효소시지의 독자적 경쟁력을 강화시키고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제 1 세부: 기능성 미생물 발효 육제품의 제조와 기능성 조사 및 판매

가. 발효 육제품의 제조

- (1) 원료육 선택
- (2) 발효 육제품 가공
- (3) 세절 및 충전, 선별된 기능성 미생물 첨가
- (4) 훈연 발효 육제품 생산
- (5) 숙성 및 건조

나. 발효 중 이화학적 변화조사

- (1) 생산과정 중의 pH 변화
- (2) 건조에 의한 수분활성도(A_w) 저하
- (3) 소시지의 결착력 정도
- (4) 발효 중 미생물의 변화

다. 발효 육제품의 기능성 조사

- (1) 동물 실험을 통한 항 콜레스테롤 기능성 조사
- (2) 타 제품과의 항산화 정도 비교 분석

라. 관능평가: 관능평가로 미생물에 의한 향미 증진 정도 조사

- (1) 향미 평가
- (2) 색택 평가

마. 발효 육제품 제품 판매

- (1) 제품 명칭 개발
- (2) 언론매체를 통한 홍보
- (3) 대형마트에서의 시식 비교

2. 제 1 협동: 전통 식품으로부터 고기능성 미생물 발굴

가. 발효 식품에서 미생물을 분리하여 위장을 통과하여 살 수 있는 미생물 선별 및 동정

- (1) 전통 김치와 몽골 발효 유제품 유래 미생물 분리
- (2) 유효 미생물의 위장 통과 능력 조사: 내산성 및 내담즙성
- (3) 유산균을 생리학적 특징으로 분류 및 동정
- (4) 유산균을 유전자적 방법으로 동정(16s rDNA sequencing)

나. 미생물의 기능성 조사

- (1) 콜레스테롤 저하 효과: BSH test, cholesterol assimilation
- (2) 항 산화 효과 조사
- (3) 항 미생물 효과 조사
- (4) 장 부착 능력 조사

다. 발효 육제품의 제조에 적합한 기능성 미생물 선택

- (1) 유산균이 생성하는 pH 측정
- (2) 적정 생육 염도, 적온, pH 범위 측정
- (3) CO₂ 생성 측정
- (4) Catalase 활성, 단백질 분해, 지질 분해 활성
- (5) Lactic acid 이성체 조사

3. 제 2 협동: 오징어와 발효 진피를 이용한 장기저장 소시지 제조

가. 발효진피 추출물의 병원성 미생물의 생육억제 효과

- (1) 항 병원성 미생물 효과 조사
- (2) 포자 생성균의 생육억제 조사
- (3) 발효진피의 유산균 생육 증진 효과

나. 발효진피의 안전성 조사

- (1) 유전독성 조사 (Comet assay)
- (2) 세포독성 조사 (MTT assay)

다. 발효진피와 오징어를 이용한 장기저장 육제품의 생산

- (1) 저장 기간의 확보
- (2) 제품의 안전성 확보

IV. 연구개발결과

전통 발효식품인 김치와 몽골 발효 육제품에서부터 분리, 선택된 유산균들은 12종으로, 대표적인 것으로는 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus casei*가 주로 동정되었다. 이 균주들의 내산성 및 내담즙성 특성을 살펴본 결과 Probiotics로 이용될 수 있는 좋은 생존률을 보였다. 이들 유산균의 발효육제품 적합성 실험 결과, *L. sakei* NR28 균주가 Probiotics로서의 가능성을 가지는 동시에 발효소시지의 starter로서 선정되었다. proteolytic, lipolytic 활성은 나타나지 않았고, 항생제 내성조사와 biogenic amine 생성능을 실험한 결과, *L. sakei* NR28 뿐만 아니라 후보균주들 모두 안전성에는 문제가 없는 것으로 나타났다. 마지막으로 콜레스테롤 저하 효과, 항비만 효과, 항산화 효과, 항 미생물 효과, 장 부착 능력을 위주로 연구를 수행한 결과, *In vitro*와 *In vivo* test 결과로부터 항콜레스테롤 효능이 확인되었고, Metagenomics를 이용한 장내균총 변화에 따른 항비만 효과를 확인하였다. 항산화 효과는 DPPH test에서 일반적인 수준으로 나타났으며, 장 부착 능력은 *L. rhamnosus* GG에 비해 2배 가량 높은 수준으로 나타났다. 결론적으로, 본 연구를 통해 선별된 *L. sakei* NR28 균주는 발효소시지의 starter로서 적합한 균종인 동시에 뛰어난 장 부착능력과 콜레스테롤 저하 및 항비만 효과, 항균효과를 가진 고기능성 Probiotics로서, 이를 통해 제조된 발효소시지의 기능성 및 경쟁력 강화에 높은 기여를 할 수 있을 것으로 평가된다.

이상의 선별된 스타터 컬처를 이용해 발효 소시지의 제조기술을 확립하였다. 발효에 의한 색도의 변화는 숙성 중 젖산 생성과 수분 증발, 아질산염의 영향 등으로 인하여 계속 증가되었고, 수분활성도는 숙성 7일차부터 유의적으로 낮아져 21일차에는 0.881 ~ 0.885로 낮은 수분활성도를 나타내었다. pH값은 발효 7일차까지 하락 하고, 시간이 경과됨에 따라 점진적으로 안정화되었다. 전단력(Cutting Strength)과 경도(Hardness)는 숙성이 진행됨에 따라 크게 증가하며, 숙성에 따른 미생물의 변화는 모든 실험군에서 대장균군, 대장균, 살모넬라균, *Listeria monocytogens*는 음성으로 나타났다.

한편, 유산균의 증식을 방해하지 않으면서도 병원성균과 포자생성균에 대한 발효진피의 항균 효과를 입증하였고, 이같은 특성은 발효진피를 발효 육제품에 첨가하였을 경우 제품의 안전성을 확보하여 항균활성에 있어 화학첨가제의 역할을 일정부분 대신할 수 있는 획기적인 가능성을 제시하였다. 이 발효진피가 식품에 적용되기 이전에 세포독성 및 유전독성 유무와 그 농도를 측정하기 위한 MTT 및 COMET assay 결과에서 발효진피는 간과 장 세포에 대해 각각 20mg/ml, 10mg/ml 의 농도범위에서 세포에 전혀 독성을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다. 발효진피 추출물과 오징어의 독자적인 혼합으로부터 발효육제품의 저장 안정성이 확보되는지 여부를 확인해본 결과, 발효진피와 오징어의 첨가는 항균활성에 의한 안정성 증진과 발효진피 추출물 고유의 기능성, 원가의 절감 측면에서는 유리한 점을 제공해 줄 수 있으나 제품의 안정

성에 있어서는 극적인 결과를 보여주지 못했다. 추후 다양한 원료 및 원료의 가공형태, 가공방법, 보관방법 등에 대한 세부적인 연구가 이루어진다면 이 같은 문제를 극복한 여러 가지 독자적인 형태의 한국형 발효소시지를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 독자적 기능성 스타터 컬처의 발굴

본 과제에의 핵심연구로서 전통식품인 김치로부터 기능성 probiotics이면서 육제품 발효 스타터를 독자적으로 분리해내었다. 비록 현재 국내의 육제품 스타터 시장은 수입에 의존하고 있는 실정이나 시장의 확대와 내수화 필요성이 증진된다면 독자적 기능성 스타터의 부가가치는 매우 높을 것으로 생각된다.

2. 발효 육제품의 경쟁력 확보

발효진피로부터의 항균효과와 항산화효과 등이 제품의 안정성과 기능성에 긍정적인 효과를 가져다주는 것처럼 한국형 발효 육제품의 글로벌 마켓에서의 경쟁력 강화를 위해 다양한 천연물 대체제의 개발이 필요할 것으로 판단된다.

3. 축산가공품의 제품영역확대

유산균의 효능은 익히 알려져 있고, 전통적으로 우리 소비자들의 “유산균” 브랜드에 대한 믿음은 강하다. 육제품은 브랜드가 난무하고, 최근 국내에 햄,소시지가 고열량, 고콜레스테롤, 비만, 동맥경화 등 성인병의 원인으로 지목되어 일부 소비자들로부터 외면을 받고 있어 현 시점에서 콜레스테롤을 저하 등 기능성을 갖는 미생물을 활용한 건강 발효육제품 개발은 축산가공품의 새로운 제품영역 확대이며, 소비자불신해소 및 국민건강 증진은 물론 축산업부문에까지 광범위하게 큰 도움이 될 것으로 확신한다.

4. 판매추진을 통한 부가가치 창출

본 과제에서 개발된 기능성발효소시지는 건강기능성, 저장성 등이 확보되어 있으므로 국내시장 판매확대는 물론 해외시장에 까지 수출 될 수 있도록 적절한 마케팅을 접목하여 매출확대와 수익창출을 기대한다.

SUMMARY

I. Project Title

Development of a new technique for highly functional semi-dried sausage process using by functional microorganism

II. Objectives and Significance

Intake of excessive fat and sodium can result in obesity, hardening of artery, and high blood pressure. Since fermented sausage is produced through fermentation process while drying, it has the shortcomings of higher fat and sodium content in comparison with other meat and dairy products. Due to this reason, while efforts are being spent to lower the fat content of the fermented sausage itself, the probiotic effects of lactic bacteria have been attracting a special attention as a starter culture to enhance the benefit of taking meat products through the fermented sausage. Kimchi is traditional Korean vegetable food made through fermentation by lactic bacteria, which has been studied extensively as an excellent pool of lactic bacteria. We demonstrated in our previous work Kimchi's characteristic as a potential probiotics by separation of lactic bacteria from Kimchi. The purpose of the present research work is to separate from the Kimchi the bacteria strain that is suitable for meat fermentation while having a superior property of lowering cholesterol, and obtain the probiotic starter culture with a potential of lowering cholesterol. *L. Sakei* NR28 Strain separated from it has been proven to be the most outstanding in terms of activation and regeneration within 24 hours within the range of the ordinary manufacturing condition (temperature, salinity, and pH, etc.) for the fermented sausage, and its cholesterol lowering capability was additionally proven through in vivo. Moreover, we demonstrated functionality of *L. sakei* NR28 that intestinal adhesion activity, antimicrobial activity, and anti-obesity effect for values. fermented sausage.

III. Scope and Contents of the Study

Part 1. Manufacturing the fermented sausage and their functionality

1. Production of fermented sausage
 - (1) Meat material selection
 - (2) Processing materials
 - (3) Cutting, filling, and adding starter culture
 - (4) Smoking and fermentation
 - (5) Ripening and drying

2. Monitoring the Physico-chemical change during meat fermentation

- (1) pH
- (2) Water activity (A_w) reduction
- (3) Binding capacity
- (4) Microorganisms

3. Investigation the functionality

- (1) *In vivo* cholesterol lowering effect test
- (2) Antioxidant activity (DPPH assay)

4. Sensory evaluation

- (1) Flavor evaluation
- (2) Color evaluation

5. Selling the fermented sausage

- (1) Trade naming
- (2) Marketing by media
- (3) Sampling for major supermarket

Part 2. Selection of functional microorganism from traditional fermented foods

1. Isolation and selection of starter culture for fermented sausage

- (1) Isolation of lactic acid bacteria from kimchi and mongolian diary food
- (2) investigation of GI tract adaptation (acid tolerance and bile tolerance)
- (3) Identification the isolated lactic acid bacteria
- (4) 16s rDNA sequencing

2. Functionality of the isolated microorganisms

- (1) Cholesterol lowering effects: BSH test, cholesterol assimilation
- (2) Anti-oxidative effect (DPPH assay)
- (3) Antimicrobial activity
- (4) Intestinal cell adhesion activity

3. Selection of the functional probiotics starter

- (1) Growth properties and acid production
- (2) salt concentration, temperature, and pH condition
- (3) CO₂ production
- (4) Catalase activity, proteolytic and lipolytic activity

Part 3. Manufacturing the long-term storage fermented sausage using cuttlefish and fermented citrus peel

1. Anti-pathogenicity effect of fermented citrus peel extract

- (1) Antimicrobial activity
 - (2) Inhibition of *B. subtilis* endospore
2. Safety of fermented citrus peel
- (1) Genotoxicity (Comet assay)
 - (2) Cytotoxicity (MTT assay)
3. Production of the fermented sausage with fermented citrus peel and cuttlefish
- (1) Storage periods
 - (2) Stability

IV. Results

Isolated and selected lactic acid bacteria are twelve strains from kimchi and Massai milk which are traditional fermented food of Korea and Mongolia, respectively. Among them, the representative species are *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus casei*. In acid-tolerance and bile salt tolerance tests, all selected strains had good survival rate as probiotics. As a result of suitability test of them as starter culture for fermented sausage, *L. sakei* NR28 strain had a potential as probiotics and selected as starter culture.

From antibiotic resistance and biogenic amine production test, we proved that there were no problem of safety in all twelve strains. And they had no proteolytic and lipolytic activity. *L. sakei* NR28 strain had cholesterol-lowering effect *in vivo* as well as in *vitro* studies. In metagenomic study of murine gut microbiota, the strain had anti-obesity effect, too. *L. sakei* NR28 strain showed anti-oxidative effect as general level in DPPH test. In adherence assay, the strain had two-times higher ability of adherence to intestinal cells than that of *L. rhamnosus* GG as positive control.

In conclusion, selected *L. sakei* NR28 strain from kimchi is proper to be a starter of fermented sausage and has properties of functional probiotics such as high adherence ability to intestinal cells, cholesterol-lowering effect, anti-obesity effect and antimicrobial effect. Using this strain for starter of fermented sausage contributes to functionality and competitiveness in the world market.

Based on the selected starter culture, we established a manufacture technique of fermented sausage. The color of sausage was changing during fermentation as a result of lactic acid production, moisture evaporation and nitrite effect. The water activity(A_w) decreased from 7 days of fermentation, it showed the lowest level in 21 days, from 0.881 to 0.885. The pH level of the sausage declined until 7 days of fermentation, and then showed stable level gradually as time passes. Cutting strength and hardness of the sausage highly increased during the fermentation. In all experimental groups, they had negative to pathogenic bacteria such as *E. coli*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*.

Extract from dried citrus peel showed antimicrobial effect to pathogens and spore-forming bacteria, not to probiotics. Using this character of extract present to replace the use of chemical additives for antimicrobial effect. Before applying the extract to food, cytotoxicity and genotoxicity were examined in MTT and COMET assay. The extract did not have toxic effect to cells at concentration of 20mg/ml and 10mg/ml in liver and intestine cells, respectively. When the extracts and squid mixture were added to ferment sausage, the mixture promoted antimicrobial effect and assign the functionality of extract. It can provide beneficial aspect in cost reduction. However, safety of goods did not show dramatic results.

V. Use of the research result

1. Excavation of functional probiotics starter culture

We have worked that isolation and selection the probiotics meat starter culture from Korean traditional food kimchi. In Korea, although the meat starter market is depending on imports, but the value of our own functional probiotics starter will grow gradually by expansion of the market and boosting domestic demand.

2. Secure global competitiveness

Fermented citrus peel extract bring product stability and functionality by antimicrobial and anti-oxidative activity. Like this, natural additives will give competitiveness of Korean fermented sausage in the world market. Fermented citrus peel extract will be good example.

3. Intensification of meat processing products

There are many meat processing products in Korea, but it has the shortcomings of higher fat and sodium content. This contents are major cause of adult illnesses such as obesity, hyper-cholesterolemia, and atherosclerosis. So, consumers avoid this products increasingly. However, consumers also already knew about “the beneficial effects of lactic acid bacteria” and they believe dairy food brands absolutely. Therefore the probiotic effects of lactic bacteria have been attracting a special attention as a starter culture to enhance the benefit of taking meat products through the fermented sausage. It means that we make a new area for meat processing products.

4. Create added value by sales

The functional fermented sausage made by this work, have health benefits and stability so it is possible to sale for domestic and abroad market.

CONTENTS

Preface	1
Summary(in Korean)	2
Summary	6
Contents	10
Contents(in Korean)	11
Chapter 1. Objectives and Significance	12
Chapter 2. Current State of the Techniques	13
Section 1. Starter Culture	13
Section 2. Fermented Citrus Peel Extract	13
Chapter 3. Contents of the Study and Results	14
Section 1. Selection of functional microorganism from fermented foods	14
Section 2. Manufacturing the fermented sausage and their functionality	35
Section 3. Manufacturing the long-term storage fermented sausage using cuttlefish and fermented citrus peel	55
Chapter 4. The attainment of the project and contribution	63
Chapter 5. Result and Application	64
Chapter 6. foreign science and technology informations	65
Chapter 7. References	66

목 차

제출문	1
요약문	2
Summary	6
Contents	10
목차	11
제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제1절 Starter Culture	13
제2절 발효진피	13
제3절 발효소시지.....	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	14
제1절 전통식품으로부터 고기능성 미생물 발굴	14
제2절 기능성 미생물 발효 육제품의 제조와 기능성 조사 및 판매	35
제3절 오징어와 발효 진피를 이용한 장기저장 소시지 제조	55
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	63
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	64
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	65
제 7 장 참고문헌	66

제 1 장 연구개발과제의 개요

세계 육류 시장의 연간 생산 규모는 2003년 기준 1억9300만 톤 규모로 축종별로는 돈육이 46.0%, 계육 28.0%, 우육 25.9%를 차지한다. 세계 육가공 시장의 연간 규모는 1000만 톤 정도로 소시지(70%)와 햄(30%)이 주종을 이룬다. 하지만 국내 시장은 1999년과 2000년을 정점으로 매년 한 자릿수 매출 신장률을 기록하며 장기적인 정체 상황을 맞고 있다. 이러한 이유는 현재 국내에서 불고 있는 웰빙 열풍 때문인데, 육류 특유의 고지방 및 고콜레스테롤 영양구성과 함께 아질산 염이나, 발색제 등의 첨가로 가정에서의 기피 요인이 되고 있다. 하지만 육류는 유아에서 성인에 이르기까지 단백질의 주 공급원으로서 균형잡힌 식단에 반드시 필요한 식품이다. 소비자들 또한 육가공 제품의 무조건적인 기피보다는 보다 고급화된 식육가공품을 원하고 있다. 현재 시장에서 발색제가 없는 햄이나 기능성을 인위적으로 함유한 햄, 소시지 등은 출시가 되고 있으나 고급 반 건조 소시지는 아직 출시되지 않고 있다. 본 과제를 통해 생산될 반 건조 소시지는 우리나라의 전통 식품인 김치와 발효 진피에서 분리된 미생물을 이용하여 그 기능성을 확보하기에 국내 시장에서 경쟁력을 확보할 수 있다고 생각한다.

본 과제의 핵심연구는 기능성 미생물을 전통식품인 김치와 발효 진피에서 분리하여 반 건조 소시지의 starter culture로 이용하고, 향미와 풍미 증진을 위해 오징어를 사용하여 반 건조 소시지를 생산하는 것이다. 전통 발효 식품인 김치와 몽골 유제품에서 미생물을 분리하여 기능성 미생물을 확보하고, 미생물의 기능성과 적합성 조사를 통해서 육제품 첨가에 적절한 미생물을 선별 및 동정한다. 선별한 기능성 미생물과 발효 육제품 제조의 생화학적 변화를 연구한 기술을 활용하여 우리 입맛에 가장 적합한 한국형 발효 육제품을 제조 생산 및 판매한다. 또한 발효진피를 이용한 제품 안정성 및 저장성을 증대시킨 독자적 경쟁력을 지닌 제품을 개발하고, 발효 육제품의 저장성 증진을 통해 제품의 향미 및 특색을 확보한다. 본 연구의 결과로서 Semi-dried sausage 제조를 통한 한국 축산 농가를 보호할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 발효진피와 같은 천연재료와 오징어 첨가에 따른 생산을 통해 농어업 종사자들의 경제적 이익을 도모할 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구의 목표는 아래와 같다.

- 전통식품으로부터 안전한 고기능성 미생물의 선별과 효과의 검증 및 우수균주 확보
- 육제품 첨가에 적합한 기능성 미생물 획득
- 한국형 발효 육제품의 제조 기술 개발 및 콜레스테롤 저하 소시지 개발
- 오징어를 이용한 저가, 상온 유통 발효 육제품 제조 기술 개발
- 발효진피를 이용한 저장성 증대

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 Starter culture

현재 국내에서 제조공정을 거쳐 유통되는 발효식품은 김치, 장류, 유제품, 제과 등 다양하지만 starter를 사용하는 제품은 발효유에 한정되며, 그나마도 검증된 수입제품에 의존하기 때문에 국내 자체적 starter 브랜드는 없는 실정이다. 하지만 국외에서의 starter 시장규모는 국내 사정과 많이 다르다. 2010년 Christian hansen 사의 보고서에 따르면 해당년도 영업이익은 378만 유로에 달한다. 외국의 대표적 stater 생산 업체는 Christian Hansen, Danisco, Gewuerzmuller 등이 있고 이들은 유제품 뿐만 아니라 발효 육제품에 대한 다양한 종류의 starter를 생산판매하고 있다. 최근에는 starter에 기능성을 특화시켜 알려지나 염증을 완화시키는 등 건강에 유의한 효과를 가지는 Probiotic starter를 개발하여 판매하고 있다.

제 2 절 발효진피

2012년 중소기업 수출증진을 위한 지원사업에서 발간한 '수확후 관리기술 요람' 감귤편에 따르면 감귤과피에 대한 국내외적 핵심기술은 과피의 색소 성분과 기능성 성분에 집중되어 있다. 과피 색소의 구성성분과 그 합성시기, 기능성 성분의 분석과 그 합성시기, 수확 후 유통조건에 따른 함량 변화 등이 연구의 골자이다. 국내에서는 성숙도에 따른 당도 변화, 비타민 및 색소 성분의 함량과 품질에 관하여 주로 연구되고 있으나 아직 미흡한 실정이고 국외적으로는 카로티노이드 등의 기능성 물질에 대한 체계적인 분석이 이루어지고 있다. 본 연구에서는 발효과정이 추가된 고부가가치 천연물로서의 진피를 개발하고 발효 육제품에 적용하고자 하였다.

