



**Studies on Developments of Functional  
Meat Products Using Pork**

“ ”

2000 . 10 . .

:  
:  
:  
( 가 )  
:  
( )  
:  
( )

•

•

가 , 가 가 가 가 가 .  
가 가 가 가 가 가 .

13

가 . 가 , 가  
가 . 가 가 가 가  
가 가 가 가 가

가 가 가 가 가 가

가

Lysozyme

가

가 , , 가 가 가



•

가

.

,

nitrosamine

,

.

( , )  
gluthathion 가

vitamin C, vitamin E, carnosine, tyrosine,

가

(nitrite, nitrosamine )

가

nitrite pattern . ,

가

가

,

.

□ □	□ □ □ □ □ □ □ □	□ □ □ □ □ □ □ □ □ □
<p>1 (1997 1998)</p>	<p>○</p>	<p>-</p> <p>- 가 가</p> <p>- nitrosamine</p> <p>,</p> <p>- Nitrosamine</p>
<p>2 (1998 1999)</p>	<p>○</p> <p>가</p>	<p>-</p> <p>- vitamin C, vitamin E, carnosine, tyrosine, glutathione 가 가</p> <p>- (nitrite, nitrosamine )</p> <p>- 가 nitrite pattern</p> <p>-</p> <p>- 가</p>

□ □	□ □ □ □ □ □ □ □	□ □ □ □ □ □ □ □ □ □
3 (1999 2000)	○	- - 가 - - 가 -

•

1.

(Hydrogen peroxide, Superoxide, Hydroxyl radical) Iron sources *in vitro*  
oil emulsion · OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KO<sub>2</sub>

· OH KO<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

· Fe<sup>2+</sup> ion binding  
· Fe<sup>2+</sup> ion , 가  
, total iron · Ascorbic acid  
26.97 ppm 가 , 19.74,  
22.14 ppm , 5.50 ppm (P<0.05).  
, 79.54 %, 77.11 % ,  
, SOD 0.16 가  
, pyrogallol SOD  
(P<0.05). pH  
, 가 pH 1.2 99.8%, 98.6%  
, pH 가 , ,  
pH 6.0 가 .  
, , +  
가 Fe<sup>2+</sup> ion binding .  
, +  
hydroxyl radical  
iron  
Fe<sup>2+</sup> ion total iron . , 가  
vitamin C , 가  
, SOD .

pH

1.2 pH 3.0

, pyrogallol

SOD 가

SOD 가 가 pyrogallol

가

(HPNP, CPNP, FPN)

*in vitro*

, Fe<sup>2+</sup> 가 HPNP FPN Fe<sup>2+</sup> binding

, CPNP , Fe<sup>2+</sup> 가

Fe<sup>2+</sup> binding .

가가 가

, 가 FPN KO<sub>2</sub>

iron ferrous iron

total iron CPNP가 가 , HPNP, FPN

ascorbic acid FPN, HPNP, CPNP

free radical

HPNP, CPNP, FPN , HPNP 가

. Superoxide dismutase(SOD) HPNP,

CPNP, FPN SOD HPNP가 가 .

pH pH가

, pH 1.2

( , , , allspice, , , )가 free radical

nitrosamine

pH

ethanol pH ,

3.0 가 . Fe<sup>2+</sup>

hydroxyl radical

deoxyribose  $\cdot$ OH Fe<sup>2+</sup> binding , ethanol ,  
 TBARS . Iron total iron 6.8  
 2.0 mg/100 g , iron ethanol  
 mg/100 g 가 . iron ethanol  
 iron iron .  
 Ascorbic acid ethanol 14.3  
 mg/100 g, 16.7 mg/100 g 가 .  
 , 50 % ,  
 ethanol . SOD  
 8 % , ethanol  
 , ethanol 85.3 % , 63.5 % 가  
 . ethanol  
 ethanol  
 , , ( , , ,  
 , allspice, , , )가 free radical  
 nitrosamine . ( , , )  
 chitosan 11.6 % , sesamol 2.2 % , ascorbic acid 2.8 % .  
 TBARS .  
 chitosan 29.8 % , sesamol 35.2 % , 15.8 % sesamol  
 가 . SOD SOD  
 8 % , chitosan 51.3 % , sesamol 19.9 % , 8.4 %  
 chitosan 가 . nitrite pH 1.2  
 chitosan 17.4 % , sesamol 56.4 % , 19.0 % , sesamol  
 pH 1.2 pH 3.0 56.4 % , 55.4 % .  
 가 starter  
 , starter  
 가 . 가 300  
 100 . 100

10 . 10

48 21

32 37 . Starter

가 10

gram . Catalase test nitrate

reduction test, glucose CO2

6 , 4 . 200ppm

8% .

*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* .

*Lactobacillus plantarum* 2 , *L. lactis lactis* 1 ,

*Pediococcus pentosaceus* 5 , *L. brevis* 1 , 1 가

가

가

( , , ) 가가

(0.1% , 0.3%)

가

가 TBARS

carosine 0.10 MDA ppm

84.4% , 74.9% .

가

TBARS ,

free radical

nitrosamine

iron

sources oxygen species oil  
fish oil 가 TBARS  
fish oil .  
0.1% 0.3% 가 TBARS  
, iron sources binding . ,  
. , ferrous  
iron binding GSH 가 , copper ion  
binding 가 . Hemoglobin  
,  
superoxide, hydrogen peroxide hydroxyl radical  
. Deoxyribose hydroxyl radical  
0.1% 0.3% TBARS  
. , 0.3%  
TBARS . iron  
가 , ascorbic acid  
. 가  
,  
. , 0.3%  
pH , 0.3%  
pH 1.2 pH 3.0 95%  
, ascorbic acid .  
pH +  
가 가 .  
10 20 가 30 가  
. 10 0  
0.09 MDA ppm , + 가  
0.07 MDA ppm TBARS  
가 . ,  
TBARS 가 , 40 0.50 MDA  
ppm 0.48 MDA ppm, 0.46 MDA ppm  
TBARS . , 30 가 20

가 20 가 .

10

, 30 10

가 .

가 가 .

(VBN)

가 . 10 30 가 가

, 10 가 , 3

0 20 가 가 가

,

가 가 VBN ,

VBN 가 . 10

$2.2 \times 10^1$   $3.3 \times 10^2$  CFU/g 가 , 30  $2.2 \times 10^1$  3.2

$\times 10^6$  CFU/g 10 가 가 . , 10

가 10 가가 , 20

가 가 . 30

1 가 가 ,

가 3  $2.7 \times 10^1$  CFU/g ,

가 가 3 . 10

가 , 30

가 . ,

가 가 , 가

가 가 . , + 가 가 가

, 30 20

,

가 .

가 potassium sorbate(0.5 % ,

1.0 %) nitrite 가 ascorbic acid (0.5 %, 1.0 %) 가  
 30 pH, , , ,  
 TBARS, , 가 nitrite 가  
 (P>0.05). , 가 pH  
 가 0.5 % .  
 가 pH 10 pH 6.3  
 (chitosan, sesamol, ) 가 pH 6.4  
 , 10 30 10  
 가 가 . 30  
 10 , 59 43 %  
 . ascorbic acid 가  
 , 10 30 가  
 가 TBARS , .  
 potassium sorbate 가 가  
 TBARS , .  
 10  
 , 30 5 10  
 . 10 20  
 lightness 가 , 30 5 lightness  
 . , Redness lightness 10 30  
 10 가 가 . , ,  
 , 10  
 30 . 가 , 10 40  
 , 30 20 가 . ,  
 sesamol  
 가 .  
 starter  
 가 *L. plantarum* *P. pentosaceus*

, , 4 3  
 109 CFU/ml 가  
 108 CFU/ml  
 . 48  
*L. plantarum*(N-2) *P. pentosaceus*(N-3) starter I *L. plantarum*  
 (N-2) *P. pentosaceus*(N-4) starter II 100%  
 가 .  
 8% 가 48  
 pH 4 .  
 가 .  
 starter 가  
 starter 가  
 starter 가  
 starter 가  
 starter 가  
 Starter 가  
 starter 가 108 CFU/ml .  
 가 starter 가 가  
 102 CFU/ml 72 가  
 가 가 .  
 pH pH  
 starter 가 pH 6 starter 가  
 36 pH가 5 .  
 starter 12 72  
 95% starter 가  
 가 70%

Starter 가  
 starter 가 가  
 starter 가 가  
 . pH starter 가  
 pH가 5  
 starter 가 97%  
 10ppm L  
 starter 가 가 a  
 starter 가 가 가  
 starter 가  
 가 potassium sorbate(0.5 %, 1.0 %), ascorbic acid (0.5 %, 1.0 %) nitrite  
 가 10  
 30 pH, , ,  
 TBARS, , 가 nitrite  
 (P>0.05). , 가 가  
 pH  
 가 0.5 %  
 가  
 2 3  
 (0.1%, 0.3%) 가 (10 , 30 )  
 pH 가 pH  
 , 10 30 pH  
 98.50 ppm, 0.1% 가 98.20 ppm, 0.3% 가 79.50 ppm  
 , 가 가

가

10 30 TBARS

TBARS 가

*L. plantarum* *P. pentosaceus* starter

2 starter

32 pH

starter starter

95%

starter

SP(*Staphylococcus xylosus*+*Pediococcus pentosaceus*) starter

starter

starter

pH 2 starter 4

48 가 pH

가 meat starter

가 Starter 가

2 108 CFU/ml 가

가 starter II

4 101 CFU/ml Starter 가

2 starter I starter II 가 가

가

가 pH

, starter I, starter II

starter가

4

starter II

가

14

starter I

2

starter I, starter II

starter

가

. texture

hardness

starter 가 가

14

starter II

가

starter I

14

starter가 oleic acid

linoleic acid

myristic acid, palmitic acid, stearic acid

2.

가

가

가

( , ) 가

가

가가

## SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of herb extracts on lipid oxidation and free radical reaction in iron sources reacted with active oxygen species. The results were summarized as follow; The catalytic effects of active oxygen on lipid oxidation in oil emulsion tended to be showed  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{KO}_2$  in order. At the same time, herb extracts itself were tended to be showed a little catalytic effects. Active oxygen scavenging ability of herb extracts didn't show, but herb extracts played role as a strong chelating agents to bind iron ion if  $\text{Fe}^{2+}$  ion exist in oil emulsion. The content of  $\text{Fe}^{2+}$  ion and total iron in *Salvia miltiorrhiza* Bge. and *Angelica gigas* Nakai were higher than those of *Prunus persica* Stokes and *Pinus strobus*.. The content of ascorbic acid of *Pinus strobus* showed the highest (26.97 ppm) among several herb extracts. Electron donating ability of *Pinus strobus* and *Salvia miltiorrhiza* Bge. were 79.54% and 77.11%, respectively, which was showed higher content than those of *Prunus persica* Stokes and *Angelica gigas* Nakai. The SOD-like activity of *Prunus persica* Stokes showed optical density(O.D.) 0.16, compared to other herb extracts which means the most strong antioxidant reaction. The nitrite scavenging effects were tended to be different, depending on pH value as pH value was increased. Especially, they didn't show the nitrite scavenging effect in pH 6.0. In conclusion, the *Pinus strobus* extract among herb extracts were the most effective by evaluation as functional sources.

This study was carried out to investigate the effects of ethanol extracts on lipid oxidation of oil emulsion. The results are as follows; The scavenging ability of plant extracts for hydroxyl radical was found, and plant extracts played an important role as a strong chelating agents to bind iron if  $\text{Fe}^{2+}$  ion exists in oil emulsion. *Pinus densiflora*(PD), *Lithospermum erythrorhizon*(LE) and PD+LE acted as strong chelating agents to bind iron to reduce lipid oxidation in oil emulsion. The content of  $\text{Fe}^{2+}$  ion in ethanol extracts from LE and PD+LE were significantly higher( $P < 0.05$ ) than that of

ethanol extracts from PD. The content of total iron has same tendency. The ascorbic acid content of PD(16.36 ppm) was slightly higher than those of LE(13.08 ppm). Electron donating ability of PD was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of LE. However, the superoxide(SOD)-like ability of LE showed a little higher than those of LE and PD+LE, which means the strong antioxidant activity of LE. The nitrite scavenging effects were dependent on pH value, however, they decreased as pH value increased. Especially, they almost didn't show the nitrite scavenging effect in pH 6.0. In conclusion, the PD and LE extracts may be used as natural antioxidant sources to reduce lipid oxidation in oil emulsion.

This study was carried out to investigate the effects of pine needle extracts on lipid oxidation and free radical reaction in iron sources reacted with active oxygen species. The results were summarized as follow; the catalytic effects of active oxygen on lipid oxidation in oil emulsion tended to be showed  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{KO}_2$  in order. At the same time, pine needle extracts itself were tended to be showed a little catalytic effects. Active oxygen scavenging ability of pine needle extracts didn't show, but pine needle extracts played role as a strong chelating agents to bind iron ion if  $\text{Fe}^{2+}$  ion exist in oil emulsion. The content of  $\text{Fe}^{2+}$  ion and total iron in CPNP were higher than those of HPNP and FPN. The content of ascorbic acid of HPNP showed the highest (167.97 mg/100g) among several pine needle extracts. Electron donating ability of HPNP and CPNP were 81 % and 78 %, respectively, which were showed higher content than those of FPN. The SOD-like activity of HPNP showed 44.30 %, compared to other pine needle extracts which means the most strong antioxidant reaction. The nitrite scavenging effects were tended to be different, depending on pH value as pH value was increased. Especially, they didn't show the nitrite scavenging effect in pH 6.0.

The plant extracted from *Nameko*, Gallic, Green tea, Allspice, *Polygonum multiflorum*, *Schizandra chinensis*, *Armeniaca* and Pine needle were utilized to investigate the effects of extracts on free radical reaction, lipid oxidation

and nitrite scavenging ability. The pH of ethanol extracts showed a higher than that of hot water extracts, among of which were showed the lowest pH 3.0 in *Schizandra chinensis*. The important factor of lipid oxidation were Fe<sup>2+</sup> ion and active oxygen, in which were bound by plant extracts in case of Fe<sup>2+</sup> ion existed. However, the hydroxyl radical scavenging ability of extracts were lowed, compared to extracts reacted with Fe<sup>2+</sup> ion. Among of them, the hydroxyl radical scavenging ability of *Nameko* and Pine needle extracts had a lower TBARS value than those of control. The iron content of extracts were less than 2.0 mg/100 g, but the total iron content of *Schizandra chinensis* extracts were 6.8 mg/100 g. The ethanol extracts of pine needle were higher than those of hot water extracts on the basis of Fe<sup>2+</sup> ion content. The ascorbic acid content of green tea showed 14.3 mg/100 g in hot water extracts and 16.7 mg/100 g in ethanol extracts. Electron donating ability of extracts showed more than 50 %, except *Nameko* and allspices, which were higher in ethanol extracts than those of hot water extracts. The superoxide dismutase(SOD)-like activity of green tea showed 85.3 % and 63.5 % in hot water and ethanol extracts, respectively. The nitrite scavenging ability of green tea was the most effective in both extracts.

The natural sources extracted from crab shell, korean tangrine peel, sesame meals were utilized to investigate the effects of extracts on free radical reaction, lipid oxidation and nitrite scavenging ability. The recovery percentage of extracts from waste resources(crab shell, sesame meal, dry korean tangrine peel) were chitosan 11.6 %, sesamol 2.2 % and ascorbic acid 2.8 %, respectively. The antioxidants were tended to have a lower TBARS value than those of control. The nitrite scavenging and electron donating ability of sesamol were tended to be the most effective extract among all extracts. However, In case of chitosan, the superoxide dismutase(SOD)-like activity was the most highest, compared to other extracts. The functional sausage was prepared to carried out to investigate functional and storage characteristics through the screening of effective extracts. This products were stored at different temperature.

The studies were carried out to develop a new starter for the production of high quality fermented meat products. Three hundred strains of lactic acid bacteria were isolated from *kimchi*, a Korean traditional fermented vegetable food. Ten strains selected from isolated lactic acid bacteria which depletion of nitrite was highest among three hundred strains. Nitrite depletion activity of selected strains were determined in MRS broth containing 200 µg/Ml of nitrite. Nitrite depletion ratio of selected strains showed over 95% on the average after 48 hrs incubation at 32 and 37 °C. Selected strains showed gram-positive, catalase negative, nitrate reduction negative, no CO<sub>2</sub> production from glucose. These strains showed growth at 200 ppm nitrite, 8% of NaCl and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*. These strains identified as *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, respectively.

This study was carried out to investigate effects on processing characteristics in case of addition of plant extracts and also reviewed synergic effects of plant extracts and various antioxidants on antioxidant and antimicrobial activities. The results are summarized as follows; The addition of plant extracts did not change the stability of emulsion, which means there were a little effects of plant extracts on processing characteristics, irrespective of concentration of plant extracts. The antioxidant ability of plant extracts and various antioxidants showed the most strong ability in ethanol extracts from green tea and *Schizandra chinensis*. These values were very similar to antioxidant of carnosine. Electron donating ability of ethanol extracts from *Pinus densiflora* and Green tea were tend to be showed 84.4%, 74.9%, respectively, in which showed more higher antioxidant ability than other antioxidants. And also, The complex treatment between plant extracts and various antioxidants were tended to be synergic effect in case of TBARS value, however there did not show synergic effects on antimicrobial activities on the basis of functional characteristics.

The natural sources extracted from green tea and pine needle were utilized to investigate the effects of extracts on free radical reaction, lipid oxidation and nitrite scavenging ability. The purpose of these research is to develop functional sausage using plant extracts from green tea and pine needle. The degree of lipid oxidation is very sensitive to kinds of oil emulsion reacted with iron sources and oxygen species. The results revealed the highest TBARS value in case of fish oil was used in oil emulsion. Thus, fish oil was used to investigate antioxidant ability of plant extracts from green tea and pine needle. The antioxidants of extracts from green tea and pine needle were different depending on concentration of extracts, which were a lower TBARS value in 0.3% extracts concentration, compared to 0.1% extracts concentration. And also, the binding ability on iron sources was superior in hot water extracts, but oxygen scavenging ability was the lowest TBARS values in ethanol extracts. The important factor of lipid oxidation were  $Fe^{2+}$  ion and active oxygen, in which were bound by plant extracts except GSH in case of  $Fe^{2+}$  ion and  $Cu^{2+}$  ion were existed. However, the hydroxyl radical scavenging ability of extracts were lowed, compared to extracts reacted with  $Fe^{2+}$  ion and hemoglobin. The hydroxyl radical scavenging ability of green tea and pine needle extracts had a little low TBARS value in 0.1% and 0.3% extracts concentration in deoxyribose. The ethanol extracts of pine needle were higher than those of hot water extracts on the basis of  $Fe^{2+}$  ion content. The ascorbic acid content of green tea showed 14.3 mg/100 g in hot water extracts and 16.7 mg/100 g in ethanol extracts. Electron donating ability of extracts showed difference depending on extracts concentration, which were higher in ethanol extracts than those of hot water extracts. The nitrite scavenging effects were tended to be different depending on pH value, however they were decreased overall as pH value was increased. Especially, the nitrite scavenging ability of 0.3% extracts from green tea and pine needle were the most effective in pH 1.2 and pH 3.0, which were showed 95% nitrite scavenging ability. The functional sausage was prepared to carried out to investigate functional and

storage characteristics through effective extracts. This products were stored at different temperature. The changes of pH were tended to be a little ranged from pH 6.07 to pH 6.35 in control. At the same time, the pH changes treated with plant extracts showed the same tendency as control.

The treatments using natural extracts revealed a little low TBARS value during storage at 10 . But, they were not significantly different( $P>0.05$ ).

The nitrite scavenging ability of extracts from pine needle were higher than green tea extracts, irrespective of storage temperature. As storage time goes by, the nitrite contents of sausage product gradually were a little more decreased during storage at 30 than those of storage at 10 . The VBN content was tended to be increased as storage time goes by, irrespective of storage temperature. The changes of VBN contents were rapidly more increased during storage at 30 than those of storage at 10 . The treatments using plant extracts revealed a little low VBN content, compared to control during storage. The total bacteria was tended to be increased as storage time goes by, irrespective of storage temperature. The changes of total bacteria were more increased to  $2.2 \times 10^1$   $3.2 \times 10^6$  CFU/g during storage at 30 than  $2.2 \times 10^1$   $3.3 \times 10^2$  CFU/g in case of storage at 10 . The treatments using plant extracts revealed an antimicrobial activity until storage at 3 days, compared to control. The lightness of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 than those of storage at 10 . Overall, the lightness of sausage color treated with pine needle extracts were a more bright than those of control. However, the redness of sausage color treated with pine needle and green tea showed the most lowest red color, compared to control.

Sensory test suggested that the changes of sausage color, flavor, texture and taste were tended to be decreased gradually. Especially, sensory score were rapidly decreased for 20 days storage at 30 . However, the sensory scores of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 than those of stored at 10 .

In conclusion, these research suggested that pine needle and green tea

were the most effective plant extracts on the basis of the functional properties (antioxidants and nitrite scavenging ability). At the same time, sausage prepared from pine needle extract was the most effective natural resources on the basis of the functional and physico-chemical properties.

These studies were carried out to develop the functional meat products using extracts from waste resources. The changes of pH were tended to be a little decreased from pH 6.4 to pH 6.0. At the same time, the moisture content showed the same tendency as 62–60%. The water holding capacity of functional sausage gradually were tended to be a little more decreased during storage at 30 °C, compared to 10 °C. The changes of salt content also have a same tendency, except the treatments of vitamin C. The treatments using natural resources revealed a low TBARS value. But they were not significantly different ( $P > 0.05$ ). The nitrite scavenging ability of extracts from *Schizandra chinensis* were the most highest, compared to other extracts. As storage time goes by, the nitrite contents of sausage product gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. The lightness of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. But they were not significantly different ( $P > 0.05$ ). The redness of sausage color also had very similar tendency to the lightness of sausage color in spite of redness of sausage color was a little increased during storage until 10 days. Sensory test suggested that the changes of sausage color, flavor, texture and taste were tended to be decreased gradually, but there was not significantly different during storage at 10 °C and 30 °C ( $P > 0.05$ ). However, the sensory scores of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of stored at 10 °C. In conclusion, sausage treated sesamol extracted from sesame meal was the most effective natural resources on the basis of the functional properties.

The characteristics of *L. plantarum* N-2, N-9, and *P. pentosaceus* N-3, N-4 selected among 10 strains isolated from *kimchi* were studied to develop meat starter. The selected strains survived in artificial gastric juice (pH 2.5) after incubation for 3 hrs at 37 °C. The strains also survived in artificial bile juice containing 1% oxagall for 24 hrs at 37 °C. Nitrite depletion ratio of four

kinds of mixed starter made by selected strains was above 95% in MRS broth containing 200µg/Mℓ nitrite after incubation for 48 hrs at 32 . Two kinds of mixed starter(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3 and *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4) showed 100% nitrite depletion ratio in the same condition. The two kinds of mixed starter showed growth in MRS broth containing 8% NaCl. and survived after heat treatment for 20min at 60 .

The change of residual nitrite content, pH, color, lactic acid bacteria and coliform bacteria during fermentation for 72 hrs at 32 was examined to investigate the effect of mixed starter on curing of pork meat. Nitrite depletion ratio showed above 90% in starter inoculated meat and about 70% in control after 72 hrs incubation at 32 . the growth of coliform bacteria inhibited significantly in mixed starter inoculated meat compared to control. The number of coliform bacteria was 5.98 (log CFU/ml) in control, 2.85 (log CFU/ml) in starter I (*Pediococcus pentosaceus* N-3+ *Lactobacillus plantarum* N-2) inoculated meat and 3.06 (log CFU/ml) in starter II(*P. pentosaceus* N-4 + *L. plantarum* N-2 ) inoculated meat after fermentation for 72 hrs at 32 . The effect of addition time of mixed starter on changes of nitrite depletion and coliform bacteria was also investigated. Nitrite depletion ratio of cured meat after fermentation for 72 hrs at 32 showed 97.0 % of starter added meat before curing and 96.8% of starter added meat after 2 days pre-curing, respectively. The starter added before curing was better than after pre-curing for 2 days in changes of coliform bacteria, pH and nitrite depletion ratio during fermentation of sausages for 72 hrs at 32 .

These studies were carried out to develop the functional meat products using extracts from *Schizandra chinensis*. The changes of pH were tended to be a little decreased from pH 6.4 to pH 6.0. At the same time, the moisture content of functional sausage showed range from 62 to 60 %. The water holding capacity of functional sausage gradually were tended to be a little more decreased during storage at 30 , compared to storage at 10 . The changes of salt content also have a same tendency, except the

treatments of *Schizandra chinensis* and ascorbic acid. The treatments using natural resources revealed a low TBARS value. But, they were not significantly different ( $P > 0.05$ ). The nitrite scavenging ability of extracts from *Schizandra chinensis* were the most highest, compared to other extracts. As storage time goes by, the nitrite contents of sausage product gradually were a little more decreased during storage at 30 than those of storage at 10 . The lightness of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 than those of storage at 10 . But they were not significantly different ( $P > 0.05$ ). The redness of sausage color also had very similar tendency to the lightness of sausage color in spite of redness of sausage color was a little increased during storage until 10 days. Especially, the sausage with extracts from *Schizandra chinensis* and sausage with ascorbic acid had a higher red color than those of other treatments. But, there were not significantly different ( $P > 0.05$ ), depending on each treatments. Sensory tests suggested that the changes of sausage color, flavor, texture and taste were tended to be decreased gradually, but there was not significantly different during storage at 10 and 30 ( $P > 0.05$ ). However, the sensory scores of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 than those of stored at 10 . In conclusion, these research suggested that *Schizandra chinensis* was the most effective plant extracts on the basis of the functional properties (antioxidants and nitrite scavenging ability). But, it is desirable to add under 0.5% extracts powder of *Schizandra chinensis* on the basis of texture.

Nitrite was well known to generate nitrosamine in case of reacted with amine and acted as carcinogen. These studies were carried out to develop the functional sausage products using extracts from *schizandra chinensis* depending on concentration (0.1%, 0.3%). At the same time, the nitrite scavenging ability depending on the concentration of *schizandra chinensis* extracts were determined. The pH values were tended to be low as the concentration of *schizandra chinensis* was increased during storage time. As storage time goes by, pH change of sausage product were a little more

dropped during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. The residue nitrite contents were tended to be decreased as the concentration of *schizandra chinensis* was increased. As storage time goes by, the residue nitrite contents were lowered in case of addition of *schizandra chinensis*, compared to those of control, irrespective of temperature. And also, the sausage added *schizandra chinensis* had a low TBARS value than that of control, in which revealed antioxidant ability of *schizandra chinensis* against rancidity during storage time.

Effect of mixing ratio of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from *kimchi* on fermentation of sausage was studied to select mixed starter. Several mixing ratio of *L. plantarum* and *P. pentosaceus*(8:2, 6:4, 5:5, 4:6 and 2:8) did not show significant difference in depletion of nitrite in MRS broth containing 200 ppm nitrite. Nitrite depletion ratio of two kinds of mixed starter(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3 and *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4) was higher than that of commercial meat starter (*Staphylococcus xylosum* + *P. pentosaceus*). The growth of *Listeria monocytogenes* Scott A, *Escherichia coli*, ATCC 11775, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 was inhibited by addition of the two kinds of mixed starter in artificially contaminated meat during fermentation for 48 hrs at 32 °C.

Three isolated lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* N-2, *Pediococcus pentosaceus* N-3, N-4) from *kimchi* were used to make mixed starter. Effect of the mixed starter on microbiological and physico-chemical changes during fermentation of sausage was investigated compare with commercial starter to develop meat starter. The selected starter II(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4) and starter I (*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3) showed lower coliform bacterial count and higher hardness and cohesiveness than commercial starter in early stage of fermentation(4-7 days). The activities of selected starter was similar to commercial starter in changes of weight loss, lactic bacteria, Aw, and residual nitrite content during fermentation for 21 days. But pH range was 4.2-4.5 in selected starter I and II added

sausage and 4.5 4.7 in commercial starter added sausage during fermentation. The ratio of nitrite depletion was about 98% in all treatments after fermentation for 21 days. Content of essential amino acid such as threonine, alanien, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine and histidine in starter II added sausage much higher than in commercial starter and starter I added sausage after fermentation. Content of palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid and linoleic acid in starter II added sausage was higher than commercial starter added sausage after fermentation.

# CONTENTS

## Chapter 1. Introduction

Section 1. The search purpose and scope .....	35
---	----

## Chapter 2. (1st year)

Section 1. Effect of hot water extracts of <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge., <i>Prunus persica</i> Stokes, <i>Angelica gigas</i> Nakai and <i>Pinus strobus</i> on lipid oxidation .....	39
---	----

Section 2. Effect of ethanol extracts in <i>Pinus densiflora</i> , <i>Lithospermum</i> <i>erythrorhizon</i> on the lipid oxidation of oil emulsion .....	55
---	----

Section 3. Antioxidants of pine needle extracts according to preparation method .....	69
--	----

Section 4. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts .....	87
--	----

Section 5. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of waste extracts(sesame meal, korean tangrin peal, crab shell) .....	107
--	-----

Section 6. Studies on the isolation of lactic acid bacteria from <i>kimchi</i> and its physico-chemical characteristics to develop starter of fermented sausage .....	121
---	-----

## Chapter 3. (2st year)

Section 1. Comparison of synergic effects of plant extracts and various antioxidants on functional ability and emulsion stability .....	143
--	-----

Section 2. Studies on developments of functional meat products using plant extracts from pine needle and green tea .....	159
Section 3. A study on development of functional sausage using waste resources .....	202
Section 4. Cultural characteristics of mixed starter made by isolated lactic acid bacteria during meat fermentation .....	220
Section 5. Effect of addition time of mixed starter on the changes of microbiological and physico- chemical characteristics of meat during curing .....	231
 <b>Chapter 4. (3st year)</b>	
Section 1. Development of functional sausage using extracts from <i>Schizandra chinensis</i> .....	251
Section 2. Effects of <i>Schizandra chinensis</i> concentration on sausage characteristic .....	271
Section 3. Effect of mixed starter on manufactured of fermented sausage .	285
Section 4. Effect of selected mixed starter on the changes of microbiological and physico- chemical characteristics during fermentation of sausage .....	299
<b>Appendix</b> .....	323

<b>1</b>		
1	.....	35
<b>2 (1 )</b>		
1	, ,	...39
2	( , )	.....55
3		.....69
4		.....87
5	( , , )	.....107
6	starter	.....121
<b>3 (2 )</b>		
1		....143
2		..159
3	( , , )	.....202

4	starter	.....220
5	Starter 가 가	.....231
4	(3 )	
1		.....251
2		가 .....271
3	starter가	.....285
4	가	.....299
		.....323

# 제 1 장





**1**

가

가

# 제 2 장



2 (1 )

1 , ,

**Effect of hot water extracts of *Salvia miltiorrhiza* Bge., *Prunus persica* Stokes, *Angelica gigas* Nakai and *Pinus strobus* on lipid oxidation**

Abstract

This study was carried out to investigate the effects of herb extracts on lipid oxidation and free radical reaction in iron sources reacted with active oxygen species. The results were summarized as follow; The catalytic effects of active oxygen on lipid oxidation in oil emulsion tended to be showed  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{KO}_2$  in order. At the same time, herb extracts itself were tended to be showed a little catalytic effects. Active oxygen scavenging ability of herb extracts didn't show, but herb extracts played role as a strong chelating agents to bind iron ion if  $\text{Fe}^{2+}$  ion exist in oil emulsion. The content of  $\text{Fe}^{2+}$  ion and total iron in *Salvia miltiorrhiza* Bge. and *Angelica gigas* Nakai were higher than those of *Prunus persica* Stokes and *Pinus strobus*.. The content of ascorbic acid of *Pinus strobus* showed the highest (26.97 ppm) among several herb extracts. Electron donating ability of *Pinus strobus* and *Salvia miltiorrhiza* Bge. were 79.54% and 77.11%, respectively, which was showed higher content than those of *Prunus persica* Stokes and *Angelica gigas* Nakai. The SOD-like activity of *Prunus persica* Stokes showed optical density(O.D.) 0.16, compared to other herb extracts which means the most strong antioxidant reaction. The nitrite scavenging effects were tended to be different, depending on pH value as pH value was increased. Especially, they didn't show the nitrite scavenging effect in pH 6.0. In conclusion, the *Pinus strobus* extract among herb extracts were the most effective by evaluation as functional sources.

1.

가 가

(1). , free radical

DNA, RNA, ,

(2).

,

BHA,

BHT, EDTA ,

tocopherol ,

가 (3) 가 가 .

, microsomal enzyme activity 가,

가 (4- 7)

radical

가 (8, 9), . ,

가

radical

radical source ,

가 . ,

vitamin, minerals, polyphenol

(10),

가 (11). ,

(*Pinus strobus*)

(*Salvia miltiorrhiza Bge.*), (*Prunus persica Stokes*), (*Angelica*

*gigas Nakai*) 가

iron

free radical

,

.

2.

가.

, Trichloroacetic acid(TCA), Griess reagent  
(sulfanilic acid, naphthylamine) Sigma chemical Co.(St. Louis, MO)  
, 2-thiobarbituric acid (TBA) Eastern Organic Chemicals (Rochester,  
NY)

( , , ) 20 g 100 ml 가  
85 3hr 2 , Whatman #1  
50 ml

. Oil emulsion

Oil emulsion maleic acid buffer(8 ml) pH 6.5  
50  $\mu$ l Tween- 20, 0.5 ml 15  
KOH 2 3 0.1N KCl pH 6.5

oil emulsion 0.5 ml {40 mM hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),  
potassium superoxide (KO<sub>2</sub>), 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 ppm Fe<sup>2+</sup> hydroxyl radical  
( $\cdot$ OH)} 0.1 ml 가 , 50 ppm Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ion 0.1 ml  
, 0.1 ml 가 1 ml가  
4

. Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) Buege (12)  
. 1ml 37 water bath 1  
50  $\mu$ l dibutyl hydroxy toluene  
(BHT) 7.2% 가  
2 ml TCA/TBA 가 15 가

. 가 2,000 × g 15 .  
 531 nm (HITACHI UV- 2001)  
 가 . TBARS ml  
 μg malondialdehyde(MDA) .

. Nonheme iron( )  
 Ferrozine iron (13) . Total iron  
 1 ml 2% ascorbic acid (w/v) 0.1 ml 가  
 (22 ) 5 . 11.3% TCA(w/v) 1 ml 가  
 3,000 × g 15 . 2 ml  
 0.8 ml 10% ammonium acetate 0.2 ml ferroin color reagent(75  
 mg ferrozine 75 mg neocuproine HCl 가 )  
 가 3,000 × g 15 5  
 562 nm (HITACHI UV- 2001) . Ferrous iron(Fe<sup>2+</sup>)  
 0.1 ml ascorbate 0.1 ml TCA 가 .

. Ascorbic acid  
 Sikic (14) chelex- 100 3 가  
 10,000 × g 10 0.5 ml  
 5% TCA 2 ml . , 4 10 15,000  
 × g 0.5 ml 85% orthophosphoric acid  
 0.05 ml, 8% , '-dipyridyl 0.05 ml, 3% aqueous ferric chloride 0.05 ml 가  
 1 ferrous dipyritydyl chromophore  
 525 nm .

Blois(15) . 2 ml 20mM  
 DPPH 1.0 ml 30 517nm  
 . 100- [( 가 / 가 ) × 100]

. SOD

SOD	Marklund	(16)	0.2 ml
tris-HCl buffer(50 mM	tris + 10 mM	EDTA, pH 8.5)	3.0 ml
pyrogallol 0.2 ml	가 25	10	7.2mM
		1.0N HCl	1.0 ml
420 nm			

Kato(17)	1 mM NaNO <sub>2</sub>	2 ml	1 ml	가 , 0.1N
HCl(pH 1.2), 0.2M	(pH 3.0, pH 6.0)			pH 1.2, 3.0, 6.0
	10 ml			37 1
	1 ml	2%	2 ml	30%

Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml  
 가 15 520 nm

Griess reagent 가 ,  
 가 가 (%) .

± ,  
 =0.05 Duncan's multiple test

3.

가.