제 3 절 기능성발효육소시지

국내에 기능성발효육제품은 아직 뚜렷한 상품이 출시되고 있지 못하다. 국내 발효햄 기술력은 해외기술보다는 부족하나 기술제휴, 자체개발 등을 통하여 CJ제일제당, 롯데햄, 대상F&F, 에스푸드, 오델, 돈텐팜 등 육가공업체는 이미 국내 단기숙성(2주내 발효 후 출하) 생햄 생산기술을 보유하고 있으며(농촌진흥청 국립축산과학원 2009.6월 발표) 국내시장이 성숙 될 때까지 제품 출시 보류계획을 가지고 있다. 대상F&F, 오델, 돈텐팜 등은 살라미 생산기술을 개발 또는 연구 중에 있다. 기능성 발효육제품은 Probiotic 개념을 도입하여 미국, 유럽 및 일본 등지에서 개발되어 혈압강화작용, 항산화작용, 항 스트레스 작용이 되고 있으나 아직 과학적 증명이 미미한 상태다. 또한 일본의 기능성 육제품의 경우 식물섬유 또는 대두단백질을 포함한 특정보건용 식육제품이 8종정도 등록되어 있으나 아직 대중화 되지 못한 상태이다(有原圭三, 2003). 다른 기능성 육제품이 예로는 유산균의 단백질 분해 효소 활성화에 의한 혈압강화 작용, 항산화 작용, DNA 손상 예방작용, 스트레스성 위궤양 예방작용 등을 가진 발효 돼지고기 이고(有原圭三, 2001), 식이섬유 혼합(Cofrades 등, 2000), 치커리(chicory)에서 추출된 fructose 중합체인 inulin(Pszczola, 1998), 최근에 가열된 식육에서 항암효과를 나타내는 CLA(Raes, 2001) 첨가 또는 축척 제품들에 대한 연구들이 진행 중이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 전통식품으로부터 고기능성 미생물 발굴

1. 서설

김치는 한국의 전통 채소발효식품으로 김치에 들어가는 마늘, 생강, 고춧가루 등의 천연 식재료들은 다양한 비타민과 미네랄, 식이섬유, Phytochemical들을 함유하고 있어 2008년 Health 지가 선정한 5대 세계건강식품에 소개될만큼 그 기능성이 잘 알려져 있다. 또한 김치는 유산균의 발효에 의해 숙성되기 때문에 사람의 건강에 유익한 유산균들의 보고(寶庫)로서 정장작용, 콜레스테롤 저하 효과, 항비만 효과, 항산화 효과, 항염 효과 등이 있는 것으로 보고되었다(Lee 등 2004, Lee 등 2011). 한편, 반건조 발효소시지 또한 탁월한 Probiotic의 carrier로서, 안정성이 탁월하여 장기보관이 가능하며 다른 발효식품들에 비해 상대적으로 유통 및 섭취가 용이하여 유럽 등에서 전통적으로 섭취되고 있는 발효 식품이다. 하지만 육제품이 가지는 고열량, 고콜레스테롤은 비만과 동맥경화 등 성인병의 원인으로 소비자들에게 좋지 않은 이미지를 주고 있다(Kim 등 2008). 이에 독일의 Gewuerzmuller사는 자사의 기존 meat fermentation starter 제품에 Probiotic 균주를 혼합하여 건강 증진 효과를 추가한 신제품을 이미 출시한 바 있다. 본 연구에서는 발효 육제품의 strater culture로 활용하기에 적합한 기능성 미생물을 분리 동정하기 위해 전통식품인 김치와 몽골육제품을 이용하여 유산균을 선별하였다. 이들 균주로부터 meat fermentation 적합성이 가장 높으면서 탁월한 콜레스테롤 저하 효과를 가진 균주를 선별해내어 발효소시지의 콜레스테롤 저하 기능성 probiotic starter culture를 얻는 것이 본 연구의 목표이다.

2. 연구 내용

한국형 발효 육제품의 개발과 경쟁력 강화를 위한 연구로서 김치로부터 분리한 유산균을 통해 starter의 작용과 콜레스테롤 저하 기능성을 가진 균주를 개발하고자 하였다. 먼저 김치와 몽골 발효육제품으로부터 기능성 미생물의 분리하여 내산성 및 내담즙성을 조사한 뒤 16s rDNA 동정을 수행하였고, 항생제 내성, biogenic amine 생성 여부 등을 통해 안전성이 확보된 미생물을 선별해 내었다. 발효 육제품의 제조에 적합한 starter를 선택하기 위해 적정 pH, Salt tolerance, 생육 적온, CO₂ 생성여부, catalase, proteolytic, lipolytic 활성을 조사하여 적합성을 판단하였다. 선별된 유산균주는 콜레스테롤 저하 효과, 항산화 효과, 항 미생물 효과, 장 부착 능력, 항 비만 효과 등을 조사하여 그 기능성을 검증하였다. 최종적으로 선별된 *L. sakei* NR28 균주는 in vivo 검증을 통해 콜레스테롤을 저하하는 효능을 가지고 있는 것으로 나타났고 장내 균총의 변화 관찰에 의해 *Bacteroidetes*과 *Firmicutes*의 비율변화에 의한 항비만효과가 있을 것으로 기대되었다. 또한 잘 알려진 Probiotic 균주인 *L. rhamnosus* GG보다 뛰어난 장 부착 능력을 보여주었으며, antimicrobial 활성 및 AI-2 억제에 의한 병원성균의 저해 효과가 있는 것으로 나타났다.

3. 연구 방법

가. 유산균 분리

우리나라 뿐만 아니라 아직까지 잘 알려지지 않은 culture인 몽골 지역의 발효유에서 미생물을 분리한다. 몽골 지역 발효육제품은 예로부터 배가 아프거나 기력이 부진할 때 전통적으로 식품

뿐만 아니라 약으로 섭취되고 있다. 몽골 지역의 육류와 유제품 위주의 비타민 등이 부족한 영양 상태를 발효유가 채워주고 있는데 이것으로 보아 유제품 내의 기능성을 가진 유산균을 분리할 수 있을 것으로 보인다. 고압멸균된 백에 sample을 보관한다. 백에 NaCl 90ml을 넣고, sample 10g을 NaCl에 풀어준다. 스토마커로 으깨고 5분 waiting한다. 100 μ l를 따서 NaCl에 dilution해 준다. 10⁻⁶, -7, -8, -9을 plate에 duplication해서 도말한다. 37 $^{\circ}$ C inubator에서 1~2일 정도 waiting. plate에 자란 균을 colony 별로 색깔, 크기, 투명도 등 고려해서 분리하고, 각 colony들을 MRS broth에 키운다. 37 $^{\circ}$ C incubator에서 1~2일 키워서 현미경을 통해서 single colony인지 확인한다.

나. Catalase test and Gram staining

유산균은 catalase negative, gram positive 인 미생물이다. 따라서 유산균을 선별하기 위해 MRS Agar에서 자란 균 중 catalase test와 gram염색을 통해 유산균을 확인한다. 0.3% H₂O₂를 준비한 후 colony에 접종한 뒤, 기포가 발생하지 않는 colony를 선택한다.

다. Morpholgy and gas production

Probiotics로서 가장 많이 이용되는 유산균은 lactobacillus 계통이다. lactobacilli 의 많은 유익한 기능성이 연구 증명 되어 왔고, 이용되고 있다. 이 과제에서는 이러한 lactobacillus를 분리, 선택하여 기능성 발효 유제품을 만드는 것을 목표로 한다. 또한 lactobacillus 중 발효 유제품에 적합한 gas를 생성하지 않는 homofermentative 균주를 선별한다. 따라서 lactobacillus를 선별하기 위해 분리된 균주의 모양(rod shape)으로 선택하고, gas 생성 여부를 확인하여 선별한다. 현미경을 통하여 분리된 균주들의 모양을 관찰한다. 이중 rod 모양의 균주들을 선별한다. MRS broth 에 durham tube를 넣고 균을 1% 접종하여 24h 배양시킨후, durham tube에 기포가 생성된지 확인한다.

라. 내산성 및 내담즙성 검사

내산성은 균이 위에서 얼마만큼 살 수 있는가를 확인해 보는 test로서 pH2.5~3의 위산에서 균이 살 수 있어야 위산을 통과하여 장으로 이동 할 수 있다. 내산성 test는 pH 3 에서 처음 접종한 균수에 비해 몇 %가 살아 남았는가를 측정하는 방법으로 CFU와 survival rate를 계산하여 효과를 검증한다. 내담즙성 test는 균이 담즙산에 얼마만큼 살아남을 수 있는가를 확인해 보는 test로서 이 때, 담즙산과 같은 환경을 제공하기 위하여 0.3% oxgal로 broth를 맞춰주고 담즙산에 얼마나 tolerance한지를 확인하기 위해 3시간에 한번씩 OD 값을 측정하여 growth curve를 그린다. 유산균을 음식물과 함께 섭취하였을 때 강한 위산을 분비하는 위에서 1시간 정도 머무른 후, 십이지장에서는 담즙을 분비하여 고농도의 담즙에서 2시간 정도 통과한 후 장으로 이동하게 된다. 유산균이 이런 극심한 환경에서 살아남아 장으로 들어갈 수 있어야 장에 달라붙어 숙주에게 좋은 영양을 끼치게 되어 probiotics로서의 역할을 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 우리 인체(위와 십이지장)환경과 비슷한 조건으로 실험을 설정한 SSDP(Simulated stomach duodenum passage) 방법(Haberer 등 2002)으로 유산균의 내산성 내담즙성 실험하였다. MRS broth에 HCl을 넣고 pH3으로 맞춘후 121도에서 15분간 멸균한다. NaHCO₃(6.4g/l), KCl(0.239g/l), NaCl(1.28g/l)을 DDW에 녹이고 HCl을 이용하여 pH7.5로 맞춘 후 고압멸균하여 Synthetic duodenum juice로 사용한다. 유산균을 18시간동안 MRS broth에서

배양시킨다. 1ml의 유산균액을 e-tube에 담아 원심분리한 후, PBS로 2번 씻어준다. PBS를 제거한 후, 침전된 유산균을 pH3 MRS broth 1ml에 녹인 후, 9ml의 pH3 MRS broth에 넣고 vortexing한다. 그 중 1ml을 따서 연속희석하여 MRS 배지에 도말한 후 37°C, 24시간 배양하여 처음 접종된 유산균의 수를 계수한다. 나머지 9ml은 37°C에서 한 시간 배양 후, 17ml의 Synthetic duodenum juice를 넣고 4ml의 oxgal solution을 넣어준다. 37°C, 2시간 배양 후 연속 희석하여 MRS 배지에 도말한 후 37°C, 24시간 배양하여 살아남은 유산균을 계수한다. 처음 접종된 유산균의 수와 3시간 후 살아남아있는 유산균의 수를 비교하여 %로 나타낸다.

마. 16s rDNA sequencing

선별균주의 16S rDNA는 Escherichia coli의 16S rDNA 유전자의 8-27과 1511-1491위치에 각각 상응하는 두개의 primer, 즉, 16S seqfw (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 과 16S seqrev (5'-GGN TAC CTT GTT ACG ACT TC-3')를 사용하여 PCR로 증폭한다. PCR 반응은 rep-PCR에서 기술된 바와 같이 반응혼합물을 조성하여 35 cycle (94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 2분)을 실행한다. PCR 반응물은 quantum prep-PCR clean column (Biorad, Germany)로 정제하며 GATC Biotech (GATC, Konstanz, Germany)에서 양방향으로 읽는다.

바. 생육온도 범위 및 적정 온도, 염도, pH 측정

18시간 배양시킨 유산균을 MRS broth에 1% 접종한다. 4, 15, 25, 30, 37, 45°C에서 각각 배양시키며, 12시간간격으로 OD값을 측정하여 생육범위 및 시간에 따른 성장속도를 측정함으로써 적정온도를 판별한다.

MRS broth에 NaCl을 농도별(0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%)로 넣어 멸균한다. 18시간 배양시킨 유산균을 MRS broth에 1% 접종한다. 12시간간격으로 OD값을 측정하여 생육범위 및 시간에 따른 성장속도를 측정함으로써 적정염도를 판별한다.

MRS broth의 성분 중 dextrose는 멸균시 고온에서 pH를 변화시키기 때문에 fructose나 sucrose로 대체하여 배지를 만든다. 배지에 1M HCl를 넣어가며 pH를 6, 5, 4, 3, 2로 맞춘 뒤 멸균한다. 18시간 배양시킨 유산균을 MRS broth에 1% 접종한다. 12시간 간격으로 OD값을 측정하여 생육범위 및 시간에 따른 성장속도를 측정함으로써 적정pH를 판별한다.

사. Proteolytic and Lypolytic test

균을 MRS broth에서 18시간 배양한다. skim milk agar(1%skim milk powder, 0.5% yeast extract, 1.5% agar)를 준비한 뒤 균을 도말한다. 37°C에서 24~48시간 배양한 뒤 콜로니 주변에 나타나는 clearzone으로 Proteolytic activity를 측정한다.

균을 MRS broth에서 18시간 배양한다. tributrin agar를 auto한 후 80°C로 식힌후, tributrin을 1%첨가 후 agar plate를 만든 후 균을 도말한다. 콜로니 주위에 나타나는 clearzone으로 Lypolytic test를 측정한다.

아. 항생제 내성 및 Biogenic amine(BA) 생성 테스트

항생제(Erythromycin, Gentamicin, Ampicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Streptomycin, Ciprofloxacin, Penicillin G)을 2배 희석법으로 0.025~64µg/ml의 농도로 넣은 MRS agar plate를

만든다. 18시간 배양한 유산균을 10^5 /spot이 되도록 plate에 접종한다. 24~48시간 37°C incubator에서 배양 후, 최소저해농도(MIC)를 측정한다.

아미노산 전구체(L-Tyrosine disodium salt, L-Histidine monohydrochloride monohydrate, L-Ornithine monohydrochloride, and L-Lysine monohydrochloride)를 0.1%첨가한 MRS broth를 만든다. 18시간 배양한 유산균을 1%접종한 뒤 5~10번 교대 배양하여, decarboxylase 효소를 활성화시킨다. Sara Bover-Cid and Wilhelm Holzapfel(1999)에 의해 고안된 decarboxylase media에 효소 활성화된 균을 도말한다. 37°C에서 24~48시간 배양 후 보라색으로 변함을 통하여 BA생성 균을 판별한다. decarboxylase media속에 있는 bromocresol purple은 pH 5.2에서 노란색을 띄지만 pH6.8로 올라갈수록 보라색으로 변한다. 따라서 BA 생성으로 인해 pH가 올라갈 때 보라색으로 변하는 것을 이용하여 BA생성을 확인할 수 있다.

자. Cell surface hydrophobicity and adhesion test

유산균의 cell wall의 hydrophobicity를 통하여 대장에서 잘 부착할수 있는지 test한다. hydrophobicity assay는 Doyle와 Rosenberg방법(1995)에 따라 수행한다. 유산균을 MRS broth에 37°C에서 18h시간 배양시킨 후, 배양액 3ml을 10,000g,5min,4°C에서 원심분리 한 후, pellet을 PBS 용액으로 2번 wash해준다. PBS에 현탁시킨후 580nm에서 OD-1값을 측정한다. 1.5ml의 유산균에 1.5ml N-hexadecane을 넣어준후 2분동안 vortexing해준다. 30분동안 안정시킨후 상등액을 580nm에서 OD-2측정한다. Hydrophobicity 값은 $(OD1-OD2 / OD1) \times 100$ 으로 한다.

Schillinger의 방법(2005)을 따라 유산균의 장 부착 능력을 측정하였다. HT 29 cell을 12 well plate에 7×10^4 cell로 접종하여 21일 동안 배양하여 딱 찬 상태로 만들어 준다. 18h 배양한 유산균을 DMEM에 Overnight 배양 후 원심분리하여 DMEM으로 한번 씻어 준다. 이것을 MRS 고체배지에 도말 하여 viable cell counting 한다. 1ml의 DMEM속에 녹아있는 유산균(약 1×10^8)을 tissue culture plate에 각 well에 넣고 원심분리 (2000g, 2분)한다. CO₂ 10%의 상태에서 1시간 incubation한 후에 상등액을 MRS 고체배지에 연속 희석하여서 균수를 측정한다. HT29 cell을 triton x100(0.05% solution)으로 분해해서 MRS 고체배지로 균수를 측정한다. 유산균의 장 부착은 “처음 살아 있는 균수 - 상등액 속의 균수” 를 측정해서 “HT29 세포를 부순 것의 세포 수” 를 세어서 비교한 것으로 부착된 유산균 수를 측정할 수 있다.

차. Antimicrobial and AI-2 inhibition test

분리 유산균의 박테리오신 생산여부를 조사하기 위하여 균체를 직접가하는 Direct method와 상등액을 이용하는 agar well diffusion method로 측정한다.

Direct method: MRS broth에서 overnight culture를 한 유산균을 MRS agar plate에 $1\mu\text{l}$ 접종한후 24시간 30°C에서 배양한다. 그 위에 0.7% soft MRS agar에 병원성 미생물을 각각 접종한 후, 유산균을 배양한 plate에 overlay해준다. 30°C에서 18시간~24시간 배양하여 생육 저지 원의 형성 유무를 관찰한다.

Agar well diffusion method: MRS broth에서 overnight culture를 한 유산균을 원심분리 (10000g,4°C,15min)하여 회수한 상등액을 pH 7로 중화한 다음 membrane filter(0.45um pore size)로 제공한다. MRS agar와 병원성 미생물을 접종하여 혼합하여 말린 후, 살균된 직경 6mm의 cork borer로 well을 뚫은 다음 각 well에 $40\mu\text{l}$ 의 상등액을 주입한다. 30°C에서 18시

간~24시간 배양하여 생육 저지원의 형성 유무를 관찰한다.

Autoinducer bioassay: Bassler 등에 의해 고안된 방법(1998)을 따라 Autoinducer-2에 대한 activity 억제 효과를 확인하였다. positive 균주인 *Vibrio harveyi* BB152 균주를 AB medium*에서 30℃, 120rpm, overnight 배양한다. reporter 균주인 *Vibrio harveyi* BB170 균주와 BB152 균주를 AB medium에서 30℃, 120rpm, 16시간 배양한다. *V. harveyi* BB152 균주는 centrifuge(15,000rpm, 4℃, 5분)으로 상등액을 얻어, 0.20µm pore-size-filter(Ministart, sartorius stedim)로 filtering하여 사용한다. *Vibrio harveyi* BB170 균주는 OD₆₀₀(optical density)를 0.1로 맞춘 후, 1:2000 비율로 AB media에 희석하고, 96-Well microtiter white plate (Whatman 7701-3350)에 위에서 희석한 BB170 균주 90µl와 유산균의 CFSEM을 1:9 비율로 섞어 1시간 동안 배양한 *E. coli*(ATCC 43894) 배양상등액 10µl를 넣어 luminometer(GloMax[®] 96 Microplate Luminometer, Promega)로 3시간 이후부터 30분 간격으로 측정한다.

카. DPPH assay

200µl의 유산균의 cell lysate 샘플을 800µl의 DPPH solution(200µM in methanol)에 섞고 2시간 동안 상온반응 시킨 후, 517nm 파장에서 Optical density를 측정한다(Ju 등 2011). 측정된 값의 계산식은 다음과 같다: DPPH radical scavenging activity(%) = (1-[absorbance of sample at 517nm/absorbance of control at 517nm])×100.

파. BSH and Cholesterol assimilation test

담즙산 분해 효소를 생성하는 유산균이 혈중 콜레스테롤을 감소시킨다는 국내외 다수 연구들을 바탕으로 유산균을 18시간 동안 액체 배지에 배양한다. 유산균을 0.5% (v/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid(TDCA) (Sigma, St. Louis, U.S.A)과 0.37g/l CaCl₂(Sigma, St. Louis, U.S.A)을 포함하고 있는 MRS 고체 배지 위에 놓은 6mm filter disk(Whatman, England)에 접종한다. 접종된 배지를 혐기적으로 37℃에서 72시간 동안 배양한 후 디스크 주위에 형성된 침전 구획을 측정한다.

0.5% (w/v) TDCA와 0.1g 수용성 콜레스테롤이 함유된 MRS 배지에 균을 배양하고 그 배양상등액을 얻어 Mathara 등의 방법(2008)을 따라 콜레스테롤의 함량을 측정한다.

타. Cholesterol lowering effect - In vivo

식이를 통해 hypercholesterolemia를 유도시킨 C57BL/6 mice로부터 항콜레스테롤 및 항비만 가능성을 조사한다. 아산제약 total cholesterol, 중성지방, HDL 측정용 kit를 사용하였다. 4주령의 C57BL/6를 2주간 안정화시킨 후에, 고 콜레스테롤혈증 유도 식이(HCD)를 급여한다. 식이에는 1%의 콜레스테롤과 그 흡수를 촉진시키는 sodium cholic acid가 0.25% 첨가된 미국 Research diet사의 D12336 제품을 사용한다. chow diet를 자유급여하는 Normal Diet (ND)그룹, D12336을 자유급여하는 HCD 그룹, D12336과 유산균을 10⁸CFU/day로 식이에 섞어 급여하는 유산균 그룹으로 각각 나누어 6주간 급여한다(n=8). Control로 사용된 LGG는 일반적으로 장내 정착력이 우수한 Probiotics로 잘 알려져 있지만, 2010년 발표된 논문(Ying et. al. The

probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. British Journal of Nutrition)에서 비교군으로 사용된 LGG가 NPC1L1 down regulation에 유의적으로 관여하여 콜레스테롤 저하효과를 가진다고 보고되어 생체 내에서의 생활성과 동시에 콜레스테롤에 관한 기능성의 비교군으로서 본 실험에 적용하였다. 고콜레스테롤혈증이 가지는 임상적 차이는 혈중 LDL의 농도로 확인할 수 있다. 다른 비교군에 비해 NR28 유산균주가 가지는 항콜레스테롤 효과를 확인한다. 일반식이를 급여하는 동일한 mouse model에 생균을 경구투여하되, 안정화 기간동안의 체중변화와 3주간 유산균을 급여하면서 나타나는 체중변화 및 간과 정소지방량의 비교를 통해 항비만과의 연관성을 확인한다.

하. Murine gut microbiota profiling

primer와 probe 제작: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Clostridia*, *Bacilli*, *Erysipelotrichi*, *Lactobacilli*를 선택적으로 증폭할 수 있는 primer와 probe를 제작한다. Multiple Sequence Alignment를 사용하여 RDP-II에 등재되어 있는 16s rRNA를 ClustalW2 program으로 정렬하여 일치하는 염기서열을 작성하고 primer와 probe의 적합성 확인 및 RT-PCR을 통한 증폭 여부를 확인한 후, 위의 그룹에 속하는 균들을 무작위로 선택하여 DNA를 추출 후 만들어진 primer와 probe의 특이성을 확인한다.

In vivo test: 4주령 BALB/c 쥐를 정상식이만 하는 그룹과 정상식이와 유산균(10^8 cell/ml)을 매일 경구 투여하는 그룹으로, 한 그룹 당 8마리씩 나누어 2주간 안정시키고, 경구투여 전 2주간의 fecal 샘플과 3주간 경구투여 후 fecal 샘플을 채취하여 미생물군총을 비교하였다. 안정기를 제외한 5주의 기간 동안 1주일에 한차례씩 무게 변화와 식이량을 측정하였다. 각 쥐는 실험 마지막 날 해부하여 소장을 적출하고 g당 20ml의 1xPBS를 섞어 homogenize한 후, 1ml씩 분주하여 -80°C 에 보관하였다. 변과 소장에서 검출한 미생물군체의 DNA를 추출 후, primer와 probe를 사용하여 real-time PCR로 분석하였다(Holzapfel 등 2011, Osborn 등 2009).

4. 연구 결과

가. 유산균의 분리

다양한 종류의 김치와 몽골 발효유제품에서 유산균을 분리하였다. 33개 균이 여러 김치로부터 분리되었다. 27가지의 균이 catalase negative, gram positive로 유산균이었고, 그 중 11개는 gas를 생성하지 않는 rod shape 균들이었다. 52개 균이 몽골 발효유제품으로부터 분리되었다. 모든 균이 catalase negative, gram positive 이었으나 gas를 생성하지 않는 rod shape 균은 1종이었다.

나. Catalase test, gram staining, morphology and gas production.