가	가
TBARS	Fig. 1
hydroxyl radical(·OH)	0.18 MDA ppm 가 TBARS
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.05 MDA ppm)	(P<0.05). Halliwell (18)
hydroxyl radical	4 mM KO <sub>2</sub>

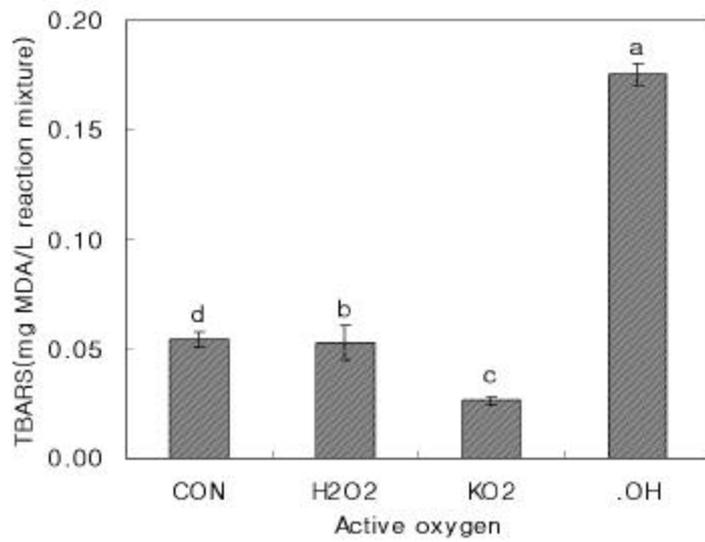
가 superoxide 가

(19)

4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone

280  $\mu$ M

90%



**Fig. 1. Effects of active oxygen on lipid oxidation in oil emulsion.** Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$

, Fig. 2

가 0.05 MDA ppm

가

, 가

(0.09 MDA

ppm)

TBARS

가

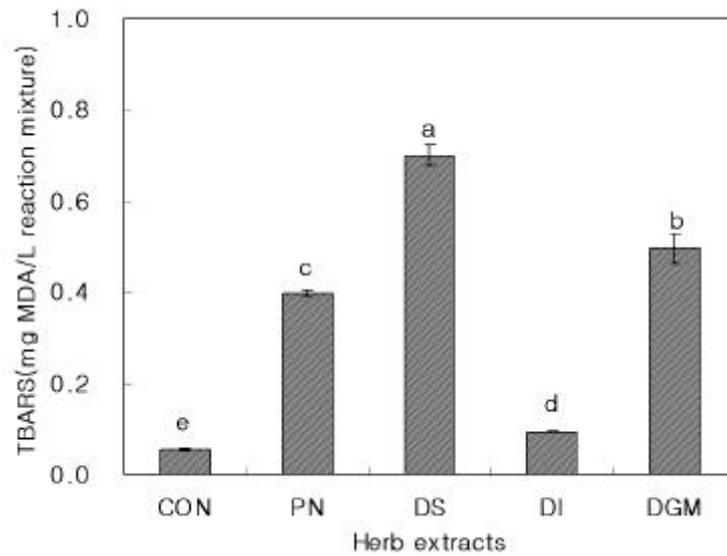
가

가 . Fig. 3

가 TBARS

가

Fig. 1 Fig. 2



**Fig. 2. Effects of several herb extracts without active oxygen on lipid oxidation in oil emulsion.** CON: Control, PN: Hot water extract of Pine Needle, DS: Hot water extract of Dansam, DI: Hot water extract of Doin, DGM: Hot water extract of Danggimi. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$

. Iron sources

Kanner (20) free ionic iron

, Ahn (21)

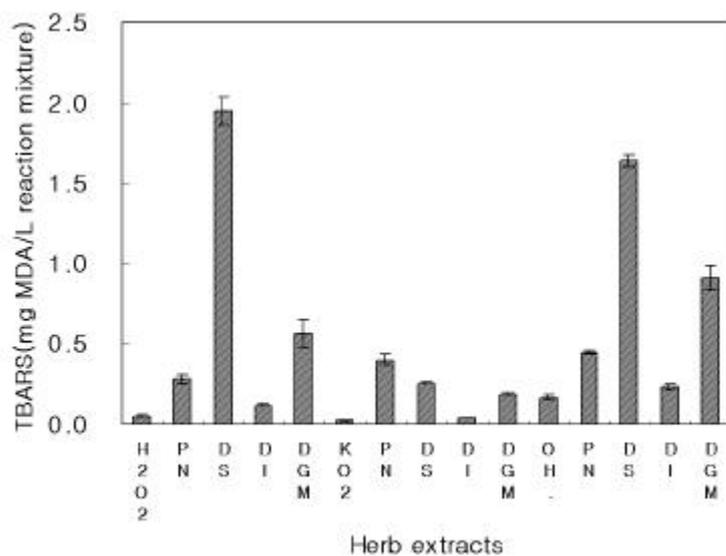
iron

iron free ionic iron

, Table 1

Fe<sup>2+</sup> ion





**Fig. 3. Effects of several herb extracts reacted with active oxygen on lipid oxidation in oil emulsion. CON: Control, PN: Hot water extract of Pine Needle, DS: Hot water extract of Dansam, DI: Hot water extract of Doin, DGM: Hot water extract of Danggimi. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at P<0.05**

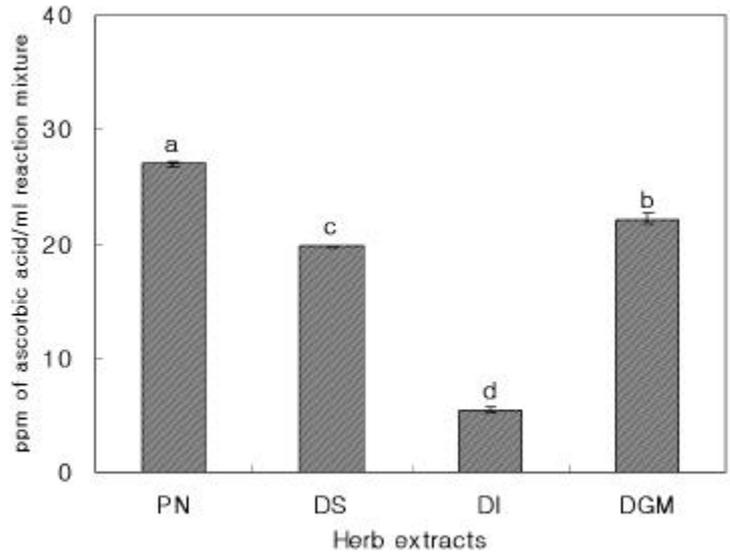
**Table 2. The content<sup>1)</sup> of Fe<sup>2+</sup> and total iron in hot water soluble fractions from several herbs**

Several herbs	Fe <sup>2+</sup> iron(ppm)	Total iron(ppm)
PN	1.59f	2.85d
DS	3.17d	11.27a
DI	0.62g	2.15e
DGM	7.29c	7.75b

1) ppm of iron/ml reaction mixture

Symbols are the same as Fig. 2

Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at P<0.05



**Fig. 4. The content of ascorbic acid in hot water soluble fractions from several herbs.** CON: Control, PN: Hot water extract of Pine Needle, DS: Hot water extract of Dansam, DI: Hot water extract of Doin, DGM: Hot water extract of Danggimi. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at P<0.05. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at P<0.05

radical 가 (Fig. 1),

(22).

가 .

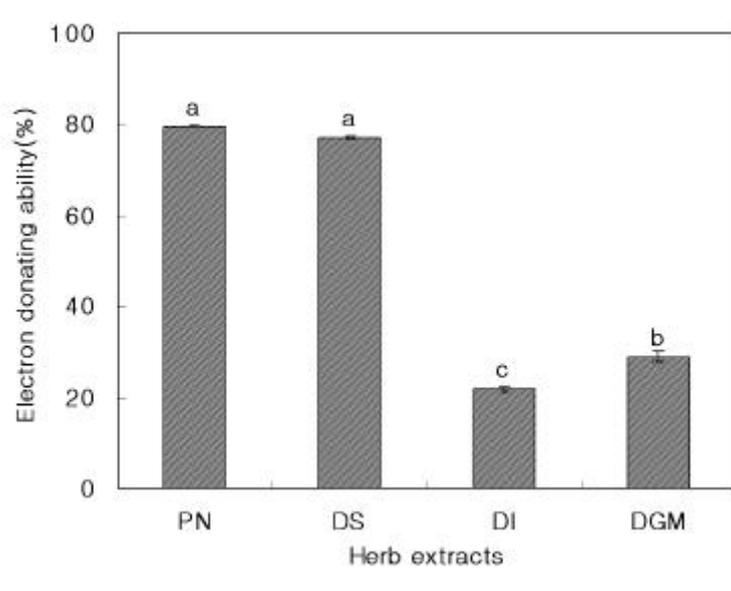
70% acetone 80.9, 82.6%

(11)  
77.11%

79.54%,

21.75%, 28.83%

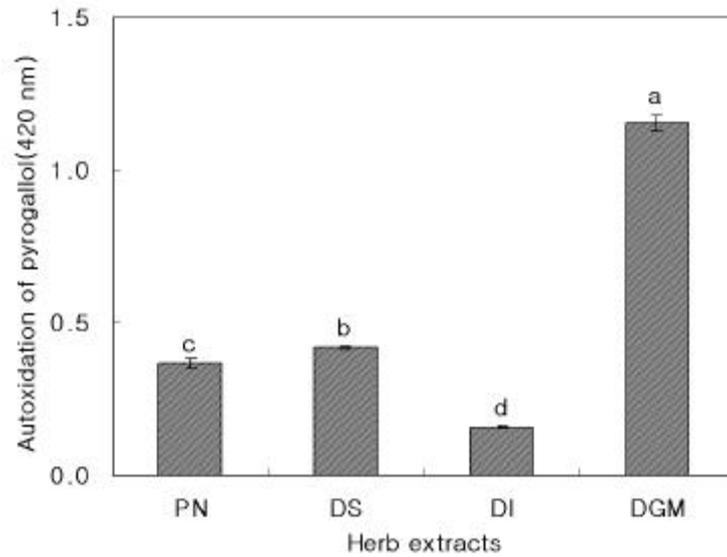
(Fig. 5).



**Fig. 5. Electron donating ability of hot water soluble fractions from several herbs.** CON: Control, PN: Hot water extract of Pine Needle, DS: Hot water extract of Dansam, DI: Hot water extract of Doin, DGM: Hot water extract of Danggimi. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ . Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$

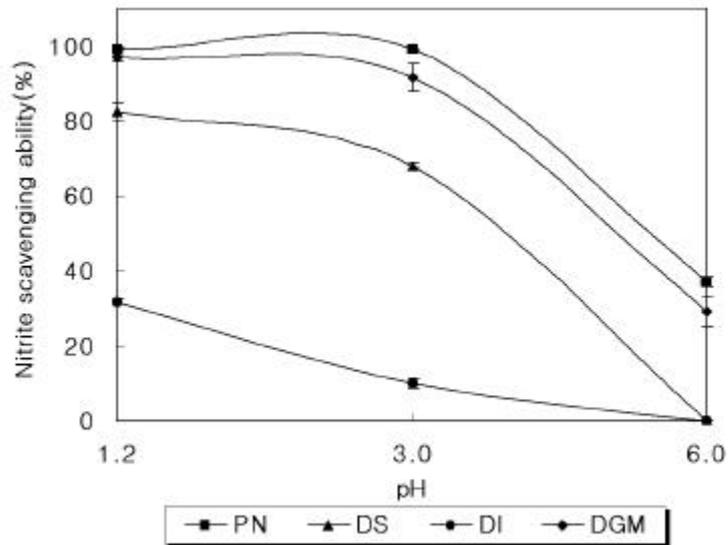
. Superoxide dismutase(SOD)

가 4 superoxide(O<sub>2</sub>-)  
 superoxide  
 pyrogallol . , superoxide  
 pyrogallol  
 가 pyrogallol  
 superoxide  
 . , 420nm 가 0.16,  
 0.37 0.42 1.15  
 ( $P < 0.05$ ). , SOD  
 (Fig. 6).



**Fig. 6. Autoxidation of pyrogallol in hot water soluble fractions from several herbs.** CON: Control, PN: Hot water extract of Pine Needle, DS: Hot water extract of Dansam, DI: Hot water extract of Doin, DGM: Hot water extract of Danggimi. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at P<0.05. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at P<0.05

(23) 2, 3  
 , 2,000 ppm (24)  
 (11) pH  
 (Fig. 7), pH 1.2 가 99.03%, 96.90%  
 , pH 3.0



**Fig. 7. Nitrite scavenging effects of hot water soluble fractions from several herbs.** CON: Control, PN: Hot water extract of Pine Needle, DS: Hot water extract of Dansam, DI: Hot water extract of Doin, DGM: Hot water extract of Danggimi. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

4.

(Hydrogen peroxide, Superoxide, Hydroxyl radical) iron sources *in vitro*  
oil emulsion · OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KO<sub>2</sub>  
· OH · Fe<sup>2+</sup> ion binding  
· Fe<sup>2+</sup> ion , 가  
, total iron · Ascorbic acid  
26.97 ppm 가 , 19.74,  
22.14 ppm , 5.50 ppm (P < 0.05).

, 79.54 %, 77.11 % ,  
 , SOD 0.16 가  
 , pyrogallol SOD  
 (P<0.05). pH  
 , 가 pH 1.2 99.8%, 98.6%  
 , pH 가 , ,  
 pH 6.0  
 가

## 5.

1. 藤券正生 : 食品機能, 機能性 食品創製の基盤. 學會出版セソタ-, p.344(1988)
2. Haumann, B. F. : Antioxidants; Firms seeking products they can label as 'natural'. *Inform*, **1**, 1002(1990)
3. Corl, M. M. : Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and their mode of action. *JA OCS*, **51**, 321(1974)
4. Farag, R. S., Badei, A. Z. M. A. and Baroty, G. S. A. : Influence of thyme and clove essential oils in cotten seed oil oxidation. *JA OCS*, **66**, 800(1989)
5. Branen, A. L. : Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JA OCS*, **52**, 59(1975)
6. Farag, R. S., Ali, M. N. and Taka, H. S. : Use of some essential oils as natural preservatives for butter. *JA OCS*, **68**, 188(1990)
7. Osawa, T. and Namiki, M. : A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 735(1981)
8. Kasuga, A., Aoyagi, Y. and Sugahara, T. : Antioxidants activities of edible plants. *日本食品工業學會誌*, **35**, 22(1988)
9. Larson, R. A. : The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**, 969(1988)
10. 築原和 : 食用植物中の生理的 機能成分. *食品と開發*, **27**, 29(1992)

11. , , : , , *Food Cosmetol. Toxicol.*, **27**(6), 978(1995)
12. Buege, J. A. and Aust, S. D. : Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, **105**, 302(1978)
13. Carter, P. : Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent(ferrozine). *Anal. Biochem.*, **40**, 450(1971)
14. Sikic, B. I., Mimnaugh, E. G., Litterst, C. L., and Gram, T. E. : The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. and Biophys.* **179**, 663(1977)
15. Blois, M. S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **4617**, 1198(1958)
16. Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismmutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 468(1974)
17. Kato, H., Lee., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. : Inhibition of nitrosamine formmation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1333(1987)
18. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 501(1986)
19. , , : 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone . *J. Agric. Food Chem.* **37**(4), 310(1994)
20. Kanner, J., Hazen, B., and Doll, L. : Catalytic "free" iron ions in muscle foods. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 412(1988)
21. Ahn, D. U., Wolfe, F. H., and Sim, J. S. : The effect of free and bound iron on lipid peroxidation in turkey meat. *Poultry Science*, **72**, 209(1993)
22. Harman, D. : The free-radical theory of aging. In morden biological theories of aging, Warner, H. R., Butler, R. N., Sprott, R. L., and Schneider, E. L.(ed.), Raven Press, NY, p.89(1987)
23. , , , :

- . , **25**(5), 530(1993)
24. Wite, J. W. : Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 886(1975)

**Effect of ethanol extracts in *Pinus densiflora*,  
*Lithospermum erythrorhizon* on the lipid oxidation of  
oil emulsion**

## Abstract

This study was carried out to investigate the effects of ethanol extracts on lipid oxidation of oil emulsion. The results are as follows; The scavenging ability of plant extracts for hydroxyl radical was found, and plant extracts played an important role as a strong chelating agents to bind iron if Fe<sup>2+</sup> ion exists in oil emulsion. *Pinus densiflora*(PD), *Lithospermum erythrorhizon*(LE) and PD+LE acted as strong chelating agents to bind iron to reduce lipid oxidation in oil emulsion. The content of Fe<sup>2+</sup> ion in ethanol extracts from LE and PD+LE were significantly higher(P<0.05) than that of ethanol extracts from PD. The content of total iron has same tendency. The ascorbic acid content of PD(16.36 ppm) was slightly higher than those of LE(13.08 ppm). Electron donating ability of PD was significantly higher (P<0.05) than those of LE. However, the superoxide(SOD)-like ability of LE showed a little higher than those of LE and PD+LE, which means the strong antioxidant activity of LE. The nitrite scavenging effects were dependent on pH value, however, they decreased as pH value increased. Especially, they almost didn't show the nitrite scavenging effect in pH 6.0. In conclusion, the PD and LE extracts may be used as natural antioxidant sources to reduce lipid oxidation in oil emulsion.

1.

enzyme(superoxide dismutase) enzyme free radical radical (1- 5) radical lipid radical Fe<sup>2+</sup> heme (6). Superoxide radical 가 , , (7- 9). superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathion (10, 11). 가 가 (12- 15), (16). vitamin, minerals, polyphenol (17), 가 (18). , (*Pinus densiflora*) (*Lithospermum erythrorhizon*) free radical 가 가

2.

가.

, Trichloroacetic acid(TCA), Griess reagent(sulfanilic acid, naphthylamine) Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO), 2-thiobarbituric acid (TBA) Eastern Organic Chemicals (Rochester, NY)

50g ethanol 1  
24 hr Whatman paper No. 1

. Oil emulsion

Oil emulsion, maleic acid buffer(pH 6.5) 8ml  
Tween- 20, 50 $\mu$ l 0.5 ml 15 KOH 2 3  
0.1N KCl pH 6.5

oil emulsion 0.5ml 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 50 ppm Fe<sup>2+</sup>(·OH) 50  
ppm Fe<sup>2+</sup> 0.1 ml 0.1 ml 가 1 ml  
가

. Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) Buege Aust  
(19) . 1 ml 37 water bath  
1 . 7.2% dibutylhydroxytoluene  
(BHT) 50 $\mu$ l 가  
2 ml TCA/TBA 가 , 15 가  
. 가 2,000 × g 15  
(HITACHI UV- 2001) 531 nm ,

가 . TBARS  
 mg malondialdehyde(MDA) .

(Nonheme iron)

Ferrozine iron (20) . Total iron  
 1 ml , 2% ascorbic acid (w/v) 0.1 ml 가  
 (22 ) 5 . 11.3% TCA(w/v) 1  
 ml 가 3,000 × g 15 .  
 2 ml 0.8 ml 10% ammonium acetate 0.2 ml  
 ferrozine color reagent (75 mg ferrozine 75 mg neocuproine HCl  
 가 ) 가 , 3,000 × g 15  
 5 562 nm . Ferrous  
 iron(Fe<sup>2+</sup>) 0.1 ml ascorbate 0.1ml TCA 가

(Ascorbic acid)

Sikic (21) 10 10,000 × g  
 0.5 ml 5% TCA 2 ml , 4  
 10 15,000 × g 0.5 ml 85%  
 orthophosphoric acid 0.05 ml, 8% , '-dipyridyl 0.05 ml, 3% aqueous ferric  
 chloride 0.05 ml 가 . 1 ferrous dipyridyl chromophore  
 525 nm .

Blois(22)

2 ml 2 ×  
 10-4M DPPH(1,1- diphenyl- 1- picrylhydrazyl) 1.0 ml vortex 30  
 517 nm . 100- [(  
 가 / 가 ) × 100] .

. SOD

SOD Marklund Marklund(23)

0.2 ml tris- HCl buffer(50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3.0 ml 7.2 ×  
 10<sup>-3</sup>M pyrogallol 0.2 ml 가 25 10 1.0N HCl 1.0 ml  
 420 nm .

Kato (24) 1 mM NaNO<sub>2</sub> 2 ml 1 ml 가 ,  
 0.1N HCl(pH 1.2), 0.2M (pH 3.0, pH 6.0) pH 1.2, 3.0,  
 6.0 10 ml . 37 1

1 ml 2% 2 ml 30%  
 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1)  
 0.4 ml 가 vortex 15 520 nm  
 Griess reagent 가 ,  
 가 가 (%) .

± ,  
 =0.05 Duncan's multiple test

### 3.

가. ,

Fe<sup>2+</sup> hydroxyl radical  
 TBARS(2- thiobarbituric acid reactive substances)  
 4.26 MDA ppm , ,  
 + 1.10 MDA ppm, 2.12  
 MDA ppm, 1.78 MDA ppm

(Table 1).

**Table 1. Effect of plant extracts on lipid oxidation in oil emulsion treated with Fe<sup>2+</sup> ion and hydroxyl radical( ·OH)**

Table 1. Effect of plant extracts on lipid oxidation in oil emulsion treated with Fe<sup>2+</sup> ion and hydroxyl radical(·OH)

	Ferrous ion and Hydroxyl radical	
	Fe <sup>2+</sup>	·OH
CON	2.13±0.097 <sup>a</sup>	0.45±0.025 <sup>a</sup>
PD	0.55±0.005 <sup>d</sup>	0.33±0.002 <sup>b</sup>
LE	1.06±0.006 <sup>b</sup>	0.32±0.007 <sup>c</sup>
PD+LE	0.89±0.016 <sup>c</sup>	0.31±0.008 <sup>d</sup>

CON: Control, PD: *Pinus Densiflora*, LE: *Lithospermum Erythrorhizon*, PD+LE: *Pinus Densiflora* + *Lithospermum Erythrorhizon*. <sup>a-d</sup>Means in the same column bearing different superscript are significantly different(P<0.05).

식물체 추출물의 항산화 효과는 여러 연구자들에 의해서 보고되고 있는데 박 등(25)은 유자와 칩으로부터 추출한 에탄올 추출물과 물 추출물의 항산화 효과를 검토한 결과 두 추출물 모두에서 우수한 항산화 효과를 나타내었으며, 특히 에탄올 추출물에서는 추출물의 농도가 증가할수록 항산화 효과는 크게 나타났으며, 농도 5 mg 이상 첨가시 유자과육, 유자피질, 칩 모두 우수한 것으로 나타났다고 보고하였다. 이러한 항산화 효과에 대하여 You 등(26)은 유자에 많이 함유된 ascorbic acid 보다는 가열 추출과정에서 생성된 갈변물질에 기인하거나 Oh 등(27)이 보고한 칩의 isoflavonoid 물질, 페놀성화합물과 flavone 유도체들에 기인하는 것으로 추측된다. 솔잎의 항산화성 물질을 구명하기 위하여 Bu 등(28)이 구조 분석한 결과 4-hydroxy-5-methyl-3 [H]-furanone이라는 물질로 밝혀졌고, 이것은 280 μM에서 지질과산화 반응을 90%이상 억제시킨다고 보고하였다. 또한, 활성산소종 중에서도 지방산화를 일으키고 노화촉진 역할을 한다는 hydroxyl radical(29)에 의한 각 추출물의 포집효과는 대조구의 지방산화 정도가 0.90 MDA ppm을 나타내었고, 솔잎추출물에서는 0.65 MDA ppm, 자초추출물에서는 0.63 MDA ppm 그리고, 솔잎과 자초추출 복합물에서는 0.63 MDA ppm을 나타내어 대조구에 비하여 솔잎추출물이 27.8%, 자초추출물이 30.0% 그리고 솔잎과 자초추출 복합물에서는 30.0%의 hydroxyl radical 포집능력을 나타내었다 (P<0.05). 이것은 추출물 모두 Fe<sup>2+</sup>이온과 hydroxyl radical에 대해서 binding 능력과 포집능력이 우수하다는 것을 나타내는 것이다. 이러한 추출물들의 산화촉

진제 역할을 하는  $Fe^{2+}$  ion 함량은 솔잎이 0.72 mg/100 g, 자초 2.16 mg/100 g, 솔잎과 자초복합물 2.18 mg/100 g 으로 솔잎추출물이 가장 낮았다. Total iron 함량은 솔잎이 0.88 mg/100 g, 자초 2.58 mg/100 g, 솔잎과 자초복합물이 2.54 mg/100 g으로 자초 추출물의 total iron 함량이 가장 높았으나(Table 2), Lee와 Tchai(30)가 보고한 상추 4.8 mg/100 g 과 비름 5.4 mg/100 g 보다는 낮은 함량을 나타내었다. 항산화제 역할을 하는 ascorbic acid 함량을 측정(Table 2.)한 결과 솔잎이 32.74 mg/100 g, 자초가 26.12 mg/100 g 그리고, 솔잎과 자초복합물이 39.48 mg/100 g 을 나타내었다. 이는 Nha와 Yang(31)의 보고에서 밤 21.8 mg/100 g, Kim(32)의 고추잎 25.7 mg/100 g 과 Kim 등(33)의 명일엽 전초 20.2 mg/100 g 보다는 전반적으로 높은 수치를 나타내어, 자초보다는 솔잎추출물의 항산화 효과가 우수한 추출물임을 나타내었다( $P < 0.05$ ).

Table 2. The content of  $Fe^{2+}$ , total iron and ascorbic acid in ethanol extracts from plants

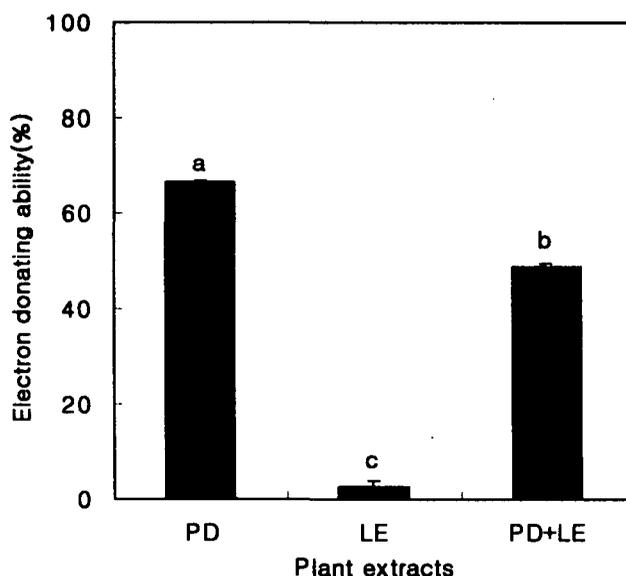
	Iron sources and ascorbic acid		
	$Fe^{2+}$	Total	Ascorbic acid
PD	$0.72 \pm 0.019^a$	$0.87 \pm 0.007^b$	$32.74 \pm 1.560^b$
LE	$2.16 \pm 0.106^b$	$2.56 \pm 0.054^a$	$26.12 \pm 0.600^c$
PD+LE	$2.18 \pm 0.103^b$	$2.55 \pm 0.091^a$	$39.48 \pm 2.320^a$

PD: *Pinus Densiflora*, LE: *Lithospermum Erythrorhizon*, PD+LE: *Pinus Densiflora* + *Lithospermum Erythrorhizon*. <sup>a-c</sup>Means in the same column bearing different superscript are significantly different( $P < 0.05$ ).

#### 나. 전자공여능

라디칼의 소거작용은 라디칼을 포집하여 소거시키는 방법과 라디칼에 전자를 공여하여 안정화시키는 방법이 있다. 이 두 방법 중 후자의 방법인 전자공여능은 지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도가 된다. 따라서, 이러한 기준에 의해 전자공여능을 측정한 결과(Fig. 1) 솔잎추출물이 66.47%로 높은 전자공여능을 나타내었으나( $P < 0.05$ ), 자초추출물은 2.67%로 매우 낮은 전자공여능을 나타내었다. 그러나, 솔잎과 자초복합물은 48.89%을 나타내어 솔잎추출물에 의한 전자공여능 효과가

증진되었다. 이러한 결과는 Kang 등(18)이 보고한 70% acetone으로 추출한 솔잎이 82.6%, 쪽추출물이 45.8%의 전자공여능 효과를 나타낸 결과보다 다소 낮은 수치를 나타내었으나 전반적으로 솔잎의 전자공여능 효과가 우수하였다.



**Fig. 1. Electron donating ability of ethanol extracts from plants.** PD: *Pinus Densiflora*, LE: *Lithospermum Erythrorhizon*, PD+LE: *Pinus Densiflora* + *Lithospermum Erythrorhizon*. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

#### 다. SOD 유사활성 물질

산소가 물이 되기까지 4전자환원과정중 첫번째 산물인 superoxide( $\cdot O_2^-$ )의 산화억제 작용을 알아보기 위하여 Fig. 2에서는 superoxide dismutase(SOD) 효소와 유사한 역할을 하는 SOD 유사활성물질을 측정하였다. 즉, 이 방법은 pyrogallol 시약이 superoxide와 반응하여 갈변물질을 내는 원리를 이용하여 자동산화반응을 지연시키거나 낮추어서 SOD유사활성물질을 찾아내는 방법으로 많이 사용되고 있다. Pyrogallol 자동산화 반응으로 420 nm 에서 흡광도 수치를

구한 결과 솔잎이 0.55, 자초가 0.30 그리고, 솔잎과 자초복합물이 0.42를 나타내어 솔잎보다는 자초가 pyrogallol의 자동산화를 방지하는 효과가 인정되었다 ( $P < 0.05$ ). 따라서, SOD 유사활성물질은 솔잎에 비해 자초가 우수한 superoxide 분해능을 가진 것으로 사료된다(Fig. 2).

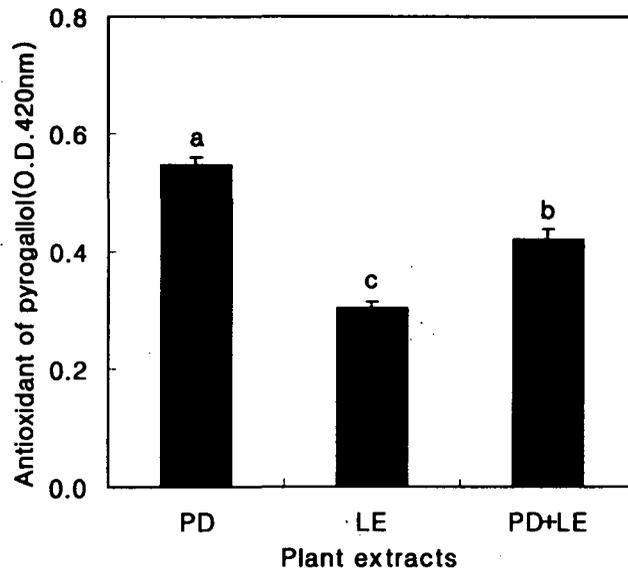
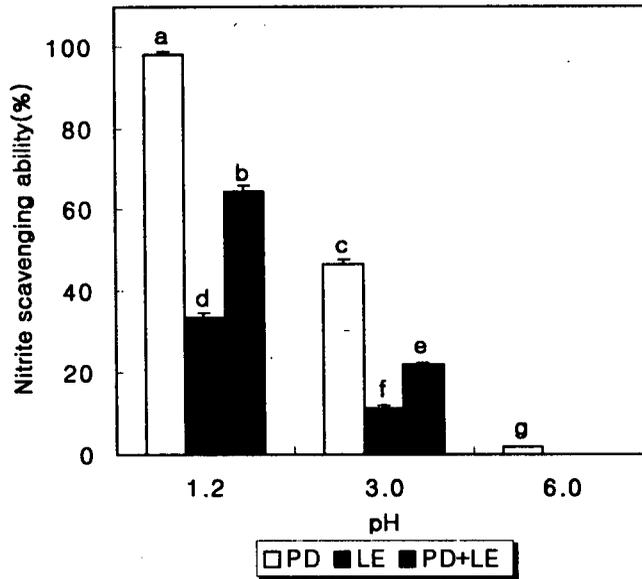


Fig. 2. Autoxidation of pyrogallol in ethanol extracts from plants. Symbols are the same Fig. 1. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

#### 라. 아질산염 소거작용

아질산염은 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약에 존재하는 2급, 3급 아민류와 결합하여 발암의 전구물질을 형성하는 것으로 알려져 있고(34) 채소류와 근채류 등에 많이 함유되어 있으며, 어떤 것은 2,000ppm까지 검출된다고 보고되어 있다(35). 이러한 아질산염의 소거작용은 Kim 등(36)과 같이 pH의 감소에 따라 소거능이 우수한 것으로 나타났으며(Fig. 3), pH 1.2에서 솔잎, 자초가 각각 97.95%, 33.53%의 아질산염 소거능을 나타내었는데 자초보다 솔잎이 강한

아질산염 소거능을 나타내었다. 그러나, pH가 증가할수록 아질산염 소거능은 감소하는 경향이었으며, pH 6.0에서는 솔잎(2.03%)을 제외하고는 아질산염 소거능을 나타내지 않았다.



**Fig. 3. Nitrite scavenging effects of ethanol extracts from plants.** Symbols are the same Fig. 1. Values are means of 4 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

#### 4. 요약

천연항산화제로서 지방산화를 억제하는 천연산화방지제로 솔잎, 자초, 솔잎+자초 복합추출물을 검토한 결과 솔잎추출물이 가장 강한  $Fe^{2+}$  ion binding 능력을 나타내었으며, 자초, 솔잎+자초복합추출물도 우수한 효과를 나타내었다. 활성산소중 지방산화에 결정적인 역할을 하는 hydroxyl radical 포집능력 역시 추출물 모두 우수하였으며, 지방산화 촉진인자인 iron함량은 자초보다는 솔잎이  $Fe^{2+}$

ion 및 total iron 함량이 낮았다. 또한, 항산화제 함량의 척도가 되는 vitamin C 함량은 솔잎 추출물이 자초보다 높아 항산화력이 우수한 추출물로 나타났으며, 이러한 추출물에 대해 항산화능력을 다각적으로 평가하기 위하여 전자공여능, SOD 유사활성물질 및 아질산염 분해능을 측정하였다. 전자공여능은 자초보다는 솔잎이 우수하였고, 솔잎과 자초를 혼합시킨 처리구는 자초 단독보다는 높은 전자공여능을 나타내었다. 아질산염 분해능도 솔잎이 자초보다 pH 1.2 와 pH 3.0에서 우수한 분해능을 나타내어 기능성 재료로 이용될 수 있음을 시사하고 있다. 그러나, pyrogallol의 자동산화를 낮추어 줄 수 있는 물질이 있다면 SOD 유사활성 물질이 어느 정도 함유되어 있다고 평가하는 방법을 토대로 SOD 유사활성을 평가한 결과 자초가 솔잎보다 pyrogallol 자동산화를 방지하는 효과가 인정되었다. 이러한 결과는 어떤 면에서 자초도 좋은 항산화 재료로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

## 5. 문 헌

1. Babizhayev, M. A., Seguin, M. C., Gueyne, J., Evstigneeva, R. P., Ageyeva, E. A. and Zheltukhina, G. A.: L-carnosine( $\beta$ -alanyl-L-histidine) and carbinine ( $\beta$ -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem. J.*, **304**, 509 (1994)
2. Chan, W. K. M., Decker, E. A., Lee, J. B. and Butterfield, D. A.: EPR spintrapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. *J. Agric. Food Chem.*, **42**(7), 1407-1410(1994)
3. Dahl, A., Midden, W. R. and Hartman, P. E.: Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochem. Photobiol.*, **47**, 357(1988)
4. Decker, E. A., Crum, A. D. and Calvert, J. T.: Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.*, **40**(5), 756-759(1992)
5. Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C. and Ames, B. N.: Antioxidant

- activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**, 3175(1988)
6. Kwak, C. S.: Effects of dietary fats on lipid peroxidation, drug metabolizing enzyme activities and eicosanoid productions in 2-acetylaminofluorene-treated rats. D.C. Thesis, Seoul Univ., Seoul, Korea(1991)
  7. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219**, 1-14(1984)
  8. Petrone, W. F., English, D. K., Wong, K. and McCord, J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A., **77**, 1159(1980)
  9. Wei, C. E., Allen, K. and Misra, H. P.: *J. Appl. Toxicol.*, 169(1989)
  10. Pryor, W. A.: Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reaction. *Annu. Rev. Physiol.*, **48**, 657(1986)
  11. Saul, R. L., Gee, P. and Ames, B. N.: Free radicals, DNA damage and aging. In Modern Biological Theories of aging. Warner, H. R., Butler, R. N. Sprott, R. L. and Schneider, E. L. (Ed.), Raven Press, NY, USA, p.113(1987)
  12. Akaike, T., Ijiri, S., Sato, K., Katsuki, T. and Maeda, H.: Determination of peroxy radical-scavenging activity in food by using bactericidal action of alkyl peroxy radical. *J. Agr. Food Chem.*, **43**, 1864(1995)
  13. Warner, H. R.: Overview: Mechanisms of antioxidant action on life span. *Toxicol. Ind. Health*, **9**, 151(1993)
  14. Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S. and Aruoma, O. I.: Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**(1&2), 7(1995)
  15. Thomas, M. J.: The role of free radicals and antioxidants: How do you know that they are working? *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**(1&2), 21(1995)
  16. Pratt, D. E.: Natural antioxidants from plant materials. In "Phenolic compounds in food and their effects on health(II)" Huang, M. T., Ho, S. T. and Lee, C. Y.(eds.), *Am. Chem. Soc.*, Washington, DC, 54(1992)
  17. 築原和毅: 食用植物中の生理的機能成分. *食品と開発*, **27**, 29(1992)

18. Kang, Y. H., Park, Y. K., Oh, S. Y. and Moon, K. D.: Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(6), 978-984(1995)
19. Buege, J. A. and Aust, S. D.: Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, **105**, 302(1978)
20. Carter, P.: Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent(ferrozine). *Anal. Biochem.*, **40**, 450(1971)
21. Sikic, B. I., Mimnaugh, E. G., Litterst, C. L. and Gram, T. E.: The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **179**, 663(1977)
22. Blois, M. S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **4617**, 1198(1958)
23. Marklund, S. and Marklund, G.: Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 468(1974)
24. Kato, H., Lee, Chuyen, N.V., Kim, S. B. and Hayase, F.: Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1333(1987)
25. 박진우, 이문주, 김동수. 1993. 차류 소재의 기능성에 관한 연구, 1. 유자와 찻 추출물의 항산화성 및 아질산염소거작용. 동의공업전문대학 논문집. 1.
26. You, B. J., Chang, M. H. and Jeong, I. H.: "Antioxygenic effects of browning reaction product obtained from L-ascorbic acid solution". *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**(5), 622-626(1991)
27. Oh, M. J., Lee, K. S., Son, H. Y. and Kim, S. Y.: "Antioxidative components of pueraria rott". *Korean J. Food Sci. Technol.*, **22**(7), 793-798 (1990)
28. Bu, Y. C., Jeon, C. O. and Or, G. Y.: Separation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone of antioxidants from pine needle. *Korean Agri. Chem. Biotech.*, **37**(4), 310-314(1994)
29. Kanner, J., Hazen, B. and Doll, L.: Catalytic "free" iron ions in muscle

- foods. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 412(1988)
30. Lee, E. K. and Tchai, B. S.: A study of iron contents of blood-making foodstuffs in relation to dietary therapy in Tong-Eui-Bo-Gam. *J. Korean Soc. Nutr.*, 10(2), 54(1977)
  31. Nha, Y. A. and Yang, C. B.: Changes of constituent components in chestnut during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(6), 1164-1170 (1996)
  32. Kim, K. O.: Rapid determination of ascorbic acid in red pepper leaves by near-infrared reflectance spectroscopic analysis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27(3), 393-398(1998)
  33. Kim, O. K., Kung, S. S., Park, W. B., Lee, M. W. and Ham, S. S.: The nutritional components of aerial whole plant and juice of *Angelica keiskei* Koidz. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 24(6), 592-596(1992)
  34. Do, J. Y., Kim, S. B., Park, Y. H., Park, Y. B. and Kim, D. S.: The nitrite-scavenging effects by the component of traditional tea materials. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25(5), 530-534(1993)
  35. Wite, J. W.: Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *J. Agric. Food Chem.*, 23, 886(1975)
  36. Kim, S. M., Cho, Y. S., Kim, E. J., Bae, M. J., Han, J. P., Lee, S. H. and Sung, S.: Effect of hot water extracts of *Salvia miltiorrhiza* bge., *Prunus persica* stokes, *Angelica gigas* nakai and *Pinus strobus* on lipid oxidation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27(3), 399-405(1998)

### 제 3 절 제조방법별 솔잎추출물의 항산화성 검토

## Antioxidants of pine needle extracts according to preparation method

#### Abstract

This study was carried out to investigate the effects of pine needle extracts on lipid oxidation and free radical reaction in iron sources reacted with active oxygen species. The results were summarized as follow; the catalytic effects of active oxygen on lipid oxidation in oil emulsion tended to be showed  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{KO}_2$  in order. At the same time, pine needle extracts itself were tended to be showed a little catalytic effects. Active oxygen scavenging ability of pine needle extracts didn't show, but pine needle extracts played role as a strong chelating agents to bind iron ion if  $\text{Fe}^{2+}$  ion exist in oil emulsion. The content of  $\text{Fe}^{2+}$  ion and total iron in CPNP were higher than those of HPNP and FPN. The content of ascorbic acid of HPNP showed the highest (167.97 mg/100g) among several pine needle extracts. Electron donating ability of HPNP and CPNP were 81 % and 78 %, respectively, which were showed higher content than those of FPN. The SOD-like activity of HPNP showed 44.30 %, compared to other pine needle extracts which means the most strong antioxidant reaction. The nitrite scavenging effects were tended to be different, depending on pH value as pH value was increased. Especially, they didn't show the nitrite scavenging effect in pH 6.0.

#### 1. 서 론

최근 국민들의 건강에 대한 관심이 증가함에 따른 건강 지향적인 식품개발이 활발히 진행되고 있으며, 기호식품에 있어서도 건강유지를 위한 기능성 제품이 상품화되어 왔다(1-3). 우리나라에서 자생하고 있는 소나무과 중에서 잣나무잎

은 민간요법에서는 임질과 매독의 치료약으로 사용되고 있으며(4), 국내부존자원 중 쉽게 얻을 수 있는 솔잎의 약리작용에 대해 한의서(5)와 민간요법(6)에 따르면 간장질환, 비뇨생식기계질환, 위장질환, 신경계질환, 순환기계질환, 피부질환 등에 효과가 있다고 보고되어 있고(7), 성분분석결과 솔잎에는 엽록소, 비타민 A와 비타민 K가 함유되어 있고, 그 외에도 단백질, 지방, 인, 철, 효소, 정유(식물성 휘발류, 테르펜 계열), 미네랄, 비타민 C가 함유되어 있으며, 체내의 노폐물을 배출시켜 신진대사를 활발하게 하는 성분들이 함유되어 있다고 알려져 있다(8). 솔잎은 예전부터 구황식물로 이용되어 온 점을 생각할 때 솔잎추출물은 혈청 콜레스테롤 저하효과를 갖고 있어 기능성 식품소재로 이용될 수 있다(9). 이러한 솔잎의 약용효과에 관한 실험으로 강 등(10)은 솔잎추출물 급여가 고지방식이를 섭취한 흰쥐에서 혈청과 간장 지질조성에 미치는 영향을 검토한 결과, 간장 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 솔잎추출물 급여군이 낮게 나타났고, 혈청 지질함량 및 동맥경화지수를 감소시켰으며 HDL-콜레스테롤을 증가시킴으로써 고지혈증 개선효과가 있고, 간장에서의 중성지방과 총 콜레스테롤 등 지질농도의 상승 억제효과가 있다고 보고하였다. 강 등(7)은 솔잎을 열수 및 70% acetone으로 처리하여 얻은 추출물로 기능성 검토를 수행하였는데, 솔잎의 열수 및 70% acetone 추출물 모두 polyphenol 성분 중 flavanol형 tannin의 함량이 60% 이상이었고, 항변이원성 실험에서는 70% acetone 추출물이 높은 억제 활성을 나타내었으나 angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해작용은 열수추출물이 61%로 저해능이 높았다고 보고하였다. 그러나, 솔잎추출물의 항산화성을 제조방법별로 검토한 보고는 없는 듯하여 여러가지 약리작용이 있는 솔잎을 제조방법(열풍건조구, 시판분말구, 생솔잎구)에 따라 열수추출하여 그 추출물의 항산화성을 검토하고자 이 실험을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험재료

열풍건조분말과 생솔잎 (*Pinus Densiflora*)은 경산대학교 인근야산에서 채취하여 사용하였으며, 시판분말은 경산시장내 농협에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 특급시약이고, trichloroacetic acid(TCA), grease reagent

(sulfanilic acid,  $\alpha$ -naphthylamine) 등은 Sigma chemical Co.(USA)에서 구입하였고, 2-thiobarbituric acid(TBA)는 Eastern Organic Chemicals(USA)에서 구입하였다.

#### 나. 시료제조와 추출

열풍건조분말은 세척·건조한 솔잎을 80℃의 열풍건조기에서 3시간 건조한 후 가정용 분쇄기(대우분쇄기 KMF-360)로 마쇄하여 분말화하였다. 준비된 열풍건조분말과 시판분말 50g과 생솔잎 100g에 각각 10배, 5배의 증류수를 가하여 85℃에서 3시간 동안 2회 반복 추출하여 실험에 사용하였다.

#### 다. 시료 조제

Oil emulsion은 사용하기 전에 만들고 pH 6.5로 보정한 maleic acid buffer, 8 ml를 넣은 다음 50  $\mu$ l의 Tween-20과 0.5 ml 정도의 아미노유를 넣고 15분간 교반한 후 KOH 2~3조각을 넣고 교반하면서 0.1 N HCl로 pH 6.5가 되도록 제조하여 사용하였다. 항산화성 실험에 사용된 시료 조제는 oil emulsion 0.5 ml에 산소종(40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, potassium superoxide(KO<sub>2</sub>), 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+50 ppm Fe<sup>2+</sup> 이온( $\cdot$ OH)) 0.1 ml를 가하고, 50 ppm Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 이온 0.1 ml와 솔잎추출물을 각각 0.1 ml씩 첨가하여 전체 1 ml가 되도록 증류수로 조정하여 4회 반복 실시하였다.

#### 라. Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 분석

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege 등의 방법(11)에 따라 측정하였다. 1 ml 반응 혼합물이 채워진 시험관을 37℃ water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나자마자 50  $\mu$ l dibutylhydroxytoluene(BHT) 7.2%를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000×g의 속도로 15분간 원심분리시켰다. 상정액을 흡광도(HITACHI UV-2001) 531 nm에서 측정하였고, 공시료는 시료대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 반응혼합물 ml에 대하여 생성되는 MDA  $\mu$ g으로 표시하였다.

마. Nonheme iron(비헴철)측정

Ferrozine iron 분석방법(12)을 변형하여 측정하였다. Total iron 분석을 위해서 1 ml 시료를 사용하였고, 여기에 2 % ascorbic acid (w/v) 0.1 ml를 가하여 혼합한 다음, 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 11.3 % TCA(w/v) 1 ml를 가하고 섞은 다음 반응물을 3,000×g에서 15분간 원심분리 시켰다. 상정액 2 ml를 시험관에 옮기고 0.8 ml의 10 % ammonium acetate와 0.2 ml의 ferrozine color reagent (75 mg ferrozine + 75 mg neocuproine + HCl 1 drop)를 가하여 섞는다. 그리고, 시료를 3,000×g에서 15분간 원심분리시킨 다음 5분 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferrous iron( $Fe^{2+}$ )분석은 ascorbic acid를 가하지 않고 TCA 0.1 ml를 가한 후 위의 방법과 같이 측정하였다.

바. Ascorbic acid 측정

Sikic 등(13)의 방법에 따라 시료를 10분 동안 10,000×g에서 원심분리시킨 후 상정액 0.5 ml를 취하여 5 % TCA 2 ml로 단백질을 침전시켰다. 다시, 4 °C에서 10분 동안 15,000×g에서 원심분리시켰다. 상정액 0.5 ml를 취하여 85 % orthophosphoric acid 0.05 ml, 8 %  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl 0.05 ml, 3 % aqueous ferric chloride 0.05 ml를 가한 후 1시간 동안 ferrous dipyridyl chromophore 물질이 생성되도록 실온에 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(14)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2 ml에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH 1.0 ml를 넣고 vortex한 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은  $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다.

아. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법(15)에 따라 각 시료 0.2 ml에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris + 10 mM EDTA) 3 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하고 25 °C에서 10분간 방치 다음 1 N HCl 1 ml로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여  $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다.

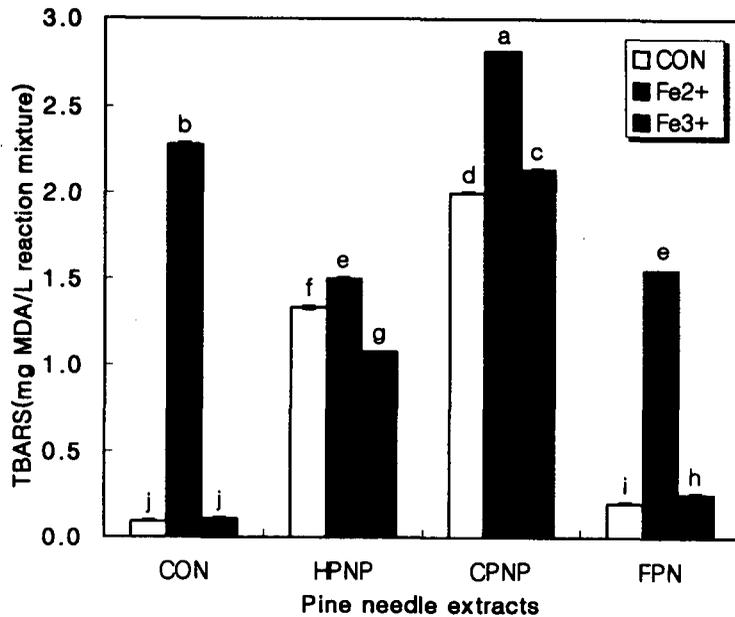
자. 아질산염 소거작용 측정

Kato 등(16)의 방법으로 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 2 ml에 각 시료 1 ml를 가하고, 0.1 N HCl(pH 1.2), 0.2 M 구연산 완충액(pH 3.0, pH 6.0)으로 각각 pH 1.2, 3.0, 6.0으로 보정한 다음 반응용액의 부피를 10 ml로 하였다. 이 용액을 37 °C에서 1 시간 반응시킨 후 각 반응액 1 ml를 취하여 2% 초산용액 2 ml와, 30% 초산용액으로 용해한 griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml를 가한 다음 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 griess reagent 대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은 100-[시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도]×100]으로 나타내었다.

### 3. 결과 및 고찰

가. 슬릿추출물이 iron관련 지방산화(TBARS)에 미치는 영향

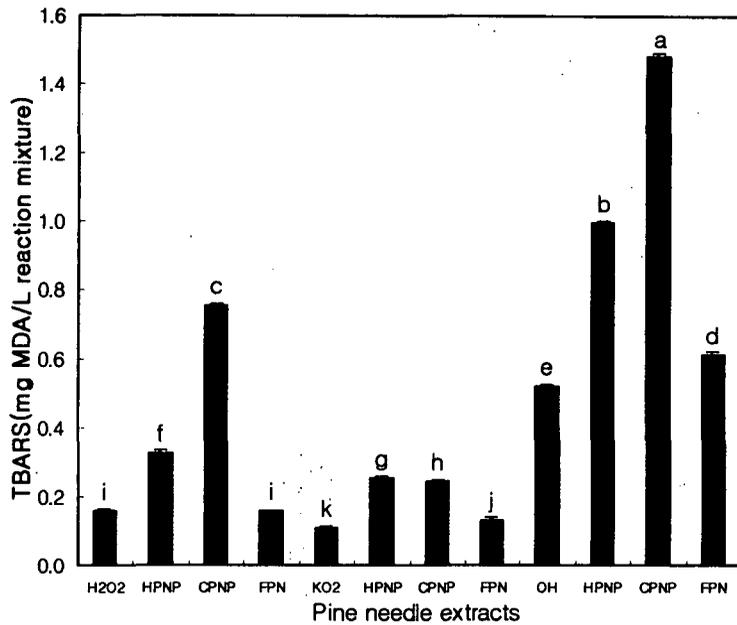
지방산화를 촉진하는 Fe<sup>2+</sup> 이온에 대한 각 추출물들의 지방산화 정도를 oil emulsion 상태에서 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. Fe<sup>2+</sup> 이온첨가구가 2.28 MDA ppm인 것에 비하여 HPNP와 FPN은 각각 1.50 MDA ppm, 1.56 MDA ppm으로 Fe<sup>2+</sup> 이온에 대한 binding능력이 우수하였으나, CPNP는 2.82 MDA ppm으로 지방산화를 오히려 촉진시켰다. 추출물에서 지방산화 촉진인자인 Fe<sup>2+</sup> 이온의 함량(Fig. 3)은 CPNP, HPNP, FPN이 각각 77.7 mg/100 g, 42.2 mg/100 g, 4.4 mg/100 g으로 나타나 Fe<sup>2+</sup> 이온이 지방산화에 미치는 영향을 알 수 있었으며, Fe<sup>3+</sup> 이온첨가구가 0.11 MDA ppm인 것에 비하여 CPNP, HPNP, FPN은 각각 2.14 MDA ppm, 1.08 MDA ppm, 0.26 MDA ppm순으로 나타나 Fe<sup>3+</sup> 이온에 대한 제조방법별 추출물의 binding능력은 없는 것으로 나타났다. Kanner 등(17)은 육제품에서 지방산화를 일으키는 중요한 촉매제는 free ionic iron이라고 하였고, Ahn 등(18)도 칠면조육에서 지방산화를 촉진하는 iron은 저장된 iron이 아니라 free ionic iron이라고 하여 역시 본 실험의 결과를 뒷받침하였다.



**Fig. 1. Effects of pine needle extracts reacted with iron sources on lipid oxidation in oil emulsion.** CON: Control, HPNP: Hot air drying of pine needle powder, CPNP: Commercial pine needle powder, FPN: Fresh pine needle. <sup>a-j</sup>: Means in the same column bearing different superscript are significantly different (P<0.05).

나. 활성 산소종( $H_2O_2$ ,  $KO_2$ ,  $\cdot OH$ )과 반응한 솔잎추출물이 지방산화에 미치는 영향  
 활성 산소종 존재 하에 솔잎추출물의 첨가가 지방산화에 미치는 영향을 알아  
 보고자 oil emulsion 상태에서 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)  
 를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 부 등(19)은 지방산화를 억제하는 물질을 솔잎  
 에서 구조 분석한 결과 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone이라는 물질이라고  
 하였고, 이것은  $280 \mu M$ 에서 지질과산화 반응을 90% 이상 억제시킨다고 보고하  
 였으나, 활성산소종과 반응한 추출물들은 활성 산소종 그 자체보다 지방산화도  
 가 오히려 높게 나타났으며, 가장 낮은 값을 나타낸 FPN도 0.131 MDA ppm으  
 로  $KO_2$ 보다 높게 나타나 활성산소종에 대한 포집능력은 없는 것으로 나타났다.  
 그리고, 40 mM의  $KO_2$ 가 0.108 MDA ppm으로 가장 낮게 나타났는데, 이는

superoxide 자체가 지방산화를 일으키는데 직접 관여하는 것이 아니라 다른 지방산화 촉진인자와 반응했을 때 지방산화를 일으키는 것을 간접적으로 증명하는 것이다.

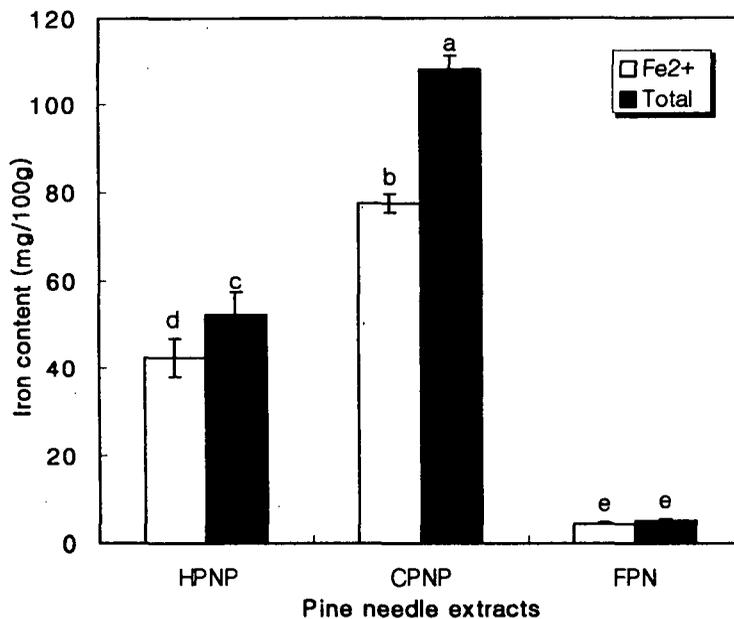


**Fig. 2. Effects of pine needle extracts reacted with active oxygen on lipid oxidation in oil emulsion.** CON: Control, HPNP: Hot air drying of pine needle powder, CPNP: Commercial pine needle powder, FPN: Fresh pine needle. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4 mM; KO<sub>2</sub>, 4 mM; ·OH, 5 ppm Fe<sup>2+</sup> + 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(final concentration). <sup>a-k</sup>: Means in the same column bearing different superscript are significantly different(P<0.05).

#### 다. Iron함량 측정

각 추출물들에 함유된 iron함량을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. Ferrous iron 함량은 FPN 0.45 mg/100 g, HPNP 4.22 mg/100 g, CPNP 7.7 mg/100 g순이었으며, total iron함량은 FPN 0.48 mg/100 g, HPNP 5.19 mg/100 g, CPNP 10.82 mg/100 g순으로 나타났다. 이는 iron을 가장 많이 함유한 CPNP가 지방산화를

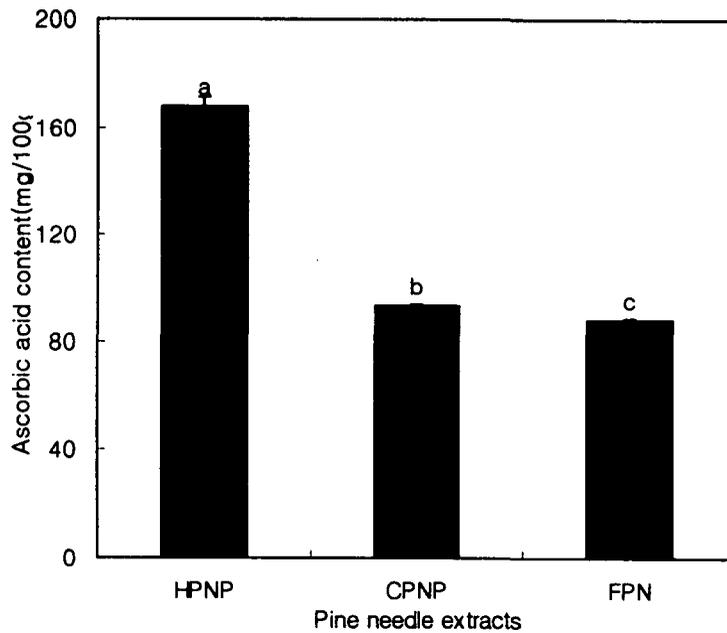
촉진한다는 것을 Fig. 1에서와 같이 보여준다. 이와 채(20)의 실험결과 total iron 함량이 검은 참깨와 흰 참깨는 모두 16 mg/100 g, 상추 4.8 mg/100 g, 도라지 6.2 mg/100 g, 단김 17.6 mg/100 g, 두릅 7.4 mg/100 g, 청각 8.7 mg/100 g 등으로 나타나, 일상적으로 섭취하고 있는 식품에 많은 iron이 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 이는 본 실험에서 FPN의 total iron 함량보다는 약간 높았으나 HPNP와 CPNP보다는 total iron 함량이 상당히 낮았다. 특히, CPNP의 total iron 함량이 높은 것은 시판솔잎분말을 제조하는 과정에서 iron의 혼입을 시사하는 것이다. Decker 등(21)은 iron이 결합된 ferritin의 농도를 분석물 1 ml당 ferritin에 결합한 iron의 농도를 0.5에서 3.0으로 증가시킴으로써 지방산화 촉매는 2.7배 증가하였다고 보고하였고, 이는 가열된 ferritin에 의한 TBARS의 증가는 ferritin분자내 구조가 바뀜으로써 ascorbic acid의 접근이 쉬워져 상호작용이 용이하고 따라서, ferritin에 결합되어 있는 iron의 유리가 쉬워지기 때문이라고 보고하였다.



**Fig. 3.** The content of Fe<sup>2+</sup> and total iron in pine needle extracts. CON: Control, HPNP: Hot air drying of pine needle powder, CPNP: Commercial pine needle powder, FPN: Fresh pine needle. <sup>a-c</sup>: Means in the same column bearing different superscript are significantly different(P<0.05).

#### 라. Ascorbic acid 함량 측정

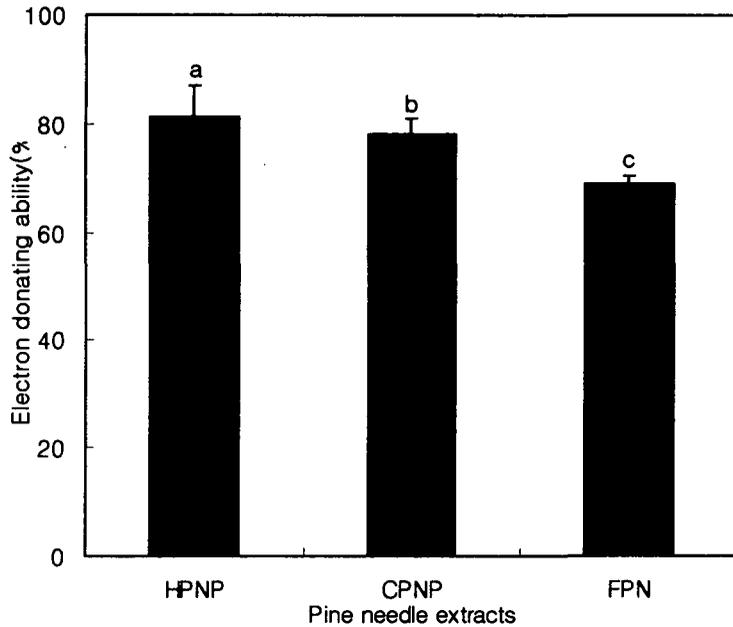
각 추출물에 함유된 ascorbic acid의 함량을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. HPNP 167.97 mg/100 g으로 가장 높았고, CPNP와 FPN은 각각 93.02 mg/100 g, 87.78 mg/100 g 순으로 나타났다. 앞서 Fig. 1에서 ferrous iron을 4.22 mg/100 g 함유한 HPNP가 ferrous iron을 0.45 mg/100 g 함유한 FPN과 유사한 지방산화도를 나타낸 것은 많은 ascorbic acid를 함유하고 있기 때문인 것으로 사료된다. 본 실험의 결과는 열수추출물의 ascorbic acid 함량을 측정한 결과로써 박 등(22)이 감잎의 처리를 재래식, 증자법, 발효법으로 행하여 ascorbic acid 함량을 측정한 결과 각각 13.1 mg/100 g, 70.0 mg/100 g, 551.9 mg/100 g 순으로 나타난 것에 비하여 함량에 차이가 있는 것으로 사료된다. 한편, 박과 김(23)은 보관상 최적 온도인 4 °C에서 24시간 동안 보관한 신선초 생즙의 ascorbic acid 함량이 44.5 mg/100 g으로 나타났다고 보고하였다. 그리고, 김 등(24)은 명일엽에는 27.8 mg/100 g의 ascorbic acid가 함유되어 있다고 보고하였다. L-ascorbic acid는 항산화제 및 항갈변제로 인정되어 식품, 음료 및 과일쥬스 등에 첨가되고 있다(25). 또한 L-ascorbic acid 유도체에는 강한 항산화제가 존재한다고 보고되고 있다(26, 27). 그리고 L-ascorbic acid 갈변반응물질의 항산화성에 대한 반응기구에 대하여는 Namiki 등(28)이 dehydro-L-ascorbic acid(DHA)와 tryptophan을 반응시켜 얻은 갈변반응물질 중에서 강한 항산화성의 주된 성분은 DHA와 tryptophan의 축합물로서 비교적 고분자물질이라고 발표한 것과 L-Ascorbic acid의 분해물질의 일종인 2,3-diketo-L-glulonic acid의 분해산물이 산소를 포집하는 효과를 나타낸다고 보고하였다.



**Fig. 4. The content of ascorbic acid in pine needle extracts.** CON: Control, HPNP: Hot air drying of pine needle powder, CPNP: Commercial pine needle powder, FPN: Fresh pine needle. <sup>a-c</sup>: Means in the same column bearing different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).

#### 마. 전자공여능 측정

지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도인 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. DPPH( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl)에 대한 솔잎추출물의 전자공여 효과는 HPNP 81%, CPNP 78%, FPN 69%의 순으로 HPNP가 가장 높은 전자공여능을 나타내었다. 강 등(7)은 솔잎 열수 추출물과 70% acetone 추출물의 전자공여능 효과는 각각 80.9%, 82.6%로 나타나 큰 차이는 없었다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 HPNP의 전자공여능 81%와 유사한 수치를 나타냄으로써 활성 free radical을 억제할 수 있는 항산화물질로 사료된다. 활성 free radical은 인체 내에서 각종 질병과 노화를 일으키므로 식물 추출물 등에서 산화성 free radical과 반응함으로써 항산화제로서 이용할 수 있는 가능성을 시사하는 것이다.

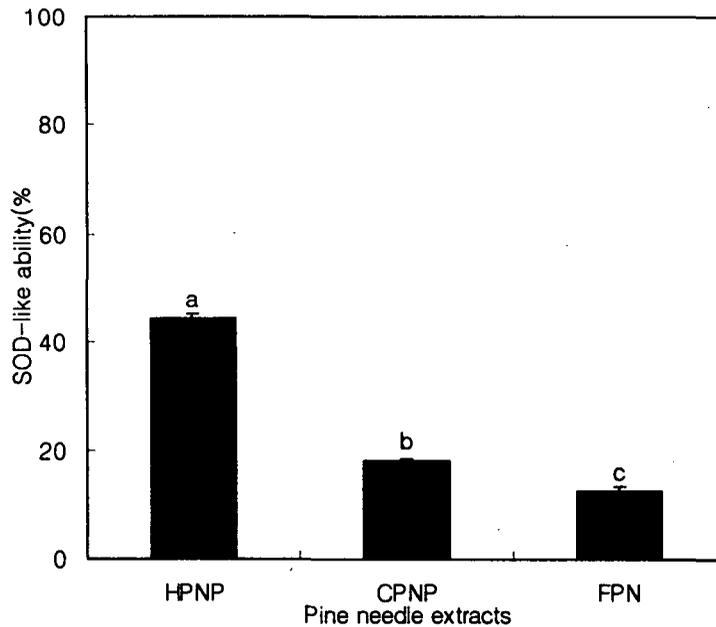


**Fig. 5. Electron donating ability of pine needle extracts.** CON: Control, HPNP: Hot air drying of pine needle powder, CPNP: Commercial pine needle powder, FPN: Fresh pine needle. <sup>a-c</sup>: Means in the same column bearing different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).

#### 바. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

솔잎에 존재하는 polyphenol성 물질의 중요한 기능인 SOD 유사활성을 측정 한 결과는 Fig. 6과 같다. HPNP 44.30%, CPNP 18.14%, FPN 12.80% 순으로 SOD 유사활성능은 HPNP가 가장 우수하였다. 이와 같은 결과는 한국식품개발 원(29)에서 초파리를 이용하여 SOD 유사활성이 높다고 알려진 식물체 추출액 12종의 효능평가에서 초파리 배양시간에 따른 생존을 비교분석결과 상치, 키위, 팽이버섯, 양파, 감, 고사리, 콜리플라워 등의 첨가구의 초파리 생존율은 65~82%로 나타났으나 SOD 유사활성을 어느 정도 가지고 있는 것으로 사료되며, HPNP의 경우 44.30%의 SOD 유사활성능을 나타내어 효능에 대한 것은 좀 더 상세한 실험이 요구된다. 한과 김(30)은 SOD 효능에 관한 보고에서 SOD는 진행성 전신경화증, 크론병, 레이노병 등의 여러 질병에 개선효과가 높은 편(70

%)이었다고 하였으며, 노인성 검버섯 또는 여성의 기미에도 효과가 나타났는데 이는 인체의 멜라닌색소 생합성 과정 중 SOD 유사활성물질이 산화과정을 저해하여 색소합성이 억제되었기 때문인 것으로 보고한 바 있다.

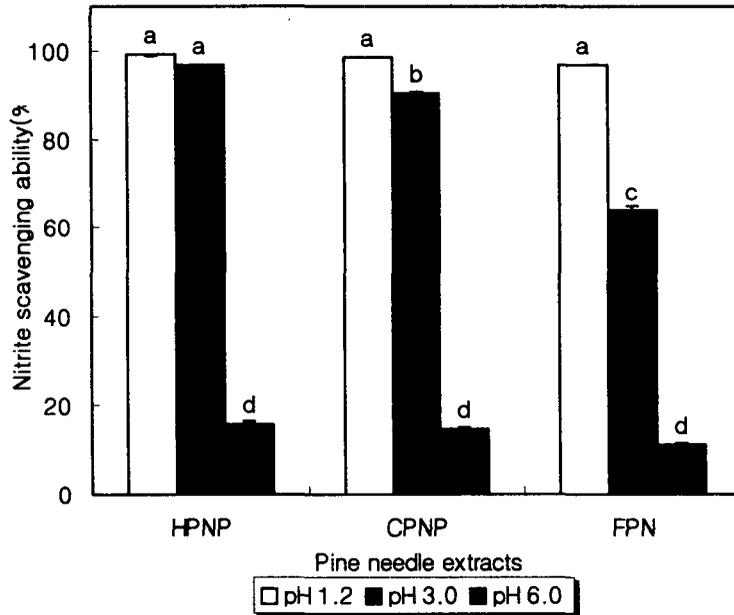


**Fig. 6. Autoxidation of pyrogallol in pine needle extracts.** CON: Control, HPNP: Hot air drying of pine needle powder, CPNP: Commercial pine needle powder, FPN: Fresh pine needle. <sup>a-c</sup>: Means in the same column bearing different superscript are significantly different (P<0.05).

#### 사. 아질산염 분해능 측정

아질산염은 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2급 및 3급 아민 등의 아민류와 반응하여 니트로사민을 생성하는 것으로 보고되고 있는데 (31), 이들 니트로사민은 동물실험결과 대부분이 발암성을 나타내는 물질로 밝혀짐으로써 주목을 끌게 되었다. 솔잎추출물의 아질산염 소거능을 pH별로 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 반응용액의 pH가 낮을수록 아질산염 분해능이 높게

나타났고 특히, pH 3.0 이하에서 90 %이상의 높은 분해능을 나타내었으나, pH가 증가할수록 분해능은 감소하여 pH 6.0에서는 11~15 % 정도의 낮은 분해능을 나타내었다. 이것은 강 등(7)이 솔잎 추출물의 아질산염 소거능을 각기 다른 pH에서 조사한 결과 pH 3.0 이하에서 80 %이상의 높은 분해능을 나타내었다는 보고와 일치한다. 그리고, 이 등(32)은 버섯 추출물을 이용한 아질산염 소거작용을 실험한 결과 영지버섯의 diethylether 추출물 및 표고버섯의 butanol 추출물이 68.34 % 및 68.23 %로 높은 아질산염 소거작용을 나타내었다고 보고하였으나 본 실험의 pH 3.0 이하에서 80 % 이상의 높은 아질산염 분해능보다는 다소 낮지만 pH에 따른 아질산염 소거능 차이는 나타나지 않았다. 아질산염은 일정 농도 이상을 섭취하게 되면 혈액 중의 헤모글로빈이 산화되어 메트헤모글로빈을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있다(33). 니트로사민의 생성을 억제하기 위한 연구로는 ascorbic acid의 니트로사민 생성 억제능이 최초로 밝혀진 이래, 여러 연구자들에 의하여 ascorbic acid의 니트로사민의 생성 억제능이 보고되었다(34~36). Cooney와 Ross(37)는 페놀화합물의 니트로화 반응에 미치는 영향에 대하여 발표하였는데 phenol, guaiacol 그리고 resorcinol은 니트로소화 반응을 강력하게 억제한다고 하였다. 그리고, 천연물에 의한 아질산염 소거작용에 대한 연구로는 해조 추출물(38) 및 야채 추출물(39)에 관한 보고가 있으며, Normington 등(40)은 중국오얏에서 분리한 3-hydroxy-2-pyranone이 아질산염을 분해함으로써 니트로소화 반응을 억제한다고 보고하였다.