분리된 유산균의 적합성을 판단하기 위한 실험들의 결과를 아래의 Table 1, 2로 정리하였다.

	catalase	gram	morphology	gas	origin
B6a1	-	+	rod	-	배추김치(꼬마김치)
B6a2	-	+	coccus	-	배추김치(꼬마김치)
B6a3	-	+	rod	+	배추김치(꼬마김치)
B6a4	-	+	rod	-	배추김치(꼬마김치)
I1	-	+	ovoid	+	배추김치(가정집 수제김치)
I2	-	+	Ovoid	+	배추김치(가정집 수제김치)
I3	-	+	Ovoid	+	배추김치(가정집 수제김치)
I4	-	+	small ovoid	+	배추김치(가정집 수제김치)
I5	-	+	ovoid	+	배추김치(가정집 수제김치)
I6	-	+	ovoid	+	배추김치(가정집 수제김치)
I7	-	+	small thin rod	+	배추김치(가정집 수제김치)
I8	-	+	big thick rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR5	-	+	ovoid	+	배추김치(가정집 수제김치)
NR7	-	+	ovoid	+	배추김치(가정집 수제김치)
NR11	-	+	rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR21-1	+		yeast		배추김치(가정집 수제김치)
NR21-2	+		yeast		배추김치(가정집 수제김치)
NR22-1	+		yeast		배추김치(가정집 수제김치)
NR22-2	+		yeast		배추김치(가정집 수제김치)
NR23-1	+		yeast		배추김치(가정집 수제김치)
NR23-2	+		yeast		배추김치(가정집 수제김치)
NR24	-	+	short small rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR25	-	+	short small rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR26	-	+	short small rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR27	-	+	short small rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR28	-	+	short small rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR29	-	+	short small rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR61	-	+	chain ovoid	+	깍두기(가정집 수제김치)
NR62	-	+	thin rod	+	깍두기(가정집 수제김치)
NR63	-	+	chain ovoid	+	깍두기(가정집 수제김치)
NR64	-	+	chain ovoid	+	깍두기(가정집 수제김치)
NR65	-	+	thick chain rod	-	배추김치(가정집 수제김치)
NR74	-	+	small kimchi	-	물김치(가정집 수제김치)

Table 1. 김치유래 균주들의 catalase, mprphology, gas production 특성

	catalase	gram	morphology	gas	origin
C1	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C2	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C3	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C4	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Byaslag
C5	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C6	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C7	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C8	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C10	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Byaslag
C11	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Byaslag
C12	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C13	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C14	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C15	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C16	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C17	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C18	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Byaslag
C21	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A40	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A42	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A43	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A44	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A45	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A46	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A47	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A48	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A49	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A50	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A51	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A52	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A54	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A55	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A56	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A57	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A58	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A59	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A60	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A64	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Airg
A65	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Airg
A66	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Airg
A70	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A71	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A73	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A75	-	+	coccus	+	(몽골발효유제품)Airg
A77	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Airg
A78	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Airg
A79	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Airg
A80-1	-	+	rod	-	(몽골발효유제품)Airg
A81	-	+	rod	+	(몽골발효유제품)Airg
H1	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Aaruul
H2	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Aaruul
Y21	-	+	coccus	-	(몽골발효유제품)Tarag

Table 2. 몽골발효유제품 유래 균주들의 catalase, mprphology, gas production 특성

다. 내산성과 내담즙성

김치에서 분리된 모든 균주들은 담즙 0.3% 함유 배지에서 모두 살아남았다. 선택된 12가지 균주 모두 pH3에서 높은 비율로 살아남았고, 몇 균주들은 자랄 수 있었다.

Strains		Initial mean counts (log CFU/ml)	After 3h pH 3.0 (log CFU/ml)	Survival (%)
<i>L. sakei</i>	B6a4	5.5	0.66	10.9
	I8	4.5	0.36	8.0
	NR11	5.5	0.39	7.1
	NR24	4.5	0.75	16.7
	NR25	3.0	0.033	1.1
	NR26	3.25	0.03	0.9
	NR27	2.4	0.06	2.5
	NR28	2.8	0	0
	NR29	2.2	0.039	1.8
	NR65	3.0	0.42	14.0
	1 st M3	3.5	0.033	0.9
<i>L. plantarum</i>		3.7	6	162
	NR74			

Table 3. 각 균주들의 내산성 및 내담즙성

유산균을 음식물과 함께 섭취하였을 때 강한 위산을 분비하는 위에서 1시간 정도 머무른 후, 십이지장에서는 담즙을 분비하여 고농도의 담즙에서 2시간 정도 통과한 후 장으로 이동하게 된다. 유산균이 이런 극심한 환경에서 살아남아 장으로 들어갈 수 있어야 장에 달라붙어 숙주에게 좋은 영양을 끼치게 되어 probiotics로서의 역할을 할 수 있다. 따라서 김치와 발효 유제품으로부터 분리, 선별된 유산균을 섭취하면 장까지 도달하여 숙주에게 좋은 영향을 끼칠 수 있을 것이라 기대되며, 차후 발효 유제품에 스타터 컬처로 접종되어 단순히 발효의 역할만 하는 것이 아니라 기능성발효 유제품으로서의 역할을 할 것 이라 예상된다.

라. BSH & Cholesterol assimilation

콜레스테롤을 저하시키는 효과를 알아보기 위한 in vitro 실험으로서 BSH test를 수행하여 cholesterol assimilation 결과 데이터와 함께 분석하였다. 모든 균주에서 BSH activity는 유의적으로 유효하게 나타났으며, cholesterol assimilation의 경우 B6a4, NR28, NR74 균주들은 대조균으로 사용된 LGG보다 뛰어난 콜레스테롤 저하 효과를 보였다(Table 4).

Strains	BSH* activity	Cholesterol assimilation in the presence of	
		Taurodeoxycholic acid	
		%	assimilation
<i>L. sakei</i> B6a4	+	40.7±16.4	
NR11	+	60.6±13.6	
NR24	+	61.2±11.4	
NR25	+	52.2±14.1	
NR26	+	54.8±14.1	
NR27	+	59.9±15.1	
NR28	+	43.5±20.1	
NR29	+	59.2±18.8	
NR65	+	59.3±19.5	
1stM3	+	58.5±10.1	
<i>L. plantarum</i> NR74	+	47.8±14.2	
<i>L. rhamnosus</i> GG	+	48.0±21.0	

Table 4. 분리된 유산균들의 Bile salt hydrolase 및 Cholesterol assimilation 활성

마. 전통식품 유래 미생물의 동정(16S rDNA sequencing)

내산성 내담즙성을 통과한 선별된 균주들을 유전자 단계에서 동정하였다(Table 5). 김치에서 선별된 11가지 균중 10개는 *Lactobacillus sakei* 로 동정 되었고, 한 개의 균은 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었다.

No.	Identification	Similarity(%)	
		forward	Reverse
B6a4	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	97	98
I8	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	97	98
NR11	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K,	98	98
NR24	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	99	97
NR25	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	99	97
NR26	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	99	98
NR27	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	98	99
NR28	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	97	99
NR29	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K,	98	99
NR65	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K,	98	97
NR74	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1(Forward)	100	
<i>Lactobacillus plantarum</i> . ATCC 14917(Reverse)		99	

Table 5. 김치 유래 미생물의 16S rRNA sequence

몽골 발효유제품에서 분리된 유산균들은 *Lactococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* 등에 속하는 균주인 것으로 동정되었다(Table 6). 몽골 발효유제품에서 분리된 유산균들 중 가스를 생성하지 않는 A 80-1을 선별하였고, 이것을 16S rDNA로 sequencing 한 결과 *Lactobacillus casei*로 동정되었다.

Table 6. 몽골 발효유제품 유래 미생물의 16S rRNA sequence

Strains	16SrRNA sequence comparative in NCBI	Similarity (%)	
Homofermentative cocci	C11-2, A50, A 60	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain Douzhi109	99%
	A55, A 81-1	<i>Lactococcus lactis</i> CICC6030 or <i>Lactococcus lactis</i> SCC43K	99%
	A46	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain TA-6	99%
	H1	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%
Heterofermentative rods	C6, C16, A65-1	<i>Weissella viridescence</i>	99%
Heterofermentative cocci	C12, A48	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%
	A54	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> or <i>confusa</i>	99%
Homofermentative rods	A 80-1	<i>Lactobacillus casei</i>	99%

바. 발효유제품으로부터 가장 우세한 유산균 선별

Cholesterol assimilation의 결과로부터 콜레스테롤 저하 효과가 상대적으로 높은 *L. sakei* 균주를 선별하여 발효소시지 발효조건인 2.5% NaCl, 22도에서 생육적응성을 살펴보았다(Figure 1). LS-1은 상업용으로 판매되는 starter로서 대조균으로 사용되었다. 실험 결과 선별한 B6a4, NR25, NR26, NR28 중 해당 조건에서의 생육활성은 NR28이 가장 좋은 것으로 나타났고 LS-1 과도 비슷한 수준이었다.

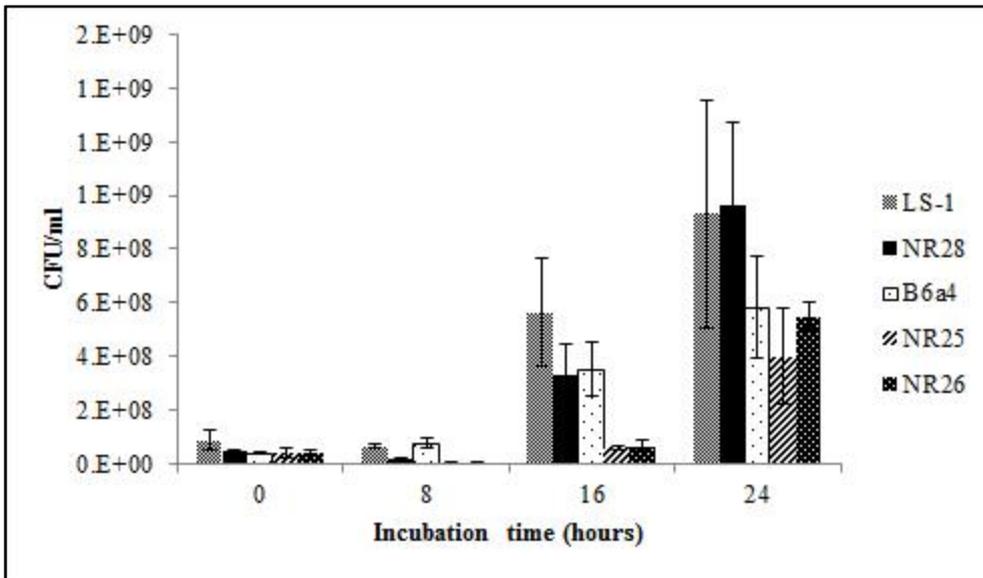


Figure 1. 선별된 *L. sakei* 균주들의 발효소시지 발효조건에서의 생육활성 비교

동시에 김치와 몽골유제품에서 분리.선별된 유산균을 유제품에 넣어 발효유제품을 만든 것(제1세부과제 1차년도 진행)으로부터 가장 우세하게 자란 유산균을 조사하였다. 발효식품(김치, 몽골유제품)으로부터 분리, 선별된 12가지 유산균을 넣고 발효유제품을 만든 후 유산균을 측정 한 결과, 5×10^7 의 유산균이 측정되었다. 이중 6가지 모양이 다른 균을 선별한 후 (L17-1,G17-1,

G17-2, G17-3, G27-1, G27-2) 이를 동정하였다(Table 7).

Strain	
L17-1	<i>Lactobacillus sakei</i>
G17-1	<i>Lactobacillus curvatus strain CTSPL4</i>
G17-2	<i>Lactobacillus sakei strain BMG 148</i>
G17-3	<i>Lactobacillus pentosus strain 124-2</i>
G27-1	<i>Lactobacillus pentosus strain 124-2</i>
G27-2	<i>Lactobacillus sakei</i>

Table 7. 발효육제품가공 후 우세하게 자란 미생물의 16S rRNA sequence

발효육제품에서 가장 우세하게 자란 유산균 중 *Lactobacillus sakei*가 김치 에서 분리.선별한 유산균과 동일함을 당발효 실험과 Sequencing 분석을 통하여 확인한 결과 발효육제품으로 분리된 유산균중 L17-1, G17-2, G27-2가 *L. sakei*로 동정되었다(Table 8). 이 *L. sakei*가 김치로부터 분리.선별된 균인지 확인하기 위하여 당발효 실험을 통하여 비교한 결과, 김치로부터 분리.선별된 *L. sakei* NR28과 동일한 당발효 pattern을 보였다. 따라서 G27-2와 NR28의 sequencing 이 일치하는지 확인하여 동일함을 판정하였다.

Strains	CO ₂ from gluconate	NH ₃ from Arginine	Lactic acid isomer	m-Dap	Carbohydrates fermented												
					Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Gluconate	Mannitol	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sucrose	Maltose	Trehalose	Gentibiose	Salicin
<i>L. sakei</i>	-	-	DL	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+
B6a4	-	-	DL	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+
NR11	+	+	L	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	(+)
NR24	+	+	L	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
NR25	+	+	L	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
NR26	+	+	L	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
NR27	+	+	L	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	(+)
NR28	+	+	L	-	(+)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
NR29	+	+	L	-	+	+	+	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+
NR65	+	+	L	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)
<i>L. plantarum</i>	+	-	DL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NR74	+	-	DL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 8. 선별된 유산균들의 당발효 특성

사. Proteolytic, lipolytic test

육제품에는 유산균이 자라기 위해서 필요한 당분이 부족한데, 원료육속에 있는 단백질과 지질을 분해하여 영양분으로 사용할 수 있는지 단백질, 지질 분해 능력 실험을 실시하였다.

positive control로 사용된 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213은 skim milk agar(proteolytic 활성 선별배지)와 tributyrin agar(lipolytic 활성 선별배지)에서 콜로니 주위에 투명환을 형성함으로써 단백질과 지질은 분해할 수 있는 능력을 지닌 것이 확인되었지만, 김치로부터 선별된 유산균 *L.sakei* NR28은 어떤 배지에서도 투명환을 보이지 않아, 단백질과 지질을 분해할 수 있는 능력이 없는 것으로 판별된다.

아. 항생제 내성 조사 및 Biogenic amine 생성 조사

본 과제에서 선별된 *Lactobacillus sakei* NR28은 Scientific Committee for Animal Nutrition(SCAN 2002)과 European Food Safety Authority(EFSA 2008) 에서 제안한 Breakpoint에서 Erythromycin, Ampicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Penicillin G 항생제에 대해서 내성을 갖지 않았지만, Gentamicin 과 streptomycin에서 약간의 내성을 보였다. 하지만 Danielsen and Wind가 제안한 breakpoint에서는 내성으로 판별되지 않았는데, 이는 많은 Lactobacilli에서 aminoglycosides계의 항생제에 내성을 보였고, 이는 intrinsic 내성으로, 항생제 내성에서 우려되는 내성유전자를 다른 장내박테리아(병원성 균)에게 전달할 수 있는 위험과는 관계가 없는 것으로 판별되어진다(Table 9).

		Em	Gm	Am	Te	Ch	Sm	Ci	PG
<i>Lactobacillus sakei</i> NR28		<0.25	32	1	4	1	>64	4	<0.25
Breakpoints for <i>L.sakei</i>	SCAN	4	1	2	16	16	16	4	4
	Danielsen and Wind	1	128	4	8	16	>256	>32	4
	EFSA	1	16	4	8	4	64	-	-

Table 9. *Lactobacillus sakei* NR28의 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 농도 항생제에 대한 최소억제농도 (MIC). Em: Erythromycin; Gm: Gentamicin; Am: Ampicillin; Te: Tetracyclin; Ch: Chloramphenicol; Sm: Streptomycin; Ci: Ciprofloxacin; PG: Penicillin G; SCAN: Scientific Committee for Animal Nutrition(2002) ; EFSA: European Food Safety Authority(2008) ; Danielsen and Wind; Danielsen, M., Wind, A. A., 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. International Journal of Food Microbiology 82,1-11.

Enterococcus faecalis ATCC29212 는 biogenic amine(tyrosine) 으로부터 tyramine을 형성함으로써 pH가 올라가 배지가 보라색으로 변한 반면, 선별된 *L. sakei* NR28은 4가지 아미노산 전구체(Tyrosine, Ornithine, Lysine, Histidine)에서 어떤 biogenic amine도 형성하지 않았다. 특히 Tyramine의 형성은 두통과, 혈압에 관련되어 있는 것으로 알려졌는데, 본 과제에서 선별한 유산균은 이런 위험으로부터 안전함이 증명되었다.

자. Antimicrobial test

Paper disk method를 이용한 항미생물 생육저해효과를 확인해본 결과, *Listeria innocua*와 *Listeria monocytogenes*에서 두드러진 억제능을 보였고, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*에서도 약하지만 억제활성을 보였다(Table 10).

Strains	Paper disk method							H ₂ O ₂	Presumptive bacteriocin production	
	L.i.	L.m.	B.	S.a.	E.	S.T	P.		L.i.	W.
	<i>L. sakei</i> NR28	++	++	+	+	-	-		-	-

Table 10. *L. sakei* NR28의 병원성균에 대한 항균 효과

+++ : strong positive (diameter >2mm), ++ (diameter >1.5mm), + (diameter>1), -: negative

L.i.: *Listeria innocua* KACC 3586; L.m. : *Listeria monocytogenes* KCCM 40307; B.: *Bacillus cereus* ATCC 08715;

S.a: *Staphylococcus aureus* KCCM 11335; E.: *Escherichia coli* ATCC 25922; S.T: *Salmonella Typhimurium*

ATCC 14028; P.: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; W.: *Weissella koreensis* KACC 11853

차. AI-2 inhibition

Autoinducer-2(AI-2)는 미생물의 신호전달물질로서 종 간의 신호를 매개하는 것으로 알려져 있다 (Saloomeh 등 2009). 장출혈성 대장균인 *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894)의 경우 adhesion과 관련된 virulence factor들의 발현이 이 AI-2의 활성화와 밀접한 관계가 있다는 것이 알려져 있다(Kim 등 2008). 우리는 AI-2 저해에 의한 항병원성 효과로서 가장 많은 연구가 이루어진 *L. acidophilus* La-5를 양성대조균으로 하여 *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894) 균주의 AI-2 activity에 대한 NR28 배양액의 저해효능을 확인해보았다(Figure 2). 일반적인 배양조건에서 AI-2 activity를 보이지 않던 La-5는 가장 높은 저해효과를 보여 여러 연구결과들과 일치하는 것을 확인하였다. 균종은 다르지만 마찬가지로 NR28 역시 높은 저해능을 보였으며, 단일 실험결과로만 보았을 때 La-5와 대등한 저해능을 가진 것으로 판단되어 quorum sensing 저해에 의한 병원성균 억제효과에 긍정적인 가능성을 제시해 주었다. 한편, Probiotics가 생산하는 항생물질에 의한 EHEC의 생육저하가 AI-2 activity에 영향을 줄 수 있으므로 균 수의 변화를 함께 측정하여 그 값을 적용해 보았으나 전체 경향성에 유의적인 영향을 줄 정도의 균 수 변화는 없었다(GMRS: MRS 배지만을 처리한 대조균).

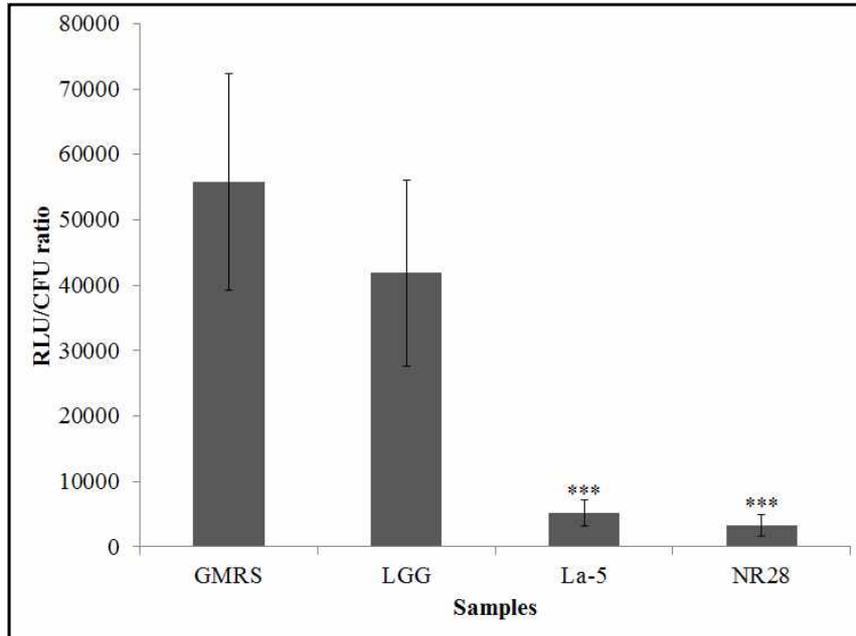


Figure 2. 유산균 배양상등액의 *E. coli* O157:H7 AI-2 activity 저하 효과. (***, $P < 0.001$)

카. DPPH 항산화능

DPPH 라디칼 소거능으로 확인한 항산화효과의 실험 결과 NR28 균주의 cell lysate는 대조군으로 사용된 *L. casei* 균주와 비슷한 수준을 보여 특별히 탁월한 항산화효과를 보여주지는 않았다(Figure 3). 비교대조군으로 사용된 yeast extract의 경우 10mg/ml 농도에서 70%의 소거능을 나타내었다.

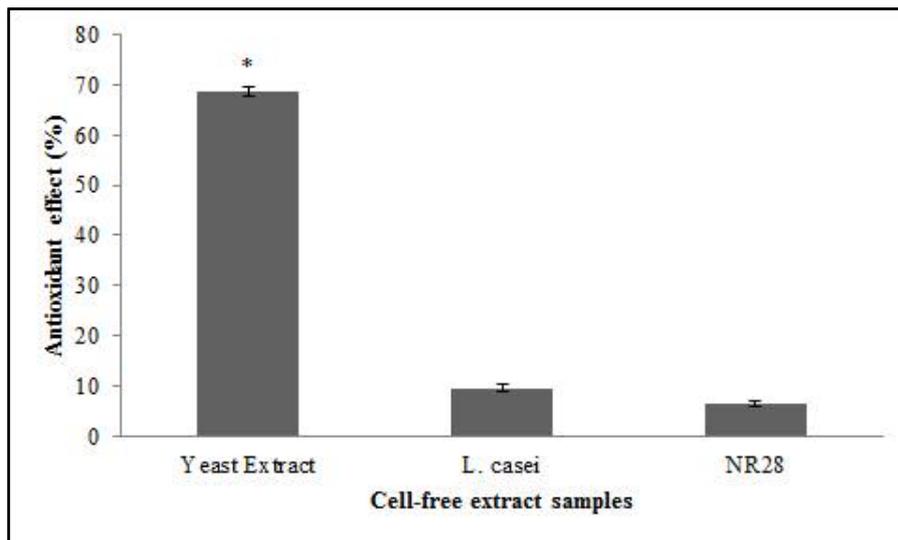


Figure 3. *L. sakei* NR28의 DPPH 라디칼 소거능. (*, $P < 0.05$)

파. Cholesterol lowering effect - *In vivo*

내인성 및 속발성 고콜레스테롤혈증의 병변은 지방식의 과잉과 무관하므로 오히려 당지질대사의 이상으로 인한 체중감소 등의 반대양상을 보인다. 그러나 담, 간의 질환과 함께 혈중 콜레

스테롤의 농도 및 LDL 농도는 비정상적으로 높게 나타난다. 6주간의 급여 기간 동안 체중의 변화와 간과 정소지방의 무게, 혈중 중성지방의 농도를 살펴보면, HCD를 급여하여 고콜레스테롤혈증을 유발한 그룹들이 오히려 일반식이 (ND)를 급여한 쥐들보다 체중증가가 적고, TG의 함량이 유의적으로 낮으며, 정소지방의 무게 역시 대체로 낮은 반면, 간의 무게는 오히려 증가한 양상을 보이고 있다(Figure 4, 5, 6, 7). 그러나 혈중 콜레스테롤 및 LDL 농도는 매우 높게 나타났다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때, 식이를 통한 고콜레스테롤 혈증의 유도가 제대로 이루어졌음을 알 수 있다. 다만 이러한 속발성 병변에 뒤따르는 대사적 이상현상이 예상치 못한 변수로 나타날 수도 있는데, 실험초기에 고콜레스테롤혈증을 유도한 그룹들의 몸무게가 잠시 낮아지거나 정체된 것 외에 외형상 나타나는 이상증상은 없었다.