**Fig. 7. Nitrite scavenging ability of pine needle extracts.** CON: Control, HPNP: Hot air drying of pine needle powder, CPNP: Commercial pine needle powder, FPN: Fresh pine needle. <sup>a-d</sup>: Means in the same column bearing different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 요약

솔잎의 제조방법별 열수추출물(HPNP, CPNP, FPN)의 항산화성을 검토하기 위하여 *in vitro*상에서 실험을 수행하였다. 각 추출물들의 지방산화 억제능을 측정된 결과,  $Fe^{2+}$  이온 첨가구에서는 HPNP와 FPN이  $Fe^{2+}$  이온 binding능력이 우수하였으나, CPNP는 오히려 지방산화를 촉진하였고,  $Fe^{3+}$  이온 첨가구에서는  $Fe^{3+}$  이온 binding능력은 없는 것으로 나타났다. 활성 산소종 존재 하에서 솔잎 추출물의 첨가가 지방산화에 미치는 영향은 활성산소종보다 지방산화도가 오히려 높게 나타났으며, 가장 낮은 값을 나타낸 FPN도  $KO_2$  보다 높게 나타나 포집능력은 없는 것으로 나타났다. 지방산화를 촉진하는 iron 함량은 ferrous iron

과 total iron 모두 CPNP가 가장 높게 나타났고, 다음으로 HPNP, FPN순으로 나타났다. 항산화제인 ascorbic acid함량은 FPN, HPNP, CPNP 순으로 나타났다. 산화성 활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도인 전자공여능은 HPNP, CPNP, FPN순이었고, HPNP의 전자공여능이 가장 높은 것으로 나타났다. Seroxide dismutase(SOD) 유사활성을 측정한 결과 HPNP, CPNP, FPN순으로 나타나 SOD 유사활성능은 HPNP가 가장 우수하였다. 솔잎 추출물을 각기 다른 pH에서 측정한 아질산염 분해능은 반응용액의 pH가 낮을수록 아질산염 분해능이 높게 나타났고 특히, pH 1.2에서 높은 분해능을 나타내었다.

## 5. 문 헌

1. 최동성, 고하영 : 식품기능화학, 지구문화사, 서울, 235 (1995)
2. 지성규 : 기능성식품, 광일문화사, 서울, 100 (1992)
3. 정연강, 백홍근 : 기능화시대를 맞는 식품산업, 신한종합연구소, 서울, 7 (1991)
4. 御影雅辛, 李奉柱, 朴種喜, 難波植雄 : 韓國產生藥의 研究(第7報), 日本生藥學會誌, 45, 336(1991)
5. 박종갑 : 한방대의전, 동양종합통신교육원출판부, 대구, 134 (1984)
6. 문화방송편저 : 한국민간요법대전, 금박출판사, 서울, 21 (1988)
7. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D.: Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 978(1995)
8. 上原美鈴 : 신비의 솔잎치료법, 국일미디어, 서울, 21 (1995)
9. Lee, Y.H., Shin, S.H., Choi, Y.S. and Lee, S.Y.: Development the health foods containing the extract from *pinus strobus* leave (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25, 379(1996)
10. Kang, Y.H., Park, Y.K., Ha, T.Y. and Moon, K.D.: Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet(in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25, 367 (1996)
11. Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation. Method in

- enzymol, **105**, 302(1978)
12. Carter, P. : Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent(ferrozine). *Anal. Biochem.*, **40**, 450 (1971)
  13. Sikic, B.I., Mimnaugh, E.G., Litterst, C.L., and Gram, T.E. : The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **17**(16) 9, 663 (1977)
  14. Blois, M.S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.*, **4617**, 1198 (1958)
  15. Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 468(1974)
  16. Kato, H., Lee, Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F. : Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1333 (1987)
  17. Kanner, J., Hazen, B. and Doll, L. : Catalytic free iron ions in muscle foods. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 412 (1988)
  18. Ahn, D.U., Wolfe, F.H. and Sim, J.S. : The effect of free and bound iron on lipid peroxidation in turkey meat. *Poultry Sci.*, **72**, 209 (1993)
  19. 부용출, 전체옥, 오지연 : 솔잎으로부터 항산화 성분인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 분리. *한국농화학회지*, **37**, 312 (1994)
  20. Lee, E.K. and Tchai, B.S. : A Study of Iron Contents of Blood-making Foodstuffs in Relation to Dietary Therapy in Tong-Eui-Bo-Gam (in Korean). *K. J. N.*, **10**, 115 (1977)
  21. Decker, E.A. and Welch, B. : Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 674 (1990)
  22. Park, Y.J., Kang, M.H., Kim, J.I., Park, O.J., Lee, M.S. and Jang, H.D. : Changes of Vitamin C and Superoxide Dismutase(SOD)-like Activity of Persimmon Leaf Tea by Processing Method and Extraction Condition (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 282 (1995)
  23. Park, W.B. and Kim, D.S. : Changes of Contents of  $\beta$ -Carotene and

- Vitamin C and Antioxidative Activities of Juice of *Angelica keiskei* Koidz stored at different conditions (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 377 (1995)
24. Kim, O.K., Kung, S.S., Park, W.B., Lee, M.W and Ham, S.S. : The Nutritional Components of Aerial Whole Plant and Juoce of *Angelica keiskei* Koidz (in Korean). **24**, 594 (1992)
  25. John, M.S. and Steven, N. : Effects of storage temperature and duration on total Vitamin C content of canned single-strength grapefruit juice. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 417 (1980)
  26. Takagi, M., Higahioka, H. and Morita, N. : Effects of liophilic derivatives of L-Ascorbic acid and Dehydro L-Ascorbic acid on the peroxidation of linoleic acid on the peroxidation of Linoleic acid in neutral phosphate buffer containing alcohol. *J. Nutr. Sci., Vitaminol.*, **32**, 389 (1986)
  27. Takagi, M. Miyamoto, I. and Morita, N. : Effects of active oxygen scavengers on the peroxidation of Linoleic acid catalyzed by Dehydro-L-Ascorbic acid or Its degradation products. *J. Nutr. Sci., Vataminol.*, **34**, 141 (1988)
  28. Namiki, M., Shigeta, A. and Hayashi, T. : Antioxidant effect of the reaction mixture of dehydroascorbic acid with tryptophan. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1207 (1982a)
  29. 생체산화를 억제할 수 있는 물질의 탐색 : 효능평가 및 이를 이용한 기능성 식품의 개발. 한국식품개발원, 23 (1995)
  30. 한대석, 김석중 : SOD유사활성물질과 기능성 식품의 개발. 식품기술, **7**, 41 (1994)
  31. Crosby, N.T. and Sawyer, R. : N-nitrisamines: A review of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. "Advances in food research"(C.O.Chichstered.), Academic press, **21**, 1 (1976)
  32. Lee, G.D., Chang, H.G. and Kim, H.K.: Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 432 (1997)
  33. Peter, F.S. : The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1761 (1975)

34. Miirvish, S.S. : Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**, 633 (1970)
35. Arche, M.C. and Weisman, M. : Reaction of nitrite with ascorbate and its relation to nitrosamine formation. *J. Nat. Cancer Inst.*, **54**, 1203 (1975)
36. 河端俊治, 赤築秀憲, 石橋亭 : N-ニトロソジメルアミン生成に對する L-アスコルビン酸の 添加効果. 日本誌, **40**, 1251 (1974)
37. Cooney, R.V. and Ross, P.D. : N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide phenols. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 789 (1987)
38. Kim, D.S., Ahn, B.W., Yeum, D.M., Lee, D.H., Park, Y.H. and Kim, D.S.: Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. 2. Nitrite-scavenging effects of seaweed extracts (in Korean). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **20**, 469 (1987)
39. Kim, D.S., Ahn, B.W., Yeum, D.M., Lee, D.H., Kim, S.B. and Park, Y.H.: Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. 1. nitrite-scavenging effects of vegetable extracts (in Korean). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **20**, 463 (1987)
40. Normington, K.W., Baker, I., Molina, M. Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. and Puju, S. : Characterization of a nitrite scavenger 3-hydroxy-2-pyranone from chinese wild plum juice. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 215 (1986)

## 제 4 절 식물체 추출물의 항산화성 및 아질산염 소거작용

### The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts

#### Abstract

The plant extracted from *Nameko*, Gallic, Green tea, Allspice, *Polygonum multiflorum*, *Schizandra chinensis*, *Armeniaca* and Pine needle were utilized to investigate the effects of extracts on free radical reaction, lipid oxidation and nitrite scavenging ability. The pH of ethanol extracts showed a higher than that of hot water extracts, among of which were showed the lowest pH 3.0 in *Schizandra chinensis*. The important factor of lipid oxidation were  $Fe^{2+}$  ion and active oxygen, in which were bound by plant extracts in case of  $Fe^{2+}$  ion existed. However, the hydroxyl radical scavenging ability of extracts were lowed, compared to extracts reacted with  $Fe^{2+}$  ion. Among of them, the hydroxyl radical scavenging ability of *Nameko* and Pine needle extracts had a lower TBARS value than those of control. The iron content of extracts were less than 2.0 mg/100 g, but the total iron content of *Schizandra chinensis* extracts were 6.8 mg/100 g. The ethanol extracts of pine needle were higher than those of hot water extracts on the basis of  $Fe^{2+}$  ion content. The ascorbic acid content of green tea showed 14.3 mg/100 g in hot water extracts and 16.7 mg/100 g in ethanol extracts. Electron donating ability of extracts showed more than 50 %, except *Nameko* and allspices, which were higher in ethanol extracts than those of hot water extracts. The superoxide dismutase(SOD)-like activity of green tea showed 85.3 % and 63.5 % in hot water and ethanol extracts, respectively. The nitrite scavenging ability of green tea was the most effective in both extracts.

## 1. 서 론

항산화제는 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연시킬 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하며 인공합성품을 비롯하여 동식물체 내에서도 이러한 기능을 갖고 있는 물질이 많이 알려지고 있으며, 대부분 천연항산화제들은 식물체로서 나무, 줄기, 뿌리, 잎, 꽃 등의 식물체에 대부분 존재하며 이들은 주로 폴리페놀물질로 알려져 있다(1). 천연으로부터 산화반응 및 radical의 반응성을 억제할 수 있는 항산화물질을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있고(2), 일부는 상품화되고 있다.

항산화제의 역할은 크게 금속이온의 착염화 기능, enzyme(superoxide dismutase) 활성과 enzyme 유사활성 물질에 의한 free radical 포집력으로 radical 반응을 종결시키는 것으로 보고(3-7)되고 있다. 이들은 생체계나 식품 중에 존재하는 불포화지방산을 다량 함유한 지질을 쉽게 산화시켜 hydroperoxide 등(8)으로 되며, 생체내에서 DNA에 손상을 주어 발암 및 돌연변이 등의 세포기능 장애를 유발하고, 동맥경화 및 노화 등에도 관여하며, 식품의 품질을 저하시킨다고 알려져 있다.

최근에는 식품분야에서 효소는 아니지만 활성산소의 반응성을 감소 또는 무력화할 수 있는 물질의 발굴과 이용에 관한 연구가 커다란 관심이 되고 있으며(9-12), 유지의 지방산화에서 알 수 있듯이 어느 산화방지제가 모든 종류의 유지류에 같은 산화방지 효과를 나타내지는 못하듯이 특정 물질이 생체의 산화반응 또는 radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제하지는 못한다고 판단되어지며, 활성산소의 종류나 radical source 에 따라 또한 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화 물질의 연구가 필요하다고 생각되어진다. 따라서, 이미 기능성이 알려진 식물체 [팽이버섯(13, 14), 마늘(13, 14), 녹차(14), allspice(14), 하수오, 오미자, 행인, 솔잎(15)] 가 free radical 반응 및 지방산화 억제에 미치는 영향과 니트로사민 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 식물체 추출물의 분해효과를 검토하고자 본 실험을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재료

팽이버섯, 마늘, 녹차, allspice은 경산시장내 농협에서 구입하여 사용하였으며, 한약재(하수오, 오미자, 행인)는 대구 약전골목에서 구입 사용하였다. 솔잎은 경산대학교 인근 야산에서 채취하여 사용하였으며, 실험에 사용된 시약은 특급시약이고, Trichloroacetic acid(TCA), Griess reagent(sulfanilic acid, naphthylamine) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였고, 2-thiobarbituric acid (TBA)는 Eastern Organic Chemicals(Rochester, NY)에서 구입하였다.

#### 1) 식물체 추출

식물체(팽이버섯, 마늘, 녹차, allspice, 하수오, 오미자, 행인, 솔잎) 각각 20 g 에 증류수 100 ml 를 가하여 85 °C 에서 3시간 동안 2회 반복 추출하고, Whatman No. 1로 여과한 후 열수추출물로 사용하였다. Ethanol 추출물은 식물체 각각 20 g 에 200 ml 를 넣고 상온에서 24 hr 정치시킨 후 Whatman No. 1에 여과한 후 시료로 사용하였다.

#### 2) Oil emulsion 조제

Oil emulsion은 사용하기 전에 만들고 pH 6.5로 보정한 0.1 M maleic acid buffer, 8 ml 를 넣은 다음 50  $\mu$ l 의 Tween-20 과 0.5 ml 정도의 fish oil 을 넣고 15분간 교반한 후 KOH 2~3 조각을 넣고 교반하면서 0.1 N HCl로 pH 6.5가 되도록 제조하여 사용하였다.

### 나. 실험방법

#### 1) pH 측정

pH는 일반적인 방법에 따라 추출물을 pH meter(Model DP-135M)로 측정하였다.

## 2) Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(16)에 따라 측정하였다. 1 ml 반응 혼합물이 채워진 시험관을 37 °C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나자마자 50  $\mu$ l dibutylhydroxytoluene (BHT) 7.2 % 를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000 $\times$ g 의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도(HITACHI UV-2001) 531 nm 에서 측정하였고, 공시료는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해서  $\mu$ g malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

## 3) Hydroxyl radical( $\cdot$ OH)의 생성 측정

Hydroxyl radical( $\cdot$ OH)의 생성 측정은 Gutteridge(17)의 방법에 의해 측정하였다. Oil emulsion 대신에 deoxyribose 를 사용하여 1 ml 반응 혼합물이 채운 시험관을 37 °C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 직후 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고, 혼합하여 끓는 물에서 15분간 가열시킨 후 찬물에서 냉각시켜 2,000 $\times$ g 의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도 531 nm 에서 측정하였다.

## 4) Nonheme iron(비헴철) 측정

Nonheme iron(비헴철) 측정은 Ferrozine iron 분석방법(18)을 약간 수정하여 측정하였다. Total iron 분석을 위해서 1 ml 시료를 사용하였고, 여기에 2 % ascorbic acid (w/v) 0.1 ml 를 가하여 혼합한 다음, 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 11.3% TCA(w/v) 1 ml를 가하고 섞은 다음 반응물을 3,000 $\times$ g 에서 15분간 원심분리 시켰다. 상등액 2 ml 를 시험관에 옮기고 0.8 ml 의 10 % ammonium acetate 와 0.2 ml 의 ferrozine color reagent(75 mg ferrozine + 75 mg neocuproine + HCl 1 drop)를 가하여 섞은 다음 시료를 3,000 $\times$ g 에서 15분간 원심분리 시킨 다음 5분 후 562 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Ferrous iron( $Fe^{2+}$ )분석도 단지 0.1 ml ascorbate 대신에 0.1 ml TCA를 가한 후 위의 방법과 같이 측정하였다.

#### 5) Ascorbic acid 측정

Ascorbic acid 측정은 Sikic 등(19)의 방법에 따라 시료를 10분 동안  $10,000 \times g$  에서 원심분리 시키고, 상등액 0.5 ml 를 취하여 5% TCA 2 ml 로 단백질을 침전시켰다. 다시, 4 °C 에서 10분 동안  $15,000 \times g$  에서 원심분리 시키고, 상등액 0.5 ml 를 취하여 85% orthophosphoric acid 0.05 ml, 8%  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl 0.05 ml, 3% aqueous ferric chloride 0.05 ml 를 가한 후, 1시간 동안 ferrous dipyridyl chromophore 물질이 생성되도록 실온에 방치한 후 525 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6) 전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2 ml 에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH 1.0 ml 를 넣고 vortex 한 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은  $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$  으로 나타내었다.

#### 7) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법(21)에 따라 각 시료 0.2 ml 에 pH 8.5 로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl] amino-methane + 10 mM EDTA) 3 ml 와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml 를 가하고 25 °C 에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 ml 로 반응을 정지시킨 후 420 nm 에서 흡광도를 측정하여  $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$  으로 나타내었다.

#### 8) 아질산염 소거작용 측정

아질산염 소거작용 측정은 Kato 등(22)의 방법으로 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 2 ml 에 각 시료 1 ml 를 가하고, 0.1 N HCl(pH 1.2), 0.2 M 구연산 완충액(pH 3.0, pH 6.0)으로 각각 pH 1.2, 3.0, 6.0으로 보정한 다음 반응용액의 부피를 10 ml 로 하였다. 이 용액을 37 °C 에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1 ml 를 취하여 2% 초산용액 2 ml 와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml 를 가한 후 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess reagent 대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은  $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$  으로 나타내었다.

### 9) 통계처리

통계처리는 각각의 시료에 대해 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 분산분석을 한 후  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 가. pH

각 식물체 추출물의 pH를 측정한 결과 Fig. 1과 같이 열수추출물 보다는 ethanol 추출물의 pH가 높게 나타났으며, 전반적으로 각 추출물들의 pH는 pH 4.5~6.8 범위를 나타내었다. 오미자 추출물의 열수와 ethanol 추출물에서 각각 pH 3.0, pH 3.3으로 가장 낮은 값을 나타내었다.

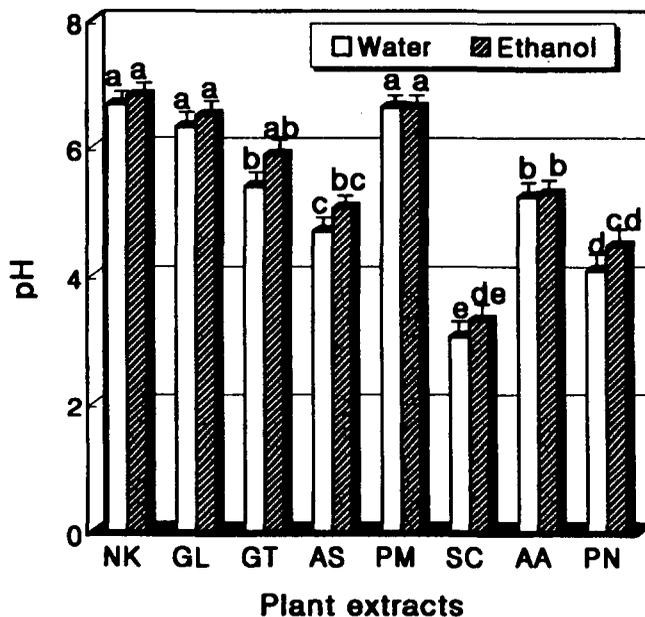


Fig. 1. pH of hot water and ethanol extracts from plants. NK: nameko, GL: gallic, GT: green tea, AS: allspice, PM: *Polygonum multiflorum*, SC: *Schizandra chinensis*, AA: *Armeniaca*, PN: pine needle. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P<0.05$ .

#### 나. 식물체 추출물이 지방산화에 미치는 영향

식물체 추출물들의 지방산화 촉진인자인  $Fe^{2+}$  이온과 활성산소중 지방산화를 일으키는데 주요한 역할을 하는 hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) (23)에 대한 각 추출물들의 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 식물체 추출물 모두 대조구 3.43 MDA ppm에 비하여 추출물 모두 낮은 TBARS 값을 나타내어  $Fe^{2+}$  이온 binding 능력은 우수하였다. 그 중에서도 녹차 ethanol 추출물이 1.14 MDA ppm으로 가장 낮은 TBARS 값을 나타내어 산화촉진인자인  $Fe^{2+}$  이온을 binding 하는 능력이 탁월하였다. 이러한, 열수추출물과 ethanol 추출물간의 지방산화정도의 차이는 인정되지 않았지만 ( $P > 0.05$ ), Kim 등 (24)이 유기용매별 대두추출물의 항산화 실험에서 전반적으로 메탄올 추출물이 항산화 효과가 우수하였으나, 난황레시틴 리포솜의 과산화 억제 정도는 열수추출물이 우수하다고 보고한 결과와 부분적으로는 일치하나 용매별 추출물의 지방산화정도는 시료조제 및 추출방법에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다.  $\cdot OH$  포집능력은 전반적으로 대조구 0.46 MDA ppm에 비하여 대부분의 추출물들은 낮은 TBARS 값을 나타내었으나 마늘, 하수오, 오미자는 대조구에 비하여 높은 TBARS 값을 나타내었다.  $\cdot OH$ 에 대한 각 추출물들의 포집능력을 좀더 세밀한 검토하기 위하여 deoxyribose 상에서 실험한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조구 1.10 MDA ppm에 비하여 팽이버섯, 솔잎 ethanol 추출물이 각각 0.52 MDA ppm, 0.67 MDA ppm으로 낮은 TBARS 값을 나타내어  $\cdot OH$  포집능력이 가장 우수하였으며, 열수추출물보다는 ethanol 추출물이  $\cdot OH$  포집능이 우수하였다 ( $P < 0.05$ ). 또한, oil emulsion 상에서 (Fig. 6)의  $\cdot OH$ 이 0.46 MDA ppm에 비하여 deoxyribose 상에서 (Fig. 3)의  $\cdot OH$ 은 1.10 MDA ppm으로 나타내어,  $\cdot OH$  포집능 측정은 oil emulsion 상에서 보다는 deoxyribose 상에서 측정하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

#### 다. Iron 함량

지방산화 촉진작용을 갖고 있는 ferrous iron과 total iron 함량을 조사한 결과 (Fig. 4) 열수추출물의 경우 대부분 추출물들은 ferrous iron과 total iron 모두 2.0 mg/100 g 미만이었으나, 오미자 추출물의 total iron 함량은 6.8 mg/100 g으로 가장 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 이는 본 실험에서 오미자의 total iron 함량은 Lee와 Tchai (25)의 실험에서 상추 4.8 mg/100 g과 비름 5.4 mg/100 g 보다는 높으며, 단감 17.6 mg/100 g 보다는 낮은 수치를 나타내었으며, 도라지 6.2 mg/100 g

과 유사한 값을 나타내었다. Ethanol 추출물에서도 같은 경향이었으며, 전반적으로 열수추출물 보다는 낮은 값을 나타내었다. 그러나, 솔잎 추출물의 경우 열수추출물의 ferrous iron과 total iron이 각각 1.0 mg/100 g, 1.2 mg/100 g 인데 비하여 ethanol 추출물의 경우는 1.8 mg/100 g, 2.1 mg/100 g 으로 열수추출물보다 ethanol 추출물이 높은 함량을 나타내었다. 따라서, Fe는 지방산화를 촉진시키는 인자로 작용할 뿐만 아니라 체내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하는 catalase의 구성성분이며(26), Haber-weiss 반응( $Fe^{3+} + O_2 \cdot^-$ )을 촉진시켜 체내 free radical 생성을 증가시켜 지질과 산화반응을 유도하는 산화반응의 전구체로 작용하기(27, 28) 때문에 iron 함량의 농도를 파악하는 것이 중요하다. 또한, Fe의 산화 전구체로서의 작용은 체내의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 비타민 C의 농도가 저농도일 경우에는 촉진되며, 적정 농도일 때는 Fe<sup>2+</sup>와 Fe<sup>3+</sup>의 비율이 적절하여 지질과산화 반응을 진행시키지 않는다는 보고도 있다(29). 그러나, 본 실험에서 주요한 관심사는 nitrite 함량을 소거시키는데 iron의 역할이 중요하며, 이를 토대로 천연물 중 nitrite 소거능이 우수한 천연물을 선별하고자 iron 함량을 측정하였으며, 다른 추출물보다 오미자 추출물의 total iron 함량이 6.8 mg/100 g 으로 다른 추출물에 비하여 높아 nitrite 소거능의 관점에서 iron의 역할을 검토하고자 하였다.

#### 라. Ascorbic acid 함량

항산화작용과 밀접한 관계를 갖는 추출물의 ascorbic acid 함량은 Fig. 5에 나타내었다. 녹차의 열수 및 ethanol 추출물에서 각각 14.3 mg/100 g, 16.7 mg/100 g 을 나타내어 가장 높은 ascorbic acid 함량을 나타내었다(P<0.05). Ascorbic acid는 수용성 물질로서 전반적으로 ethanol 보다는 열수추출물의 함량이 높게 나타났다. 이는 Nha와 Yang(30)의 보고에서 밤 21.8 mg/100 g, Kim(31)의 고추잎 25.7 mg/100 g 과 Kim 등(32)의 명일엽 전초 20.2 mg/100 g 보다는 전반적으로 낮은 수치를 나타내었으며, Park 등(33)의 감잎 13.1 mg/100 g 과 유사한 값을 나타내었다. 이러한, ascorbic acid의 역할은 농도에 따라 달라지는데 낮은 농도(250 ppm 이하)에서는 지방산화를 촉진시키거나, 높은 농도(500 ppm 이상)에서는 Fe<sup>2+</sup> 이온과 Fe<sup>3+</sup> 이온의 균형을 깨뜨려 지방산화정도를 역전시키거나 또는 산소포집제(oxygen scavenger)로 작용함으로써 지방산화를 억제시킨다고 보고하였다(34).

Ascorbic acid의 항산화제로서 역할은 지방산화를 일으키는 peroxy radical

을 감소시키거나 자연적으로 생성되는 항산화제인 vitamin E의 산화 형태를 줄여줌으로써 항산화제로 작용하는데 비하여 ascorbic acid의 산화촉진 활성은 금속이온(특히,  $Fe^{3+}$  복합물)을 환원시켜서 지방산화를 일으키는 물질을 만들고 이것이  $O_2$ 와 반응하는 형태로 되기 때문이라고 하였다(35).

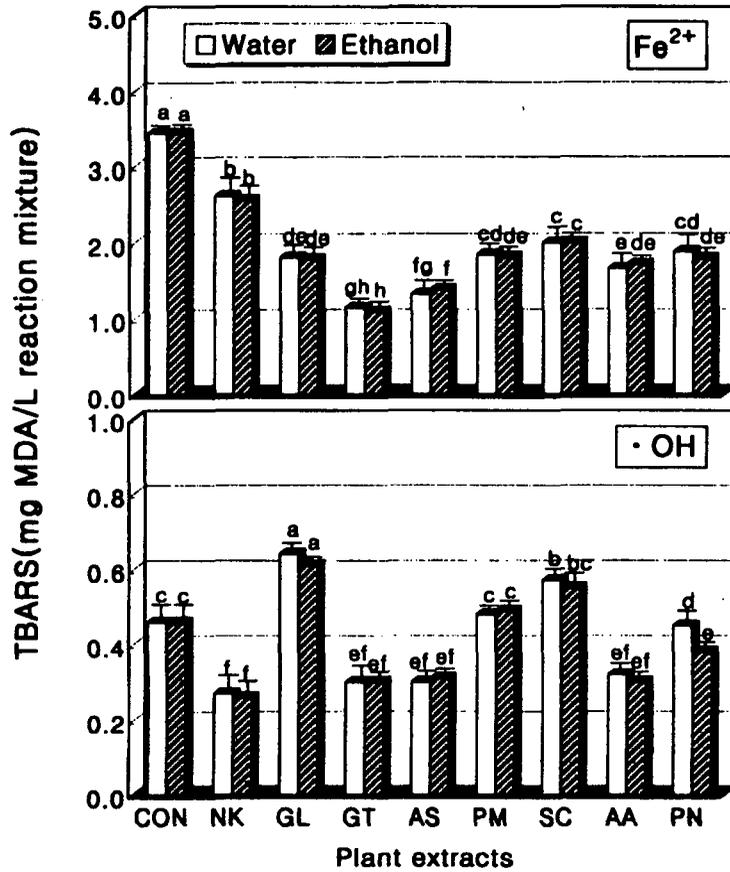


Fig. 2. Effects of plant extracts reacted with  $Fe^{2+}$  ion and  $\cdot OH$  on lipid oxidation in oil emulsion. CON: control, NK: nameko, GL: gallic, GT: green tea, AS: allspice, PM: *Polygonum multiflorum*, SC: *Schizandra chinensis*, AA: *Armeniacae*, PN: pine needle. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

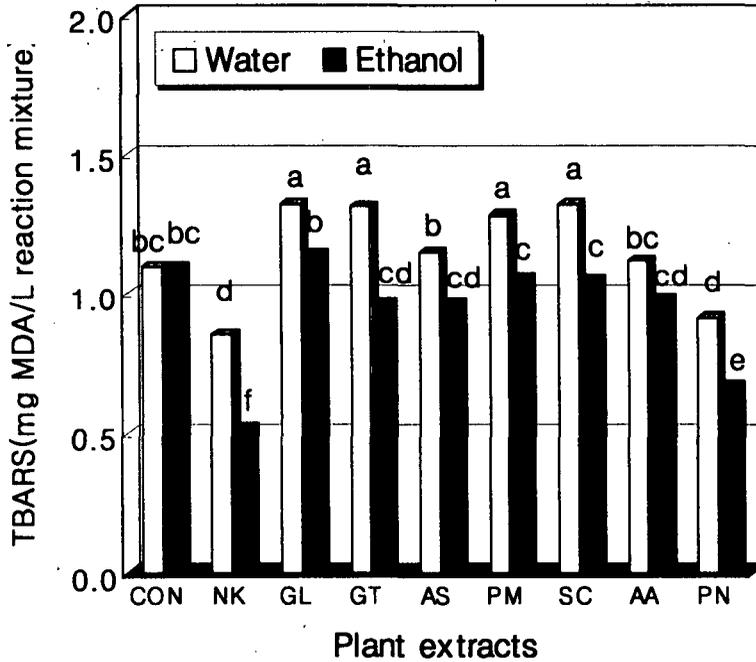


Fig. 3. Effects of plant extracts reacted with  $\cdot\text{OH}$  on deoxyribose degradation. CON: control, NK: nameko, GL: gallic, GT: green tea, AS: allspice, PM: *Polygonum multiflorum*, SC: *Schizandra chinensis*, AA: *Armeniacae*, PN: pine needle. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

#### 마. 전자공여능

DPPH ( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl)에 대한 전자공여능을 측정한 결과 (Fig. 6) 팽이버섯, 마늘 추출물을 제외하고는 50%이상의 전자공여능을 나타내었으며, 열수추출보다는 ethanol 추출물의 전자공여능이 우수하였으며, allspice ethanol 추출물이 95%로 가장 높은 값을 나타내었다. 또한, 솔잎의 열수추출물과 ethanol 추출물은 각각 74.9%, 92.4%로 나타나, Kang 등(15)의 솔잎 열수추출물과 70% acetone 추출물의 전자공여능 값이 각각 80.9%, 82.6%로 나타난 결과와 큰 차이를 나타내지 않았다. Kang 등(36)은 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenol 성 물질에 대한 항산화작용의 지표라 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것 일수록 전자공여능이 높다고 하였다. DPPH

는 아스코르빈산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로서 전자공여능의 차이 측정이 가능하다. 따라서, 항산화물질의 전자공여능을 측정할 때는 DPPH법이 편리하다고 알려져 있으나, 색소가 함유된 추출물의 경우 DPPH법의 적용에는 많은 경험이 요구된다.

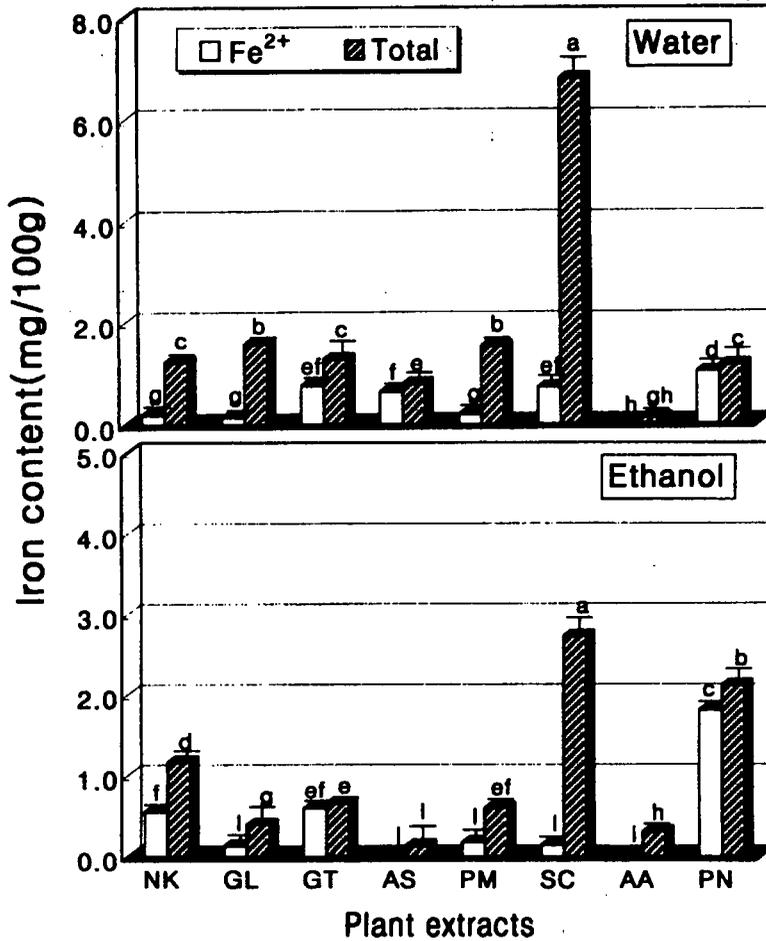


Fig. 4. Contents of Fe<sup>2+</sup> and total iron in plant extracts. NK: nameko, GL: gallic, GT: green tea, AS: allspice, PM: *Polygonum multiflorum*, SC: *Schizandra chinensis*, AA: *Armeniaca*, PN: pine needle. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at P<0.05.

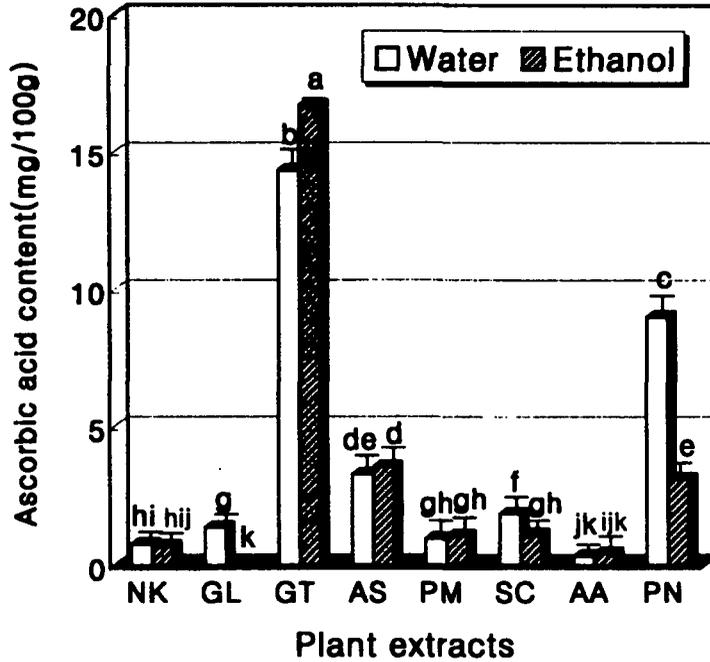
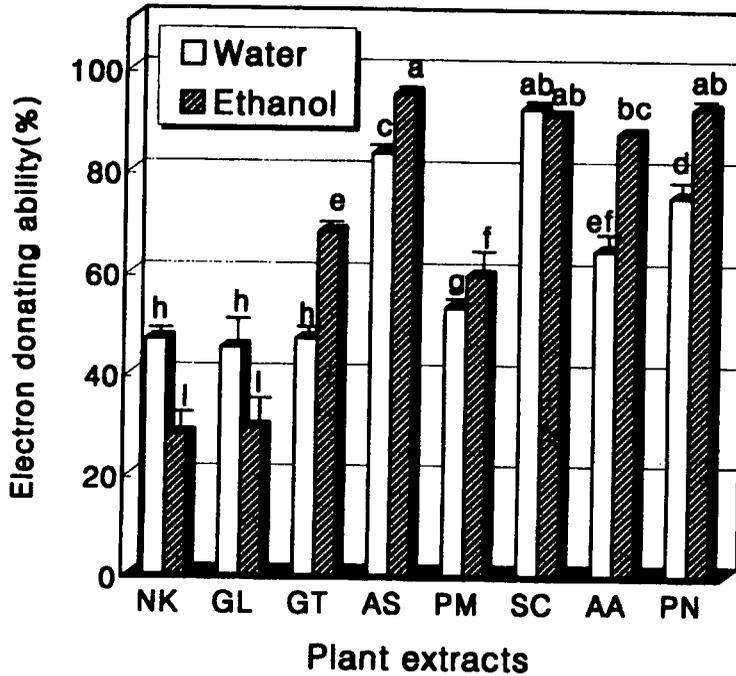


Fig. 5. Contents of ascorbic acid in plant extracts. NK: nameko, GL: gallic, GT: green tea, AS: allspice, PM: *Polygonum multiflorum*, SC: *Schizandra chinensis*, AA: *Armeniaca*, PN: pine needle. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

바. SOD 유사활성

Pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 Fig. 7과 같이 각 추출물들의 SOD 유사활성을 측정한 결과 전반적으로 8% 이상의 SOD 유사활성을 나타내었다. 그러나, 솔잎 ethanol추출물은 SOD 유사활성능이 미미하였으며, 녹차 열수와 ethanol 추출물은 각각 85.3%, 63.5%로 가장 높은 활성능을 나타내었다. 이는 Kim 등의 팽이버섯, 마늘, 브로콜리, 상추의 SOD 유사활성이 ethanol 추출보다 열수추출물이 효과가 크다는 결과와 일치하는 것이다. Park 등은 감잎의 ascorbic acid 함량은 건조와 발효방법에 따라 차이를 나타내었으며, SOD 유사활성은 건조방법에 따른 차이는 없었다고 하였으며, Mattila 등(37)은 SOD 유사활성 물질은 저분자 물질이라 하였다. SOD 유사활성 물질은 활성산소의 시발

물질이라 할 수 있으며, superoxide anion의 저해물질로는 생체내 superoxide dismutase(SOD)라는 효소가 있지만 이의 일종으로 SOD와 작용기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성 물질이라 부르며, 식물체(38, 39)를 대상으로 탐색하고 효능이 평가된 바 있다.



**Fig. 6. Electron donating ability of plant extracts.** NK: nameko, GL: gallic, GT: green tea, AS: allspice, PM: *Polygonum multiflorum*, SC: *Schizandra chinensis*, AA: *Armeniaca*, PN: pine needle. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

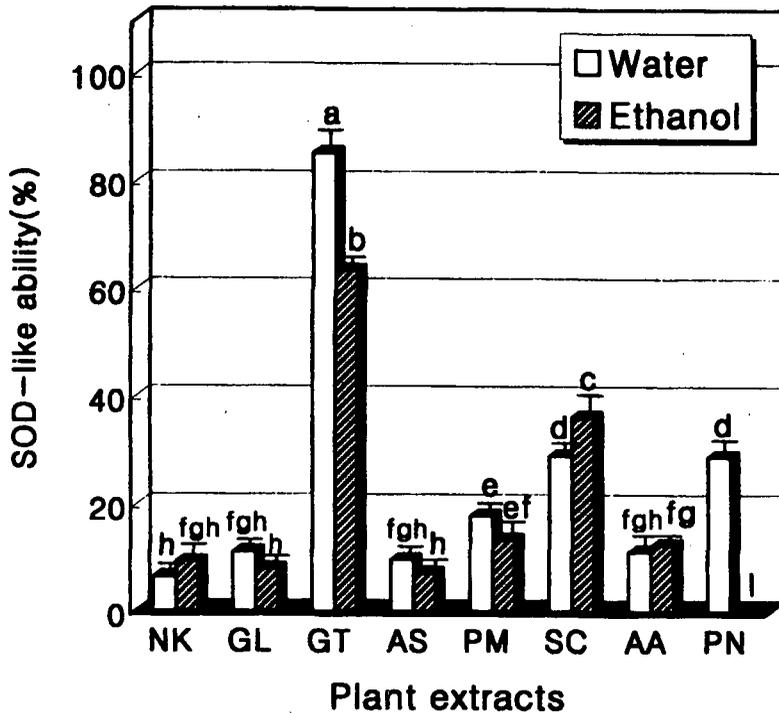


Fig. 7. Effect of plant extracts on the autoxidation of pyrogallol. NK: nameko, GL: gallic, GT: green tea, AS: allspice, PM: *Polygonum multiflorum*, SC: *Schizandra chinensis*, AA: *Armeniacae*, PN: pine needle. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

#### 사. 아질산염 소거작용

단백성 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2급, 3급 등의 아민류와 반응하여 니트로사민을 생성(40)하는 아질산염은 채소류와 근채류 등에 많이 함유되어 있으며, 어떤 것은 2,000 ppm까지 검출된다고 보고(41)되어 있다. 아질산염의 소거작용은 Kang 등(15)이 보고한 결과와 같이 pH의 감소에 따라 본 실험에서도 아질산염 소거능이 우수한 것으로 나타났으며(Fig. 8), 열수추출물이 전반적으로 ethanol 추출물에 비하여 높은 아질산염 소거능을 나타내었다. 또한, 녹차의 열수추출물과 ethanol 추출물은 pH 1.2와 3.0에서 100%의 아질산염 소거능을 나타내었다. 이는 Yeo 등(42)의 보고와 일치하였다. 그리고, 솔잎의 열수추출물도 pH 1.2와 pH 3.0에서 각각 95.5%, 93.5%의 높은 소거능을 나타내었

으며, pH3.0 이하에서 솔잎은 80% 이상의 아질산염소거능이 있다는 Kang 등 (15)의 보고와 일치하였다. 이러한, 아질산염의 소거인자는 대부분 ascorbic acid 이며, 결명자 추출물의 아질산염 소거인자는 nor-rubrofusarin-6- $\beta$ -mono-D-glucoside 로 추정(43)하였다.

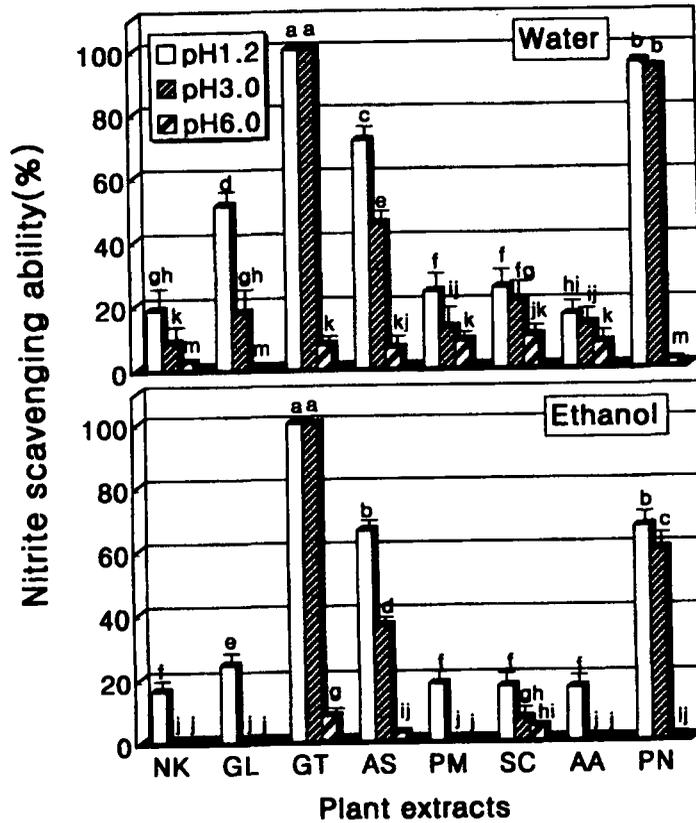


Fig. 8. Nitrite scavenging ability of plant extracts. NK: nameko, GL: gallic, GT: green tea, AS: allspice, PM: *Polygonum multiflorum*, SC: *Schizandra chinensis*, AA: *Armeniaca*, PN: pine needle. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at P<0.05.

#### 4. 요 약

식물체(팽이버섯, 마늘, 녹차, allspice, 하수오, 오미자, 행인, 솔잎)가 free radical 반응 및 지방산화 억제에 미치는 영향과 nitrosamine 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 천연물의 분해효과를 검토한 결과 각 추출물의 pH는 열수추출물보다 ethanol 추출물이 높은 pH를 나타내었으며, 그 중에서 오미자 열수추출물이 3.0으로 가장 낮았다. 지방산화의 촉진인자인  $Fe^{2+}$  이온과 활성산소 중 지방산화를 일으키는데 주요한 역할을 하는 hydroxyl radical에 대한 각 추출물들의 영향은 추출물 모두  $Fe^{2+}$  이온 binding 능력은 탁월하였으며, deoxyribose 상에서  $\cdot OH$  포집능 측정에서도 팽이버섯, 솔잎 ethanol 추출물이 다른 추출물에 비하여 낮은 TBARS값을 나타내었다. Iron의 함량은 열수추출물에서는 2.0 mg/100 g 미만이었으나, 오미자 추출물의 total iron 함량이 6.8 mg/100 g 으로 가장 높게 나타났다. 용매별 iron 함량 측정에서는 ethanol 추출물의 iron 함량이 전반적으로 열수추출물보다 낮은 iron 함량을 나타내었다. Ascorbic acid 함량은 녹차추출물이 열수 및 ethanol 추출에서 각각 14.3 mg/100 g, 16.7 mg/100 g 을 나타내어 가장 높은 함량을 나타내었다. 전자공여능은 팽이버섯, 마늘 추출물을 제외하고 50% 이상의 전자공여능을 나타내었으며, 열수추출보다는 ethanol 추출물의 전자공여능이 우수하였다. SOD 유사활성은 전반적으로 8% 이상의 활성능을 보였으나, 솔잎 ethanol추출물은 활성능이 미미하였으며, 녹차 열수와 ethanol 추출물이 각각 85.3%, 63.5% 로 가장 높은 활성능을 나타내었다. 아질산염 소거작용은 열수추출물이 전반적으로 ethanol 추출물에 비하여 높은 소거능을 나타내었다. 녹차추출물의 열수와 ethanol 추출물은 아질산염 소거능이 매우 우수하였다.

## 5. 문 헌

1. Pratt, D.E.: Natural antioxidants from plant materials. In "Phenolic compounds in food and their effects on health(II)" Huang, M.T., Ho, S.T. and Lee, C. Y.(eds.), *Am. Chem. Soc., Washington, DC*, p.54(1992)
2. Larson, R.A.: The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**, 969(1988)
3. Babizhayev, M.A., Seguin, M.C., Gueyne, J., Evstigneeva, R.P., Ageyeva, E.A. and Zheltukhina, G.A.: L-carnosine( $\beta$ -alanyl-L-histidine) and carcine ( $\beta$ -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem. J.*, **304**, 509(1994)
4. Chan, W.K.M., Decker, E.A., Lee, J.B. and Butterfield, D.A.: EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1407(1994)
5. Dahl, A., Midden, W.R. and Hartman, P.E.: Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochem. Photobiol.*, **47**, 357(1988)
6. Decker, E.A., Crum, A.D. and Calvert, J.T.: Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 756(1992)
7. Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C. and Ames, B.N.: Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**, 3175(1988)
8. Hsieh, R.J. and Kinsella, J.E.: In advances in food and nutrition research. Academic Press, New York, **33**, 233(1989)
9. Akaike, T., Ijiri, S., Sato, K., Katsuki, T. and Maeda, H.: Determination of peroxy radical-scavenging activity in food by using bactericidal action of alkyl peroxy radical. *J. Agr. Food Chem.*, **43**, 1864(1995)
10. Warner, H.R.: Overview: Mechanisms of antioxidant action on life span. *Toxicol. Ind. Health*, **9**, 151(1993)
11. Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S. and Aruoma, O.I.: Free radicals

- and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**(1&2), 7(1995)
12. Thomas, M.J.: The role of free radicals and antioxidants: How do you know that they are working? *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**(1&2), 21 (1995)
  13. Kim S.J., Han, D.S., Moon, K.D. and Thee, J.S.: Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**(5), 822(1995)
  14. Jung, S.W., Lee, N.K., Kim, S.J. and Han, D.S.: Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(6), 891(1995)
  15. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D.: Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort Extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(6), 978(1995)
  16. Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, **105**, 302(1978)
  17. Gutteridge, J.M.C.: Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxysugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.*, **224**, 761(1984)
  18. Carter, P.: Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent(ferrozine). *Anal. Biochem.*, **40**, 450 (1971)
  19. Sikic, B.I., Mimnaugh, E.G., Litterst, C.L., and Gram, T.E.: The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. and Biophys.* **179**, 663(1977)
  20. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1198(1958)
  21. Marklund, S. and Marklund, G.: Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 468(1974)
  22. Kato, H., Lee., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol.Chem.*,

- 51, 1333(1987)
23. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.*, **246**, 501(1986)
  24. Kim, J.Y., Maeng, Y.S. and Lee, K.Y.: Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(5), 635(1995)
  25. Lee, E.K. and Tchai, B.S.: A study of iron contents of blood-making foodstuffs in relation to dietary therapy in Tong-Eui-Bo-Gam. *J. Korean Soc. Nutr.*, **10**(2), 54(1977)
  26. Johnson, M.A. and Fischer, J.G.: Role of minerals in protection against free radicals. *Food Technol.*, p.112(1994)
  27. Rief, D.W.: Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Rad Biol. Med.*, **12**, 417(1992)
  28. Braugher, J.M., Duncan, L.A. and Chase, R.L.: The involvement of iron in lipid peroxidation. *Biochem.*, **261**, 10282(1986)
  30. Nha, Y.A. and Yang, C.B.: Changes of constituent components in chestnut during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(6), 1164(1996)
  31. Kim, K.O.: Rapid determination of ascorbic acid in red pepper leaves by near-infrared reflectance spectroscopic analysis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**(3), 393(1998)
  32. Kim, O.K., Kung, S.S., Park, W.B., Lee, M.W. and Ham, S.S.: The nutritional components of aerial whole plant and juice of *Angelica keiskei* Koidz. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **24**(6), 592(1992)
  33. Park, Y.J., Kang, M.H., Kim, J.I., Park, O.J., Lee, M.S. and Jang, H.D.: Changes of vitamin C and superoxide dismutase(SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(3), 281(1995)
  34. Sato, K. and Hegarty, G.R.: Warmed over flavor in cooked meats. *J. Food Sci.*, **36**, 1098(1971)
  35. Wills, E.D. : Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues.

- Biochem. J.*, **99**, 667(1966)
36. Wills, E.D. : Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.*, **99**, 667(1966)
37. Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D.: The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(2), 232(1996)
38. Mattila, R.J., Lorentz, H. and Rinne, U.K.: *J. Neurol. Sci.*, **86**, 321(1988)
39. Kim, S.J., Han, D., Park, M.H. and Rhee, J.S.: Screening for superoxide dismutase-like compounds and its activators in extracts of fruits and vegetables. *Biosci. Biotech Biochem.*, **58**, 2263(1994)
40. Kim, S.J., Han, D., Moon K.D. and Rhee, J.S.: Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci. Biotech Biochem.*, **59**, 822(1995)
41. Do, J.R., Kim, S.B., Park, Y.H., Park, Y.B. and Kim, D.S.: The nitrite-scavenging effects by the component of traditional tea materials. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **25**(5), 530(1993)
42. Wite, J.W.: Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 886(1975)
43. Yeo, S.G., Yeum, D.M., Lee, D.H., Ahn, C.W., Kim, S.B. and Park, Y.H.: The nitrite-scavenging effects by component of green tea extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **23**(2), 287(1994)

## 제 5 절 폐자원(참깨박, 감귤껍질, 게껍질) 추출물의 항산화성 및 아질산염소거작용

### The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of waste extracts(sesame meal, korean tangrin peel, crab shell)

#### Abstract

The natural sources extracted from crab shell, korean tangrine peel, sesame meals were utilized to investigate the effects of extracts on free radical reaction, lipid oxidation and nitrite scavenging ability. The recovery percentage of extracts from waste resources(crab shell, sesame meal, dry korean tangrine peel) were chitosan 11.6%, sesamol 2.2% and ascorbic acid 2.8%, respectively. The antioxidants were tended to have a lower TBARS value than those of control. The nitrite scavenging and electron donating ability of sesamol were tended to be the most effective extract among all extracts. However, In case of chitosan, the superoxide dismutase(SOD)-like activity was the most highest, compared to other extracts. The functional sausage was prepared to carried out to investigate functional and storage characteristics through the screening of effective extracts. This products were stored at different temperature.

#### 1. 서 론

우리가 섭취해온 식품은 사람에게 해(害)가 되지 않고, 식품 중 영양소가 생체에 대하여 생명유지를 위한 영양적인 기능을 증시하였으며, 공업화, 기계화로 인한 생활의 풍요로움으로 미각, 후각, 시각적인 기능을 갖는 기호식품을 선호하게 되었다. 그러나, 최근에는 식품의 섭취로 생명활동에 조절기능인 생체방어, 질병의 방지와 회복, 신체리듬의 조절, 노화억제 등의 기능을 부여한 기능성식품을 추구하게 되었다. 또한, 국민들의 건강에 대한 관심이 증가함에 따른 건강

지향적인 식품개발이 활발히 진행되고 있으며, 기호식품에 있어서도 건강유지를 위한 기능성 제품이 상품화되어 왔다. 이러한 시점에서 인체에 무해한 천연물로부터의 항산화제 발굴과 각종 식품의 첨가제에 대한 안정성에 대한 관심이 높아지고 있다. 그 대표적인 예로 육제품이나 수산가공품 등에 발색제로 첨가되는 질산염이나 아질산염은 육색의 발색 및 안정화(1) 뿐만 아니라, *Clostridium botulinum*에 대한 정균작용(2), 육제품의 풍미 향상(3), 산패취 발생감소(4-7) 등을 개선하는데 중요한 역할을 한다. 그러나, 식품 및 생체내의 잔존 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내며 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중에 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키며(8), 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 함유되어 있는 2급 및 3급 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성하는 것으로 알려져 있다(9, 10).

따라서, 갑각류에서 얻어지는 chitosan은 hypolipidemic, hypocholesterolemic activity가 있으며(11, 12), dietary fiber(13)로 가능하다. 또한, 갑각류에 존재하는 플라보노이드는 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항암성 등의 활성을 갖고 있으며(14), 한국산 조생종 감귤의 과육과 과피에 존재하는 플라보노이드 성분인 naringin은 항균작용(15), hesperidin은 혈압저하효과(16)를 나타내며, 이들은 과육보다 과피에 더 많이 함유되어 있다고 보고되고 있다(14). 그리고, 참깨의 항산화물질은 생체내 산화방지, 유지의 산패방지, 콜레스테롤 강화작용, 화학적 유발 유방암 예방효과, 피부미용 및 노화방지 등 다양한 생리통병 치료와 예방효과를 지니고 있다(17)는 보고에 의거하여 국내의 농·수산가공업체들로부터 배출되는 계껍질, 감귤껍질, 참깨박 등 폐자원의 효율적인 이용을 위하여 이들의 free radical 반응 및 지방산화 억제에 미치는 영향과 니트로사민 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 분해효과를 검토하고자 본 연구를 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재료

감귤, 계는 경산시장내 농협에서 구입하여 껍질만을 제조방법에 따라 추출 사용하였으며, 참깨박은 경산대학교 참기름 실습실에서 참기름 제조 후 남은 박을 추출 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 특급시약이고, Trichloroacetic acid(TCA), Griess reagent (sulfanilic acid, naphthylamine)등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였고, 2-thiobarbituric acid(TBA)는 Eastern Organic Chemicals (Roochester, NY)에서 구입하였다.

#### 1) 폐자원 추출

##### ① Chitosan 제조

키틴제조는 No 등(18)의 방법을 일부 수정하여 행하였다. 탈단백질은 시료 50 g 에 3.5% NaOH를 1:10(w/v)의 비율로 넣어 2시간 동안 60~70 °C 에서 교반하면서 단백질을 제거한 후 그 잔사를 물로 반복, 수세하여 여과한 후 건조 (50 °C, 24 hr)시켰다. 탈단백 건조시료에 1N HCl을 1:15(w/v)의 비율로 가하여 30분간 실온에서 교반하면서 회분을 제거하여 수세 및 여과한 후, 50 °C 의 건조기에서 건조하였다. 탈색소는 건조된 조키틴에 1:10(w/v)의 비율로 아세톤을 가하여 일부 색소를 추출한 후 여과하여 아세톤을 수거하고, 다시 0.315 % NaOCl 을 1:10(w/v)의 비율로 가하여 실온에서 30분간 침지한 다음 수세, 여과 및 건조시켜 제조한 키틴을 No와 Meyers(19)의 방법에 따라 키틴에 50 % NaOH 용액을 1:10(w/v)의 비율로 가하여 100 °C 에서 30분간 교반하면서 가열한 뒤 수세 및 여과한 후 50 °C 의 건조기에서 건조하여 키토산으로 사용하였다.

##### ② Sesamol 제조

Sesamol 제조는 이(20)의 방법으로 참깨박 100 g 을 hexane 용액에 1차 추출하고, Whatman No. 1 으로 여과한 후, 다시 85 % ethanol로 진탕 추출, 여과한 후 vacuum rotary evaporator로 농축하고 열풍건조하여 시료로 사용하였다.

### ③ 감귤껍질 제조

감귤껍질 제조는 감귤껍질 100 g 을 깨끗이 수세한 후 air dry oven에서 80℃, 3 hr 건조 후 가정용 분쇄기(대우분쇄기 KMF-360)로 마쇄하여 20~30 mesh 로 거른 뒤 분말을 사용하였다.

#### 나. 실험방법

##### 1) 수율

수율은 껍질, 참깨박, 감귤껍질로부터 유효성분을 제조방법에 따라 획득한 다음 양을 % 로 계산하였다.

##### 2) Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(21)에 따라 측정하였다. 1 ml 반응 혼합물이 채워진 시험관을 37 ℃ water bath 에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나자마자 50  $\mu$ l dibutylhydroxytoluene (BHT) 7.2 % 를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000×g 의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도(HITACHI UV-2001) 531 nm 에서 측정하였고, 공시료는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해서  $\mu$ g malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

##### 3) 전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2 ml 에 2×10<sup>-4</sup>M DPPH 1.0 ml 를 넣고 vortex 한 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 100-[(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100]으로 나타내었다.

##### 4) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법(23)에 따라 각 시료 0.2 ml 에 pH 8.5 로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl] aminomethane

+ 10 mM EDTA) 3 ml 와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml 를 가하고 25 ℃ 에서 10분 간 방치 후 1 N HCl 1 ml 로 반응을 정지시킨 후 420 nm 에서 흡광도를 측정하여  $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$  으로 나타내었다.

#### 5) 아질산염 소거작용 측정

아질산염 소거작용 측정은 Kato 등(24)의 방법으로 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 2 ml 에 각 시료 1 ml 를 가하고, 0.1 N HCl(pH 1.2), 0.2 M 구연산 완충액(pH 3.0, pH 6.0)으로 각각 pH 1.2, 3.0, 6.0으로 보정한 다음 반응용액의 부피를 10 ml 로 하였다. 이 용액을 37 ℃ 에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1 ml 를 취하여 2% 초산용액 2 ml 와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml 를 가한 후 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess reagent 대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은  $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$  으로 나타내었다.

#### 6) 통계처리

통계처리는 각각의 시료에 대해 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 분산분석을 한 후  $\alpha = 0.05$  수준에서 Duncan's multiple test 에 따라 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 수율

게껍질, 참깨박, 건조된 감귤껍질로부터 유효성분 즉, chitosan, sesamol, ascorbic acid 의 추출 수율은 Table 2 와 같이 chitosan 11.6%, sesamol 2.2%, ascorbic acid 2.8% 를 나타내었으며, 게껍질로부터 chitosan 의 수율은 Chung 등(25)의 보고와 유사하였다. 또한, 참깨박으로부터 sesamol 의 추출은 순수 정제된 sesamol 이 아니라, crude sesamol 이며, 폐자원 추출물의 수율은 chitosan 이 가장 높게 나타났다.

**Table 1. Yield of extracts from waste resources**

Ingredient	Extract Yield(%) <sup>1)</sup>
Chitosan	11.6
Sesamol	2.2
Ascorbic acid	2.8

<sup>1)</sup>Average of triplicate determinations.

#### 나. 지방산화에 미치는 영향

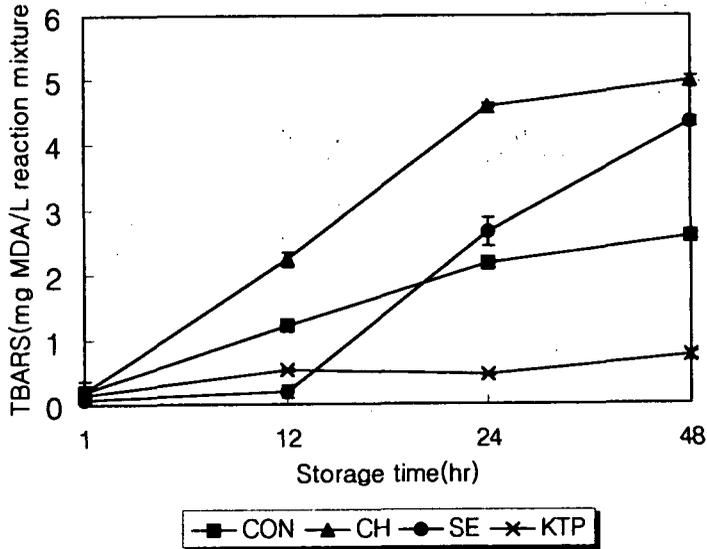
식품의 산패는 주로 공기중의 산소와 결합하여 일어나는데 이를 방지하기 위하여 독성이 없고 항산화성이 뛰어난 천연 항산화제의 개발에 관심이 집중되고 있다. 따라서, 폐자원 추출물에 존재하는 유효성분이 항산화 효과가 있는지를 알아보기 위하여 oil emulsion 상에서 대조구와 비교한 결과(Fig. 1), 대조구 0.3 MDA ppm 에 비하여 chitosan 0.20 MDA ppm, sesamol 0.08 MDA ppm, 감귤껍질 0.16 MDA ppm 으로 낮은 TBARS 값을 나타내었으며, 폐자원 추출물 중 sesamol 추출물이 가장 낮은 TBARS 값을 나타내었다(P<0.05). 이러한 결과는 Soliman 등(26)의 볶아진 참깨의 휘발성 물질, Kim과 Kim(27)의 참깨 및 들깨 박 에탄올 추출물, Noreen 등(28)의 건조된 오렌지에서 항산화 효과, No 등(29)의 김치의 소금절임시 키토산 첨가가 김치의 저장성을 연장 시켰다는 보고와 일치하는 것이다.

#### 다. 전자공여능

DPPH( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl)에 대한 폐자원 추출물의 전자공여능을 측정한 결과, Fig. 2 와 같이 chitosan 29.8%, sesamol 35.2%, 감귤껍질 15.8%로 나타나 sesamol의 전자공여능이 가장 우수하였다.

Lee 등(30)의 diethylether로 추출한 영지버섯, 양송이버섯, 표고버섯의 전자공여능은 95.1%, 33.8%, 38.4%를 나타내어 표고버섯 추출물과 sesamol 추출물의 전자공여능은 유사한 값을 나타내었다. Kang 등(31)은 전자공여능은 전반적으로 농도가 상승함에 따라 증가한다고 하였으며, 1 mM~6 mM 사이에는 농도차에 의한 효과는 크지 않았으며, 페놀성 화합물 중 hydroxybenzoic acids 가운데에서 gallic acid, hydroxycinnamic acids에서 hydrocaffeic acid, flavonoids 가운데

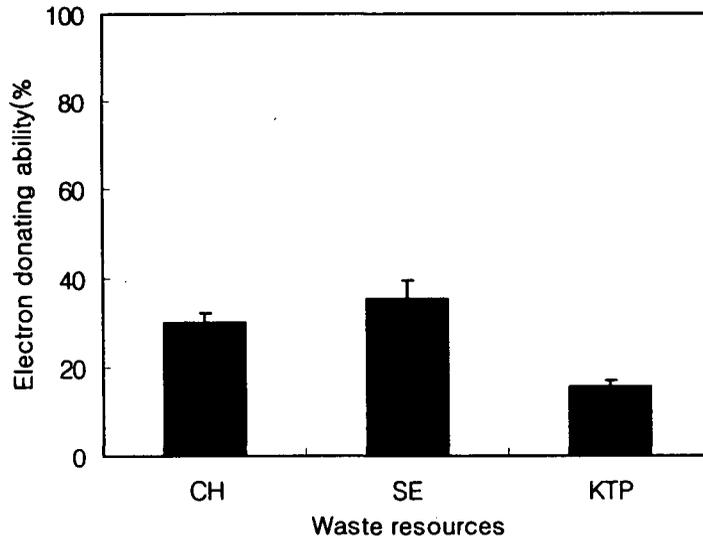
데에서는 (+) catechin 류가 높은 전자공여능을 나타내었으며, 전자공여능은 환원력이 큰 것이 높은 값을 나타낸다고 하였다.



**Fig. 1. Effects of the extracts from waste resources on lipid oxidation.** CON: Control, CH: Chitosan, SE: Sesamol, KTP: dry Korean tangrine peel. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

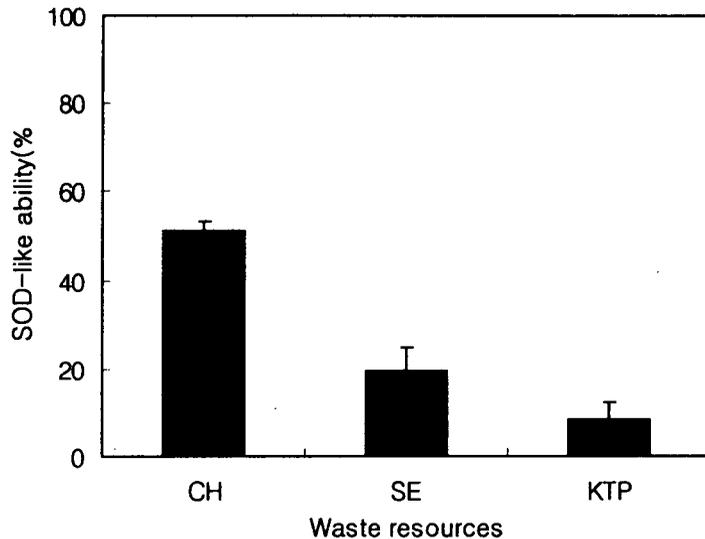
#### 라. SOD 유사활성

자연의 항산화 효소중의 하나인 superoxide dismutases(SOD; superoxide oxidoreductase EC 1.15.1.1)는 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된  $H_2O_2$ 는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환된다. SOD는 효소분자에 들어 있는 금속 조효소의 종류에 따라 Cu/ZnSOD, MnSOD 그리고 FeSOD 등의 세가지 종류로 나누어진다(32, 33). SOD는 아니지만 superoxide anion의 활성을 억제시킬 수 있는 물질 즉, SOD 유사활성능을 측정 한 결과(Fig. 3),



**Fig. 2. Electron donating ability of the extracts from waste resources.** CON: Control, CH: Chitosan, SE: Sesamol, KTP: dry Korean tangrine peel. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

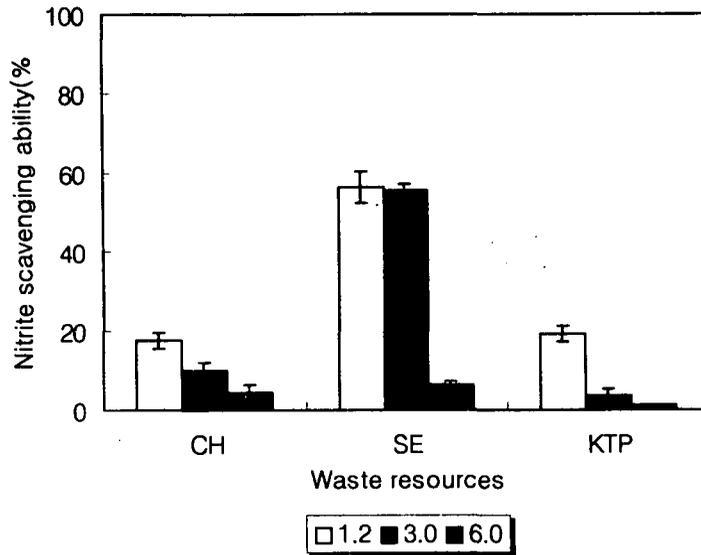
전반적으로 SOD 유사활성이 8% 이상으로 나타났으며, chitosan 51.3%, sesamol 19.9%, 감귤껍질 8.4%로 나타나 chitosan이 가장 우수하였다( $P < 0.05$ ). 또한, 한과 김(34)은 국내에서 생산된 62종의 과실, 채소, 버섯의 SOD 유사활성을 측정된 결과, 과실에는 감과 키위가 식물과 버섯류에는 딸기, 마늘, 미나리, 상추, 브로콜리의 활성도가 높았으며, 수용성 화합물중에서는 ascorbic acid, ascorbic acid-6-palmitate, glutathione(reduced)가 활성이 높다고 하였다. 이러한 결과를 미루어 보아 천연물 중 ascorbic acid의 함량이 높은 것이 항산화효과, SOD 유사활성 및 nitrite 소거작용이 우수할 것으로 사료된다.



**Fig. 3. Effects of the extracts from waste resources on autoxidation of pyrogallol.** CON: Control, CH: Chitosan, SE: Sesamol, KTP: dry Korean tangrine peel Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

#### 마. 아질산염 소거작용

폐자원 추출물의 nitrite 소거작용을 검토하기 위하여 각 pH별 nitrite 소거작용을 측정된 결과(Fig. 4), pH의 감소에 따라 nitrite 소거작용이 높게 나타났으며, 폐자원 추출물은 pH 1.2에서 chitosan 17.4%, sesamol 56.4%, 감귤껍질 19.0%로 나타났으며, sesamol이 pH 1.2와 pH 3.0에서 각각 56.4%, 55.4%의 높은 소거작용을 나타내었다. 이는 Lee 등(35)의 영지버섯 diethylether 추출물과 표고버섯 부탄올 추출물의 경우 68.3%, 68.2% 보다는 낮으나, 영지 및 양송이 부탄올 추출물의 아질산염 소거작용 44.4%, 43.4% 보다는 높은 수치를 나타내었다. 니트로사민의 전구물질인 아질산염과 아민이 식품내에 존재하고 있으므로 이들을 함유하고 있는 식품을 동시에 섭취하였을 때 니트로사민의 생성가능성은 매우 높다. 그러므로, 아질산염의 소거능이 우수한 sesamol을 아질산염과 아민이 존재할 수 있는 생체식품 및 가공식품과 함께 섭취하도록 함으로써 니트로사민에 의한 암의 발생을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.



**Fig. 4. Nitrite scavenging ability of the extracts from waste resources.** CON: Control, CH: Chitosan, SE: Sesamol, KTP: dry Korean tangrine peel. Values are means of 4 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

#### 4. 요약

폐자원으로 얻어지는 게겍질, 감귤겍질, 참깨박과 식물체(팽이버섯, 마늘, 녹차, allspice, 하수오, 오미자, 행인, 솔잎)가 free radical 반응 및 지방산화 억제에 미치는 영향과 nitrosamine 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 천연물의 분해효과를 검토하였다. 폐자원(게겍질, 참깨박, 감귤겍질)으로부터 각각 chitosan 11.6%, sesamol 2.2%, ascorbic acid 2.8%를 획득하였다. 폐자원은 대조구에 비하여 낮은 TBARS값을 나타내어 항산화성이 인정되었다. 전자공여능은 chitosan 29.8%, sesamol 35.2%, 감귤겍질 15.8%로 나타나 sesamol의 전자공여능이 가장 우수하였다. SOD 유사활성능은 전반적으로 SOD 유사활성이 8% 이상으로 나타났으며, chitosan 51.3%, sesamol 19.9%, 감귤겍질 8.4%로 나타나 chitosan이 가장 우수하였다. 폐자원 추출물의 nitrite 소거작용은 pH 1.2에서 chitosan 17.4%, sesamol 56.4%, 감귤겍질 19.0%로 나타났으며, sesamol이 pH 1.2와 pH 3.0에서 각각 56.4%, 55.4%의 높은 소거작용을 나타내었다.