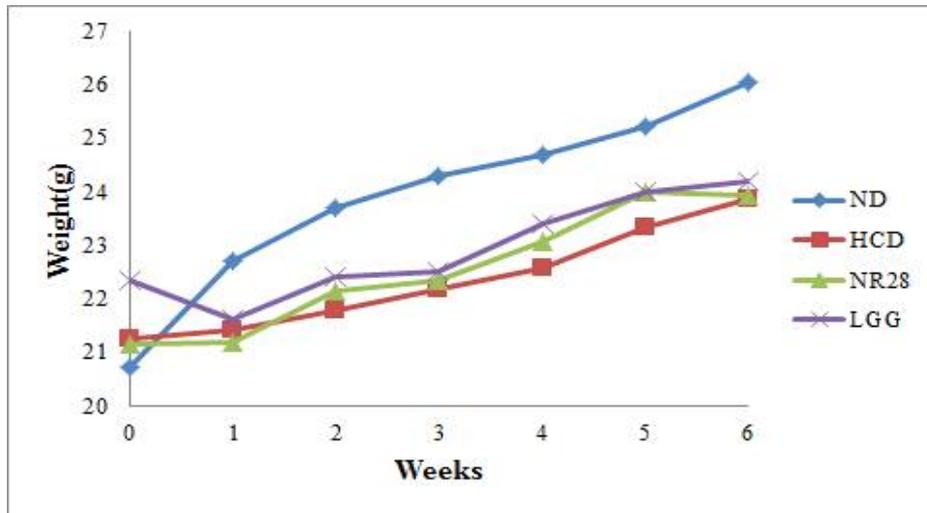


Figure 4. 각 실험군의 몸무게 변화

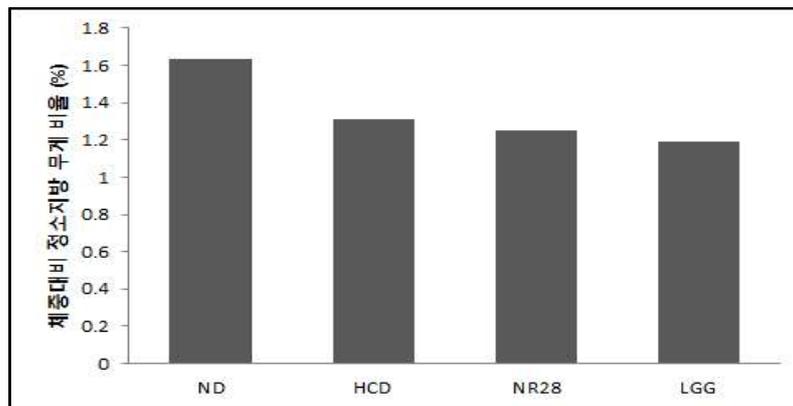


Figure 5. 체중대비 정소지방의 무게 비율

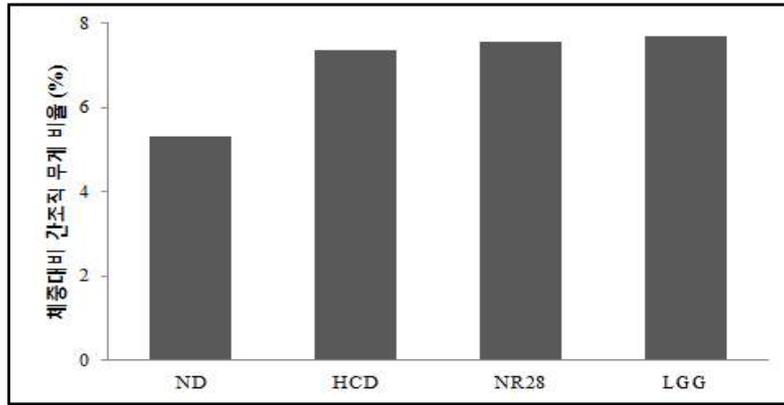


Figure 6. 체중대비 간조직의 무게 비율

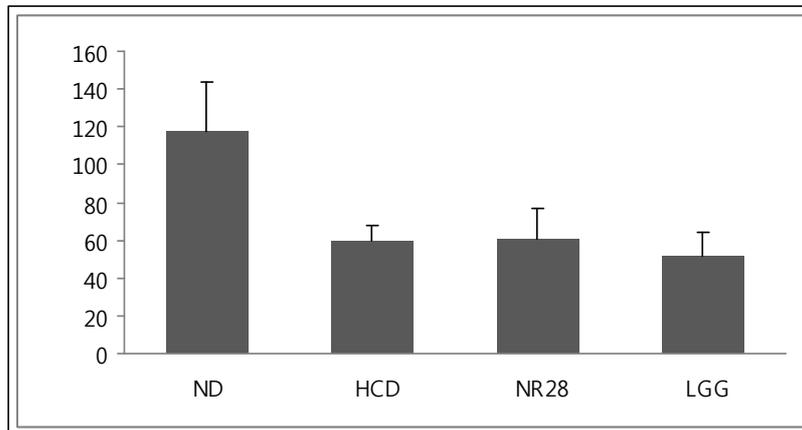


Figure 7. 혈중 중성지방의 농도

6주간의 급여 기간 동안 실제로 섭취한 고콜레스테롤 식이(HCD)의 양과 그 가운데 포함된 콜레스테롤의 양을 측정하여 정상적인 쥐의 혈중 콜레스테롤 수치에 대비하여 증가한 혈중 콜레스테롤 수치의 비율을 계산한 결과, HCD만을 먹인 그룹에 비해 유산균을 함께 처리한 실험군의 값이 유의적으로 낮았다(Figure 8). 이는 같은 양의 콜레스테롤을 먹더라도 유산균을 먹음으로써 콜레스테롤의 체내 흡수를 낮추는 효과를 기대할 수 있음을 의미한다. 더욱이 Probiotics로 잘 알려진 *L. rhamnosus* GG(LGG)에 비해 NR28의 효과가 더 높은 것으로 나타났다.

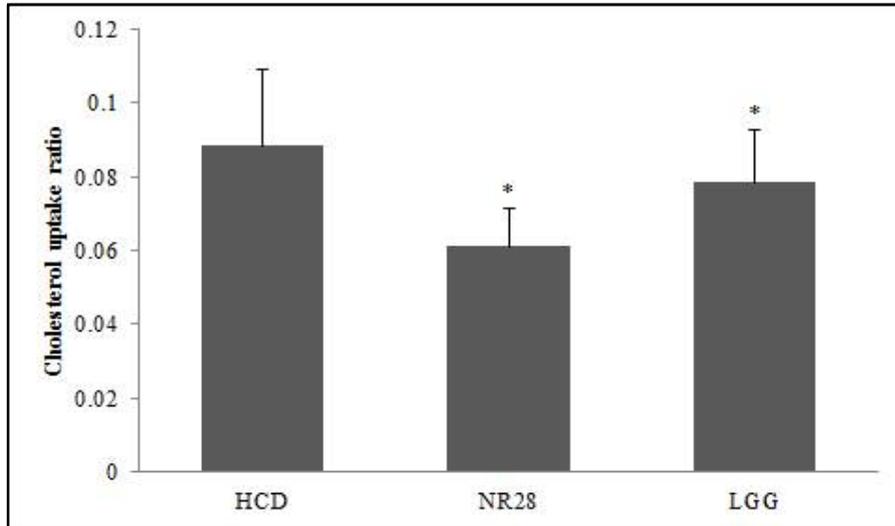


Figure 8. 섭취된 콜레스테롤의 양과 혈액 내 콜레스테롤 농도 증가량의 비율. (*, $P < 0.05$)

serum에서 total cholesterol, TG, HDL를 측정하고 이를 토대로 LDL의 농도를 계산한 결과 ND에 비해 고콜레스테롤혈증 유도 그룹들의 총콜레스테롤 농도와 LDL 수준이 비정상적으로 높게 나타나 고콜레스테롤혈증이 잘 유도되었음을 확인할 수 있었다(Figure 9, 10). HCD그룹에 대비하여서는 유산균을 먹인 그룹의 혈중 총콜레스테롤 농도가 유의적으로 낮게 나타났으며, 특히 NR28그룹의 혈중 콜레스테롤 함량이 가장 낮게 나타났다. 또한 고콜레스테롤혈증의 직접적인 지표가 되는 LDL의 수준 역시 NR28그룹이 HCD에 대비해 유의적으로 낮게 나타나 in vivo 실험모델에서 NR28이 콜레스테롤의 흡수를 낮춰주고 고콜레스테롤혈증을 예방한다는 것을 보였다. 하지만 HDL의 경우 HCD그룹이 유의적으로 높게 나타났다(Figure 11).

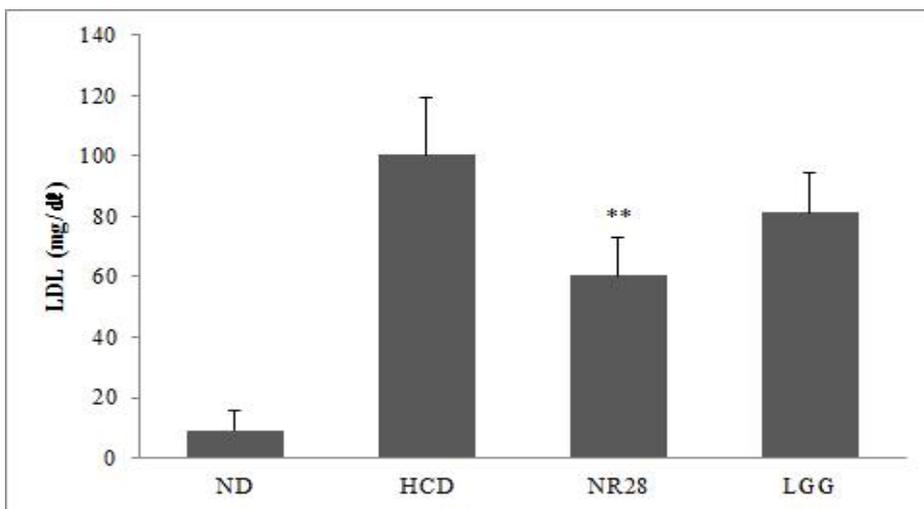


Figure 9. 혈중 LDL의 농도. (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

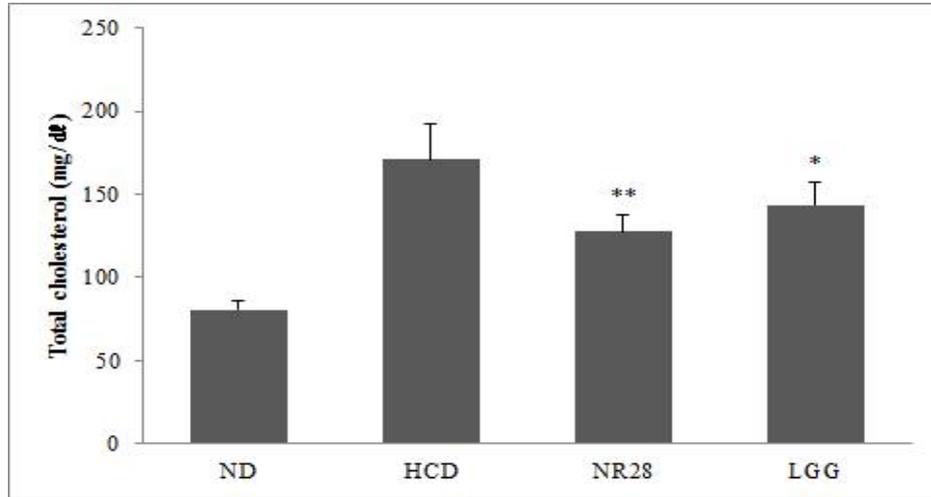


Figure 10. 혈중 총콜레스테롤 함량. (*,P<0.05, **,P<0.01)

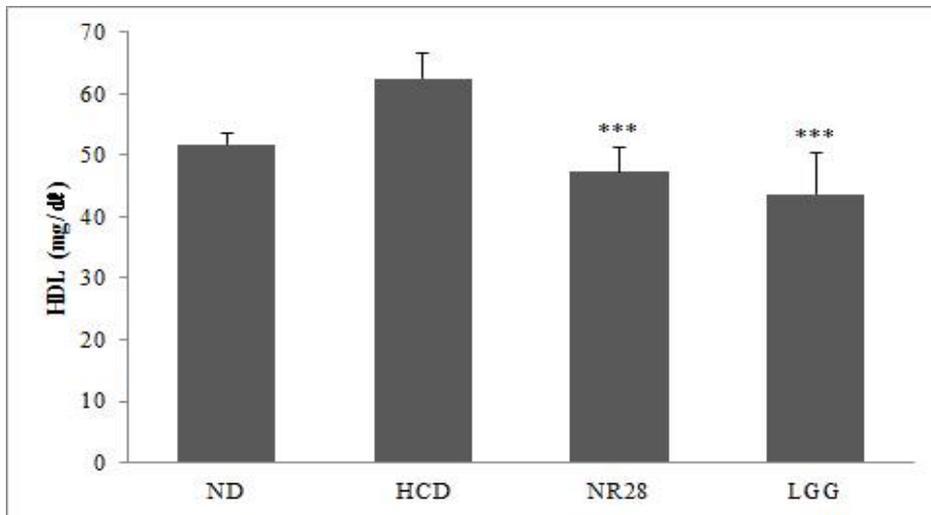


Figure 11. 혈중 HDL의 농도 비교. (*,P<0.05, **,P<0.01, ***,P<0.001)

타. Antiobesity effect - *In vivo*

변으로부터 분석한 장내균총의 *Firmicuts: Bacteroidetes* 비율 변화는 유의적으로 큰 차이가 나타나지 않았으나, 총 균수에서는 NR28과 LGG를 급여한 그룹에서 감소하는 것으로 나타났다. 소장에서는 *Firmicuts: Bacteroidetes* 비율변화가 나타났는데, NR28과 LGG를 급여한 그룹에서 *Firmicuts*의 비중이 감소하였다(Figure 12). 또한 실제 쥐의 몸무게 변화에서는 NR28이 근소하게나마 감소경향을 나타내었지만 크게 차이가 없었던 반면, epididymal 지방의 무게는 NR28과 LGG가 ND에 비해 유의적으로 낮게 나타났다(Figure 13). 이러한 경향성은 Ley 등 (2006)이 밝힌 바와 같이 급여된 유산균에 의한 장내균총의 변화와 그에 따른 비만의 감소 결과와 일치하는 것이다. 더불어 비만과 관련된 Acetyl-CoA carboxylase, Fatty Acid Synthase, Stearoyl-CoA desaturase 유전자의 발현량을 real-time PCR로 분석한 결과 역시 ND에 비해 유산균을 급여한 그룹에서 유의적으로 비만관련 유전자들의 발현량이 감소한 것으로 나타나 김치로부터 분리한 *L. sakei* NR28 균주가 장내균총의 조절에 의한 비만 억제효과가 있음을 보여주었다(Figure 14).

Figure 12. 변 샘플(a)과 소장 샘플(b)에서의 *Firmicutes*와 *Bacteroidetes*의 비율

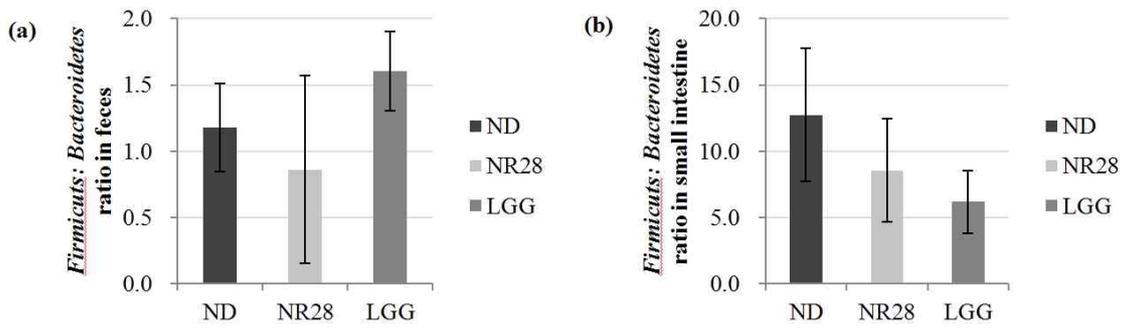


Figure 13. 쥐의 몸무게 및 지방량 변화 (*, $P < 0.05$)

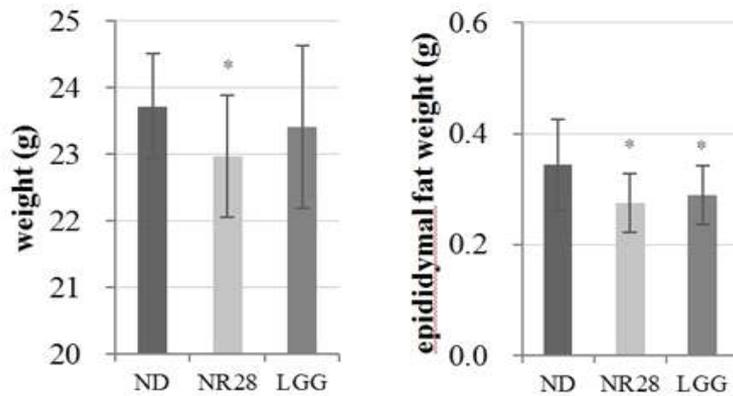
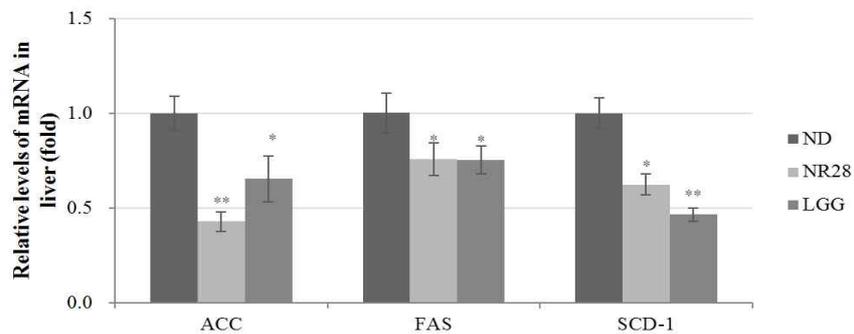


Figure 14. 쥐의 간 조직 내 비만관련 유전자의 발현양 비교. ACC, Acetyl-CoA carboxylase; FAS, Fatty Acid Synthase ; SCD-1, Stearoyl-CoA desaturase. (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)



5. 결론

이상의 연구들을 통해 전통 발효식품인 김치와 콩국 발효 유제품에서부터 분리, 선택된 유산균들은 12종으로, 대표적인 것으로는 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus casei*가 주로 동정되었으며 이들 균주는 기존에 발효소시지의 starter culture로 많이 이용되는 균주들이다. 더불어 이 균주들의 내산성 및 내담즙성 특성을 살펴본 결과 Probiotics로 이용될 수 있는 좋은 생존률을 보였다. 따라서 비록 이 균주들이 유제품이 아닌 유제품이나 김치로부터 분리되었을지라도 발효유제품에서도 잘 적응하고 발효 과정상의 안전성 및 이화학적 기능을 잘 발휘하며, 유산균 본래의 기능성까지 기대할 수 있는 새로운 균주들로서 그 가능성과 발견 가치가 크다고 할 수 있겠다. 따라서 이들 유산균을 원료육에 넣어 발효시킨 뒤 가장 우세하게 자란 유산균을 선별하는 한편, 선별된 유산균이 발효유제품에 적합한지 판별하기 위하여 성장 온도, pH, 염도 범위를 측정하고 발효유제품의 조건에서 잘 살아남는지 조사하였다. 그 결과로서 *L. sakei* NR28 균주가 Probiotics로서의 가능성을 가지는 동시에 발효소시지의 starter로서 선정되었다. 또한 유제품에는 유산균이 자라기 위해서 필요한 당분이 부족한데, 원료육 속에 있는 단백질을 분해하여 영양분으로 사용할 수 있는지 proteolytic, lipolytic test를 통하여 적합성을 판별하였지만 해당 균주들에서는 그러한 활성이 나타나지 않았다. 한편, 안전성에서 문제가 되지 않는 starter로 선정하기 위해 항생제 내성조사와 biogenic amine 생성능을 실험한 결과, *L. sakei* NR28 뿐만 아니라 후보균주들 모두 안전성에는 문제가 없는 것으로 나타났다. 마지막으로 선별된 Starter 균주의 probiotics적 기능성 조사를 통하여, 발효유제품에 적용될 가능성을 추가로 밝히고자 하였다. 콜레스테롤 저하 효과, 항비만 효과, 항산화 효과, 항 미생물 효과, 장 부착 능력을 위주로 연구를 수행한 결과, *In vitro*와 *In vivo* test 결과로부터 항콜레스테롤 효능이 확인되었고, Metagenomics를 이용한 장내균총 변화에 따른 항비만 효과에 대해 검증을 시도하여 유의적인 결과를 얻어내었다. 항산화 효과는 DPPH test에서 일반적인 수준으로 나타났으며, 장 부착 능력은 *L. rhamnosus* GG에 비해 2배 가량 높은 수준으로 나타났다. 항 미생물 효과는 리스테리아에 한해 두드러진 생육억제 효과가 있는 것으로 나타났으나, EHEC에 대한 quorum sensing autoinducer-2 signal molecule에 대한 억제 작용을 확인해본 결과, 크리스찬 한센 사의 *L. acidophilus* La-5와 비슷한 효과를 보여 *L. sakei* NR28이 EHEC의 생육에는 영향을 미치지 않으나 EHEC의 LuxS-mediated virulence vector에 상당한 억제효과를 가질 것으로 기대되었다. 결론적으로, 본 연구를 통해 선별된 *L. sakei* NR28 균주는 발효소시지의 starter로서 적합한 균종인 동시에 뛰어난 장 부착능력과 콜레스테롤 저하 및 항비만 효과, 항균효과를 가진 고기능성 Probiotics로서, 이를 통해 제조된 발효소시지의 기능성 및 경쟁력 강화에 높은 기여를 할 수 있을 것으로 평가된다.

제 2 절 기능성 미생물 발효 육제품의 제조와 기능성 조사 및 판매

1. 서설

현재 우리나라 국민 1인당 육류소비량은 35kg 수준으로 스페인의 82kg, 이탈리아의 61kg과 비교하면 반에도 못 미치는 수준이다. 이 같은 차이는 식사 때 마다 손쉽게 간편하게 육류를 섭취할 수 있는 육가공품의 소비량이 적은 것에 기인한 것으로 볼 수 있다. 실제로 국민 1인당 60kg의 육류를 소비하는 독일은 전체 육류소비의 50%인 30kg을 햄 등 육가공품으로 소비하고 있다. 이러한 국내 소비저조의 주된 이유는 유럽의 발효육제품의 독특한 향신료, 고염도 등 우리나라 소비자 기호에 맞지 않는 부문과 한국전통의 식습관 및 요리문화와 관련되어 있다고 하겠으나, 국내 소비자들이 요구하는 수요에 적극 대응하지 못한 요인이 크다. 최근 식품소비 동향에서 보면 소비자들은 전통적인 식이 보충제(dietary supplement) 보다는 기능성이 강화된 식품이나 음료(nutraceutical, functional food)에 더욱 관심을 기울이고 있다(Sloan, 2004). 대부분 국내 육가공업체는 안전하고 고품질의 육제품을 생산하여 국민의 건강증진에 기여하고 있으나 생산되는 약 105개(한국육가공 협회, 2005.9월) 육가공제품은 기능성이나 품질 차별화보다는 가격경쟁에 주력하는 인상을 지울 수 없다. 따라서 기능성 미생물을 이용한 건강기능성 발효 육제품은 새로운 시장 창출과 새로운 먹거리 문화를 이끌 대안으로 판단된다. 발효 육제품은 세절한 육과 등지방, 식염, 발색제, 당류 및 향신료 등을 혼합하여 유산균에 의하여 혼연건조 숙성시킨 육제품의 일종이다. 이러한 발효 육 제품은 식염 첨가와 건조에 의하여 수분활성도가 저하되고, 육 자체의 당과 첨가한 당이 젖산균에 의하여 유산 등의 유기산으로 분해되어 pH가 낮아져 부패 미생물 성장을 억제하므로 미생물에 대해 안전한 식품이 되는 것을 알 수 있다. 제조는 일반적인 발효 육제품 가공기준에 기초로 하여 샘플을 제조하고, 유산균, GdL 등이 숙성·저장 중 발효 육제품에 미치는 영향을 이화학적, 미생물학적으로 알아보았다. 살라미 상품화를 위해서 제품 설계시 소비자의 선호도, 기호성, 유통시장 흐름 파악 및 다각도에서 신제품 출시를 위한 검토가 이루어진 후 제품 컨셉을 정하며, 수 차례의 전문 패널의 관능평가를 통하여 상품화 할 수 있는 수준을 찾는다. 또한 상품화를 위해서 영양성분 조사, 유통기한 설정, 일반성분 검사, 배합비, 포장규격서 및 제조기술서 확정 등이 이루어지고, 생산 및 판매에 관한 문제점이 해결 되어야만 신제품에 대한 출시가 이루어진다. 살라미 제품을 포함한 발효육제품은 아직 소비자에게 생소한 제품으로 판단되며 국내유통시장에서 연간 약 50톤으로 미미하게 수입판매가 이루어지고 있으나, 와인시장 확대로 향후 살라미 시장도 증가할 것으로 전망하며, 발효 육제품을 상품화하기 위해서 많은 시간과 비용 투자가 어려운 현실임에도 불구하고 건강 기능성 육제품에 대한 소비자들의 요구가 증가하고 있으므로 발효 육제품에 대한 법적기준 마련, 기능성 미생물을 이용한 발효육제품 개발 및 상품화연구는 진전되어야 하고 이러한 노력은 본 연구의 목표이기도 하며 상품화를 통하여 기능성 발효 육제품의 판매증가로 이어져 육가공품의 새로운 제품군으로 자리매김하길 기대한다.

2. 연구내용

협동연구과제를 통하여 김치 등 국내 전통발효식품 내 기능성유산균을 분리하였고, 본 연구과제에서 균주로 사용하여 한국고유의 한국형살라미를 개발하여 발효육제품의 경쟁력을 확보하고자 하였다. 살라미 개발에 사용된 균주는 *L. sakei* NR28 균주로서 발효소시지의 starter 기

능과 뛰어난 장 부착능력, 콜레스테롤 저하 및 항비만 효과, 항균효과를 가진 고기능성 Probiotics로 밝혀진 균주로서 이를 사용해 제조된 살라미는 기능성 측면에서 국내외 유사제품과 차별화되는 점이라 할 수 있겠다. 특히 유럽제품보다 염도를 낮춘 저염제품을 목표로 개발하고, 특이향신료를 배제하고 국내 향신료 및 첨가물을 사용을 추구하여 국내소비자의 기호는 물론 국내 농축산물산업에 기여하고자 하였다. 개발된 제품은 국내 전통발효제품인 김치 및 된장을 첨가한 살라미에서 좋은 풍미와 제품안전성이 돋보였으며 특히 된장첨가살라미는 수입제품들과의 관능비교평가에서도 좋은 점수를 나타냈다. 향후 관능평가에서 좋은 점수를 받은 살라미를 보완하고 그 기능성을 살린 마케팅을 추진할 경우 국내는 물론 해외까지 시장개척에 활용할 수 있을 것이다.

3. 연구방법

가. 발효소시지의 재료

돼지고기는 농협목우촌에서 도축 및 가공한 신선하고, PSE 증상이 없는 돈육을 도축 후 48시간이 경과된 약 pH5.8정도의 뒷다리 적육 부위와 등지방을 정육면체(5cm³)로 자른후 선모충 (*Trichinella spiralis*)을 불활성화 시키기 위하여 -20℃냉동고에서 1주간 동결시킨 후 사용하였다. starter culture로 사용된 균주는 협동연구과제에서 김치와 몽골 발효 유제품에서 분리동정한 *Lactobacillus sakei* NR27을 투입농도를 달리하여 발효소시지 제조에 사용하였으며, 소금은 일반적인 순도 99.9%의 정제염을 사용 하였고, 발색제는 21일간의 숙성과정을 고려하여 정제소금과 아질산염의(95% : 5%)비율로 혼합하여 사용하였다. 숙성기간동안의 변색방지과 지방산화를 억제하기 위하여 Vit-C를 사용하였으며, 향신료는 기본적인 후추, 마늘분말과 코리안더 천연분말을 사용하였으며, 케이싱은 직경 38mm의 통기성 Fibrous casing을 30℃~40℃의 온수에서 약 30분간 수화시킨 후 표면 물기를 제거하여 사용하였다.

나. 발효소시지의 제조

(1) 세절

발효소시지의 재료배합비는 표 1과 같다. 동결된 원료육을 Cutting작업이 용이한 상태가 되도록 해동시킨 후(표면 2/3 결빙) Silent Cutter에서 준비된 첨가물과, 미생물을 투입(스타터 컬처인 *Lactobacillus sakei* NR.27를 중량대비 0.02%)하여 Cutting 1단으로 원료육의 입자크기가 3~5mm정도 될 때까지 세절 및 혼합하여 염지육을 완성하였으며, Cutting후 육 온도는 4℃정도를 유지하였다. 동일한 배합비에 대조구 1, 실험구 1, 2로 나누어 제조하고 대조구만 starter culture를 투입하지 않으며 실험구 1, 2는 일반적 제조공정은 같으나 실험구 목적에 따라 풍미제만 다르게 투입한다. Silent cutter에서의 세절 및 유화 공정은 품질에 영향을 미치는 특히 중요한 공정으로, 원료육의 온도, 작업장의 온도, 세절 칼의 형태, 회전속도와 시간, 세절온도, 수분첨가 등이 최종 제품의 품질에 영향을 미치므로 항상 균일성을 유지해야 한다. 특히 작업장 온도는 10℃ 이하를 유지하였다.

Table 1. Formular of the Salami containing Starter Culture or not.

Ingredients Content(%)	Testing(%)		
	Control	Experiment 1	Experiment 2
Lean meat	75	75	75
Fat	25	25	25
Salt	2.5	2.5	2.5
Nitrite	0.03	0.03	0.03
Garlic Powder	0.1	0.1	0.1
Black Pepper	0.3	0.3	0.3
Coriander Powder	0.05	0.05	0.05
Ascorbic Acid	0.1	0.1	0.1
Sugar	0.5	0.5	0.5
Soybean Paste Powder	-	0.3	-
Kimchi Paste Powder	-	-	0.3
Starter Culture	-	10 ⁶ /g	10 ⁶ /g

* Based on the Salami was determined where vacuum cutter mixed of the materials

* unpublished data

(2) 충전 및 훈연

충진은 진공 충전기를 이용하여 발효 육 제품내에 기포가 형성되지 않도록하여 Fibrous casing에 충전하고 공기가 섞여 들어가지 않도록 특히 주의한다. 훈연은 참나무 칩을 사용하여 냉훈법(30℃ 이하)으로 30분간 훈연을 실시하였다.

(그림 1) 원료커팅, 첨가물투입 및 충전모습



(3) 발효 숙성

숙성 및 건조는 0~2일째 습도 95%, 온도 25℃, 3~6일째는 습도 95%, 온도 18℃, 6~21째는 습도 80%, 온도 15℃ 조건으로 숙성과정을 3단계로 나누어 설정하고 21일간의 숙성과정을 거쳐 발효소시지를 제조하였다. 숙성목적은 향미를 부여하고, 발색을 좋게하며, 미생물에 대한 안전성을 부여하는데 있다.

Table. 2 Formular of the Salami controled temperature and humidity.

발효일	습도(%)	온도(℃)
0 ~ 2일	95	25
3 ~ 6일	90	18
6 ~ 21일	80	15

다. 주관적 및 객관적 품질특성과 기호성 규명

제조된 소시지를 훈련받은 소비자를 대상으로 기호성 및 선호도를 조사한다. 항목은 향, 조직감, 다즙성, 색, 종합적 품질, 선호도 등으로 발효 육제품의 특성을 구명한다. 객관적 품질특성 구명은 저장성(지방산 변화 등), 조직감 등에 미치는 효과를 규명한다.

라. 발효육제품의 이화학적 검사

발효소시지의 숙성중 가장 중요한 변화는 산생성에 의한 pH저하, 건조에 의한 수분활성도 저하, 결합력의 생성 그리고 발색 및 풍미생성 등이다. 그리고 발효소시지의 저장안정성은 수분활성도, pH, 아질산염 및 질산염, 저장온도, starter culture의 첨가에 의한 미생물 등 복합적인 상호작용에 의하여 저장기간이 결정된다. 모든 소시지는 동일한 batch로 생산한 것을 이용하였으며, 개별포장 된 제품을 무작위로 선발하여 저장기간별 품질평가 및 기능평가에 이용될 시료로 설정 후 평가항목별 저장기간별 제품을 설계된 기간동안 저장 후 분석에 이용하였다. 저장기간이 끝난 제품은 -80C에 보관하여 모든 시료의 저장기간이 끝난 후 검사 항목에 따라 분석 순서 및 반복배치 설계에 따라 3반복 분석하였다. Table 3는 기능성 발효 소시지의 저장기간 중 품질평가를 위한 실험설계와 조사항목을 나타낸다.

Table 3. Experiment design for the effect of the sausage quality.

	Product								
	Control			Experiment 1			Experiment 2		
	storage(day)			storage(day)			storage(day)		
	0	10	20	0	10	20	0	10	20
분석설계									
pH	v	v	v	v	v	v	v	v	v
objective color	v	v	v	v	v	v	v	v	v
texture(Compression)	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Aw(water activity)	v	v	v	v	v	v	v	v	v

(1) pH 측정

고체용 pH meter(704 pH Meter ,Metrohm)로 발효육제품의 각각 다른 부위를 5회 반복 측정하였다.

(2) 수분활성도(Aw, water activity) 측정

Aw측정기(HUMIDITYIC, Novasima, swiss)로 25℃에서 수분 분압에 의한 함량이 도달될시 상대습도 값을 3회 측정하여 그 평균치를 표시하였다.

(3) 색도 검사

발효육제품 색도는 Colorimeter(SP80, Denshoku Co. Japan)를 이용하여 발효육 제품의 단면을 3회 측정하여 그 평균치를 L(밝기, lightness), a(적색도, redness), b(황색도, yellowness) 값으로 나타냈다.

(4) 물성 검사

발효 육 제품의 물성검사는 Rheo Meter(CR-100DX, Sun scientific Co. Japan)을 이용하여 전단력(Cutting Strength)과 경도(Hardness)를 3회 측정하여 그 평균치를 표시 하였다. 물성 검사를 위한 조건은 Table 4와 같다.

Table 4. Experiment design for the effect of the sausage quality.

구분	전단력 측정 조건	경도측정 조건
시료크기	20mm(장)×20mm(폭)×10mm(고)	직경 40mm×10mm(고)
Adaptor	40mm지름의 칼날이용 (알루미늄 재질)	20mm 지름의 원형판 이용 (알루미늄 재질)
Table speed	60cm/m	60cm/m
Load Cell	10kg	10kg

마. 미생물 검사

시료 10g을 90ml의 멸균식염수와 혼합하여 균질시킨 다음 10배 희석법으로 희석하여 사용 하였다. 대장균군은 DCLA배지, 대장균은 3M-Film, 유산균 MRS agar를 이용하였으며, 시료의 접종 후 37℃에서 48시간동안 배양시켜 측정하였다.

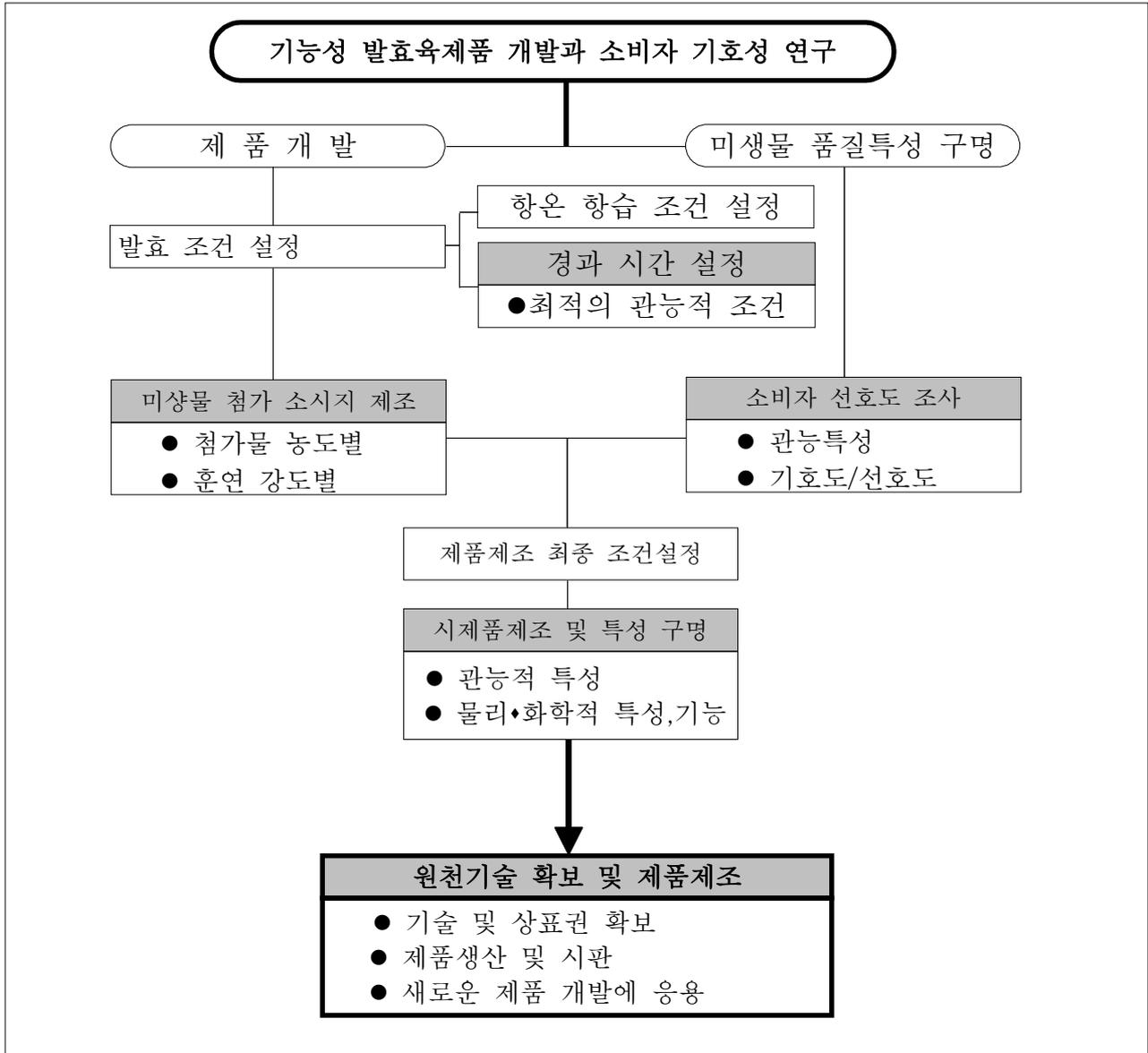
병원성균(Salmonella, Listeria mono)은 표준평판법과 항원항체의 반응의 결과를 보는 Mini-Vidas를 사용하여 정량, 정성검사를 실시하였고 결과는 log cfu/g으로 표시하였다. 살라미제품의 starter culture로 사용된 균주는 *L. sakei* NR28로 발효소시지의 starter로 성장하기 위해서는 접종 Cells를 10⁶CFU/g하여 시제품제조에 적용 하였다.

바. 시제품 생산 및 상품화 방법

국내 육가공품 소비량은 2.8kg으로 전체 육류 소비량의 8%이며 새로운 육가공 시장 가치창출이 가능한 부분은 생햄과 살라미 시장으로 현재는 대부분이 수입에 의존하고 있으며 '09년도 국내 발효육제품 수입량은 살라미가 약 6.3톤이 수입되었다(농축산신문 참조). 국내 육가공업체는 향후 국내 생햄과 살라미 시장이 와인문화의 확대 등으로 현재보다 약 10배 이상 정도 확대될 새로운 시장을 대비하기 위해 발효소시지의 상품화 준비가 필요하다. 상품화는 제품 설계시 소비자의 선호도, 기호성, 유통시장 흐름과약 등 신제품 출시를 위한 폭넓은 검토 후 제품 컨셉을 정하고 이를 반영한 개발 후, 전문관능 패널의 관능평가에서 3.0 이상 점수를 얻도록 맛을 보완한다. 배합비, 생산공정, 포장규격을 확정하여 제조기술서를 완성하고 디자인 및 포장지를 포함한 제품소개서를 만들어 상품출시를 준비한다. 월간 약 10톤 제품생산을 위한 제

조시설을 검토하여 투자비를 산출한 후 감가상각비 및 운영자금을 검토한 후 시장상황을 고려하여 최종 출시 시점을 확정된 후, 시설투자를 실시하고 생산시설이 완료되면 시험생산을 하고 제품이 안정화 되면 발효소시지를 출시한다.

Table 5. Scheme of experimental development



4. 연구 결과 및 고찰

가. 기능성 발효소시지의 저장기간 중 이화학적 변화

(1) PH변화

본 실험에서는 21일간 향은 향습을 유지하고 저장하면서 물성특성 및 소비자 관능특성을 평가하였다. 제품들의 특성에 따라 소시지 내 유산균 수와 저장기간간의 유의적($p < 0.05$) 상호작용이 존재하는 특성들을 보였다. 돼지고기 신선육의 pH는 약 5.4~5.5를 나타내나(Hwang et al., 2004), 육가공 제품의 pH는 제품의 조성에 의해 절대적으로 영향을 받는다. 본 연구에서 적용한 소시지 조성은 초기에 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서 pH5.85를 보여 유산균을 첨가한 실험구에 비해 유의적($p < 0.05$)으로 높은 값을 나타내었다. 발효소시지 숙성초기 pH는 약 5.78~5.85 수준이었으나 7일차에서 급격하게 pH4.8수준까지 감소 하였으며, 14일 이후 증가하여 약 pH 5.0~5.3수준으로 회복되는 것으로 나타났다. 그리고 21일 경과한 발효소시지에서는 모든 제품에서 pH가 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 저장기간 중 pH 감소는 미생물의 성장에 따른 젖산 생성의 결과라는 보고(Langlois와 Kemp, 1974)와 일치한 결과로 해석되었고, 한편 제품의 pH가 소시지의 품질에 큰 영향을 미친다는 사실을 고려할 때 pH 변화가 상대적으로 적은 유산균 함유 소시지가 품질 면에서 더 안정적이라는 것을 간접적으로 시사한다.

(2) 색도변화

생육의 색은 oxymyoglobin과 metmyoglobin상대적 비율과 상태에 따라 달라진다(Seideman et al., 1984). 식육을 공기 중에 산화(blooming) 시켰을 때 미토콘드리아의 산화 기전에 붉은 색을 띄게 되는데, 가열육의 경우 myoglobin, oxymyoglobin과 methmyoglobin 색소는 갈색을 나타내는 globin ferrihemochrome을 생성하고 이것은 온도와 pH에 따라 달라진다(Gasperlin et al., 2000). 일반적으로 가공 육제품은 첨가물의 종류와 가열에 의해 발생된 색소 등에 의해 결정된다(Osbun과 Keeton, 1994). 제품 표면 육색(Hunter 값)의 경우 황색도(Hunter b*)는 대조구와 유산균 첨가구가 저장기간 동안 유의적($p < 0.05$) 상호작용을 보이지 않았는데, 유산균 첨가가 저장기간에 있어 영향을 미치지 않음을 보여준다.

한편 백색도(Hunter L*)는 실험구에서 초기에 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나왔는데, 이것은 유산균이 초기에 영향을 미친다는 결과로 해석되었다. 저장기간의 백색도는 시간이 경과됨에 점차적으로 감소($p < 0.05$)하였다. 이 결과는 명도는 일반적으로 저장기간 동안 감소한다는 기존의 보고(이제룡 등, 2002; Park 등, 1997; Kim 등, 2000)와 같은 결과를 보였다. 적색도(Hunter a*)의 경우는 대조구에서 초기에 유의적($p < 0.05$)으로 높은 값을 보였으나 저장 기간이 경과 됨에 따라 유산균 함유한 실험구에서 높은 수치를 보였다.

(3) Cutting strength와 Hardness

제품의 색은 소비자들이 시장에서 제품 선택 시 가장 먼저 접하는 품질 특성으로 가장 중요한 위치를 차지하고 있다. 하지만 섭취 시 그 상품에 대한 기대치를 잘 설명해 주는 것은 관능특성이다. 가열 육제품의 조직감은 제품의 구성조성에 의해서 큰 영향을 받으나 조성분의 영향은 추가적으로 열처리 방법 및 정도와 상호작용을 하여 최종적인 조직감에 영향을 미친다(송 등, 2000). 본 연구의 경우 숙성기간별 발효소시지를 10 mm으로 절단하여 두 차례

compression 하였을 때 조직의 cutting strength와 hardness 측정결과는 저장기간 사이에는 유의적($p < 0.05$) 상관관계가 성립하였다. 저장 시작일(1일)에는 유산균을 함유한 실험구가 유의적으로($p < 0.05$) 높은 cutting strength 값을 보였다. 전체적으로 이는 유산균 함유 발효 소시지에서 저장기간 동안 조직감이 증가한다는 것으로 해석될 수 있다. Hardness 평가에서도 유산균 첨가와 저장기간 동안 상호작용을 보였는데, 실험구에서 저장기간 동안 특히 유의적($p < 0.05$) 증가를 보였으며 저장 21일에 대조구에 비해서 유의적($p < 0.05$)으로 높은 hardness를 보였다. Hardness 검사가 compression에서 첫 번째 가압시 얻어지는 조직의 저항도를 일부 반영한다는 사실을 감안하고 위에서 언급된 비슷한 경향의 cutting strength 검사결과를 종합할 때, 본 객관적 물성검사 결과는 유산균 함유 소시지가 저장기간 동안 조직감을 향상시킨다는 사실을 시사하고 있다.

(4) Aw

수분 활성도(Aw)는 발효 소시지에서 중요한 관리항목으로 수분활성도가 낮아질수록 미생물의 증식을 억제하고 저장기간 동안 조직을 강하게 한다. 실험결과 수분 활성도에 있어서 대조구와 실험구 모든 유의차가 없이 비슷하게 저장기간이 경과할수록 낮아졌으며, Aw는 초기에 0.992~0.993이었으나 숙성 마지막날인 21일차에는 0.881~0.885로 낮은 수분활성도를 나타내어 미생물의 증식이 억제될 수 있는 조건으로 안정화 되었다.