## 5. 문 헌

1. Fox, J.B.: The chemistry of meat pigments. *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 207(1967)
2. Pivnick, H., Rubin, L.J., Barnett, H.W., Nordin, H.R., Ferguson, P.A. and Perrin, H.: Effect of sodium nitrite and temperature on toxinogenesis by *Clostridium botulinum* in perishable cooked meats vacuum-packed in air-impermeable plastic pouches. *Food Technol.*, **21**, 100(1967)
3. Macdougall, D.B., Mottran, D.S. and Rhodes, D.N.: Contribution of nitrite and nitrate to the color and flavor of cured meats. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1743(1975)
4. Duncan, C.L. and Foster, E.M.: Effect of sodium chloride and sodium nitrate on germination and out growth of anaerobic spores. *Appl. Microbiol.*, **16**, 406(1968a)
5. Jhonston, M.A., Pivnick, H. and Samson, J.M.: Inhibition of *Clostridium botulinum* by sodium nitrite in a bacteriological medium and in meat. *Can. Inst. Food Technol. J.*, **2**, 52(1969)
6. William, L.: Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*, **225**, 21 (1970)
7. Roberts, T.A.: The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1735(1975)
8. Peter F.S.: The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Food Agric.*, **26**, 1761(1975)
9. Crosby, N.T. and Sawyer, R.: N-nitrosamines: A review of chemical and biological properties and their estimation in food stuffs. In "Advances in food research" Chrichster, C.o.(ed.), Academic Press, New York, **21**, 1 (1976)
10. Fiddler, W., Pensabene, J.W., Piotrowski, E.G., Doerr, R.C. and Wasserman, A.E.: Use of sodium ascorbate or erythrostate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters. *J. Food Sci.*, **38**, 1084(1973)
11. Nagyvary, J.J., falk, J.D., Hill, M.L., Schmidt, M.L., Wilkins, A.K. and Bradbury,

- E.L.: The hypolipidemic activity of chitosan and other polysaccharides in rats. *Nutrition Reports Int.*, **20**, 677(1979)
12. Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N. and Hasegawa, Y.: A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *A. Clin. Nutr.*, **33**, 787(1980)
  13. Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.*, Volume, p.85(1984)
  14. Eun, J.B., Jung, Y.M. and Woo, G.J.: Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of korean tangerine(*Citrus aurantium var.*). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(2), 371(1996)
  15. 안성순, 유일준: 한국산 천연 naringin의 항균작용 및 안정성에 관한 연구. *한국균학회지*, **16**, 1(1988)
  16. Son, H.S., Kim, H.S., Kwon, T.B. and Ju, G.S.: Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in Citrus Sinensis. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**(2), 136(1992)
  17. Ryu, S.N., Kang, C.W., Lee, J.I., Lee, S.T., Kim, K.S. and Ahn, B.O.: Perspectives of utilization and function of antioxidants in sesame. *Korean J. crop. Sci.*, **41**, 94(1996)
  18. No, H.K., Meyers, S.P. and Lee, K.S.: Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 575(1989)
  19. No, H.K. and Meyers, S.P.: Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 580(1989)
  20. 이승택: 들깨와 참깨의 생리활성물질 산업화 이용연구: 참깨 세사미놀성분의 추출분리법. 농진청, 특허출원(1997)
  21. Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, **105**, 302(1978)
  22. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1198(1958)
  23. Marklund, S. and Marklund, G.: Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide

- dismmutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 468(1974)
24. Kato, H., Lee., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol.Chem.*, **51**, 1333 (1987)
  25. Chung, G.H., Kim, B.S., Hur, J.W. and No, H.K.: Physicochemical properties of chitin and chitosan prepared from lobster shrimp shell. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(5), 870(1996)
  26. Soliman, M.A., El-Sawy, A.A., Fadel, H.M. and Osman, F.: Effect of antioxidants on the volatiles of roasted sesame seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 523(1985)
  27. Kim, E.H. and Kim, D.J.: Antioxidant activity of ethanol-extracts of defatted soybean, sesame and perilla flours in a soybean oil-water emulsion system. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **13**(4), 283(1981)
  28. Noreen, S.W. and Natholyn, D.H.: Antioxidant activity in dried orange. *J. Food Sci.*, **48**, 644(1983)
  29. No, H.K., Park, I.K. and Kim, S.D.: Extension of shelf-life of Kimchi by addition of chitosan during salting. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**(6), 932(1995)
  30. Lee, G.D., Chang, H.G. and Kim, H.K.: Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(3), 432(1997)
  31. Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D.: The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(2), 232(1996)
  32. Bannister, J.V., Bannister, W.H. and Rotilio, G.: Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **22**, 111(1987)
  33. Bowler, C., Van Montagu, M. and Inze, D.: Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **43**, 83(1992)
  34. 한대석, 김석중: SOD유사활성물질과 기능성식품의 개발. *식품기술*, **7**(4), 41 (1994)

35. Lee, G.D., Chang, H.G. and Kim, H.K.: Antioxidative and nitrite scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol* 29(3), 432(1997)

## 제 6 절 발효 육제품 starter 개발을 위한 유산균의 분리와 분리 균주의 생리학적 특성에 관한 연구 Studies on the isolation of lactic acid bacteria from *kimchi* and its physico-chemical characteristics to develop starter of fermented sausage

### Abstract

The studies were carried out to develop a new starter for the production of high quality fermented meat products. Three hundred strains of lactic acid bacteria were isolated from *kimchi*, a korean traditional fermented vegetable food. Ten strains selected from isolated lactic acid bacteria which depletion of nitrite was highest among three hundred strains. Nitrite depletion activity of selected strains were determined in MRS broth containing 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of nitrite. Nitrite depletion ratio of selected strains showed over 95% on the average after 48 hrs incubation at 32 $^{\circ}\text{C}$  and 37 $^{\circ}\text{C}$ . Selected strains showed gram-positive, catalase negative, nitrate reduction negative, no CO<sub>2</sub> production from glucose. These strains showed growth at 200 ppm nitrite, 8% of NaCl and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*. These strains identified as *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, respectively.

### 1. 서 론

발효 육제품 제조시 유산균은 일반적으로 단독 또는 혼합하여 starter로 널리 사용되고 있다(Bacus 등, 1981). 건조 및 반건조 소시지내에서 유산균의 역할은 첨가한 당을 이용하여 유산을 생성하는 것이다. 유산은 pH를 낮추어 특이한 맛과 발효취를 내게 하며 단백질을 변성시켜서 조직과 맛을 향상시킨다. 근래에는 종래의 *Pediococci*나 *Lactobacilli*에 *Micrococci*를 혼합한 균주를 이용하고 있다

(Hammes 등, 1994). 육제품 제조에 사용되는 아질산염과 질산염은 여러 국가에서 육가공 식품의 색소고정, 식감증진, *Clostridium botulinum*의 생육 억제 등의 목적을 위하여 식품 첨가물로 많이 사용되고 있으나(Bosch 등, 1995; White, 1975) 일정농도 이상의 양을 섭취하게 되면 혈액중의 헤모글로빈이 산화되어 메트로헤모글로빈을 형성하여 메트로헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으킬 뿐 아니라(Poter, 1975) 단백질성 식품이나 2급, 3급 아민류와 반응하여 강력한 발암 물질인 니트로사민을 생성하는 것으로 보고되고 있다(Crosby 등, 1976).

따라서, 육류 염지에 사용되는 아질산염을 대체할 만한 대체품의 개발이 시급하나 그 역할을 대신할 물질은 아직 밝혀지지 않은 상황이므로 사용되는 양을 최소화 하는 것이 더 시급한 문제로 대두되었다. 그러나 그 위험성으로 인하여 사용량을 줄일 경우 미생물학적으로 기본이 되는 식품 유래 질병면에서 육류의 안전성을 보증하기 어려워 최종 생산물에 대해서는 충분한 수준으로 남아 있어야 한다(오, 1997). 미국의 경우에는 1990년대 초부터 농림성에서 그 사용량이 규제되고 있다. 현재는 아질산염만이 육류 절임에 사용되고 있고 아질산나트륨으로서 최대 150ppm까지 첨가하도록 허용하고 있으나 실제로는 120ppm 이하의 낮은 양이 사용되고 있다(Cassens, 1995). 따라서 육제품 제조시 필수불가결한 요소인 아질산염이 최종 생산물에 남아있는 양을 최소화시키기 위한 방법으로 미생물에 의한 아질산염 분해에 대한 연구가 최근 진행되고 있다. 미생물에 의한 아질산염 분해 작용에 대한 연구는 Youalt(1954)와 Yamanaka(1960)등으로서 이들은 식품에서 아질산염을 감소시킬 수 있는 여러 세균들을 보고하였다. 또한 Collins-Thompson과 Dodds(1984)는 유산균이 육류에서 아질산염의 소거에 상당히 기여하였으며 이들은 세균에 의하여 유산이 생성되는 것에 기인하여 아질산염의 화학적 소거가 증가한 것이라고 하였고 많은 유산균들이 아질산염 수준을 낮출 수 있는 효소를 가진다고 하였다. 또한 Speck(1979)은 육제품에서 아질산염과 nitrosamine을 최소수준으로 하기 위하여 *Lactobacilli*를 사용할 것을 제안하기도 하였다. 따라서 육제품 제조시 starter culture로 사용하기 위해서는 고농도의 소금과 아질산염에 견디면서 성장할 수 있고 바람직하지 못한 부패성 또는 병원성 미생물의 증식을 억제하는 능력과 아질산염 분해능이 뛰어난 유산균의 분리 또는 개발이 시급하다고 하겠다. 박(1996)에 의해 발효식품인 가재미 식혜에서 분리한 유산균으로 발효 소시지를 제조한 연구 결과도 발표되고 있으나 발효식품에서 분리한 유산균의 이용 가능성에 대한 연구는 매우 미

미한 실정이다.

본 실험은 한국의 전통식품인 김치로부터 우수한 미생물을 분리, 선발하여 육제품 제조시 nitrite의 역할을 수행하고 제품 내에 남은 잔여 nitrite의 양을 성공적으로 분해할 수 있는 유산균주를 분리하여 발효 육제품 제조시 starter로서의 이용가능성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 유산균의 분리 및 선발

대구 지역 일반 가정에서 제조한 김치를 수집하여 0.02% sodium azide를 함유한 MRS agar를 사용하여 각 시료 당 약 10균주씩 분리, 총 300균주를 분리하였으며 분리한 균은 MRS agar slant에 접종하여 37℃에서 24시간 배양 후 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

분리된 균주는 durham's tube를 넣은 MRS broth를 멸균한 후 분리 유산균을 각각 접종하여 37℃에서 24시간 배양시켜 가스생성 유무를 검사하여 이상발효유산균과 정상발효유산균을 구별하였고 24시간 후의 균주의 성장도는 흡광도를 이용하여 측정하였다. 분리된 균주 중 정상발효유산균이면서 성장이 좋은 100균주를 선발하여 실험에 사용하였다.

### 나. 분리 유산균의 아질산염 소거능 측정

유산균에 의한 아질산염 소거능의 측정은 Dodds와 Collins-Thompson(1984)의 방법에 따라 실시하였다. MRS broth 9ml에 2mg/ml의 nitrite slon. 1ml를 첨가하여 최종농도가 200µg/ml가 되게 하여 멸균한 배지에 24시간 배양시킨 선발 유산균 100µl를 접종하여 21℃, 32℃, 37℃에서 배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 잔존 아질산염을 정량한 후 유산균에 의한 아질산염 소거능을 아래와 같이 계산하여 나타내었다.

$$\text{아질산염 소거능 (\%)} = \frac{\text{초기 아질산염 잔존량} - \text{24시간 배양후 아질산염 잔존량}}{\text{초기의 아질산염 잔존량}} \times 100$$

1) 시약의 조제

아질산염 정량에 사용된 시약의 제조방법은 Table 1과 같다.

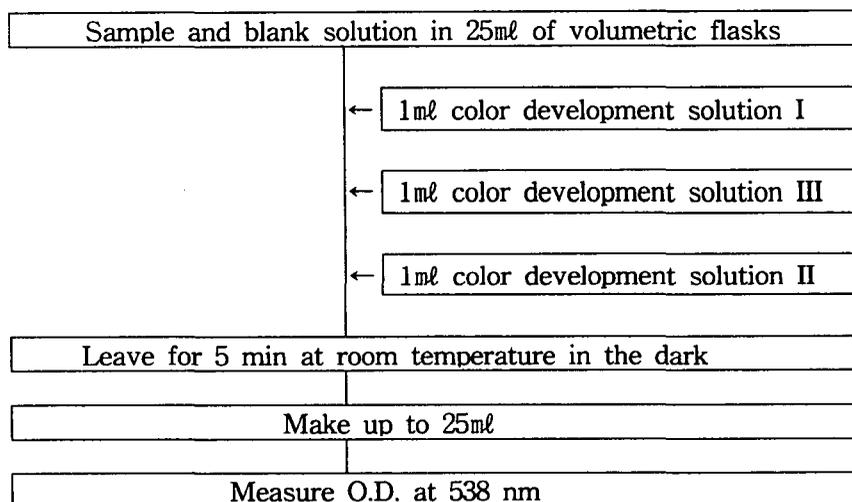
**Table 1. Reagent manufacturing method for determination of nitrite content**

Reagent	Procedure
Color Development Solution I	Dissolve, by heating on a water bath, 2g of sulfanilamide ( $\text{NH}_2\text{C}_6\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) in 800ml of cold water, filter, if necessary, and add 100ml HCl while stirring, dilute to 1000ml with distilled water
Solution II	Dissolve 0.1g of N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride ( $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$ ) in water, dilute to 100ml with distilled water
Solution III	Dilute 445ml of hydrochloric acid to 1000ml with distilled water

Store the color development solution in Well-stoppered brown bottles, Kept in a refrigerator for not longer than 1 week

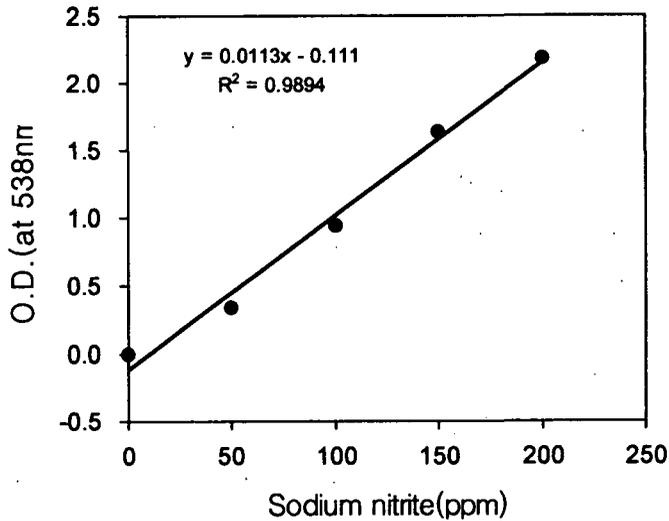
2) 잔존 아질산염 정량

아질산염은 Ito 등(1979)의 방법에 따라 Scheme 1과 같이 비색정량하였다.



**Scheme 1. Procedure for determination of nitrite.**

이 때 아질산염의 농도와 O.D.에 대한 검량선은 다음과 같다.



**Fig 1. Calibration curve for determination of sodium nitrite.**

다. 분리 유산균의 생리 및 생화학적 특성 검사

1) Catalase test(고, 1990)

MRS agar 평판상에 나타난 colony위에 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 3~4방울씩 가하여 기포의 발생유무로써 판정하였다.

2) Glucose로부터 CO<sub>2</sub> 생성 시험

당을 배제한 0.004% Chlorophenol red 첨가 MRS 기초배지에 glucose를 최종농도가 2% 되도록 첨가하여 durham 관을 넣어 멸균시킨 후 균을 접종하여 35℃에서 7일간 배양하여 CO<sub>2</sub> 및 산의 생성여부를 검사하였다.

3) Nitrate reduction test(고, 1990)

Nitrate broth배지(중류수 1ℓ에 대해 peptone 20g, disodium phosphate

2g, dextrose 1g, potassium nitrate 1g, agar 1g, adjusted pH 7.1)에 균을 접종하여 35℃, 48시간 배양한 후 0.8% sulfanilic acid 용액과 0.5%  $\alpha$ -naphthylamine 용액을 각각 한 방울씩 가하여 적갈색을 나타내면 positive, 색의 변화가 없으면 negative로 판정하였다.

#### 라. 분리 유산균의 내염성 측정

분리 유산균을 37℃에서 24시간 배양한 배양액을 식염농도가 각각 4, 6, 8, 10%로 되도록 조절한 MRS broth배지에 각각 1%씩 접종하여 37℃에서 배양하면서 pH meter를 이용하여 pH를 측정하고 spectrophotometer를 이용하여 600nm에서 O.D.를 측정하였다.

#### 마. 분리 유산균의 아질산염 내성 측정

멸균된 MRS broth에 최종 농도 200 $\mu$ g/ml이 되도록 NaNO<sub>2</sub> 용액을 첨가하여 37℃에서 24시간 배양시킨 선발 유산균 100 $\mu$ l/ml를 접종하여 균의 성장도를 spectrophotometer를 이용하여 538nm에서 O.D.를 측정하였다.

#### 바. 분리 유산균의 항균특성 측정

김치에서 분리한 유산균은 *Listeria monocytogenes* scott A, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737를 시험균주로 사용하여 paper disc method(Vanderzant 등, 1992)로 clear zone 형성 유무를 조사하여 측정하였다.

#### 사. 분리 유산균의 동정

선발 유산균의 형태학적 특성을 현미경으로 관찰하였고 당발효는 API 50 CHL(BioMereux, France)를 사용하여 선발 균주의 동정을 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 유산균의 분리 및 아질산염 소거능 측정

각 가정에서 담근 김치에서 MRS agar(0.02% sodium azide)를 이용하여 유산균 300균주를 분리한 후 각 균주의 성장도를 알아보기 위하여 MRS broth에 접종, 37℃에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정하여 300균주 중에서 성장도가 좋은 100균주를 선발하였다. 육제품 제조시 starter로 첨가하기 위하여 분리 선발된 100균주의 아질산염 소거능을 측정하여 아질산염 소거능이 큰 10균주를 선발하여 시험 균주로 사용하였다.

분리 유산균에 의한 아질산염 소거능을 측정하기 위해 MRS broth에 아질산염의 최종농도가 200ppm이 되도록 첨가한 후 21℃, 32℃, 37℃에서 유산균을 배양하면서 배지 내 아질산염 잔존량을 측정하였다(Table 2, 3, 4). 각각의 배양 온도에서 24시간 배양 후 시험 균주 모두 90%이상의 아질산염 소거능을 나타내었으며 10균주의 시험 균주 중 가장 높은 소거능을 나타낸 N-2 균주의 경우 배양 24시간 후 21℃, 32℃, 37℃에서 각각 91.72%, 99.12%, 98.93%의 아질산염 소거능을 나타내었다. 반면 N-1균주의 경우 3가지 실험 온도 모두에서 아질산염 소거능이 가장 낮은 것으로 측정되었다. 시험 균주 대부분 21℃보다 32℃와 37℃에서 배양할 때 아질산염 소거능이 높은 것으로 관찰되었는데 이는 21℃보다 30℃이상의 온도가 유산균이 성장하는데 더 유리하기 때문인 것으로 판단되었다. 오(1997)는 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum*과 *L. sake*가 25℃에서 배양 3일 후에 77~91.7%, 30℃, 35℃에서는 배양 2일에 82.8~94%의 높은 소거능을 나타내었으며 균종에 따라 차이는 있으나 고온일수록 아질산염 소거능이 높아지는 것으로 보고하였다. 또한 Dodds와 Thompson (1984)은 육제품에서 분리한 유산균과 상업적인 starter의 아질산염 소거능을 측정한 결과 실험에 사용한 모든 starter와 분리 유산균 68%가 30℃에서 24시간 이상 배양했을 때 59~93%의 소거능을 나타내었다고 보고한 바 있어 본 실험결과와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 본 실험에 사용된 균주는 아질산염이 잔류할 가능성이 높은 식품, 특히 침채류나 육가공 식품 등에 적절히 응용할 수 있는 유산균주라고 판단되었다.

**Table 2. Depletion of nitrite by lactic acid bacteria isolated from *kimchi* during incubation for 24 hrs at 21°C**

( $\mu\text{g/ml}$ )

Strain No.	Incubation time(hrs)	
	0	24
N-1	200*	57.90
N-2	200	16.56
N-3	200	32.20
N-4	200	29.11
N-5	200	31.07
N-6	200	32.73
N-7	200	33.59
N-8	200	43.08
N-9	200	36.76
N-10	200	52.79

**Table 3. Depletion of nitrite by lactic acid bacteria isolated from *kimchi* during incubation for 24 hrs at 32°C**

( $\mu\text{g/ml}$ )

Strain No.	Incubation time(hrs)	
	0	24
N-1	200	19.99
N-2	200	1.76
N-3	200	6.61
N-4	200	6.76
N-5	200	6.12
N-6	200	6.36
N-7	200	6.30
N-8	200	5.92
N-9	200	4.70
N-10	200	10.75

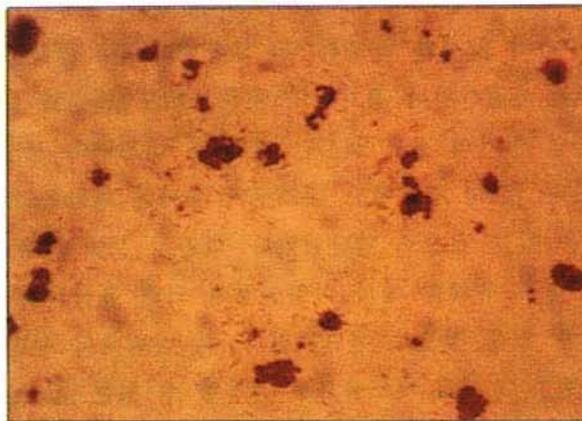
**Table 4. Depletion of nitrite by lactic acid bacteria isolated from kimchi during incubation for 24 hrs at 37°C**

Strain No.	Incubation time(hrs)	
	0	24
N-1	200	19.97
N-2	200	2.14
N-3	200	7.58
N-4	200	7.89
N-5	200	7.24
N-6	200	7.37
N-7	200	7.01
N-8	200	6.24
N-9	200	4.88
N-10	200	12.26

( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

나. 분리 유산균의 특성 검사

분리 선발 유산균의 특성을 관찰한 결과는 Table 5와 같다. 즉 분리한 10균주의 유산균 모두 정상발효유산균이고 염색결과 gram 양성을 나타내었다. 또한 catalase를 생성하지 않으며 nitrate 환원력이 없었고 glucose로부터 CO<sub>2</sub>를 생성하지 않았다. 시험 10균주를 현미경으로 검경한 결과 간균 4균주, 구균 6균주로 분류되었다. Fig 2는 대표적인 구균을 염색한 후 현미경으로 검경한 것을 사진으로 나타낸 것이다. 본 실험 결과 분리 유산균의 특성은 발효 육제품에 사용하는 starter로서의 조건을 갖춘 것으로 판단되었다.



**Fig 2. Microscopic picture of selected lactic acid bacteria after gram staining.**

**Table 5. Physiological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria isolated from *kimchi***

Strain No.	Shape	Gram stain	CO <sub>2</sub> from glucose	Nitrate reduction test	Catalase test
N-1	rod	+	-	-	-
N-2	rod	+	-	-	-
N-3	cocci	+	-	-	-
N-4	cocci	+	-	-	-
N-5	cocci	+	-	-	-
N-6	cocci	+	-	-	-
N-7	cocci	+	-	-	-
N-8	rod	+	-	-	-
N-9	rod	+	-	-	-
N-10	cocci	+	-	-	-

+ ; positive, - ; negative.

#### 다. 분리 유산균의 아질산염 내성 측정

분리 유산균의 발효 육제품 제조 시 starter로서의 이용 가능성을 검토하기 위해 아질산염에 대한 내성을 측정하였다. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 첨가된 MRS broth에 분리 유산균을 접종하여 24시간 배양한 후 흡광도와 pH 변화를 나타낸 결과는 Table 6, 7과 같다. 아질산염이 첨가되지 않은 MRS broth를 대조구로 하여 측정된 결과 아질산염 첨가의 경우 24시간 배양 후 대조구와 성장의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다. pH의 경우에도 대조구와 유사한 경향을 보여 산 생성에도 아질산염의 영향은 없는 것으로 판단되었다. 따라서 분리한 유산균이 육제품의 starter로 사용될 경우 육제품 내의 아질산염에 의해 유산균의 성장과 산 생성이 저해 받는 일은 없을 것으로 판단되었다. 본 실험에서 분리한 유산균은 최(1992)가 보고한 발효 소시지 제조용으로 사용할 수 있는 starter는 100ppm정도의 아질산염에 내성이 있어야 한다는 조건에 적합한 것으로 판단되어 발효 육제품 제조용 starter로서의 이용이 가능한 것으로 판단되었다.

**Table 6. Effect of nitrite growth of lactic acid bacteria isolated from kimchi in MRS broth for 24hrs at 37°C**

(O.D. at 600nm)

Strain No.	Incubation time(hrs)	No nitrite	200ppm nitrite
N-1	0	0.017	0.032
	24	1.993	1.794
N-2	0	0.019	0.012
	24	2.117	2.011
N-3	0	0.019	0.014
	24	1.995	1.751
N-4	0	0.018	0.023
	24	1.991	1.669
N-5	0	0.015	0.014
	24	2.008	1.866
N-6	0	0.011	0.010
	24	2.104	1.967
N-7	0	0.020	0.014
	24	1.865	1.823
N-8	0	0.021	0.018
	24	1.875	1.774
N-9	0	0.020	0.015
	24	1.995	1.881
N-10	0	0.018	0.014
	24	1.877	1.693

라. 분리 유산균의 염내성 측정

발효 육제품의 starter로 사용되는 유산균은 아질산염에 내성을 가져야 될 뿐 아니라 고농도의 소금에 성장이 가능하여야 하며(Bacus, 1984), 최(1992)가 보고한 6%의 식염농도에서 성장이 가능한 여부를 검토하기 위하여 염내성을 측정하였다. 분리 유산균의 염내성은 4, 6, 8, 10%의 NaCl이 첨가된 MRS broth에 배양된 유산균을 접종하여 배양하면서 흡광도와 pH를 측정하여 조사한 결과는 Table 8, 9에 나타난 바와 같다.

**Table 7. pH changes of lactic acid bacteria isolated from *kimchi* in MRS broth containing nitrite for 24 hrs at 37°C**

(O.D. at 600nm)

Strain No.	Incubation time(hrs)	No nitrite	200ppm nitrite
N-1	0	6.31	6.31
	24	4.00	4.11
N-2	0	6.37	6.37
	24	3.98	4.07
N-3	0	6.11	6.37
	24	3.97	4.11
N-4	0	6.22	6.22
	24	4.10	4.10
N-5	0	6.39	6.39
	24	4.00	4.12
N-6	0	6.20	6.20
	24	3.90	4.11
N-7	0	6.57	6.57
	24	3.86	4.00
N-8	0	6.44	6.44
	24	4.10	4.18
N-9	0	6.13	6.13
	24	4.20	4.03
N-10	0	6.38	6.38
	24	4.18	4.10

조금의 차이는 있으나 10균주 모두 8%의 NaCl 농도에서 배양 48시간 후에도 성장을 보여 염에 대한 내성이 매우 강한 것으로 관찰되었다. 10%의 NaCl 농도에서는 10균주 모두 48시간 배양 후에도 성장을 보이지 않았다. pH의 경우에는 6% 농도에서 48시간 배양 후 대조구와 유사한 pH의 감소를 보였으며 8% 농도의 경우에는 배양시간에 따라 pH가 감소되기는 하였으나 N-2 균주를 제외한 9균주 모두 pH 4 이하로는 떨어지지 않았다. N-2균주의 경우에는 8%의 농도에서도 배양 48시간 후의 pH가 3.87로 측정되어 산 생성능이 뛰어난 유산균주인 것으로 판단되었다.

**Table 8. Growth of isolated lactic acid bacteria in MRS broth containing various NaCl concentration for 48 hrs at 37°C**

( O.D. at 600nm)

Strain No.	Incubation time(hrs)	0%	4%	6%	8%	10%
N-1	0	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
	24	1.891	1.644	1.327	0.086	0.051
	48	1.878	1.679	1.471	1.197	0.052
N-2	0	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043
	24	2.059	2.057	1.811	0.873	0.049
	48	2.162	2.067	1.854	0.879	0.059
N-3	0	0.315	0.315	0.315	0.315	0.315
	24	1.889	1.738	1.611	0.780	0.103
	48	2.110	1.963	1.811	1.058	0.178
N-4	0	0.276	0.276	0.276	0.276	0.276
	24	2.016	1.892	1.665	0.504	0.155
	48	2.177	2.055	1.872	1.021	0.173
N-5	0	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219
	24	2.023	1.878	1.681	0.720	0.140
	48	2.162	2.061	1.881	0.994	0.158
N-6	0	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032
	24	2.024	1.894	1.688	0.728	0.163
	48	2.172	2.053	1.866	1.128	0.169
N-7	0	0.241	0.241	0.241	0.241	0.241
	24	2.061	1.691	1.665	0.836	0.157
	48	0.177	2.042	1.863	1.131	0.173
N-8	0	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
	24	1.876	1.676	1.415	0.382	0.021
	48	1.897	1.712	1.499	1.265	0.020
N-9	0	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054
	24	1.929	1.641	1.429	0.177	0.055
	48	2.032	1.724	1.495	1.229	0.055
N-10	0	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
	24	1.794	1.578	1.423	0.752	0.039
	48	1.992	1.725	1.494	1.091	0.039

**Table 9. pH changes of isolated lactic acid bacteria in MRS broth containing various NaCl concentration for 48 hrs at 37°C**

Strain No.	Incubation time(hrs)	0%	4%	6%	8%	10%
N-1	0	6.36	6.36	6.36	6.36	6.36
	24	4.19	4.01	4.12	5.92	6.02
	48	4.10	4.02	4.01	4.07	6.00
N-2	0	6.34	6.34	6.34	6.34	6.34
	24	3.79	3.59	3.69	5.85	5.93
	48	3.83	3.53	3.51	3.87	5.84
N-3	0	6.15	6.15	6.15	6.15	6.15
	24	3.95	3.78	3.72	4.57	5.91
	48	3.89	3.74	3.70	4.15	5.81
N-4	0	6.16	6.16	6.16	6.16	6.16
	24	3.91	3.72	3.70	5.11	5.72
	48	3.91	3.72	3.69	4.39	5.65
N-5	0	6.21	6.21	6.21	6.21	6.21
	24	3.65	3.60	3.61	4.67	5.76
	48	3.89	3.71	3.69	4.38	5.67
N-6	0	6.20	6.20	6.20	6.20	6.20
	24	3.89	3.71	3.70	4.82	5.77
	48	3.88	3.72	3.66	4.25	5.62
N-7	0	6.15	6.15	6.15	6.15	6.15
	24	3.97	4.41	3.75	4.65	5.75
	48	3.62	3.62	3.65	4.20	5.63
N-8	0	6.41	6.41	6.41	6.41	6.41
	24	4.05	3.96	4.01	5.47	5.97
	48	4.26	4.03	4.04	4.12	6.02
N-9	0	6.41	6.41	6.41	6.41	6.41
	24	4.02	4.03	4.20	5.78	6.00
	48	4.12	4.03	3.99	4.10	5.97
N-10	0	6.40	6.40	6.40	6.40	6.40
	24	4.01	3.79	3.86	4.72	5.88
	48	3.94	3.73	3.75	4.18	5.82

마. 분리 유산균의 항균특성 측정

분리 유산균의 병원성 미생물에 대한 항균특성은 paper disc method로 측정 한 결과는 Table 10에 나타낸 바와 같다. 시험 10균주 모두 *Staph. aureus*와 *E. coli*에 대해서 정도의 차이는 있으나 clear zone을 형성하였고 특히 N-2, N-3, N-4, N-7, N-8, N-9, N-10 균주는 4균주의 병원성 미생물에 대해서 clear

zone을 형성하였다. 유산균은 소시지 내의 *L. monocytogenes*, *Staph. aureus*의 성장을 억제한다는 연구 결과의 보고들과 유사한 경향이였다(Bartholomew 등, 1989; Haines 등, 1973). 또한 *E. coli*등의 미생물도 소시지내의 낮은 pH에서는 생존이 불가능하기 때문에 starter로 사용된 유산균에 의해 발효 소시지의 미생물학적 안전성이 결정된다고 볼 수 있다(Glass 등, 1992; Roca 등, 1989; Ünlütürk 등, 1991).

**Table 10. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against various pathogenic bacteria**

Strain No.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
N-1	+w	-	+w	+w
N-2	+	+	+	+
N-3	+	+	+	+
N-4	+	+	+	+
N-5	-	-	+w	+
N-6	-	-	+w	+w
N-7	+	+	+	+
N-8	+	+	+	+
N-9	+	+	+	+
N-10	+	+	+	+

+ ; clear zone

+w ; weak clear zone

바. 분리 유산균의 동정

선발 유산균 10균주를 API 50CHL kit를 이용하여 동정을 실시한 결과는 table 11과 같고 유산균의 당 발효 특성은 Table 12에 나타난 바와 같다. 10종의 유산균 중 *Pediococcus pentosaceus*가 5종으로 가장 많이 나타났고 *Lactobacillus plantarum*이 2종, *L. lactis lactis*, *L. brevis*가 각각 1종씩 동정되었다. 나머지 1균주는 동정이 불가능하였다. 분리된 10균주의 유산균 중에서 아질산염 소거능이 뛰어나면서 염에 대한 내성이 있고 또한 아질산염 존재하에서도 성장이 가능하고 특히 산 생성능이 뛰어난 균주를 선발하고 또한 앞으로 발효 소시지 제조시 starter로서의 이용 가능성을 검토하기 위하여 starter로서 일반적으로 많이 선호되어 사용되는 *L. plantarum*과 *P. pentosaceus*의 동정된 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 N-2, N-9인 *L. plantarum*과 N-2, N-3의 *P. pentosaceus*의 4균주로 앞으로의 실험에 사용하였다.

**Table 10. Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi**

Identification	Strain No.
<i>Lactobacillus lactis lactis</i>	N-1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	N-2, N-9
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N-3, N-4, N-5, N-6, N-7
<i>Lactobacillus brevis</i>	N-10
Impossible identification	N-8

**Table 11. Morphological and physiological characteristics of lactic acid bacteria isolated from *kimchi***

Carbohydrates	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9	N-10
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
$\alpha$ Methyl-D-mannoside	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
N Acethyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdaline	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Cellobiose	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Maltose	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Melezitose	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Raffinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycogene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
2 ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4. 요 약

본 실험은 발효 육제품에 사용 가능한 starter를 선별하기 위하여 한국의 전통식품인 김치로부터 우수한 유산균을 분리, 선별하여 발효 육제품 제조 시 starter로서 이용가능성을 검토하였다.

1. 각 가정에서 담근 김치에서 300균주의 유산균을 분리하여 성장이 우수한 100균주를 선별하였다. 100균주의 아질산염 소거능을 측정하여 10균주의 유산균을 선별하였다.
2. 10균주의 온도에 따른 아질산염 소거능을 측정한 결과 배양 48시간 이후에는 아질산염이 거의 소거되었으나 특히 21℃보다는 32℃와 37℃에서의 아질산염 소거능이 좋은 것으로 측정되었다.
3. starter로서의 사용 가능성을 검토하기 위한 분리 유산균의 생리적 특성 검사 결과 10균주 모두 정상발효유산균이었고 gram 양성을 나타내었다. catalase test와 nitrate reduction test, glucose로부터의 CO<sub>2</sub> 생성반응 모두 음성으로 나타났으며 검경 결과 구균이 6균주, 간균이 4균주로 분류되었다.
4. 분리 유산균 모두 200ppm의 아질산염에 내성이 있는 것으로 나타났으며 염에 대한 내성또한 분리 균주 모두 8%의 염 농도에서도 성장이 이루어지는 것으로 측정되었다.
5. 분리 유산균은 *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Sal. typhimurium*, *Staph. aureus*에 정도의 차이는 있으나 항균력을 나타내는 것으로 관찰되었다.
6. 분리 유산균의 동정 결과 *L. plantarum* 2균주, *L. lactis lactis* 1균주, *P. pentosaceus* 5균주, *L. brevis* 1균주, 나머지 1균주는 동정이 불가능한 균주로 나타났다.