Table 6. Least square means, significance level for the effect of interaction between the lactic acid bacteria content and storage time on pH, objective color, texture and sensory characteristics of pork salami

	Product (%)														
	Control					Experiment 1					Experiment 2				
	Storage days														
	1	2	7	14	21	1	2	7	14	21	1	2	7	14	21
pH	5.85	5.98	4.90	4.94	5.25	5.80	5.86	4.80	5.0	5.35	5.78	5.86	4.78	4.94	5.32
Hunter b*	11.4	10.2	9.4	8.2	7.8	11.0	10.1	9.5	8.6	7.9	10.8	9.9	9.1	8.4	7.9
Cutting Strength (g/cm ²)	-	120.1	200.3	480.5	650.4	-	220.2	310.5	614.2	760.5	-	170.2	240.5	550.3	700.2
Hardness (g/cm ²)	-	180.5	480.5	1250.4	1720.4	-	470.3	800.4	1700.4	2450.1	-	275.2	760.4	1340.1	2100.4
Aw	0.992	0.984	0.898	0.890	0.885	0.993	0.983	0.897	0.883	0.881	0.992	0.982	0.896	0.886	0.883
Hunter L*	52.4	51	49	43.3	37.4	53.4	52.1	48.1	42.8	35.8	53.1	52.2	48.5	42.3	35.4
Huner a*	4.91	7.5	8.3	8.8	9.1	4.5	7.7	8.6	9.0	9.3	4.2	7.8	8.5	8.9	9.2

나. 저장기간 중 미생물의 변화

Table 7은 저장기간이 경과함에 따라 총 균수와 젖산균수의 변화를 나타낸 것이다. 저장기간 동안 발효소시지 유산균수 변화를 보면 1일째 10^4 CFU/g으로 나타났으나 미생물 수는 2~3일 경과 후에 급격한 증가를 보였고, 숙성 7일째는 10^7 CFU/g, 14일 이후에는 10^8 CFU/g로 나타났으며 21일째 이후로는 더 이상의 증가를 보이지 않았다. 본 실험에서는 대장균, 대장균군, *Listeria mono*, *salmonella*와 같은 유해균은 검출되지 않았다. 그 요인으로는 위생적인 도축과 부분육가공공정을 거친 농협목우촌 원료를 사용하여 병원성균이 초기부터 음성으로 나타난 것으로 판단한다.

Table 7. The label of lactic acid bacteria.

구분	Group	Day(CFU/g)				
		1일차	2일차	7일차	14일차	21일차
유산균	대조구	3.5×10^4	2.8×10^6	2.2×10^7	3.8×10^8	5.2×10^8
	김치 살라미	3.7×10^4	4.5×10^6	1.5×10^7	3.8×10^8	6.0×10^8
	된장 살라미	4.5×10^4	4.6×10^6	3.0×10^7	5.2×10^8	8.2×10^8
대장균군	대조구	음성	음성	음성	음성	음성
	김치 살라미	음성	음성	음성	음성	음성
	된장 살라미	음성	음성	음성	음성	음성
대장균	대조구	음성	음성	음성	음성	음성
	김치 살라미	음성	음성	음성	음성	음성
	된장 살라미	음성	음성	음성	음성	음성
<i>Listeria mono</i>	대조구	음성	음성	음성	음성	음성
	김치 살라미	음성	음성	음성	음성	음성
	된장 살라미	음성	음성	음성	음성	음성
<i>salmonella</i>	대조구	음성	음성	음성	음성	음성
	김치 살라미	음성	음성	음성	음성	음성
	된장 살라미	음성	음성	음성	음성	음성

다. 관능평가 결과

(1) 첨가물 선호도 조사

관능평가는 농협목우촌의 관능평가요원 선발기준에 따라 선발한 전문요원을 활용하여 이루어졌으며 맛 감지 테스트 검사용액은 Table 8에 나타난바와 같이 각각의 농도를 조제하여 사용하였다. 패널요원은 17명이며 관능평가 항목은 향미, 맛, 기호성, 선호도로 평가하였다. 평가 첨가물은 김치, 청국장, 된장, 페파로니, 베이리브, 산초, 마늘분말, 클러브, 카라웨이, 셀러리 등 10종(Table 9)으로 5점 척도법에 의하여 관능평가를 3반복 실시한 결과, Table 9.에서 보는바와 같이 첨가물 선호도 평가에서 김치 분말과 된장 분말이 가장 선호도가 높게 평가되었다.

Table 8. 김치항목에 따른 김치 및 농도

김치항목	김치물	농도		
단 맛	설탕	0.2%	0.4%	0.8%
짠 맛	소금	0.25%	0.5%	1.0%
신 맛	구연산	0.035%	0.07%	0.14%
쓴 맛	카페인	0.035%	0.07%	0.14%

Table. 9. 첨가물 선호도 평가

구분	향미	맛	기호성	선호도	평균
김치분말	2.8	3.0	2.7	2.6	2.77
청국장 분말	2.2	2.7	2.5	2.2	2.4
된장분말	2.8	2.9	2.8	2.7	2.8
페파로니 분말	2.0	1.8	1.9	1.4	1.77
베이리브	1.6	1.5	1.2	1.5	1.45
산초분말	1.5	1.7	1.3	1.2	1.42
마늘분말	2.5	2.6	2.7	2.9	2.67
크러브	1.3	1.2	1.1	1.0	1.15
카라웨이	1.4	1.1	1.0	1.5	1.25
셀러리분말	1.1	1.0	1.0	1.0	1.02

(2) 발효소시지 제품별 관능평가 결과

발효소시지 관능평가는 겉모양, 색상, 냄새, 맛, 조직감 등 5항목을 5점 척도법에 의하여 4회 반복 평가하는 방법으로 실시하였으며, 첨가물 선호도가 높은 첨가물을 첨가하여 개발한 제품(된장첨가, 김치첨가)과 시중 수입하여 판매하는 제품(살지천, 초리쵸, 살라미 아마후도(스페인), 초리쵸 피칸테(스페인), 페파로니 살라미, 아콘 이베리안 살지쵸, 데니쉬 살라미, 스페니쉬 살라미, 이탈리아 살라미)을 비교하여 관능평가를 실시 하였으며 그 결과는 Table 10, 11, 12, 13.와 같이 연구 개발된 김치살라미와 된장살라미가 시중에서 판매되는 수입제품보다 겉모양, 색상, 풍미, 맛, 조직감에 있어 더 우수한 관능평가점수를 보였다. 특히 조직감에 있어서 연구개발된 제품(된장첨가, 김치첨가)이 더 우수한 평가를 보인 것은 김치와 된장첨가에 의한 발효숙성이 단기숙성 살라미의 조건에 적합하다고 평가된다. 아울러 된장살라미 제품의 관능평가 점수가 평균 3.0으로 나타나 출시를 위한 검토를 진행할 수 있는 수준으로 평가되며, 맛과 냄새를 보완 한다면 국내.외에 충분한 상품성이 있다고 사료된다.

Table. 10. 1차 관능평가(2011. 7.14)

제품명	겉모양	색상	냄새	맛	조직감	평균
살지천	3.0	3.2	1.7	1.4	2.0	2.26
쵸리쵸	3.2	2.3	3.1	2.7	2.6	2.78
김치 살라미	3.0	3.1	2.7	2.4	3.0	2.84
된장 살라미	3.0	3.2	2.9	2.7	3.2	3.0

Table. 11. 2차 관능평가(2011. 9.21)

제품명	겉모양	색상	냄새	맛	조직감	평균
살라미 아마후도(스페인)	2.9	2.6	2.3	2.3	2.8	2.58
쵸리쵸 피칸테(스페인)	3.0	2.4	2.5	2.7	2.8	2.68
김치 살라미	3.0	2.8	2.6	2.7	3.0	2.82
된장 살라미	3.2	3.0	2.8	2.9	3.2	3.02

Table. 12. 3차 관능평가(2011. 11.16)

제품명	겉모양	색상	냄새	맛	조직감	평균
페파로니 살라미	2.8	2.6	2.8	2.9	2.8	2.78
아콘 이베리안 살지촌	3.0	2.4	2.6	2.7	2.8	2.7
데니쉬 살라미	2.9	2.6	1.9	2.2	2.6	2.44
김치 살라미	2.9	2.9	2.5	2.8	3.0	2.82
된장 살라미	3.0	3.0	2.8	3.0	3.0	2.96

Table. 13. 4차 관능평가(2011. 12.21)

제품명	겉모양	색상	냄새	맛	조직감	평균
스페니쉬 살라미	2.6	2.7	2.2	2.5	2.1	2.42
이탈리안 살라미	2.1	2.4	1.8	1.9	2.0	2.04
데니쉬 살라미	2.5	2.2	1.9	2.4	2.5	2.3
김치 살라미	2.8	2.9	2.7	2.8	2.9	2.82
된장 살라미	3.0	2.8	2.8	2.9	2.9	2.88

라. 시제품 생산 및 상품화

(1) 상품화 개요

발효소시지 상품화를 위해 배합비(Table 1), 제품설명서(Table 20, 21) 포장규격(Table 22, 23)을 확정하였고 관능평가를 실시하여 관능평가 결과가 3,0으로 나타났으나 법적규격설정이 아직 미흡하고 경쟁사 동향(Table 17, 18), 시장여건, 설비투자(Table 15, 16, 19) 등을 종합검토 결과 시장여건이 성숙되지 않았다고 평가 되었다.

(Table 14) 국내 생햄 및 살라미 시장 현황 및 전망

구 분		생햄		살라미		
		총량	금액	총량	금액	
2009년	총 수입량	12.6ton	5억원	6.3ton	3억원	
	평균 구매량	호텔	260kg	980만원	170kg	550만원
		레스토랑	80kg	340만원	70kg	180만원
향후	시장규모	50억원까지 증가 전망		약 100억원까지 전망		

주) 2009년 6월 발효육제품 개발 동향과 산업화 전략(농촌진흥청 국립축산과학원, 한국육가공협회 주관)

Table 14의 국내 생햄 및 살라미 시장 현황 및 전망을 보면 2009년 살라미 수입총량은 6.3톤으로 생햄포함 약 8억원(약 20톤) 수준으로 산업화 하기에는 아직 시장규모가 적고 투자대비 효율이 낮은 것으로 분석된다. 향후 100억 수준의 시장규모가 형성되는 시점에 투자 등 검토가 이루어져야 한다고 사료 된다.

(2) 발효소시지 생산설비 검토

발효소시지는 일반육가공 제품과 동일 시설에서 생산 할 경우 미생물에 의한 교차오염이 예상되어 신규설비투자를 검토한 결과 살라미를 월 10톤을 생산하기 위해 Table 15, 16, 그림 2와 같이 약 24억원(건축 약 12억원, 생산설비 12억원)이 소요되는 것으로 나타나 연간 감가상각비 2.4억원이 발생하고 이자비용 1.2억원(5%이자율 기준) 적용시 제품 kg당 약 3,000원(살라미제품 제조원가 약 20,000원/kg 기준시 약 15% 수준)의 원가부담이 있는 것으로 분석 되었다.

Table 15. 건축(10ton/월, 870만원/평당, 전기, 냉동, 유틸리티 포함)

구 분	소요면적(m ²)	경비(백만원)	비고
첨가물 창고	10	87	가설계 도면 붙임참조
원료육 저장창고	30	261	
준비가공실	20	174	
훈연실	20	174	
숙성실(무균)	15	130	
포장실	10	87	
휴게실(남,여)	30	261	
소 계	135	1,174	

Table 16. 생산설비(10ton/월)

설비명	수량	소요금액(백만원)	비고
싸이런 카터	1	300	준비가공실
충진기	1	350	준비가공실
냉훈연기	4	450	훈연실
세척장치	1	10	준비가공실
트로리	20	48	기타
웨곤	20	16	기타
전자저울	5	5	계량실
소 계	52	1,179	

(3) 발효소시지 시장가격 및 업계 출시준비

발효소시지 수입가 및 백화점 판매가를 조사 한 결과(Table. 17) 살라미의 경우 약 47,000원/kg이며 이를 백화점, 할인점에서 판매가는 약 100,000원/kg 수준으로 나타났다. 국내업체에서 생산하여 판매할 경우 제조원가는 약 20,000원/kg 수준이 될 것으로 전망하며, 백화점 이외의 이태원 등에서 유통되는 다양한 형태의 살라미는 수입업체에서 슬라이스 등으로 소분판매 하는 경우가 많은 것으로 조사되어 향후 국내 살라미 제품이 본격 유통되는 형태도 이와같이 소분하여 판매하는 경우가 많을 것으로 사료된다. 동종업계의 살라미에 대한 개발, 기술보유, 출시준비 등 정보를 종합하여 보면 Table 18.과 같이 요약할 수 있다.

Table 17. 국내 생햄 및 살라미 가격

구 분		단기숙성 생햄	장기숙성 생햄	장기숙성 살라미
수입업체	평균 수입가	28,300원/kg	99,000원/kg	47,000원/kg
백화점, 할인점	평균 판매가	35,000원/kg	180,000원/kg	100,000원/kg
국내 업체 예상	평균 예상판매가	30,000원/kg		20,000원/kg

주) 2009년 6월 발효육제품 개발 동향과 산업화 전략(농촌진흥청 국립축산과학원, 한국육가공협회 주관)

국내 육가공업체 발효육제품 기술보유 및 상품출시 현황을 검토한 결과 대부분의 육가공업체는 발효소시지 출시를 위한 생산설비설치에 대한 부담과 시장여건이 성숙되지 않은 시장진입에 대한 부담으로 일부 직 거래처 등에 소량 테스트마케팅을 하거나 출시를 보류하는 등 본격적인 판매가 이루어지지 않고 있는 실정이다..

발효소시지 시제품에 대한 위 상품화 검토를 종합하여 보면 발효육제품에 대한 정부고시가 될 때까지 상품화 준비를 충실히 마무리 하고 시설투자에 대한 제조원가상승을 고려하여 시장여건이 약 100억원대로 성숙되면 고정투자와 적극적인 마케팅을 추진하여야 할 것으로 판단되며, 기능성발효소시지가 육가공품의 한 축이 되어 국민건강에 이바지하고 육가공업체에 부가가치

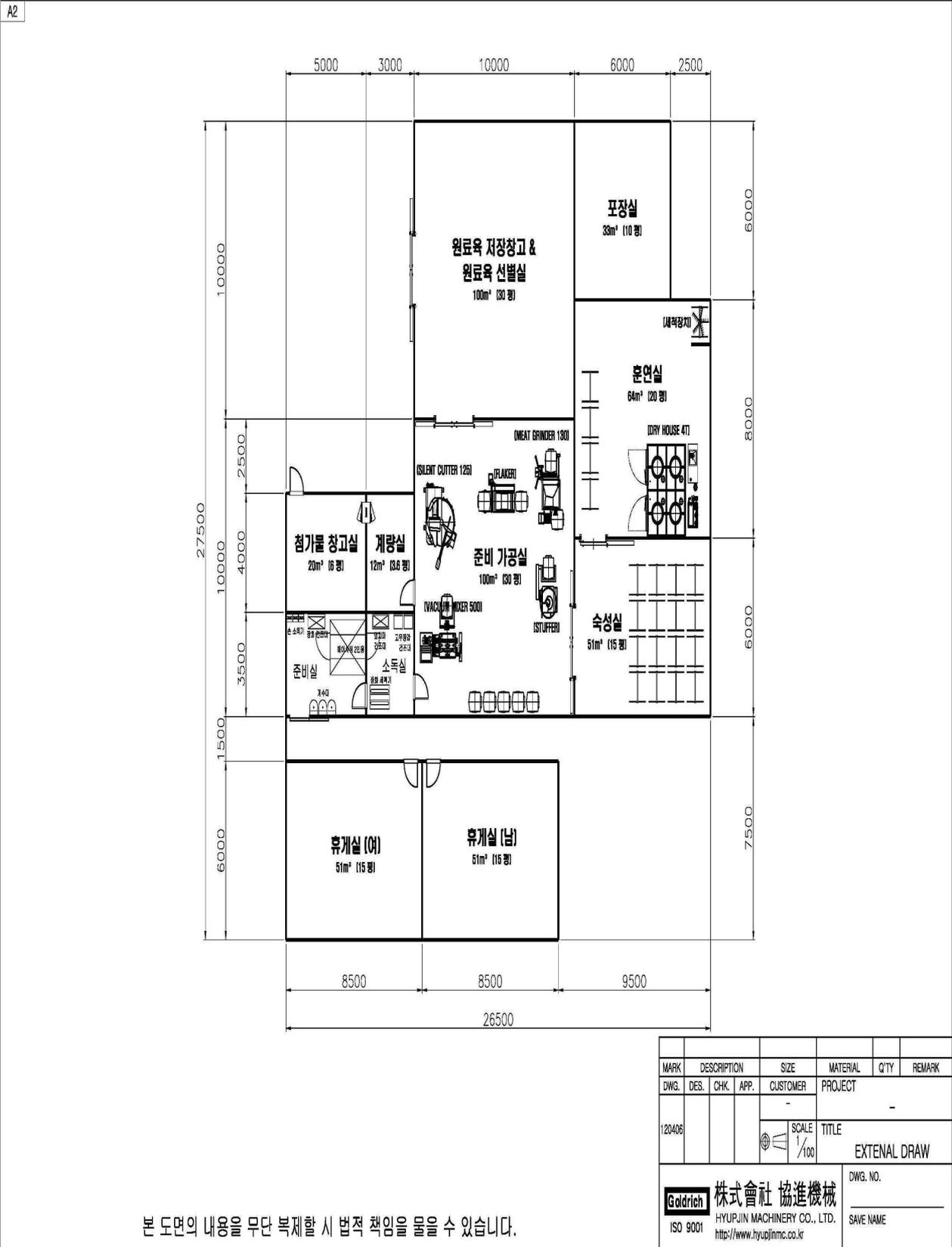
창출은 물론 나아가 국내축산업의 성장동력으로 발전하는데 기여하길 기대한다.

Table 18. 국내 육가공업체 발효육제품 기술정보 및 출시현황

육가공 업체	주요 내용	비고
CJ 제일제당	○ 생햄과 살라미 일부 연구진행 ○ 단기숙성 생햄 수입(미국, 2009년)하여 판매	코스트코
롯데햄	○ 일본식 단기숙성 생햄 개발완료 (2001년 일본 프리마햄 기술지도) - 시장 도입시기가 빠르다고 판단하여 생산판매 보류	2주내 숙성
대상 F&F	○ 독일식 단기건조숙성 생햄 및 유산균 발효살라미 개발 (2001년 네델란드 기술자를 초청) ○ 2003년 PILOT실에서 소량 생산하여 판매 - 생햄 50kg/월, 살라미 200kg/월 생산하였으나 현재중단	
에스푸드	○ 독일식 훈연 단기건조숙성 생햄 소량 생산판매 중 - 코파(Coppa) : 판매량 10kg/월 내외 - 프로슈트(Prosciutto) : '08.10월, 50kg/월, 피자 전문점	
오델	○ 2008년 소량 생산시설 설비 ○ 유산균 발효살라미 연구개발 및 기술개발 중	
돈덴팜	○ 생햄 및 살라미 제품 생산기술 및 제품개발 완료 : 2006 - 시장여건 성숙시까지 생산은 보류 중	

주) 2009년 6월 발효 육 제품 개발 동향과 산업화 전략(농촌진흥청 국립축산과학원, 한국육가공협회 주관)

(그림 2) 발효소시지 생산공장 가설계 도면



(4) 상품화 설계

(가) 배합비 확정 및 제품소개서 작성

상품화를 위해 제품관능평가를 통하여 살라미 배합비(Table 1)를 확정 하였으며, 출시를 대비 Table 20, 21과 같이 개발된 김치살라미, 된장살라미 시제품의 상품화를 위해 제품유형, 단량, 소비자가, 박스당 수량, 유통기한, 보관방법, 포장재질, 제품특징, 마케팅포인트, 주의사항, 용도 등 제품소개서를 작성하였다.

Table 20. 제품소개서(가칭 : 전통발효김치살라미)

제 품 사 진		제 품 명	전통발효김치살라미
		축산물가공품의 유형	소시지
		단 량	100 g
		소비자가	42,000원/kg
		박스수량	20 本
		박스중량	2.0 kg
		바 코 드	8803712112785 (18803712112785)
유통기한	제조일로부터 6개월	포장방법	인쇄 진공포장
보관방법	냉장보관	포장재질	(내면) 폴리에틸렌
제품특징	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100% 국산 원료육 ○ 가정에서 살라미를 1mm 두께로 썰어서 크래커 위에 치즈를 올려서 와인과 함께 먹으면 맛은 배가됩니다 	원료 및 함량	돼지고기 96.0%, 정제소금, 백설탕, 흑후추분말, 김치분말, 비타민C, 마늘분말, 유산균, 아질산나트륨(발색제, 합성보존료)
셀링포인트	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3원칙(국내산 순돈육, 무방부제 무전분 사용) ○ 100% 국산 순 돈육 원료육 사용한 전통 살라미 소시지 ○ 목우촌이 만들어 안심하고 믿을 수 있는 먹거리 ○ 기능성유산균(콜레스테롤 저하시키는 특허유산균 <i>L. sakei</i> NR28 사용) 	알레르기 유발원재료	돼지고기
주의사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개봉한 제품은 변질 우려가 있으니 반드시 냉장보관(0-10℃) 하시고 바로 드십시오 	용도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 술안주 ○ 간식용 ○ 식사용(서양식 등)
기타			

Table 21. 제품소개서(가칭 : 전통발효된장살라미)

제 품 사 진		제 품 명	전통발효된장살라미
		축산물가공품의 유형	소시지
		단 량	100 g
		소비자가	40,000원/kg
		박스수량	20 本
		박스중량	2.0 kg
		바 코드	8803712112789 (18803712112786)
유통기한	제조일로부터 6개월	포장방법	인쇄 진공포장
보관방법	냉장보관	포장재질	(내면) 폴리에틸렌
제품특징	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100% 국산 원료육 ○ 가정에서 살라미를 1mm 두께로 썰어서 크래커 위에 치즈를 올려서 와인과 함께 시식하면 맛을 배가시켜 줍니다 	원료 및 함량	돼지고기 95.86%, 정제소금, 백설탕, 흑후추분말, 된장분말, 비타민C, 마늘분말, 유산균, 아질산나트륨(발색제, 합성보존료)
셀링포인트	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3원칙(국내산 순돈육, 무방부제 무전분 사용) ○ 100% 국산 순 돈육 원료육 사용한 전통 살라미 소시지 ○ 목우촌이 만들어 안심하고 믿을 수 있는 먹거리 ○ 기능성유산균(콜레스테롤 저하시키는 특허유산균 <i>L. sakei</i> NR28 사용) 	알레르기 유발원재료	돼지고기
	주의사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개봉한 제품은 변질 우려가 있으니 반드시 냉장보관(0-10℃) 하시고 바로 드십시오 	용도
기타			

(나) 포장규격서 설정

상품화를 위해 살라미 포장규격서(Table 22, 23)는 다음과 같이 개발된 김치살라미, 된장살라미 제품에 대하여 작성하고 설정 하였다.

Table 22. 전통발효김치살라미 포장규격서

품종	제품명	단량	제조원	제품코드	BOX중량	BOX수량
육가공	전통발효 김치살라미	100g	육가공공장	12785	2.0kg	20개
코드번호	포장재명	재질	규격	인쇄	코팅	접착방식
신규	인쇄봉지	PE	170×190mm	6도		
신규	스티커	PE	80 x 90mm	3도		
신규	박스	B/B골	300 X 200 X 80mm			
63941	바코드라벨		104 x 100mm			
63942	바코드리본		110 x 300m			
63955	OPP PAPE	OPP투명	0.04 X 50 X 1000			
계						

Table 23. 전통발효된장살라미 포장규격서

품종	제품명	단량	제조원	제품코드	BOX중량	BOX수량
육가공	전통발효 된장살라미	100g	육가공공장	12786	2.0kg	20개
코드번호	포장재명	재질	규격	인쇄	코팅	접착방식
신규	인쇄봉지	PE	170×190mm	6도		
신규	스티커	PE	80 x 90mm	3도		
신규	박스	B/B골	300 X 200 X 80mm			
63941	바코드라벨		104 x 100mm			
63942	바코드리본		110 x 300m			
63955	OPP PAPE	OPP투명	0.04 X 50 X 1000			
계						

(5) 영양성분 분석

발효소시지 표기사항을 위해 전통발효된장살라미, 전통발효김치살라미 영양성분을 분석의뢰(전라북도 생물산업진흥원, 접수번호12-174) 한 결과 Table 24, 25와 같이 나타났다. 기능성 측면에서 차별화를 위해 염도를 낮춘 결과 유럽제품보다 약 10% 낮게 분석되었다.

Table 24. 전통발효된장살라미 영양성분 분석표

제품명	분석항목	분석결과		비고	
전통 발효 된장 살라미	열량	408.68	Kal	100g 당 열량	
	탄수화물	10.74	g/100g		
	당류	불검출			
	단백질	29.69	g/100g	±	1.59
	지방	27.44	g/100g	±	0.01
	포화지방	10.8	g/100g		
	트랜스지방	불검출			
	콜레스테롤	183.26	mg/100g		
	나트륨	1,360.01	mg/100g	±	11.74

주) 분석처 : 전라북도 생물산업진흥원(2012. 3.19. 접수번호12-174)

Table 25. 전통발효김치살라미 영양성분 분석표

제품명	분석항목	분석결과		비고	
전통 발효 김치 살라미	열량	419.85	Kal	100g 당 열량	
	탄수화물	6.10	g/100g		
	당류	불검출			
	단백질	29.00	g/100g	±	0.00
	지방	31.05	g/100g	±	0.00
	포화지방	12.2	g/100g		
	트랜스지방	불검출			
	콜레스테롤	223.21	mg/100g		
	나트륨	1,406.94	mg/100g	±	7.18

주) 분석처 : 전라북도 생물산업진흥원(2012. 3.19. 접수번호12-175)

5. 결론

기능성 발효육제품의 제조공정을 확립하고 상품화하기 위하여 *L. sakei* NR28을 starter culture(Cells를 10⁶CFU/g)로 사용하여 살라미제품을 제조하여 연구를 수행 하였다. 이 균주는 협동연구과제에서 제공된 균주로서 발효소시지의 starter로서 적합한 균종인 동시에 뛰어난 장 부착능력과 콜레스테롤 저하 및 항비만 효과, 항균효과를 가진 고기능성 Probiotics로 검증되었으며, 이를 통해 제조된 발효소시지도 그 기능성을 부여 할 수 있을 것으로 평가된다.

발효육제품 제조시 단기숙성효과와 안전성 확보를 위하여 기능성미생물(*L. sakei* NR28)을 첨

가 결과 적색도(Hunter a*)의 경우는 대조구에서 초기에 유의적($p < 0.05$)으로 높은 값을 보였으나 저장 기간이 경과됨에 따라 유산균을 함유한 실험구에서 높은 수치를 보였다. 이는 유산균을 첨가가 적색도 수치를 향상시킨다는 것을 보여 준다. 백색도(Hunter L*)는 실험구에서 초기에 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나왔는데, 이것은 유산균이 초기에 영향을 미친다는 결과로 해석되었다. 저장기간 중 백색도는 시간이 경과됨에 점차적으로 감소($p < 0.05$)함을 볼 수 있다. 황색도(Hunter b*)는 유산균 첨가와 저장기간 동안 유의적($p < 0.05$) 상호작용을 보이지 않았는데, 유산균 첨가가 저장기간에 있어 거의 영향을 미치지 않음을 보여준다.

수분활성도(A_w)는 초기에 0.992~0.993이었으나 숙성 마지막날인 21일차에는 0.881~0.885로 낮은 수분활성도를 나타내어 안정화 되었으며, pH값은 숙성초기 5.78~5.85 수준이었으나 7일차에 급격히 하락 되었다가 시간이 경과됨에 따라 pH값이 점진적으로 상승하는 것으로 나타나 7일째 유산균수의 증가로 인한 pH상승으로 판단된다.

숙성에 따른 물성변화를 보면 전단력(Cutting Strength)과 경도(Hardness)는 숙성이 진행됨에 따라 크게 증가하는 것으로 나타나 발효가 진행됨에 따른 산도 증가가 hardness의 향상에 영향을 주는 것으로 나타났다.

병원성미생물은 사용된 원료육과 숙성된 발효소시지 각각에서 병원성균인 대장균군, 대장균, 살모넬라균, *Listeria mono.*가 모든 실험군에서 음성으로 나타나 원료의 청결상태가 중요함을 시사하며, 숙성과정에서 유산균수는 1일차 10^4 CFU/g,수준이었으나 시간이 경과됨에 따라 증가하였으나 21일차에는 대조구나, 김치 살라미, 된장 살라미 모두 유의차가 없는 것으로 나타났다. 이는 대조구에서도 기존원료나 첨가물에 포함된 균의 증식으로 판단된다.

전문 관능평가요원을 상대로 한 제품별 관능평가를 4차에 걸쳐 실시한 결과 초리쪼, 이베리안, 살지춘, 페파로니살라미, 김치첨가살라미, 된장첨가살라미 중 김치첨가살라미와 된장첨가살라미가 높은 관능평가점수를 보였다. 이는 기능성 미생물(유산균)을 첨가한 발효숙성살라미가 시중의 수입제품보다 비슷하거나 상품적으로 부족함이 없다는 결과를 얻을 수 있었으며, 영양 성분 분석에서도 수입되는 살라미 제품보다 염도가 약 10% 낮게 분석되었다. 따라서 상품화 추진에 있어 충분한 가능성이 있다고 판단된다.

결론적으로 본 과제를 통하여 상품화를 위해 배합비, 포장규격, 제조공정, 제품설명서를 확정하였으므로 법적규격설정이 되고 시장동향에 맞추어 설비투자 등 출시를 진행한다면 기능성 발효살라미가 정제된 육가공 시장에 새로운 부가가치 창출의 활로를 개척할 것으로 의심치 않는다. 본 연구과제는 협동과제를 통하여 항클레스테롤, 항비만효과 및 항균효과가 있는 기능성 유산균을 찾아내고 이를 육제품에 투입 활용하여 한국전통 기능성발효육제품을 개발한 연구로서 국민 건강에 유익한 식품을 개발하고 확산될 수 있도록 하는데 좋은 자료가 될 것으로 평가된다.

제 3 절 오징어와 발효진피를 이용한 장기저장 소시지 제조

1. 서설

원래 진피라는 말은 제주자생 진귤(*Citrus sunki* Hort. Tanaka)의 껍질을 뜻한다. 진귤은 제주자생 재래귤로 우리가 흔히 접할 수 있는 온주밀감과는 다르나, 최근 귤류의 건조과피에 대한 관심이 높아지면서 흔히 온주밀감의 과피를 진피라고 부르게 되었다. 온주밀감은 현재 생리활성에 관한 연구들이 활발히 진행되어 항산화, 항염작용 등의 약리활성들이 보고되고 있다(Kang 등 2005). 혼란을 막기 위해 본 연구에서 사용되는 발효진피 시료는 온주밀감의 과피임을 미리 밝혀둔다. 한편, 감귤의 가공 처리는 많은 양의 과피 부산물을 발생시키는데, 이미 오래 전부터 한약재로 쓰이거나 사료 및 퇴비 등 유용한 천연물 시료로 활용되고 있다. 그러나 감귤과피는 일 년 중 수확기에 해당되는 짧은 기간에 집중적으로 발생하기 때문에 전량을 처리하지 못하고 해양투기 하는 실정에 있다(Im 등 2009). 따라서 더욱 다양한 활용방안이 모색되고 있는데, 과피의 항균효과도 그 중 하나다. 감귤과피의 추출물은 그람 양성 및 음성에 모두 항균력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Ahn 등 2007). 본 연구는 진피의 발효를 통한 항균활성의 증가로부터 발효육제품의 병원성 미생물을 억제하여 저장 안정성을 높이는 동시에, 오징어의 첨가에 따른 제품안정성을 확인하여 기능성 발효육제품의 생산원가 절감과 국내어업경제 활성화에 기여하고자 하였다.

2. 연구 내용

발효 육제품의 경쟁력 강화를 위한 연구로서 오징어 및 천연물 추출물인 발효진피 추출물 첨가에 의한 발효 육제품의 안정성 증진과 제조원가의 절감을 모색하였다. 진피의 발효와 그 추출물의 병원성 미생물의 생육억제 효과를 살펴보고 발효진피 추출물의 안전성을 조사한 뒤 협동과제로부터 확립된 제조공정에 따라 발효진피와 오징어를 이용한 장기저장 육제품을 제조하여 그 저장 기간 및 제품의 안정성을 확인하였다.

발효진피의 항균효과에 의한 GDL 등의 화학첨가제 대체 안전성 및 저장성 증대를 밝히고자 병원성 미생물에 대한 생육활성 저해 여부와 그 최소농도를 밝히는 동시에, 이들 발효진피가 유산균에 대해서는 방해작용을 하지 않는지에 대해 실험하였고, 가열을 하지 않는 발효육제품의 특성에 따라 내생포자균에 대한 억제효과 역시 살펴보았다. 또한 이미 한약재로는 오래전부터 사용되어오는 재료이나 미생물에 의한 발효과정, 농축추출과정, 항균활성 등을 감안할 때 발효진피 추출물의 안전성 조사가 요구됨에 따라 외부 음식이나 섭취물질이 직접 닿거나 흡수되는 기관인 대장조직의 cell line을 통해 세포독성 및 유전독성을 확인하고, 추가적으로 해독작용을 담당하는 간 조직의 cell line을 통해 세포독성 조사를 수행하였다. 오징어와 발효진피를 혼합한 살라미의 제조는 협동과제로부터 확립된 제조공정을 따랐으며, 오징어는 전체의 5%의 비율로 돈육을 대체하여 첨가되었고 발효진피는 0.5% 비율로 추가적으로 첨가되었다. 이러한 혼합으로부터 발효육제품의 저장 안정성이 상온에서 확보되는지 여부를 확인하였다.

3. 연구 방법

가. 진피 및 발효진피 추출물 준비

진피와 발효진피의 제조는 강 등(2005)의 방법을 따라 수행하였다. 50g의 시료를 500ml의 3차수에 넣어 3일간 침지시킨 후, 80℃에서 30분간 증탕하고 추출물을 8000g에서 30분간

원심분리한 다음 filtration하여 침전물과 미생물을 제거한다. 침전물을 제외한 filtration된 투명한 추출액을 60°C에서 감압농축한다. 진피의 발효는 50g의 건조시료를 powder 상태로 만들고, 500ml의 3차수와 5% sucrose를 넣어 autoclave 시킨다. *L. plantarum* (KACC3103)과 *S. cerevisiae* (A1-69)를 각각 1%씩 접종하고, 3% glucose를 첨가하여 37°C 혐기상태에서 7일간 배양 및 발효한다. 발효가 끝난 시료를 8000g에서 30분간 원심분리한 다음 0.2 μ m로 filtration하여 균과 부유물을 제거한다. filtration된 투명한 추출액을 60°C에서 감압농축한다.

나. 항균활성 검사

각 추출물의 병원성균에 대한 항균활성과 유산균에 대한 영향을 알아보기 위해 Paper disc agar diffusion법을 사용하였다. 농약에 의한 의도치 않은 영향이나 독성을 최대한 배제하기 위해 시중에서 판매되고 있는 건조 유기농 진피를 시료로 사용하였다(주)동우당제약 식품사업부, 유기농 귤피). 병원성 미생물은 그람음성과 그람양성을 포함해 모두 6종(*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*)을 선정하여 수행하였다. 유산균 균주는 *L. plantarum*(KACC3103), *L. johnsonii*(BFE6154), *L. rhamnosus*(BFE 5263)이 사용되었다. 배지와 agar는 Tryptic soy broth를 기본으로 하여 배양했으며, 유산균은 MRS 배지에서 실험을 수행하였다. 각 병원성 미생물을 broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 및 계대 배양을 통해 활성화 시킨 후, 평판 배지에 도말 접종하여 disc와 시료를 처리하고 24-48시간 배양하여 clear zone을 관찰하였다.

다. 포자생성균의 생육억제 조사

Bacillus subtilis 등의 미생물들은 열악한 환경에서 생존하기 위해 내생포자(endospore)를 형성한다. 이는 외부환경에 대해 매우 강한 저항력을 가져 일반적으로 120°C에서 20분 이상 가열하지 않으면 사멸되지 않는다. 더구나 식품에 오염되어 적절한 환경이 조성되면 독소를 형성하며 다시 재생되어 번식하므로 가열을 하지 않는 발효 육제품의 경우에 있어 심각한 위험요소가 될 수 있다. 병원성균에 대해 항균능력을 가지는 발효진피가 포자생성균에 대해서도 억제능을 가지는지 그 기능성에 대해 알아보기 위해 본 실험을 수행하였다. *B. subtilis*를 MnSO₄가 50ug/ml의 농도로 첨가된 Nutrient 한천배지에 접종하여 30°C에서 최소 7일간 배양하여 90% 이상의 포자형성을 유도한 후, 차가운 3차 증류수나 PBS buffer로 포자를 떼어 낸 후 4000g에서 20분 동안 원심분리 하여 포자를 모은다. 이 포자를 일정한 volume으로 발효진피가 농도별로 섞인 BHI broth에 접종하여 70°C에서 30분간 가열하여 활성화 시킨다. 37°C에서 24시간 배양하여 충분한 생육활동을 유도한 뒤, 8000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등배양액을 버리고 남은 pellet을 동일한 요령으로 2회 PBS washing을 수행한다. 깨끗이 씻긴 pellet에 PBS를 넣어 충분히 풀어준 후 600nm에서 흡광도를 측정한다.

라. 발효진피의 안전성 조사

①세포독성검사 (MTT assay)

Mosmann의 방법(1983)에 의하여, 장과 간에서의 독성을 확인하기 위해 각각 HT-29, HepG2 세포를 96-well에 5X10⁵ cells/ml 세포수로 넣고 24~48시간 안정화 배양 후, 발효진피추출물을 농도별로 첨가하고 다시 24~48시간을 배양한다. MTT 5mg/ml을 20ul씩 넣고 4시간 반응시킨

후, 배양액을 버리고 DMSO를 넣어 실온에서 20분간 반응시킨다. 흡광도는 ELISA reader로 590nm 파장에서 측정한다. 흡광도를 cell viability로 환산하여 IC₅₀값을 결정한다.

②유전독성검사 (Comet assay)

세포독성에 대한 영향과 함께 DNA에 대한 독성을 확인하기 위해 single cell gel electrophoresis (Comet assay)를 수행하였다(Wenjuan 등 2009). 3T3-L1 cell을 6 well plate배 90% confluence하게 배양시킨 후 발효진피추출물을 농도별로 넣어 함께 배양 시킨다(60min, 37°C, 5% CO₂). 50mM의 H₂O₂의 농도로 Cell에 30분간 처리하여 DNA에 상을 입힌다. Proteinase K 100μl를 처리하여 세포를 떼어내 1ml의 media와 함께 centrifugation한 뒤, 100 μl의 media에 현탁시켜 20μl를 comet assay에 이용한다. Frosted microscope slide는 0.5% NMPA(normal melting pointrose) 35μl로 precoating 해 건조한 뒤 75μl NMPA를 도포한 cover glass로 덮어 건조한다. cover glass를 떼어낸 후 0.7% LMPA(low melting point agarose) 75μl와 cell 20μl를 섞어준 후 slid에 도포하고 cover glass를 덮은 뒤 건조시킨다. 다시 cover glass를 떼어내고, 위에 75μl LMPA를 도포하고 cover glass를 덮어 건조시킨다. 굳어진 후에 slide cover glass를 제거후 lysis solution에서 1시간동안 4°C에서 cell을 lysis 시킨 후, slide를 electrophoresis (25V, 300mA, 20min)시킨 뒤, nuetrition buffer에서 중화시킨 후 75 μl의 YoYo-1를 도포한 뒤 어두운 곳에서 염색하여 Fluorescent microcope에서 세포의 DNA를 분석한다.

마. 발효진피 및 오징어 첨가 발효 육제품 제조

발효 육제품의 제조는 제1세부 과제로부터 확정된 방법을 그대로 따르되, 오징어는 5%로 육류의 비중을 대체하고, 발효진피는 0.5% 비율로 첨가하였다. 오징어육은 가격절감을 위해 조미가 공제품 제조 시 가열 및 조미 후 성형단계에서 발생하는 부산물을 사용하였으며, 경우식품에서 제공되었다. control로서 표준화된 제조법에 의한 발효 육제품을 제조하여 비교하였다. 각 21일 발효숙성 후의 절단면의 상태와 냄새를 통해 부패여부를 확인하였다. 또한 상온에서 장기 보관하며 곰팡이의 형성유무를 관찰하였다.

4. 연구 결과

가. 발효진피의 항균활성

발효진피 추출물은 30ul 볼륨 이상에서 대부분 clear zone이 관찰되었다(Figure 1). 또한 일반 건조진피 추출물에 비해 항균활성이 더 높은 것을 확인할 수 있었다(Figure2).

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeuroginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
0mg/ml	+	+	+	+	+	+
32mg/ml	+	+	+	+	+	+
63mg/ml	+	+	+	+	+	+
125mg/ml	-	(+)	(+)	(+)	-	-
250mg/ml	-	-	-	-	-	-

Table 1. 병원성균에 대한 발효진피 추출물의 최소저해농도

건조진피의 경우도 항균활성이 나타났으나, 6개의 병원성 균주 대부분에서 50ul 이상의 볼륨에서만 clear zone이 관찰되었고 *P. aeuroginosa*, *S.typhimurium*, *B. cereus*의 경우 일시적으로 항균효과를 나타내었으나 시간의 경과에 따라(48시간 경과 이후 관찰 시) clear zone이 사라지

는 특징을 보였다. 발효진피 추출물의 각 병원성 미생물에 대한 MIC 결과는 Table1에 나타내었다. 한편, 유산균에 대한 동일한 실험으로부터 발효진피 추출물이 유산균에 대하여는 항균효과를 가지지 않거나 미미하다는 결과를 얻었다(Figure 3). 따라서 진피 발효처리를 통하여 얻은 추출물을 이용하여 병원균의 증식을 억제하는 동시에 유산균의 활성을 저해하지 않는 효과를 얻을 수 있음을 확인하였다.

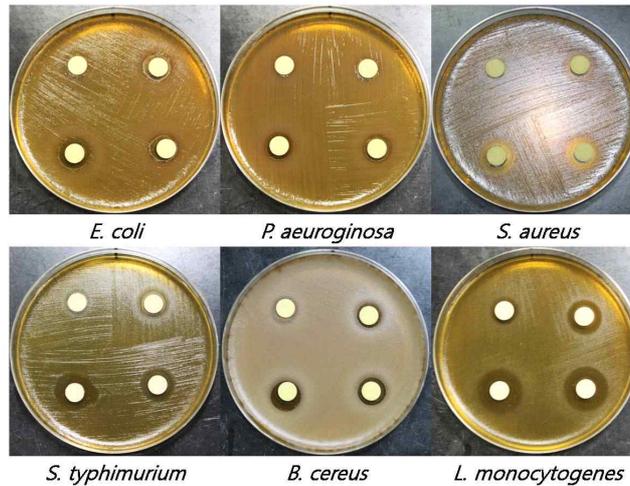


Figure 1. 병원성 미생물에 대한 발효진피 추출물의 항균효과

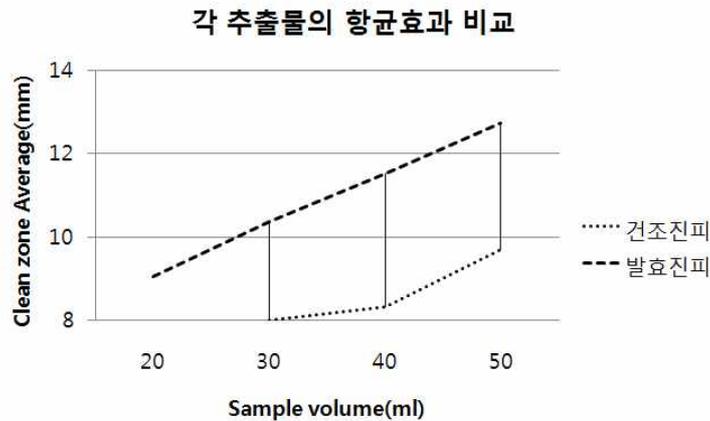


Figure 2. 건조진피 추출물과 발효진피 추출물의 항균활성 비교

한편, 대표적인 포자생성균인 *B. subtilis*에 대한 실험결과, 발효진피 추출물은 포자생성균의 포자 발아에 대해 생육억제 효과를 보이며 그 최소억제농도는 64mg/ml인 것으로 나타났다 (Figure 4).

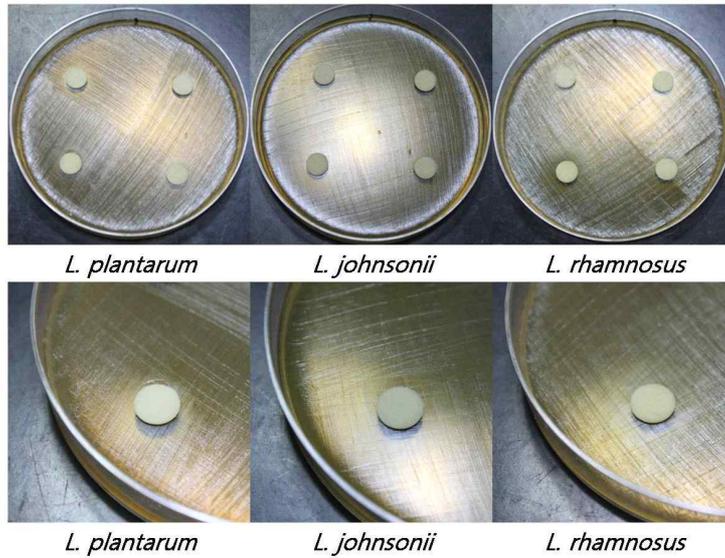


Figure 3. 유산균에 대한 발효진피 추출물의 평균 효과

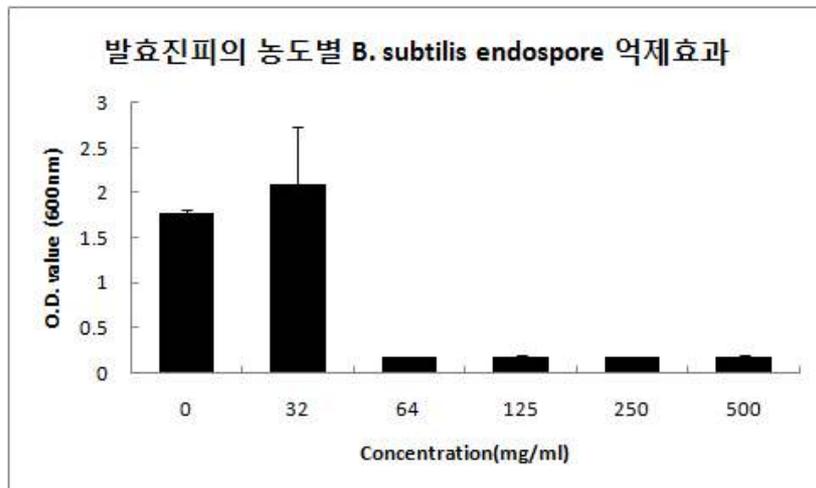


Figure 4. 발효진피 추출물의 농도별 B. subtilis endospore에 대한 발육 억제 효과

나. 발효진피의 안전성

발효진피의 장세포에 대한 세포독성 실험 결과, 10mg/ml 농도까지는 세포독성을 전혀 나타내지 않았으며 적정 농도에서는 세포의 활성을 오히려 증가시키기도 하였다 IC₅₀는 77mg/ml이었다. 또한 유전독성 실험 결과, 세포독성 실험의 경향성과 마찬가지로 10mg/ml의 발효진피 추출물에서는 DNA 손상이 발견되지 않았다(Figure 5). 간세포주에 대한 세포독성의 확인 결과, 20mg/ml 농도까지는 세포손상이 거의 나타나지 않았으며, IC₅₀값은 70mg/ml 농도 범위 이상에서 나타났다(Figure 6).