## 5. 문 헌

1. Bacus, J. N., 1984. Utilization of microorganisms in meat processing. Research Studies Press, LID.
2. Bacus, J. N., W. L. Brown, 1981. Use of microbial cultures, Meat products, *Food Technol.*, 35, 74, 83.
3. Bartholomew, D. T. and Blumer, T. N., 1980. Inhibition of *Staphylococcus* by lactic acid bacteria in country-style hams. *J. Food Sci.*, 45, 420.
4. Bosch, N., M. G. Mata, M. J. Penela and T. R. Calan, 1995. Determination of nitrite levels in refrigerated and frozen spinach by ion chromatography. *J. Chromatog. A* 706, 221.
5. Cassens, R. G., 1995. Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technol.*, 59(7), 72.
6. Crosby, N. T. and R. Sawyer, 1976. N-nitrosamines ; A review of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. "Advances in food research"(C. O Chichstered). J. Academic Pres, 21.
7. Dodds, K. L. and D. L. Collins-Thompson, 1984. Incidence of nitrite-depletion lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter cultures. *J. Food Prot.*, 47, 7.
8. Friend, B. A. and M. Shahani, 1984. Antitumor properties of lactobacilli and dairy products fermented by lactobacilli. *J. Food Prot.*, 47(9), 717.
9. Glass, K. A., J. M. Loeffelholz, J. P. Ford and M. P. Doyle. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2513.
10. Haines, W. C. and Harmon, L. G., 1973. Effects of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 25, 436.
11. Hammes, W. P. and H. J. Knaut, 1994. Starters in the processing of meat products. *Meat Sci.*, 36, 155.
12. Ito, Y., M. Yodoshi, J. I. Tanaka and M. Iwaida, 1979. Comparison of two methods and improvements for colorimetric determination of nitrite

- in cod roe. *J. Food Prot.* 42, 715.
13. Poter, F. S., 1975. The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitrosocompounds. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1761.
  14. Roca, M. and I. Kalman. 1989. Antagonistic effect of some starter cultures on Enterobacteriaceae(*E. coli*). *Meat Sci.* 25, 123.
  15. Speck, M. L., 1979. Reduction of nitrite and nitrite in food by lactic acid bacteria. 1st Biennial Marshall International cheese conference, Madison, Wisconsin.
  16. White, J. W., 1975. Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *J. Agric. Food Chem.*, 23, 202.
  17. Yamanaka, T., A. Ota. and K. Okunuky, 1961. A nitrite reducing system reconstructed with purified cytochrome components of *Pseudomonas auroginosa*, *Biochem. Biophys., Acta*, 53, 294.
  18. Youalt, J. B., 1954. Identification of nitrite by spices of Achromobactor, BF. MIRA. Res. Rep, No. 1891.
  19. Ünlütürk, A. and F. Turantas, 1991. Fate of coliform in Turkish Soudjuk during ripening and storage. *J. Sci. Food Agric*, 57, 399.
  20. Vanderzant, C., Ph D., D. F. Sjlittstoesser, D. F., Ph D. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3ed., American Health Association.
  21. 고명수, 1990. 발효 소시지용 스타아터 미생물의 분리 및 동정과 그 이용. 건국대학교 박사학위논문.
  22. 박우문, 1996. 발효식품으로부터 분리한 균주로 제조한 발효소시지의 특성. 중앙대 박사학위논문.
  23. 오창경, 1997. 김치의 (항)돌연변이 원성과 유산균에 의한 아질산염 소거. 제주대학교 대학원 식품공학과 박사 논문.
  24. 최신양, 1992. 국내외기술정보(유산균을 이용한 발효 sausage의 제조). 식품기술, 5(1), 49-53.

# 제 3 장

여 백

## 제 3 장 (2차년도)

### 제 1 절 식물체 추출물의 유효안정성 및 각종 항산화제와의 상승효과 비교

#### Comparison of synergic effects of plant extracts and various antioxidants on functional ability and emulsion stability

##### Abstract

This study was carried out to investigate effects on processing characteristics in case of addition of plant extracts and also reviewed synergic effects of plant extracts and various antioxidants on antioxidant and antimicrobial activities. The results are summarized as follows; The addition of plant extracts did not change the stability of emulsion, which means there were a little effects of plant extracts on processing characteristics, irrespective of concentration of plant extracts. The antioxidant ability of plant extracts and various antioxidants showed the most strong ability in ethanol extracts from green tea and *Schizandra chinensis*. These values were very similar to antioxidant of carnosine. Electron donating ability of ethanol extracts from *Pinus densiflora* and Green tea were tend to be showed 84.4%, 74.9%, respectively, in which showed more higher antioxidant ability than other antioxidants. And also, The complex treatment between plant extracts and various antioxidants were tended to be synergic effect in case of TBARS value, however there did not show synergic effects on antimicrobial activities on the basis of functional characteristics.

## 1. 서 론

단백질의 유화 형성에는 염용성단백질(salt-soluble protein)과 수용성단백질(water-soluble protein)이 주로 관여하며(1), 이와 성(2)은 식육 단백질은 지방을 유화하고 물을 결합하는 기능을 하는데, 그 중에서 염용성단백질은 고기 유화물에 있어 matrix 형성에 주된 영향을 끼치며, 수용성단백질은 형성된 조직을 감싸는 기능을 한다고 보고하였다. Hansen(3), Swift 등(4) 그리고 Helmer와 Saffle(5)도 염용성단백질이 소시지 유화에 있어서 유화제로서 작용함을 밝혔다. 염용성단백질(근원섬유단백질)들 중 미오신은 강직전, 그리고 액토미오신은 강직후의 근육에서 최종 가공육제품들의 모든 기능성에 기여함이 알려진 바 있고(6), 근원섬유단백질들은 총 근육단백질 함량의 약 50~60% 정도를 차지한다(7). 미오신(50~55%)과 액틴(20~25%)은 주된 근원섬유단백질들이며 이들의 기능성은 충분히 연구된 바 있으며, 미오신과 액틴을 제외한 나머지 20~25% 근원섬유단백질들이 나머지 염용성단백질 부분을 차지하며 최종 가공육제품들의 기능성에는 주로 관여하지 않지만, 액틴과 미오신의 기능성에 관여한다는 보고가 있다(8-10). Hansen(3)은 세절시간, 단백질 농도, 혼화 속도, 기름 첨가 속도, 그리고 온도 등을 유화 형성과 유화 안정도에 영향을 미치는 주된 요인이라 보고하였다. 따라서 본 연구는 천연 추출물을 이용한 육제품 제조시 천연추출물이 유화안정성에 미치는 영향을 검토하고 추출물의 항산화성 및 항균성을 비교 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 시료조제

천연생리활성물질의 추출조건에 따른 항산화성 및 항균성을 알아보기 위하여 솔잎, 녹차, 자초, 오미자를 열수(85℃, 3hr)와 에탄올(24hr 정치)로 추출하였다. 이 추출물을 여과하여 동결건조한 후 분말을 다시 농도별(0.1%, 0.3%)로 제조하여 항산화력과 항균력을 검토하였다.

#### 나. 유화안정성 측정

돈육제품 제조시 유화물의 유화력에 영향을 미치는 단백질층과 유화안정성을 측정하기 위하여 Meyer 등(11)의 방법을 수정하여 원심분리법을 이용하여 A층과 B층을 구분하여 각 층의 양을 측정하여 백분율로 표시하였다.

#### 다. 천연물의 항산화력 측정

천연물의 열수와 에탄올 추출물을 산화촉진제인  $Fe^{2+}$  이온 및  $\cdot OH$ (hydroxyl radical)에 대한 binding 효과를 TBARS(12)와 deoxyribose로 측정하여 각종 항산화제와 항산화력을 비교하고, DPPH에 대한 전자공여능(13)을 비교하였다.

#### 라. 천연물의 항균활성 측정

천연물의 열수 및 에탄올 추출물이 병원성 미생물(*Bacillus subtilis* KCTC 1021, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 19737, *Listeria monocytogenes* Scott A *Salmonella typhimurium* ATCC 14028)의 생육에 미치는 억제 효과는 paper disc method(14)를 이용하여 clear zone의 생성 유무를 관찰하였다. Clear zone을 생성하는 천연물 추출물을 tryptic soy broth에 0.1% 첨가하여 병원성 미생물을 접종한 후 37℃에서 24시간 배양하면서 대조구와 생균수를 비교하였다.

#### 마. 상승제 첨가에 의한 천연물의 항산화성 및 항균활성 측정

상승제(carnosin, ascorbate, glutathion, tyrosine, vitamine C, vitamine E)첨가에 의한 항균활성 측정은 천연물의 항균, 항산화활성 측정시 활성이 확인된 천연물의 항산화 측정은 TBARS로 측정하였으며, 항균활성은 병원성 미생물에 대하여 paper disc method를 이용하여 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 유화안정성 비교

천연물 추출물들이 유화안정성에 미치는 영향을 측정한 결과는 Table 1, 2에 나타내었다. A층 값의 비율이 높을수록 안정된 유화를 생성할 수 있다는 근거

로 볼 때 가열전 A층의 비율이 천연추출물을 첨가하여도 대조구와 비슷한 A층 비율을 나타내었다. 이것은 천연추출물의 첨가량이 0.3% 농도로 첨가되어도 육제품의 가공적성에는 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내는 것이다. 그러나, 추출물의 농도가 0.1%에서 0.3%로 증가함에 따라 가열하기전 유화 안정성은 다소 감소하는 경향이나 큰 변화는 없었다. 그러나, 가열후 추출물의 유화안정성에 미치는 영향도 가열전과 비슷한 경향을 나타내었다. 다만, 오미자의 열수 및 에탄올 추출물의 A층 값은 다른 천연추출물의 A층 비율값 보다 낮은 경향을 나타내고 있다. 이것은 오미자가 다른 천연추출물에 비해 유화안정성에 다소 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 사료된다.

**Table 1. Effect of emulsion stability before heating depending on plant extracts by the method of centrifugation**

Sample	Conc.(%)	Weight ratio of each layer(%)	
		A	B
CON		68.7	31.3
PW	0.1	69.2	30.8
	0.3	68.1	31.9
PE	0.1	70.0	30.0
	0.3	69.6	30.4
GW	0.1	70.2	29.8
	0.3	68.7	31.3
GE	0.1	70.8	29.2
	0.3	70.4	29.6
LW	0.1	70.2	29.8
	0.3	68.6	31.4
LE	0.1	70.8	29.2
	0.3	70.0	30.0
SW	0.1	70.7	29.3
	0.3	69.4	30.6
SE	0.1	76.2	23.8
	0.3	75.7	24.3

CON: Control, PW: Hot water extract of *Pinus densiflora*, PE: Ethanol extract of *Pinus densiflora*, GW: Hot water extract of *Green tea*, Ethanol extract of *Green tea*, LW: Hot water extract of *Lithospermum erythrorhizon*, LE: Ethanol extract of *Lithospermum erythrorhizon*, SW: Hot water extract of *Schizandra chinensis*, SE: Ethanol extract of *Schizandra chinensis*.

A: Unseparated emulsion phase, B: Separated water phase

**Table 2. Effect of emulsion stability after heating depending on plant extracts addition by method of centrifugation**

Sample	Conc.(%)	Weight ratio of each layer(%)	
		A	B
CON		68.0	32.0
PW	0.1	69.2	30.8
	0.3	67.9	32.1
PE	0.1	70.0	30.0
	0.3	68.4	31.6
GW	0.1	69.4	30.6
	0.3	66.0	34.0
GE	0.1	69.4	30.6
	0.3	69.2	30.8
LW	0.1	69.4	30.6
	0.3	67.4	32.6
LE	0.1	70.2	29.8
	0.3	69.2	30.2
SW	0.1	59.1	40.9
	0.3	58.2	41.8
SE	0.1	61.9	38.1
	0.3	61.0	39.0

CON: Control, PW: Hot water extract of *Pinus densiflora*, PE: Ethanol extract of *Pinus densiflora*, GW: Hot water extract of *Green tea*, Ethanol extract of *Green tea*, LW: Hot water extract of *Lithospermum erythrorhizon*, LE: Ethanol extract of *Lithospermum erythrorhizon*, SW: Hot water extract of *Schizandra chinensis*, SE: Ethanol extract of *Schizandra chinensis*.

A: Unseparated emulsion phase + Gel phase, B: Separated water phase

#### 나. 천연물의 항산화력 비교

산화촉진제인  $Fe^{2+}$  이온과  $\cdot OH$ (Hydroxyl radical)에 대한 추출물들의 항산화력과 이미 알려져 있는 각종 항산화제와의 항산화력 비교는 Table 3과 같다.  $Fe^{2+}$  이온에 대한 각 추출물과 항산화제는 대조구 2.69 MDA ppm에 비하여 glutathione을 제외한 모든 처리구에서 낮은 TBARS값을 나타내어 높은 iron binding 효과와 항산화력을 나타내었다. 농도에 따른 항산화 활성은 농도가 증가함에 따라 iron binding 능력이 증가하였다. 또한, 추출물 0.3% 농도에서는 녹차와 오미자의 에탄올 추출물이 0.13 MDA ppm으로 가장 낮은 TBARS값을 나타내었으며, 이는 항산화제인 carnosine의 0.10 MDA ppm과 유사한 값을 나타

내었다. Hydroxyl radical 포집능은 대조구 0.47 MDA ppm 에 비하여 추출물 0.1% 농도에서는 hydroxyl radical 포집능이 미미 하였으나, 0.3% 추출물 농도에서는 대조구에 비하여 자초 열수추출물을 제외하고 추출물 모두 40% 이상의 hydroxyl radical 포집 능력을 나타내었다. 또한, 열수 추출물 보다는 에탄올 추출물이 높은 포집효과를 나타내었으며, 녹차의 에탄올 추출물은 0.13 MDA ppm 으로 다른 항산화제 보다는 낮은 TBARS값을 나타내었다. 이러한 hydroxyl radical에 대해 좀 더 면밀히 살펴보기 위하여 deoxyribose와 특이적 반응을 측정 한 결과 Table 4와 같이 0.1% 농도에서는 hydroxyl radical 포집효과가 나타나지 않았으며, 0.3% 농도는 Table 1과 유사한 경향을 나타내었다. 또한, Deoxyribose 상에서도 녹차의 에탄올 추출물이 가장 낮은 값을 나타내어 녹차의 hydroxyl radical 포집이 vitamin C, vitamin E, carnosine, tyrosine, glutathione 과 같은 항산화제 보다 우수함을 입증하고 있다.

추출물들의 전자공여능은 Table 5와 같이 농도가 증가함에 따라 다소 높은 활성을 나타내었으며, 추출물 모두 추출용매에 관계없이 47% 이상의 높은 활성을 나타내었다. 에탄올 추출물은 열수추출물 보다 전자공여능이 높게 나타났으며, 특히 0.1%의 술잎과 녹차 에탄올 추출물은 각각 84.4%, 74.9%로 각종 항산화제보다도 높은 활성도를 나타내었다. 이는 Kang 등(15)의 술잎 열수추출물과 70% acetone 추출물의 전자공여능이 80.9%, 82.6%로 보고된 값과 유사하였으며, Lee 등(16)의 diethylether 로 추출한 양송이버섯이 33.8%, 표고버섯 38.4%의 전자공여능 보다는 높은 활성을 나타내었다. 이러한 전자공여능은 oxidative free radical과의 반응성에 기초를 둔 것으로 아미노산, 토코페롤, BHA, 갈변물질등 여러 가지 항산화 물질에 대하여 항산화 특성의 중요한 요인이 된다(17, 18).

**Table 3. The comparison of antioxidative ability of hot water and ethanol extracts with various antioxidants depending on concentration (0.1%, 0.3%) in oil emulsion**

Sample	Conc. (%)	Prooxidants	
		Fe <sup>2+</sup>	·OH
-----TBARS(mg MDA/L reaction mixture)-----			
CON		2.69±0.072	0.47±0.059
PW	0.1	0.61±0.027	0.52±0.017
	0.3	0.48±0.006	0.28±0.017
PE	0.1	0.36±0.029	0.31±0.005
	0.3	0.20±0.013	0.28±0.009
GW	0.1	0.26±0.008	0.36±0.066
	0.3	0.15±0.012	0.20±0.014
GE	0.1	0.17±0.007	0.21±0.005
	0.3	0.13±0.002	0.13±0.006
LW	0.1	2.35±0.124	0.66±0.023
	0.3	0.93±0.019	0.57±0.009
LE	0.1	0.66±0.010	1.03±0.014
	0.3	0.30±0.015	0.33±0.023
SW	0.1	1.75±0.031	0.43±0.014
	0.3	0.57±0.023	0.34±0.005
SE	0.1	0.81±0.101	0.50±0.005
	0.3	0.13±0.085	0.29±0.009
Vitamin C	0.1	2.22±0.211	2.72±0.138
	0.3	0.76±0.087	0.73±0.025
Vitamin E	0.1	1.77±0.015	0.30±0.040
	0.3	1.18±0.061	0.25±0.014
Carnosine	0.1	0.30±0.034	0.39±0.034
	0.3	0.10±0.005	0.19±0.016
Tyrosine	0.1	0.26±0.002	0.18±0.027
	0.3	0.07±0.008	0.16±0.006
Glutathione	0.1	5.67±0.221	0.87±0.057
	0.3	5.53±0.059	0.98±0.016

CON: Control, PW: Hot water extract of *Pinus densiflora*, PE: Ethanol extract of *Pinus densiflora*, GW: Hot water extract of *Green tea*, Ethanol extract of *Green tea*, LW: Hot water extract of *Lithospermum erythrorhizon*, LE: Ethanol extract of *Lithospermum erythrorhizon*, SW: Hot water extract of *Schizandra chinensis*, SE: Ethanol extract of *Schizandra chinensis*.

**Table 4. The comparison of antioxidative ability of plant extracts with various antioxidants reacted with hydroxyl radical depending on concentration (0.1%, 0.3%) in deoxyribose**

Sample	Conc. (%)	Hydroxyl radical
		-----TBARS(mg MDA/L reaction mixture)-----
CON		1.22±0.073
PW	0.1	1.43±0.125
	0.3	1.38±0.138
PE	0.1	1.34±0.089
	0.3	0.32±0.013
GW	0.1	1.51±0.107
	0.3	1.21±0.030
GE	0.1	1.26±0.105
	0.3	0.23±0.033
LW	0.1	2.20±0.153
	0.3	0.88±0.086
LE	0.1	2.12±0.111
	0.3	0.56±0.082
SW	0.1	1.53±0.127
	0.3	0.64±0.109
SE	0.1	1.47±0.092
	0.3	0.31±0.116
Vitamin C	0.1	1.33±0.019
	0.3	0.88±0.092
Vitamin E	0.1	1.13±0.044
	0.3	0.39±0.089
Carnosine	0.1	0.75±0.116
	0.3	0.42±0.077
Tyrosine	0.1	1.07±0.047
	0.3	0.56±0.006
Glutathione	0.1	0.90±0.031
	0.3	0.45±0.026

CON: Control, PW: Hot water extract of *Pinus densiflora*, PE: Ethanol extract of *Pinus densiflora*, GW: Hot water extract of *Green tea*, Ethanol extract of *Green tea*, LW: Hot water extract of *Lithospermum erythrorhizon*, LE: Ethanol extract of *Lithospermum erythrorhizon*, SW: Hot water extract of *Schizandra chinensis*, SE: Ethanol extract of *Schizandra chinensis*.

**Table 5. The comparison of electron donating ability of plant extracts with various antioxidants depending on concentration (0.1%, 0.3%)**

Sample	Conc. (%)	Electron donating ability(%)
PW	0.1	54.8±2.27
	0.3	58.8±1.08
PE	0.1	84.1±0.12
	0.3	85.7±0.82
GW	0.1	53.9±2.08
	0.3	55.4±2.45
GE	0.1	95.3±0.20
	0.3	96.9±0.90
LW	0.1	47.3±5.17
	0.3	50.4±0.99
LE	0.1	89.5±2.21
	0.3	89.9±1.28
SW	0.1	50.3±1.86
	0.3	54.0±3.23
SE	0.1	77.7±1.77
	0.3	80.7±3.41
Vitamin C	0.1	64.1±2.48
	0.3	71.3±1.43
Vitamin E	0.1	8.1±1.79
	0.3	19.5±1.68
Carnosine	0.1	48.3±1.55
	0.3	55.4±2.51
Tyrosine	0.1	2.9±2.01
	0.3	13.1±1.49
Glutathione	0.1	60.9±1.24
	0.3	65.3±2.57

CON: Control, PW: Hot water extract of *Pinus densiflora*, PE: Ethanol extract of *Pinus densiflora*, GW: Hot water extract of *Green tea*, Ethanol extract of *Green tea*, LW: Hot water extract of *Lithospermum erythrorhizon*, LE: Ethanol extract of *Lithospermum erythrorhizon*, SW: Hot water extract of *Schizandra chinensis*, SE: Ethanol extract of *Schizandra chinensis*.

다. 천연물의 항균활성

천연물의 열수 및 에탄올 추출물이 병원성 미생물의 생육에 미치는 영향을 paper disc method로 측정한 결과는 Table 6에 나타난 바와 같다. 실험한 천연물의 열수 추출물 모두 병원성 미생물에 대한 항균력을 나타내지 않았으나 천연물의 에탄올 추출물은 시험 병원성 균주 모두에 대해 항균력을 나타내었다. 따라서 천연물 에탄올 추출물의 병원성 미생물에 대한 항균성측정을 위해 생균수를 측정한 결과는 Table 7에 나타난 바와 같다. 실험한 천연물 모두 병원성 미생물에 대하여 항균성을 나타내었고 특히 자초 에탄올 추출물은 배양 24시간 후  $10^1$  CFU/ml로 나타나 천연물 중에서 가장 뛰어난 항균성을 나타내었다. 이는 자초의 에탄올 추출물이 식품 부패 미생물과 식중독 원인세균에 대해 항균력을 나타낸다는 박 등(19)의 보고와 일치하였다. 오미자 에탄올 추출물 역시 배양 24시간 후 모든 병원성 균에 대하여  $10^1$  CFU/ml~ $10^3$  CFU/ml를 나타내었다. 임 (20)의 보고에 따르면 오미자는 모든 병원성균에 대하여 항균성이 뛰어나다고 발표 한 바 있다. 그러나 녹차 에탄올 추출물의 경우에는 시험균주에 따라 차이는 있었으나 배양 초기 균수를 배양 24시간에도 나타내어 병원성 미생물의 성장을 억제하는 것으로 판단되었다. 솔잎과 녹차 추출물의 경우 오미자, 자초의 항균성보다는 떨어졌으나 병원성 미생물의 성장 억제능을 보였다. 솔잎 에탄올 추출물은 *Vibrio*에 항균성을 나타낸 다는 연구도 발표(21)되고 있어 본 실험과 유사한 경향을 보였다.

Table 6. Antimicrobial activities of plant extracts against pathogenic microorganism

Strain No.	SC*		LE		PD		GT	
	water	ethanol	water	ethanol	water	ethanol	water	ethanol
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	-**	+	-	+	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775,	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	+	-	+	-	+
ATCC 19737	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+	-	+	-	+	-	+
Scott A	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+	-	+	-	+	-	+
ATCC 14028	-	+	-	+	-	+	-	+

\*SC ; *Schizandra chinensis*, LE ; *Lithospermum erythrorhizon*, PD ; *Pinus densiflora*, GT ; *Green tea* \*\*+ ; positive, - ; negative

**Table 7. Viable cell of pathogenic microorganism in tryptic soy broth containing plant ethanol extracts incubation for 24 hours**

(log No. CFU/ml)

Pathogens	Incubation					
	time (hrs)	control	SC	LE	PD	GT
<i>B. sub</i>	0	4.19	4.49	4.13	3.00	4.02
	12	8.55	3.85	1.59	3.19	2.86
	24	8.32	1.98	1.24	3.31	2.37
<i>E. coli</i>	0	5.38	5.12	5.09	5.16	5.31
	12	9.01	4.53	2.57	3.73	5.01
	24	9.08	3.28	1.38	3.35	4.56
<i>Staphy. aureus</i>	0	5.44	4.79	4.26	4.60	5.49
	12	8.78	7.08	1.38	2.49	5.17
	24	8.85	3.23	1.11	1.11	5.14
<i>L. monocytogenes</i>	0	5.26	4.92	4.03	4.99	4.90
	12	8.90	3.59	1.49	2.42	4.47
	24	8.79	3.27	1.46	1.60	4.03
<i>Sal. typhimurium</i>	0	5.96	5.01	5.38	5.61	5.74
	12	9.28	4.97	3.65	2.54	5.04
	24	9.94	2.65	1.66	1.59	5.03

라. 각종 항산화제와의 항산화력 비교

앞의 실험에서 항산화성이 우수한 솔잎 및 녹차 추출물에다 기존의 항산화제(Vitamin C, Vitamin E, Carnosine, Tyrosine, Glutathione)와의 상승작용을 알아보기 위하여 TBARS를 측정 한 결과는 다음과 같다. Table 8에 나타난 바와 같이 산화촉진제인 Fe<sup>2+</sup>이온에 대한 binding 능력은 대조구 2.69 MDA ppm에 비하여 Glutathione을 제외한 모든 천연물 처리구에서 낮은 TBARS값을 나타내었다. 또한, 항산화제 단독 처리구 보다 천연추출물의 복합 처리구가 전반적으로 낮은 TBARS값을 나타내어 Fe<sup>2+</sup>이온에 대한 항산화력의 상승효과는 있는 것으로 나타났다. 이것은 앞의 실험에서 밝혀졌듯이 천연추출물의 Fe<sup>2+</sup>이온에 대한 binding 효과에 기인하는 것으로 판단된다. 그러나, hydroxyl radical에 대한 각종 항산화제의 항산화 효과를 검토하기 위하여 TBARS값을 측정한 결과 전반적으로 hydroxyl radical에 대한 항산화 효과는 거의 나타나지 않았다. 오히려, Vitamin C의 경우는 강한 산화촉진제 역할을 하는 것으로 나타났다. 이것은 Vitamin C의 농도에 따른 항산화 작용의 역 현상을 나타낸 것으로 추측되

며 이에대한 정밀한 검토가 요구된다. 그러나, 천연추출물의 복합처리에 의한 항산화력 상승효과는 대조구에 비하여 미미한 것으로 나타남에 따라 hydroxyl radical에 대한 각종 항산화제에 천연추출물 복합효과는 없는 것으로 나타났다.

**Table 8. The comparison of antioxidative ability of hot water and ethanol extracts added various antioxidants on ferrous iron and hydroxyl radical in oil emulsion**

Sample	Prooxidant	
	Fe <sup>2+</sup>	· OH
CON	2.69±0.072	0.47±0.059
Vitamin C	2.22±0.211	2.72±0.138
+PW	0.35±0.045	2.58±0.018
+PE	1.34±0.173	2.34±0.015
+GW	0.71±0.022	2.47±0.022
+GE	0.06±0.020	2.28±0.016
Vitamin E	1.77±0.015	0.30±0.040
+PW	0.46±0.066	0.34±0.019
+PE	0.46±0.050	0.28±0.005
+GW	0.37±0.021	0.34±0.008
+GE	0.35±0.010	0.28±0.014
Carnosine	0.30±0.034	0.39±0.034
+PW	0.31±0.072	0.27±0.007
+PE	0.26±0.009	0.26±0.010
+GW	0.57±0.021	0.33±0.015
+GE	0.28±0.024	0.27±0.012
Tyrosine	0.26±0.002	0.18±0.027
+PW	0.29±0.022	0.18±0.027
+PE	0.28±0.006	0.23±0.011
+GW	0.32±0.018	0.23±0.012
+GE	0.30±0.013	0.28±0.005
Glutathione	5.67±0.221	0.87±0.057
+PW	0.25±0.011	0.45±0.024
+PE	0.98±0.112	0.35±0.004
+GW	0.25±0.013	0.39±0.025
+GE	0.18±0.009	0.35±0.025

CON: Control, PW: Hot water extract of *Pinus densiflora*, PE: Ethanol extract of *Pinus densiflora*, GW: Hot water extract of *Green tea*, Ethanol extract of *Green tea*

마. 상승제 첨가에 의한 천연물의 항균활성

천연물 추출물에 의해 항균활성이 관찰된 병원성 미생물에 대한 상승제 첨가에 따른 항균활성 상승효과를 검토하기 위하여 항균활성이 확인된 천연물 ethanol 추출물에 상승제를 0.3% 첨가하여 clear zone 생성 유무를 측정하여 나타낸 결과는 table 9에서 보는 바와 같다. 실험 천연물과 상승제 혼합물의 실험구 모두에서 clear zone이 생성되었다. 그러나 천연물 에탄올 추출물 자체가 항균성을 가지므로 상승제에 의해 나타난 결과는 아닌 것으로 판단되었다. 따라서 상승제에 의한 천연물 에탄올 추출물의 항균력 상승작용은 없고 천연물 자체의 항균성에 상승제가 영향을 주지는 않는 것으로 판단되었다.

**Table 9. Antimicrobial activities of plant extracts added various antioxidant against pathogenic microorganism**

Strain No.	SC*					LE				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Antioxidants**										
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>										
ATCC 19737	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>										
Scott A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>										
ATCC 14028	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Strain No.	PD					GT				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Antioxidants										
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	+	+	+	+	+	+w	+w	+w	+w	+w
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775,	+	+	+	+	+	+w	+w	+w	+w	+w
<i>Staphylococcus aureus</i>										
ATCC 19737	+	+	+	+	+	+w	+w	+w	+w	+w
<i>Listeria monocytogenes</i>										
Scott A	+	+	+	+	+	+w	+w	+w	+w	+w
<i>Salmonella typhimurium</i>										
ATCC 14028	+	+	+	+	+	+w	+w	+w	+w	+w

\*SC ; *Schizandra chinensis*, LE ; *Lithospermum erythrorhizon*, PD ; *Pinus densiflora*, GT ; *Green tea* \*\*I ; Vitamin C, II ; Vitamin E, III ; carnosine, IV ; tyrosine, V ; glutathione

#### 4. 요약

선발된 천연 식물체 추출물의 가공적성을 검토하기 위하여 천연 식물체 추출물 첨가시 유화특성에 미치는 영향을 검토하였고 아울러 단일 식물체 추출물 보다는 추출물을 복합적으로 사용시 항산화력 및 항균력에 대한 상승작용도 검토하였다. 선발된 천연식물체 추출물(솔잎, 녹차, 자초, 오미자)의 첨가가 유화안정성에 미치는 영향은 농도에(0.1%, 0.3%) 관계없이 추출물 모두 유화안정성에 미치는 영향이 미미한 것으로 나타나 가공적성에 미치는 영향은 없는 것으로 판단된다. 또한, 각종 항산화제에 천연추출물의 항산화성 상승효과 실험은 녹차와 오미자의 에탄올 추출물이 가장 낮은 TBARS값을 나타내어 강한 항산화력을 나타내었으며, 이는 강력한 천연 항산화제인 carnosine의 0.10 MDA ppm 과 유사한 값을 나타내었다. 전자공여능은 솔잎과 녹차 에탄올 추출물이 각각 84.4%, 74.9%로 각종 다른 항산화제보다도 높은 활성도를 나타내었다. 각종 항산화제와 천연추출물의 복합처리는 단독 처리구 보다 추출물의 복합 처리구가 낮은 TBARS값을 나타내어 항산화력은 상승효과를 나타내었으나, 항산화제의 복합처리에 의한 항균작용에 대한 상승작용은 없는 것으로 나타났다.

#### 5. 문헌

1. 송인상: 고기 유화물 제조의 이론과 실제. 솔계원 박사 정년퇴임 기념논문집, 제 6장, p.143(1988)
2. 이무하, 성삼경: 가공육제품 제조. 식육과 가공의 과학. 선진문화사, 제 6장, (1992)
3. Hensen, L.J.: Emulsion formation in finely community sausage. *Food Technol.*, 14, 565(1960)
4. Swift, C.E., Locker, C. and Fryar, A.J.: Community meat emulsions, the capacity of meats for emulsifying fat. *Food Technol.*, 15, 468(1961)
5. Helmer, R.L. and Saffle, R.L.: Effect of chopping temperature on the stability of sausage emulsion. *Food Technol.*, 17, 115(1963)
6. Smith, D.M.: Meat proteins : Funtional properties in comminuted meat

- product. *Food Technol.*, **42**, 116(1988)
7. Forrest, J.C., Alberle, E.D., Hendrick, H.B., Judge, M.D. and Merkel, R.A.: "Principles of Meat Science." Freeman, W.H. and Co., San Francisco, Calif(1975)
  8. Acton, J.C., Ziegler, G.R. and Burge, D.L.Jr.: Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **18**, 99(1983)
  9. Asghar, A., Samejima, K. and Yasui, T.: Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **22**, 27(1985)
  10. King, N.L. and MacFarlane, J.J.: Muscle proteins. In "Advances in Meat Research-Restructured Meat and Poultry Products,"ed. Pearson, A.M. and Dutson, T.R. Van Nostrand Reinhold Co., New York. **3**, 21(1987)
  11. Meyer, J.A., Brown, W.L., Gilther, N.E. and Guinn, J.R.: Effect of emulsifiers on the stability of sausage emulsions. *Food Technol.*, **138**, 1796(1964)
  12. Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, **105**, 302(1978)
  13. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1198(1958)
  14. Vanderzant, C., Ph D., D. F. Sjlittstoesser, D. F., Ph D. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3ed., American Health Association.
  15. Kang, Y.H, Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D.: Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort Extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(6), 978(1995)
  16. Lee, G.D., Chang, H.G. and Kim, H.K.: Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(3), 432(1997)
  17. 김상달, 도재호, 오훈일: 고려인삼 갈변물질의 항산화효과. *한국농화학학회지*, **24**, 161(1981)
  18. 이정수: 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성에 관한 연구. 부산대학

- 교, 석사학위논문(1989)
18. 박경남: 솔잎 추출물이 *Vibrio*의 생육에 미치는 영향. 대구가톨릭대학교 석사학위논문.(2000).
  19. 임용숙: 오미자 추출물이 *Listeria monocytogenes*의 생육에 미치는 영향. 대구가톨릭대학교 박사학위논문. (1997)
  20. 박옥연, 장동석, 조학래: 자초 추출물의 항균특성. 한국영양식량학회지. 21, 97.(1992)

## 제 2 절 솔잎 및 녹차 추출물을 이용한 기능성 육제품 개발에 관한 연구

### Studies on developments of functional meat products using plant extracts from pine needle and green tea

#### Abstract

The natural sources extracted from green tea and pine needle were utilized to investigate the effects of extracts on free radical reaction, lipid oxidation and nitrite scavenging ability. The purpose of these research is to develop functional sausage using plant extracts from green tea and pine needle. The degree of lipid oxidation is very sensitive to kinds of oil emulsion reacted with iron sources and oxygen species. The results revealed the highest TBARS value in case of fish oil was used in oil emulsion. Thus, fish oil was used to investigate antioxidant ability of plant extracts from green tea and pine needle. The antioxidants of extracts from green tea and pine needle were different depending on concentration of extracts, which were a lower TBARS value in 0.3% extracts concentration, compared to 0.1% extracts concentration. And also, the binding ability on iron sources was superior in hot water extracts, but oxygen scavenging ability was the lowest TBARS values in ethanol extracts. The important factor of lipid oxidation were  $Fe^{2+}$  ion and active oxygen, in which were bound by plant extracts except GSH in case of  $Fe^{2+}$  ion and  $Cu^{2+}$  ion were existed. However, the hydroxyl radical scavenging ability of extracts were lowed, compared to extracts reacted with  $Fe^{2+}$  ion and hemoglobin. The hydroxyl radical scavenging ability of green tea and pine needle extracts had a little low TBARS value in 0.1% and 0.3% extracts concentration in deoxyribose. The ethanol extracts of pine needle were higher than those of hot water extracts on the basis of  $Fe^{2+}$  ion content. The ascorbic acid content of green tea showed 14.3 mg/100 g in hot water extracts and 16.7 mg/100 g in ethanol

extracts. Electron donating ability of extracts showed difference depending on extracts concentration, which were higher in ethanol extracts than those of hot water extracts. The nitrite scavenging effects were tended to be different depending on pH value, however they were decreased overall as pH value was increased. Especially, the nitrite scavenging ability of 0.3% extracts from green tea and pine needle were the most effective in pH 1.2 and pH 3.0, which were showed 95% nitrite scavenging ability. The functional sausage was prepared to carried out to investigate functional and storage characteristics through effective extracts. This products were stored at different temperature. The changes of pH were tended to be a little ranged from pH 6.07 to pH 6.35 in control. At the same time, the pH changes treated with plant extracts showed the same tendency as control.

The treatments using natural extracts revealed a little low TBARS value during storage at 10°C. But, they were not significantly different( $P>0.05$ ).

The nitrite scavenging ability of extracts from pine needle were higher than green tea extracts, irrespective of storage temperature. As storage time goes by, the nitrite contents of sausage product gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. The VBN content was tended to be increased as storage time goes by, irrespective of storage temperature. The changes of VBN contents were rapidly more increased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. The treatments using plant extracts revealed a little low VBN content, compared to control during storage. The total bacteria was tended to be increased as storage time goes by, irrespective of storage temperature. The changes of total bacteria were more increased to  $2.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^6$  CFU/g during storage at 30 °C than  $2.2 \times 10^1 \sim 3.3 \times 10^2$  CFU/g in case of storage at 10 °C. The treatments using plant extracts revealed an antimicrobial activity until storage at 3 days, compared to control. The lightness of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. Overall, the lightness of sausage color treated with pine needle extracts were a more bright than those of control. However, the

redness of sausage color treated with pine needle and green tea showed the most lowest red color, compared to control.