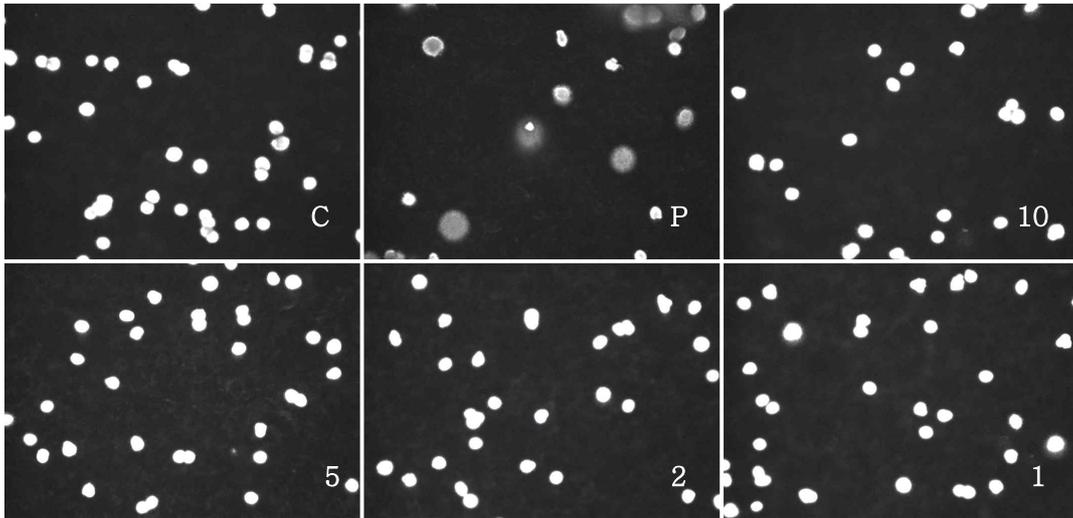


Figure 5. 발효진피의 HT-29에 대한 COMET assay 결과. 왼쪽 위로부터 C: 정상 세포의 DNA, P: H₂O₂에 의해 DNA에 손상을 입은 세포, 10: 10mg/ml농도의 FCP 샘플, 5: 5mg/ml 농도의 FCP 샘플, 2: 2mg/ml 농도의 FCP 샘플, 1: 1mg/ml 농도의 FCP 샘플.

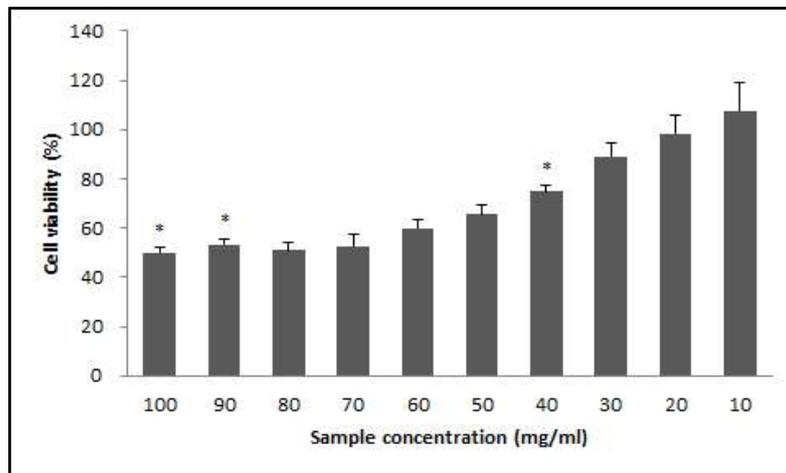


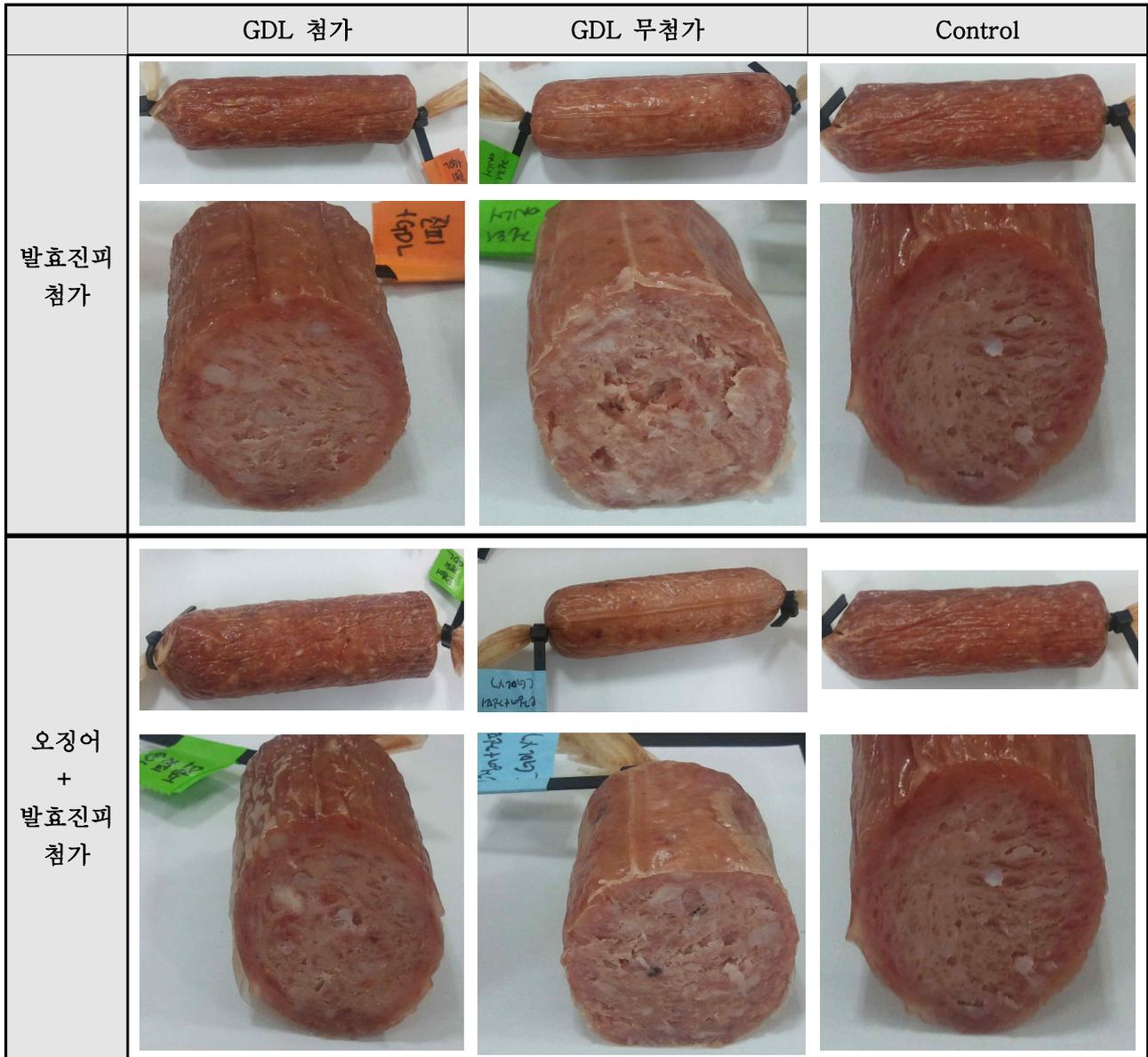
Figure 6. 발효진피 추출물의 HepG2에 대한 MTT assay 결과(P<0.05).

다. 발효진피 및 오징어 첨가 발효 육제품의 저장 안정성

GDL 첨가 비율과 동일하게 0.5%의 발효진피를 첨가한 살라미를 GDL 첨가와 무첨가로 나누어 비교해 보았다(Figure 7). GDL을 첨가한 발효진피 살라미는 표면의 건조상태와 발색상태, 경도가 control과 비슷하였으며 절단면의 결착력 형성 정도 역시 차이가 없었다. 그러나 GDL을 첨가하지 않은 살라미는 발색이 일어나지 않고 건조에 의한 경도강화가 관찰되지 않았으며, 마찬가지로 표면상의 결착력 역시 형성되지 않아 육질과 지방이 엉겨붙은 상태가 되었다. 또한 약취가 형성되어 제품으로서의 조건들을 충족하지 못하는 것으로 판단되었다. 이 같은 현상은 GDL 무첨가의 경우, 오징어를 추가로 첨가한 제조실험에서도 동일하게 나타났다. 육질과 지방이 심하게 뭉게지고 결착력과 경도 형성이 나타나지 않았다. 하지만 GDL을 첨가했을 경우에는 control과 비슷한 상태를 보여주었다. 다만 오징어 첨가군의 경우, 표면과 절단면에서 오징

어 분쇄육에 의한 특징적인 색이 나타났으며 오징어육 조각의 주변에서 육질의 차이로 인해 결착이 완전히 일어나지 않아 절단 시 오징어육 조각이 분리되어 떨어지는 경우가 있었다. 이상의 결과로부터 발효진피나 오징어육의 첨가를 위해서는 GDL을 필수적으로 사용해야만 하며, 발효진피는 살라미의 안정성에 있어 항균활성에 의한 안정성 증가 효과는 기대할 수 있겠으나 GDL을 대체할만한 효과는 가지지 못한 것으로 보인다. 또한 상온에서의 장기 저장 기간은 발효진피의 경우 6개월, 오징어를 첨가한 실험군은 3개월째에 곰팡이가 발생하였다.

Figure 7. 발효진피와 오징어를 첨가한 발효소시지의 제조



5. 결론

이상의 실험결과들을 토대로 유산균의 증식을 방해하지 않으면서도 병원성균과 포자생성균에 대한 발효진피의 항균효과를 입증할 수 있었고, 이같은 특성은 발효진피를 발효 육제품에 첨가하였을 경우 제품의 안전성을 확보하여 항균활성에 있어 화학첨가제의 역할을 일정부분 대신할 수 있는 획기적인 가능성을 제시하였다. 이 발효진피가 식품에 적용되기 이전에 세포독성

및 유전독성 유무와 그 농도를 측정하기 위한 MTT 및 COMET assay 결과에서 발효진피는 간과 장 세포에 대해 각각 20mg/ml, 10mg/ml 의 농도범위에서 세포에 전혀 독성을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다. 독성비교를 위해 흔히 사용하는 IC_{50} 값은 두 경우 모두 70mg/ml 범위 내에서는 나타나지 않았다. 최종적으로 발효진피 추출물과 오징어의 독자적인 혼합으로부터 발효육제품의 저장 안정성이 확보되는지 여부를 확인해본 결과, 발효육제품을 위한 starter에 의한 돈육과 오징어육의 발효효과는 사실상 동일하지 않으며, 이에 대한 보다 확실한 해답을 얻기 위해서는 더 많은 연구들이 진행되어야 할 것으로 판단되었다. 본 연구는 첨가제로서 제품의 안정성에 가장 큰 역할을 하는 GDL의 유무로부터 오징어와 발효진피가 각각 저장 안정성 부분에 이점을 가져다주는지를 확인하였으며, 결론적으로 GDL 없이 각 재료의 첨가는 유의적인 안정성을 증가시켜주지는 않았다. 대신 GDL과 함께 혼합하였을 때 제품의 제조에는 문제가 없었고, 오징어의 경우는 전통적인 살라미와는 다르게 상온 보관했을 경우 3개월 이후 제품에 곰팡이가 발생하여 추후 다른 종류의 어육류의 첨가에 대한 더 세부적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 전통적인 살라미가 상온에서의 장기저장이 가능한 것과 비교해 볼 때, 발효진피와 오징어의 첨가는 항균활성에 의한 안정성 증진과 발효진피 추출물 고유의 기능성, 원가의 절감 측면에서는 유리한 점을 제공해 줄 수 있으나 제품의 안정성에 있어서는 극적인 결과를 보여주지 못했다. 추후 다양한 원료 및 원료의 가공형태, 가공방법, 보관방법 등에 대한 세부적인 연구가 이루어진다면 이 같은 문제를 극복한 여러 가지 독자적인 형태의 한국형 발효소시지를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

본 연구결과로부터 독자적 기능성 스타터 컬처를 발굴할 수 있었고 발효진피와 오징어를 통한 발효 육제품의 경쟁력 확보 방안을 모색하였다. 또한 살라미제품을 개발하여 국내 축산가공품의 제품영역 확대에 기여하는 한편 축산농가의 부가가치 창출을 기대할 수 있었다. 본 연구를 통해 해외학술저널에 2편의 논문을 게재하였으며 2건의 특허출원 가운데 1건의 특허등록을 달성하였다. 연차별 각 개별과제에 대한 연구달성 및 기여내용은 다음과 같다.

연차별 각 개별과제에 대한 연구달성 및 기여내용

년차	세부연구개발목표	연구달성 및 대외기여 내용	달성도 (%)
1	기능성 미생물의 분리 및 동정	<ul style="list-style-type: none"> · 전통식품(김치, 몽골육제품) 유래 기능성 미생물 선별 및 동정 · Probiotics 가능성을 가진 새로운 유산균주들의 발굴 	100
	발효 육제품의 가공설정 및 샘플 제조	<ul style="list-style-type: none"> · 발효육제품의 가공 설정 및 샘플 제조 · 육제품의 발효 중 이화학적 변화 조사 · 독자적인 발효 육제품 제조기술 확립 	100
	발효 육제품의 경쟁력 강화를 위한 연구	<ul style="list-style-type: none"> · 발효진피 추출물의 병원성 미생물 생육억제 효과 · 진피의 발효와 그 추출법 확립 	100
2	김치 유래 기능성 미생물의 생화학적 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> · 분리된 균주들로부터 발효 육제품의 제조에 적합한 스타터 컬처 미생물 선택 · 독자적인 Probiotics 육제품 발효 스타터 컬처의 개발 	100
	한국형 발효 육제품의 개발 및 기능성 조사	<ul style="list-style-type: none"> · 한국형 발효 육제품의 개발 및 제조 · 발효 육제품의 기능성 조사 	100
	오징어를 이용한 발효 육제품의 생산 단가 절약	<ul style="list-style-type: none"> · 발효진피의 안전성 조사 · 오징어 함유 발효 육제품 샘플 제조 · 천연물 추출 첨가제로서의 발효진피 활용 방안을 제시 	100
3	전통식품 유래 미생물의 기능성 조사	<ul style="list-style-type: none"> · 전통식품 유래 미생물의 기능성 조사 · 김치유래 유산균의 콜레스테롤 저하 효과, 항비만 효과, 항미생물 효과, 장 부착 능력을 입증 	100
	발효 육제품 시제품 제조 및 생산	<ul style="list-style-type: none"> · 발효 육제품 시제품 생산 및 상품화 · 시제품의 관능평가 	100
	오징어를 이용한 발효 육제품의 안정성	<ul style="list-style-type: none"> · 발효진피와 오징어를 이용한 장기저장 육제품의 생산 	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 국내 시장에서 경쟁력을 확보

현재 수입제품을 제외한 국내 생산 제품으로 고급 발효 육제품은 출시되지 않고 있다. 본 과제를 통해 생산될 발효 육제품은 우리나라의 전통 식품인 김치에서 분리된 미생물을 이용하여 그 기능성을 확보하였기 때문에 국내 시장에서 경쟁력을 확보할 수 있다고 생각한다.

나. 발효진피의 항균작용을 이용한 합성첨가제 개선

발효 진피에 의한 병원성 미생물의 항균작용으로서 합성첨가제에 의한 제품 안정성 의존을 개선할 수 있다. 또한 이러한 천연물 첨가제에 의한 지속적인 연구를 통해 장기 저장 육제품을 생산하여 수출을 통한 양축농가의 소득을 향상시킬 수 있으리라 생각된다.

다. 국내 양축농가 및 육가공산업의 국제 경쟁력 강화에 기여

한미FTA의 영향으로 국내 양축농가는 많은 우려를 표명하고 있다. 여러 가지 대책이 마련되고 있는 가운데 시장 경쟁력 강화가 가장 핵심적인 열쇠가 될 것으로 생각되고 있다. 현재 국내 육류 산업은 가공 제품의 비중이 높지 않다. 따라서 글로벌 마켓에서의 경쟁이 가능한 장기 유통 고부가가치제품이 부족한 실정이다. 이러한 측면에서 본 과제의 연구성과는 하나의 좋은 예로써 국내 양축농가 및 육가공산업의 국제 경쟁력 강화에 기여할 것으로 기대된다.

라. 축산가공품의 제품영역확대로 육가공품 볼륨확대에 기여

유산균의 효능은 익히 알려져 있고, 전통적으로 우리 소비자들의 “유산균” 브랜드에 대한 믿음은 강하다. 육제품은 브랜드가 난무하고, 최근 국내에 햄,소시지가 고열량, 고콜레스테롤, 비만, 동맥경화 등 성인병의 원인으로 지목되어 일부 소비자들로부터 외면을 받고 있어 현 시점에서 콜레스테롤을 저하 등 기능성을 갖는 미생물을 활용한 건강 발효육제품 개발은 축산가공품의 새로운 제품영역 확대이며, 소비자불신해소 및 국민건강증진은 물론 축산업부문에까지 광범위하게 큰 도움이 될 것으로 확신한다.

마. 저지방부위(비선호부위) 판매추진을 통한 고부가가치 창출

본 과제에서 개발된 기능성발효소시지는 돼지고기 뒷다리 등 국내에서 비선호하는 부위를 이용하여 고부가가치의 육제품으로 개발한 것으로서 건강기능성, 저장성 등이 확보되어 있으므로 국내시장 판매확대는 물론 해외시장에 까지 수출 될 수 있도록 적절한 마케팅을 접목한다면 매출확대와 고수익창출을 기대한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Bioprotective and probiotic meat starter cultures for the fermentation of dry sausages, Susanna Erkkil (2001)
2. Starter cultures for making fermented sausages, *Wedliny Domowe* (<http://www.wedlinydomowe.com>)
3. Principles of preservation of shelf-stable dried meat products, FSRE Shelf-Stable (2005)
4. Fermented Meat Products: Production and Consumption, Herbert W. Ockerman and Lopa Basu
5. Starter cultures, Gewurzmuller
6. Fermented foods and healthy digestive functions, Danone
7. Prospects of Asian Fermented Foods in Global Markets, Jyoti Prakash Tamang
8. Probiotic bacterial molecules and their use in methods to treat/prevent infection by harmful bacterial and to provide nutritional health, US 20110262400A1

제 7 장 참고문헌

1. Lee YM, Kwon MJ, Kim JK, Shu HS, Choi JS, Song YO. Isolation and identification of active principle in Chinese cabbage kimchi responsible for antioxidant activity. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 129-133 (2004).
2. Lee H, Yoon H, Ji Y, Kim H, Park H, Lee J. Functional properties of Lactobacillus strains isolated from kimchi. Int. J. Food Microbiol. 145: 155-161 (2011).
3. Kim YJ, Lee HC, Park SY, Park SY, Oh S, Chin KB. Utilization of probiotic starter cultures for the manufacture of low-fat functional fermented sausages. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 28: 51-58 (2008).
4. Haberer P, Du TM, Dicks LMT, 목문 F, Holzapel WH. Effect of potentially probiotic lactobacilli on fecal enzyme activity in minipigs on a high-fat, high-cholesterol diet - a preliminary in vivo trial. Int. J. Food Microbiol. 87: 287-291 (2002).
5. Bover-Cid S, Holzapel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 53: 33-41 (1999).
6. Ju et al., Anti-obesity and antioxidative effects of purple sweet potato extract in 3T3-L1 adipocytes In vitro. J. Med Food. 10: 1097-1106 (2011).
7. Doyle RJ, Rosenberg M. Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrate. Methods in Enzymology. 253: 542-550 (1995).
8. Schillinger U, Guigas C, Holzapel WH. In vitro adherence and other functional properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. Int. Dairy J. 15: 1289-1297 (2005).
9. Bassler, B.L., Surette, M.G., Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 7046-7050 (1998).
10. Mathara et al. Functional characteristics of lactobacillus spp. from traditional maasai fermented milk in kenya. Int. J. Food Microbiol. 126: 57-64 (2008).
11. Holzapel et al., Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus sakei NR28. Beneficial Microbes (2011).
12. Osborn AM, Smith C.J. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. FEMS Microbiol Ecol 67: 6-20 (2009).
13. Saloomeh et al., AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of Lactobacillus spp. Int J Food Microbiol. 135, 295-392 (2009).
14. Kim et al., Lactobacillus acidophilus reduces expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors by inhibiting autoinducer-2-like activity. Food Control 19, 1042-1050 (2008).
15. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI, Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature 444: 1022-1023 (2006).
16. Kang SH, Lee YJ, Lee CH, Kim SJ, Lee DH, Lee YK, Park DB. Physiological activity of peel of Jeju-indigenous *Citrus sunki* Hort. Tanaka. Korean J. Food Sci. Technol. 37:

- 983-988 (2005).
17. Im H, Yoon CH, Oh E. A study on the antibiotic effect using the *d*-limonene oil extracted to wasted mandarin peels in Cheju. *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.* 26: 350-356 (2009).
 18. Ahn MS, Kim HJ, Seo MS. A study on the antioxidative and antimicrobial activities of the Citrus *Unshju* peel extracts. *Korean J. Food Culture* 22: 454-461 (2007).
 19. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983).
 20. Wenjuan Liao, Michael A. McNutt, Wei-Guo Zhu. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48: 46-53 (2009).
 21. Cofrades, S., Guerra, M. A., Carballo, J., Fernandez-Martin, F. and Jimenez Colmenero, F. Palsma protein and soy fiber content effect on blologna suusage properties as influenced by fat level. *J. Food Sci.* **65(2)**, 281-287 (2000).
 22. Gasperlin, L., B. Zlender and V. Abram. Colour of normal and high pH beef heated to different temperatures as related to oxygenation *Meat Sci.* 54:391-398. (2000).
 23. Langlois, B.E. adn Kemp, J.D. Microflora of fresh and dry-cured hams as affected by fresh ham storage. *Journal of Animal Science.* 38(3): 525-531 (1974).
 24. Osburn, W.N. and Keeton, J.T. Konjac flour gel as fat substitute in low-fat preriror pork sausage. *Journal of Food Science.* 59:484 (1994).
 25. Pszczola, D. E. Addressing functional problems in fortified foods. *Food Tech.* **52(2)**, 38-46 (1998).
 26. Raes, K., Smet, D. E., and Demeyer, D. Effect of double-musling in belgian blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids. *Anim Sci.* **73**, 253-260 (2001).
 27. Sloan, A. E. The top 10 functional food trends 2004. *Food Tech.* **58(4)** (2004).
 28. Seideman, S.C., Cross, H.R., Smith, G.C. and Durland, P.R., 1984. Factors associated with fresh meat color: a review. *J Food Quality* 63:21123.
 29. Choi S.S., Kang S.C., Choi D.Y., and Shin. H.K. Effet of Suger Addition in the Production of Row Ham with Different Qualities of Pork.. *Korean J. Anim. Sci.*, 33(6) 461~468. (1991).
 30. 농촌진흥청, 축산물이용분야 지식정복. 농촌진흥청 축산연구소. 수원 pp. 15-49 (2004).
 31. 농수축산신문, 기술혁신으로 부가가치를 높인다. 2012.1. 축산부문 (2012).
 32. 한국육가공협회 (2004) 육가공. 여름호 pp. 109-139.
 33. 有原圭三, 食肉の有する潜在的な疾病禮防作用を探る. 畜産の情報 2003. 8. 月報國內編 (2003).
 34. 有原圭三, 微生物を利用した新しいタイプ°の食肉製品の開發. 畜産の情報 2001. 6. 月報國內編 (2001).

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 자유응모 일반과제 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 자유응모 일반과제 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.