Sensory test suggested that the changes of sausage color, flavor, texture and taste were tended to be decreased gradually. Especially, sensory score were rapidly decreased for 20 days storage at 30℃. However, the sensory scores of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30℃ than those of stored at 10℃.

In conclusion, these research suggested that pine needle and green tea were the most effective plant extracts on the basis of the functional properties (antioxidants and nitrite scavenging ability). At the same time, sausage prepared from pine needle extract was the most effective natural resources on the basis of the functional and physico-chemical properties.

## 1. 서 론

최근에는 식품분야에서 효소는 아니지만 활성산소의 반응성을 감소 또는 무력화할 수 있는 물질의 발굴과 이용에 관한 연구가 커다란 관심이 되고 있다(1-4). 유지의 지방산화에서 알 수 있듯이 어느 산화방지제가 모든 종류의 유지류에 같은 산화방지 효과를 나타내지는 못한다. 즉, 특정 물질이 생체의 산화반응 또는 radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제하지는 못하는 것으로 이해되며, 활성산소의 종류, radical source 및 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화 물질의 연구가 필요하다.

유지의 산화에 의한 산패는 free radical chain reaction에 의한 자동산화 반응과 lipoxygenase 등에 의한 효소적 산화로 만들어진 일중항산소(singlet oxygen)가 불포화지방산과 반응하여 생성된 nonconjugated diene 화합물에 의한 산패로 구분할 수 있다(5). 이러한, 식용유지에 대한 항산화 연구로 팜유(6), 돈지(6), 참기름(7), 어유(8), 대두유(9), 면실유(9), 우지(10) 등에 관한 연구가 진행되어 왔으며, 지방의 산화방지에 사용되는 항산화제로는 항산화성이 강하고 가격이 저렴한 butyl hydroxy anisol이나 butyl hydroxy toluene 등이 있으나, 인체에 미치는 독성이 크기 때문에 사용이 제한되고 있다(11). 따라서, 항산화능

이 높고 보다 더 안전한 항산화제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되어 왔다(12).

또한, 육류의 지질에 대한 연구로는 지방 산화속도에 영향을 미치는 인자로서 지방산조성, 금속성 촉매제, 산소분압, 온도 및 광선 등이 연구되고 있다(13). 특히, 근육에 존재하는 미오글로빈은 그 존재형태에 따라 자유라디칼의 형성을 촉매함으로써 지방산화를 가속화시킨다고 알려져 있다(14, 15). Lie 등(16)은 미오글로빈에 의한 산화촉매 기능은 신선육에서 두드러진다고 하였고, Green 등(17)은 가열 등에 의하여 미오글로빈이 변성되면 철 이온과 불포화 지방산이 쉽게 반응하는데, non-heme iron 과는 달리 산화형( $Fe^{3+}$ )일 때 보다 강력한 산화촉매 작용을 한다고 하였다. Lewis 등(18)과 Kunsman 등(19)은 햄 화합물의 산화촉진작용은 불포화지방산에 비하여 상대적으로 낮은 비율로 존재할 때 뚜렷하였고, 반면 높은 비율로 존재할 경우에는 지방산화를 촉진하기보다는 오히려 억제한다고 하였다.

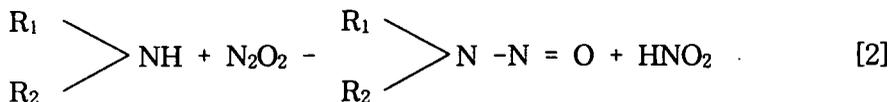
Keller 등(20)은 육류의 지질성분중 인지질은 불포화지방산의 함량이 높아 변화에 가장 민감하다고 하였고, Younathan 등(21)도 육류의 인지질이 중성지질보다 훨씬 산화에 민감하며 가열할 때 산패취를 낸다고 하였다. Igene 등(22)은 계육을 가열할 때 warmed-over flavour(WOF)를 일으키는 주요인자는 인지질이며, triglycerides는 인지질과 반응하였을 때에만 WOF 생성에 관여하며 TBA가와 관능평가 사이에 상관관계가 높았다고 보고하였다. 그리고, Zipser 등(23)은 TBA값이 과산화물가보다 산패취와의 상관관계가 높다고 하였다. Igene 등(22)은 가열에 의해 myoglobin에서 떨어져나간 nonheme iron이 산화를 촉진시킨다고 하였으며 Sato 등(24)은 가열처리육에서는 myoglobin보다 nonheme iron이 산화를 촉진시킨다고 하였는데 nonheme iron중  $Fe^{2+}$ 이  $Fe^{3+}$ 보다 활성이 높다고 하였다. Wills(25)는 nonheme iron에 의한 산화촉진은 pH에 민감하여 산성일수록 더 높았으며, myoglobin은 pH에 의한 영향을 거의 받지 않았다고 하였다.

Younathan 등(26)은 육류를 가열처리할 때 myoglobin이 강력한 산화촉진제인 ferric hemochromogen으로 바뀐다고 하였으며, Liu 등(27)은 myoglobin에 의한 산화촉매는 신선육에서만 볼 수 있다고 하였다. Green 등(28)은 가열에 의해 myoglobin이 변성되어 철이온과 불포화지방산이 쉽게 반응되는데 myoglobin은 nonheme iron의 경우와 달리 철이온이  $Fe^{3+}$ 일 때 강력한 산화촉매를 한다

고 하였다. Mottram 등(29)에 의하면 육류의 주요 풍미성분은 aldehyde와 alcohol이고 돈육은 다른 육류보다 hexanal의 함량이 현저하게 높으며, linoleic acid의 산화로 hexanal이 생성된다고 하였다.

또한, 최근 식품의 가공, 저장 및 조리중 식품성분들의 상호반응으로 식품의 저장성과 기호성 향상을 목적으로 첨가되는 식품첨가물과 식품성분과의 반응에 의하여 돌연변이 유발작용이나 발암작용을 갖는 유전독성물질의 생성이 식품의 안전성 측면에서 중요한 문제로 대두되고 있다(30). 발암물질의 대표적인 예로 육제품이나 수산가공품 등에 발색제로 첨가되는 질산염이나 아질산염은 육색의 발색 및 안정화(31) 뿐만 아니라, *Clostridium botulinum*에 대한 정균작용(32), 육제품의 풍미 향상(33), 산패취 발생감소(34-37) 등을 개선하는데 중요한 역할을 한다. 그러나, 식품 및 생체내의 잔존 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내며 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중에 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키며(38), 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 함유되어 있는 2급 및 3급 아민류와 반응하여 발암성 nitro- samine을 생성하는 것으로 알려져 있다(39, 40).

따라서, 식품의 가공중에 발생하는 nitrosamine을 억제하기 위하여 육제품 제조시 nitrosamine의 발생 가능성(41), 우리 고유의 발효식품중 김치와 젓갈류의 숙성과정중에서 발생하는 2급 amine의 생성(42)에 관한 연구가 진행되고 있다.



$$\text{Rate} = \kappa_1 [\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}] [\text{NHO}_2]^2 \quad [3]$$

$$\text{Rate} = \kappa_2 [\text{total amine}] [\text{nitrite}]^2 \quad [4]$$

Where  $\kappa_1$  and  $\kappa_2$  are the respective rate contents

Fig. 1. Reaction of nitrosation and equation of reaction rate(43).

이러한, 아질산과 2급 amine 과의 dialkylnitrosamine 생성반응은 Mirvish에 의한 방정식[1]과 [2]를 통해 진행되며, 그 반응속도는 방정식[3] 또는 [4]와 같이 amino 산과 nitrite 농도의 제곱에 비례한다(Fig. 1).

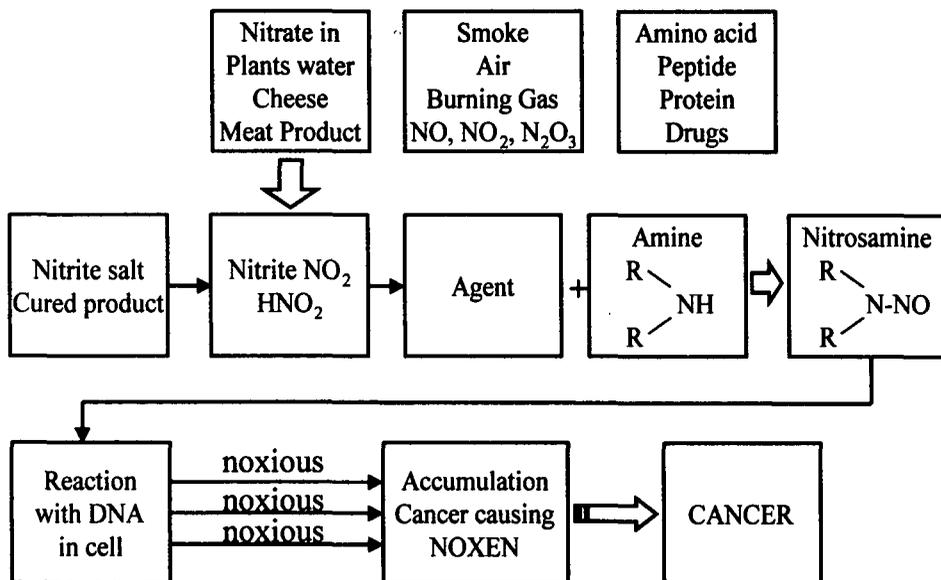


Fig. 2. Formation of nitrosamine and carcinogenicity(43).

최근에 Kanner(44)는 S-nitroso-cysteine 이 육류에서 항산화제로서의 효능을 가질 뿐만 아니라 발색과 *Cl. botulium* 에 대한 항균성 때문에 nitrite에 대한 대체원이라고 제안하였다. 대체원 개발에 대한 가장 최근의 접근 방법은 nitrosamine blocking agent 또는 *Cl. botulium* 과 함께 nitrite를 감량하여 사용하는 것이다. Nitrosamine 억제제로서의 작용하는 화합물로서 ascorbate와 erythorbate가 연구되고 있고(ascorbate와 erythorbate가 효과적이기는 하나 제품의 지방조직에 용해성이 있음) 또한, fried bacon 제조시 polysorbate 유화제와 함께  $\alpha$ -tocopherol을 500 ppm 사용했을 때 매우 효과적이라는 것이 밝혀졌다(45).

그 외에 sodium hypophosphite를 저농도의 아질산나트륨과 함께 bacon에 첨가하는 방법, lactic acid producing bacteria를 첨가하는 방법, potassium sorbate와 nitrite의 혼합사용방법(46) 또는 sorbic acid와의 혼합사용(47)등이 antibotulinal activity에 효과적이라고 하였다.

이러한 nitrite는 온도, 산성 pH 또는 ascorbate 존재하에 염지액(48)이나 염지육(49, 50)에서 감소한다는 보고가 있으며, Zipser 등(23)은 nitrite가 myoglobin을 ferrous nitric oxide hemochromen으로 변화시켜 iron porphyrin과 안정한 결합을 하게 하여 WOF와 산화를 억제한다고 하였다. Sato 등(24)은 nitrite에서 환원된 nitric oxide가 효과적인 free radical 수용체가 된다고 하였다. Gray 등(51)은 아질산염을 처리한 돈육은 pentanal과 hexanal의 함량이 크게 감소되었다고 한다.

따라서, 본 연구는 식품의 가공 및 저장에서 일어나는 각종 위해요인을 제거할 수 있는 천연물 탐색의 일환으로 육제품 제조시 첨가되는 잔존 아질산염의 함량을 낮추고자 식물체로서 그 효능을 높이 평가받고 있는 솔잎과 녹차 추출물이 지질산화반응과 free radical에 미치는 영향을 검토하고, 각종 항산화제들과 항산화력을 비교, 검토하고자 하였다. 또한, 최근 천연물을 첨가한 많은 기능성 식품이 개발되고 있는 반면, 육제품에 대한 사례는 없는 듯하여, 이러한 솔잎과 녹차를 육제품 제조시 첨가하여 기호성, 저장성 및 잔존 아질산염의 함량을 비교, 분석하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 솔잎, 녹차 추출물의 기능성 검토(실험 I)

#### 1) 재 료

녹차는 경산시장내 농협에서 구입하여 사용하였으며, 솔잎은 경산대학교 인근 야산에서 채취하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 특급시약이며, 항산화제( $\alpha$ -tocopherol, carnosine, tyrosine, glutathione), Trichloroacetic acid(TCA), Griess reagent (sulfanilic acid, naphthylamine) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였고, ascorbic acid는 Fisher Scientific에서 구입하였으며, 2-thiobarbituric acid(TBA)는 Eastern Organic Chemicals(Roochester, NY)에서 구입하여 사용하였다.

### ① 시료조제

솔잎과 녹차는 각각 20 g 에 증류수 100 ml 를 가하여 85 ℃ 에서 3시간 동안 2회 반복 추출하고, Whatman No. 1로 여과한 후 동결건조 하였다. Ethanol 추출물은 솔잎과 녹차 각각 20 g 에 200 ml 를 넣고 상온에서 24 hr 정치시킨 후 Whatman No. 1에 여과한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

### ② Oil emulsion 조제

Oil emulsion은 사용하기 전에 만들고 pH 6.5 로 보정한 0.1 M maleic acid buffer, 8 ml 를 넣은 다음 50  $\mu$ l 의 tween-20 과 0.5 ml 정도의 oil(cotton seed oil, linseed oil, fish oil, lard oil) 을 넣고 15분간 교반한 후 KOH 2~3 조각을 넣고 교반하면서 0.1 N HCl로 pH 6.5 가 되도록 제조하여 사용하였다.

### ③ Liposome(PC; phosphatidylcholine) 조제

Liposome의 조제는 Lee와 Hendricks(52)의 방법으로 Multiamellar liposome을 제조하였다. 500 mg의 PC를 chloroform에 녹인후 100 ml 비이커에서 진공 건조하에 건조시킨 다음 50 mM hepes buffer(5 mg PC/ml) 100 ml를 넣고 branson sonifier 450으로 10 plus, 30초 동안 sonicated 한 다음 pH 7.4로 보정한 후 사용하였다.

## 2) 실험방법

### ① Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(53)에 따라 측정하였다. 1 ml 반응 혼합물이 채워진 시험관을 37 ℃ water bath 에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나자마자 50  $\mu$ l dibutylhydroxytoluene (BHT) 7.2 % 를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000×g 의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도(HITACHI UV-2001) 531 nm 에서 측정하였고, 공시료는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해서  $\mu$ g malondialdehyde (MDA)로 표시하였다.

## ② Hydroxyl radical( $\cdot$ OH)의 생성 측정

Hydroxyl radical( $\cdot$ OH)의 생성 측정은 Gutteridge(54)의 방법에 의해 측정하였다. Oil emulsion 대신에 deoxyribose를 사용하여 1 ml 반응 혼합물이 채운 시험관을 37 °C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 직후 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고, 혼합하여 끓는 물에서 15분간 가열시킨 후 찬물에서 냉각시켜 2,000×g의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도 531 nm에서 측정하였다.

## ③ Nonheme iron(비헴철) 측정

Nonheme iron(비헴철) 측정은 Ferrozine iron 분석방법(55)을 약간 수정하여 측정하였다. Total iron 분석을 위해서 1 ml 시료를 사용하였고, 여기에 2% ascorbic acid (w/v) 0.1 ml를 가하여 혼합한 다음, 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 11.3% TCA(w/v) 1 ml를 가하고 섞은 다음 반응물을 3,000×g에서 15분간 원심분리 시켰다. 상등액 2 ml를 시험관에 옮기고 0.8 ml의 10% ammonium acetate와 0.2 ml의 ferrozine color reagent(75 mg ferrozine + 75 mg neocuproine + HCl 1 drop)를 가하여 섞은 다음 시료를 3,000×g에서 15분간 원심분리 시킨 다음 5분 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferrous iron( $Fe^{2+}$ )분석도 단지 0.1 ml ascorbate 대신에 0.1 ml TCA를 가한 후 위의 방법과 같이 측정하였다.

## ④ Ascorbic acid 측정

Ascorbic acid 측정은 Sikic 등(56)의 방법에 따라 시료를 10분 동안 10,000×g에서 원심분리 시키고, 상등액 0.5 ml를 취하여 5% TCA 2 ml로 단백질을 침전시켰다. 다시, 4 °C에서 10분 동안 15,000×g에서 원심분리 시키고, 상등액 0.5 ml를 취하여 85% orthophosphoric acid 0.05 ml, 8%  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl 0.05 ml, 3% aqueous ferric chloride 0.05 ml를 가한 후, 1시간 동안 ferrous dipyritydyl chromophore 물질이 생성되도록 실온에 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

⑤ 전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(57)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2 ml 에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH(1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 1.0 ml 를 넣고 vortex 한 후 30 분 동안 방치한 다음 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은  $100 - [(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도) \times 100]$  으로 나타내었다.

⑥ 아질산염 소거작용 측정

아질산염 소거작용 측정은 Kato 등(58)의 방법으로 1 mM  $\text{NaNO}_2$  용액 2 ml 에 각 시료 1 ml 를 가하고, 0.1 N HCl(pH 1.2), 0.2 M 구연산 완충액(pH 3.0, pH 6.0)으로 각각 pH 1.2, 3.0, 6.0으로 보정한 다음 반응용액의 부피를 10 ml 로 하였다. 이 용액을 37 °C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1 ml 를 취하여 2% 초산용액 2 ml 와 30% 초산용액으로 용해한 griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml 를 가한 후 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 griess reagent 대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은  $100 - [(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도) \times 100]$  으로 나타내었다.

나. 솔잎, 녹차 추출물을 이용한 소시지의 기능적 특성 및 저장성검토  
(실험Ⅱ)

1) 재료

① 소시지제조 배합비와 제조공정

i) 소시지 배합비율

Table 1. Sausage formulation

Ingredients	Absolute value(g)	Contents(%)
Pork	3000	} 100
Fat	1000	
Ice	1000	
NaCl	80	1.6
MSG	15	0.3
Sugar	15	0.3
Sodium phosphate	15	0.3
Nitrite	0.75	0.015
L-ascorbic acid	2.5	0.05
Casein	50	1.0
White pepper	15	0.3
Allspice	5	0.1
Nutmeg	2.5	0.05
Sage	2.5	0.05
ISP	50	1.0
Starch	50	1.0

ii) Sausage 제조 공정

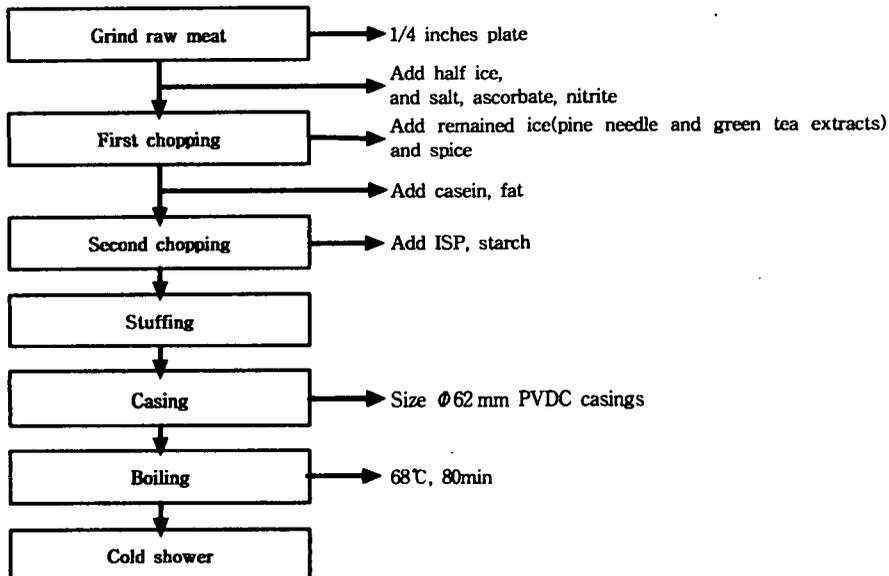


Fig. 3. Preparation process of sausage.

## 2) 실험방법

### ① 시료 조제

시료 조제는 소시지에 3배의 증류수를 가하여 유허기로 분쇄한 다음 50 ml 시험관에 옮기고 다시 Brinkman Polytron(Type PT 10/35)으로 2초간 최고 속도로 분쇄시켰다. 4 ml의 분쇄물을 polyethylene 시험관(17×100 mm)에 옮겨 실험에 사용하였다.

### ② 포장재

실험에 사용된 소시지 포장재는 polyvinylidene chloride(PVDC) coating(3.7  $\mu$ m)을 사용하였으며, 포장재의 크기는 100 × 62 (가로 × 세로) mm 로 사용하였다.

### ③ pH 측정

pH는 일반적인 방법에 따라 시료 5g 을 3배의 증류수를 가해 homogenate 한 후 pH meter (Model DP-135M)로 측정하였다.

### ④ Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정은 실험 I 의 방법과 동일하나 단지 37  $^{\circ}$ C, 1 hr 동안 incubation 시키지 않고 수행하였다.

### ⑤ 잔존 아질산염 함량측정

잔존 아질산염 함량측정은 실험 I 의 방법과 동일하나 완충액 대신 증류수를 사용하였고, 37  $^{\circ}$ C, 1 hr 동안 incubation 시키지 않고, 520 nm 흡광도 측정 후 표준곡선에 대입하여 함량을 ppm 단위로 나타내었다.

### ⑥ Volatile Basic Nitrogen(VBN) 함량 측정

휘발성 염기태질소(VBN)함량은 高板(59)의 방법으로 시료 10 g 에 증류수 30 ml 을 첨가한 후, 15,000 rpm 에서 2분간 homogenate 한후 100 ml 로 정용하여 whatman No. 1으로 여과하였다. 여과액 1 ml 를 conway 확산용기 외실에 넣고, 내실에는 0.01N H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1 ml 와 conway(0.066% methyl red : 0.066% brom- cresolgreen = 1:1) 시약을 2~3방울을 넣은 후 덮개를 살짝 닫아 미끄러

뜨린 후 외실에  $K_2CO_3$  (100 ml의 증류수에 50 g의  $K_2CO_3$  를 녹인 후 실온에서 24시간 방치한 다음 상층액을 사용하였다.) 1 ml 를 빠르게 주입하였다. 용기 외실의 용액이 잘 섞이도록 수평으로 회전시킨 다음 37 °C 에서 2시간 incubation 한 후 덮개를 열고 내실에 0.02N  $H_2SO_4$  로 색깔이 공시험구와 동일하게 될 때까지 적정하였다. 공시험구는  $K_2CO_3$  대신 증류수를 넣고, 소요된 0.02N  $H_2SO_4$  의 ml 를 mg%로 환산하여 나타내었다.

#### ⑦ 시료채취와 미생물학적 검사

제조된 소시지 10g에 멸균 증류수 90 ml 를 넣어 homogenizer(ACE nissei AM 12, Japan)를 이용하여 15,000 rpm에서 90초간 균질화 시킨 후 멸균 거즈를 이용하여 상등액을 취하였다. 상등액 1 ml 를 원액으로 하여 0.1% peptone 희석액에 적정희석한 후 pour plate method(60)로 적정배지에 접종하여 생균수를 측정하였다.

**Table 2. Media and conditions of incubation**

Type of count	Medium	Temp	Time
Total bacterial count	Plate count agar(Difco)	37°C	24hr

#### ⑧ 색차 측정

소시지의 색은 시료를 직경 3 cm, 높이 2.4 cm 의 크기로 자른 후 1개 시료당 9개를 coring 하여 30분간 공기 중에 노출시켜 발색시킨 후 polyethylene 필름으로 한 겹 포장하여 색차계(Color difference meter, Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 Hunter 값(L=명도, a=적색도)으로 표시하였다. 이때 사용된 표준색판은 기기의 manual 에 따라  $Y=94.95$ ,  $a=0.3132$ ,  $b=0.3203$  으로 하였으며, 6회 반복하여 평균값을 구하였다.

#### ⑨ 관능검사

관능검사는 소시지의 저장기간(0, 1, 5, 10, 20, 30, 40일) 중에 일어나는 변화를 알아보기 위하여 소시지를 10 °C, 30 °C 에서 저장하면서 색, 풍미, 조직감

그리고 맛을 평가하였다. 선정된 관능요원은 충분한 훈련을 거쳐 소시지의 품질 차이를 식별할 수 있는 능력이 갖추었다고 여겨지는 8명으로 구성되었다. 평가 방법은 5점법으로 기호도 검사법(61)으로 실시하였으며, 맛, 조직감 그리고 색은 아주 나쁘다 : 1점, 나쁘다 : 2점, 보통이다 : 3점, 좋다 : 4점, 아주 좋다 : 5점으로 각 시료를 평가하였다.

#### ⑩ 통계처리

통계처리는 각각의 시료에 대해 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 분산분석을 한 후  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 솔잎, 녹차 추출물의 기능성 검토

##### 1) 농도별 솔잎과 녹차추출물이 지방산화에 미치는 영향

식물체 추출물들의 지방산화 촉진인자인 iron sources와 활성산소종 지방산화를 일으키는데 주요한 역할을 하는 hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ )에 대한 각 추출물들의 농도별 영향을 Table. 3에 나타내었다. 농도별 솔잎과 녹차 추출물의 지방산화는 0.1%보다 0.3%가 전반적으로 낮은 TBARS값을 나타내어 농도 증가에 따른 항산화력이 증가하는 경향이였다. 이러한 농도별 항산화력 증가 경향은 Cheigh 등(63)이 보고한 연구결과와 일치하는 것이다.

이러한 솔잎과 녹차추출물의 항산화력을 농도별로 각종 항산화제와 비교하였다. 그 결과 Table 3과 같이 지방산화 촉진제인 iron sources와 활성산소 중에서 Hb첨가구가 가장 높은 TBARS값을 나타내었으며, 솔잎과 녹차추출물은 전반적으로 지방산화 촉진제인 iron sources와 활성산소에 대한 항산화력이 나타내었다. 또한,  $\text{Fe}^{2+}$ 과  $\text{Cu}^{2+}$ 이온 binding 능력은 솔잎추출물 보다 녹차추출물이 낮은 TBARS값을 나타내었으며, 이는 vitamin C, vitamin E 보다도 더 낮은 값을 나타내었다. Hb에 대한 항산화력은 솔잎과 녹차 추출물 모두 각 항산화제 보다도 낮은 TBARS값을 나타내었다. 솔잎과 녹차추출물의 활성산소종에 대한

항산화력은 미미하였으며, ·OH에 대한 지방산화 억제정도는 솔잎과 녹차 에탄올 추출물이 우수하였으며, 특히, 녹차 에탄올 추출물은 각 항산화제 보다도 낮은 TBARS값을 나타내었다.

**Table 3. The comparison of antioxidant ability of hot water and ethanol extracts with various antioxidants depending on concentration(0.1%, 0.3%) in oil emulsion**

	Concentration(%)					
	0.1			0.3		
	Fe <sup>2+</sup>	Hb	·OH	Fe <sup>2+</sup>	Hb	·OH
	-----TBARS(mg MDA/L reaction mixture)-----					
CON	2.69±0.072 <sup>b</sup>	5.00±0.076 <sup>a</sup>	0.47±0.059 <sup>cd</sup>	2.69±0.072 <sup>b</sup>	5.00±0.076 <sup>a</sup>	0.47±0.059 <sup>c</sup>
PW	0.36±0.027 <sup>et</sup>	0.39±0.005 <sup>e</sup>	0.52±0.017 <sup>c</sup>	0.20±0.006 <sup>t</sup>	0.23±0.010 <sup>s</sup>	0.28±0.017 <sup>d</sup>
PE	0.61±0.029 <sup>e</sup>	0.30±0.116 <sup>c</sup>	0.31±0.005 <sup>etg</sup>	0.48±0.013 <sup>e</sup>	0.98±0.031 <sup>t</sup>	0.28±0.009 <sup>d</sup>
GW	0.26±0.008 <sup>t</sup>	0.21±0.006 <sup>e</sup>	0.36±0.066 <sup>det</sup>	0.13±0.012 <sup>tg</sup>	0.21±0.006 <sup>s</sup>	0.13±0.014 <sup>t</sup>
GE	0.17±0.007 <sup>t</sup>	0.19±0.009 <sup>e</sup>	0.21±0.005 <sup>tg</sup>	0.15±0.002 <sup>tg</sup>	0.18±0.003 <sup>s</sup>	0.20±0.006 <sup>det</sup>
VC	2.22±0.211 <sup>c</sup>	2.41±0.027 <sup>d</sup>	2.72±0.138 <sup>a</sup>	0.76±0.087 <sup>d</sup>	2.16±0.082 <sup>d</sup>	0.73±0.025 <sup>b</sup>
VE	1.77±0.015 <sup>d</sup>	4.24±0.156 <sup>b</sup>	0.30±0.040 <sup>etg</sup>	1.18±0.061 <sup>c</sup>	4.16±0.087 <sup>b</sup>	0.25±0.014 <sup>de</sup>
CA	0.30±0.034 <sup>t</sup>	2.88±0.025 <sup>c</sup>	0.39±0.034 <sup>cte</sup>	0.10±0.005 <sup>tg</sup>	1.32±0.058 <sup>e</sup>	0.19±0.016 <sup>et</sup>
TY	0.26±0.002 <sup>t</sup>	3.02±0.064 <sup>c</sup>	0.18±0.027 <sup>g</sup>	0.07±0.008 <sup>g</sup>	2.58±0.123 <sup>c</sup>	0.16±0.006 <sup>t</sup>
GSH	5.67±0.221 <sup>a</sup>	2.32±0.409 <sup>d</sup>	0.87±0.057 <sup>b</sup>	5.53±0.059 <sup>a</sup>	4.01±0.085 <sup>d</sup>	0.98±0.016 <sup>a</sup>

Fe<sup>2+</sup>, 5 ppm; Hb, 4mM; ·OH, 5 ppm Fe<sup>2+</sup>+4mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(final concentration).  
 CON: control, PW: pine needle hot water extract, PE: pine needle ethanol extract, GW: Green tea hot water extract, GE: Green tea ethanol extract, VC: vitamin C, VE: vitamin E, CA: Carnosine, TY: Tyrosine, GSH: Glutathione. <sup>a-g</sup> Means in the same column bearing different superscript are significantly different(P<0.05).

**Table 4. The comparison of antioxidant ability of plant extracts with various antioxidants reacted with hydroxyl radical depending on concentration(0.1%, 0.3%) in deoxyribose**

	Concentration(%)	
	0.1	0.3
	-----TBARS(mg MDA/L reaction mixture)-----	
CON	1.81 ± 0.024 <sup>b</sup>	1.81 ± 0.024 <sup>b</sup>
PW	2.09 ± 0.029 <sup>a</sup>	2.09 ± 0.049 <sup>a</sup>
PE	1.76 ± 0.060 <sup>b</sup>	1.12 ± 0.058 <sup>fg</sup>
GW	2.06 ± 0.055 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.030 <sup>a</sup>
GE	1.61 ± 0.024 <sup>c</sup>	1.03 ± 0.033 <sup>g</sup>
VC	1.73 ± 0.019 <sup>b</sup>	1.68 ± 0.056 <sup>c</sup>
VE	1.53 ± 0.044 <sup>cd</sup>	1.23 ± 0.053 <sup>ef</sup>
CA	1.28 ± 0.032 <sup>e</sup>	1.20 ± 0.040 <sup>ef</sup>
TY	1.45 ± 0.017 <sup>d</sup>	1.36 ± 0.006 <sup>d</sup>
GSH	1.50 ± 0.031 <sup>d</sup>	1.25 ± 0.026 <sup>de</sup>

Symbols are the same as table 3. <sup>a-g</sup> Means in the same column bearing different superscript are significantly different(P<0.05).

이러한 ·OH의 포집능력을 좀더 자세히 알아보기 위하여 deoxyribose상에서 검토한 결과 Table 4와 같이 농도가 증가함에 따라 ·OH 포집능력은 증가하였으며, 0.3%의 솔잎과 녹차 에탄올 추출물이 deoxyribose상에서도 역시 각 항산화제보다 낮은 TBARS값을 나타내었다. 이것은 솔잎과 녹차 에탄올 추출물은 산소포집능을 어느정도 가지고 있다는 것을 나타내는 것이다.

## 2) Iron 함량

철분은 자연계에 존재하는 필수 미량 원소중에서 가장 풍부한 원소의 하나이며 70 Kg의 체중을 가진 정상성인의 경우 약 3~4g 정도가 체내에 함유되어 있으며(64), 그 중에서 약 65%는 hemoglobin에 3% 가량은 myoglobin에 그리고 30% 가량은 ferritin과 hemosiderin 등 유기 결합체인 저장형으로 존재하고 있다(65). 생체내에서의 과량의 철분은 ferric(Fe<sup>3+</sup>)의 형태로 저장되거나 일부 배

설된다. 이들 저장형의 철분은 생체내에서 지방질을 산화시켜 세포막을 구성하는 인지질(66) 및 vitamin E(67)의 감소를 초래하게 되어 적혈구의 노화 및 취약성이 증가함으로 용혈성 빈혈을 일으키게 된다(68). 이러한 각 추출물들의 iron 함량중  $Fe^{2+}$  이온의 함량은 녹차 추출물에 비하여 솔잎 열수와 에탄올 추출물이 각각 1.02 mg/100g, 1.80 mg/100g을 나타내었으며, total iron 함량의 경우도 솔잎 추출물이 높은 함량을 나타내었다(Fig. 5). 따라서, Fe는 Haber-weiss 반응에서 체내 free radical의 생성을 증가시키는 전구체로서 작용을 하나(69, 70), 본 실험에서는 Ando(71)의 ascorbate 존재시 ferrous 와 ferric iron 은 시험 용액에서 nitrite 함량을 감소시켰다는 보고와 Lee 등(72)도 이와 유사한 meat system 실험에서 ferrous와 ferric iron 첨가구가 대조구에 비해 상당히 낮은 nitrite 함량을 나타내었다는 보고를 근거로 볼 때 추출물 자체의 iron 함량이 육제품 속에서 nitrite를 소거시킬 수 있다고 판단된다. 따라서, 육제품 속에서의 nitrite 소거작용은 녹차 추출물보다 iron 함량이 높은 솔잎 추출물의 소거작용이 우수할 것으로 사료된다.

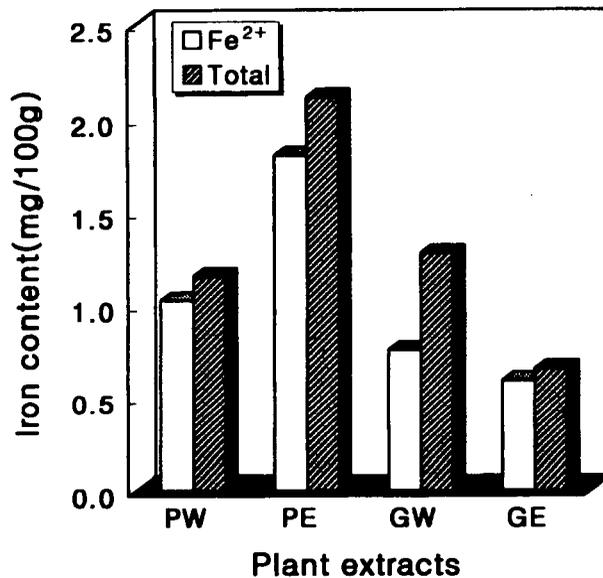
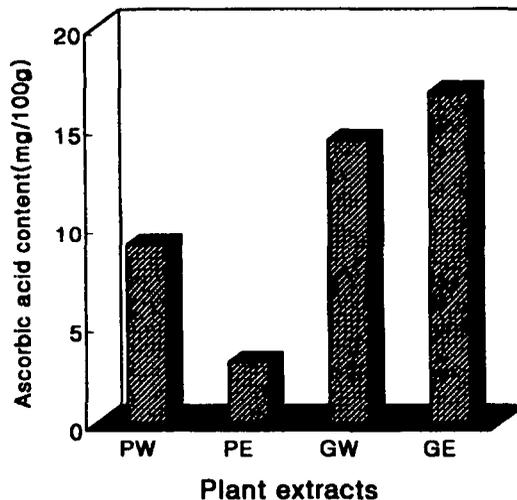


Fig. 5. Contents of  $Fe^{2+}$  and total iron in plant extracts. PW: pine needle hot water extract, PE: pine needle ethanol extract, GW: Green tea hot water extract, GE: Green tea ethanol extract.

### 3) Ascorbic acid 함량

생체내에서의 항산화제는 그 작용기전에 따라 free radical의 발생을 미연에 막는 system I 과 이미 생성된 free radical을 포착 제거하는 system II가 있으며, 경우에 따라서는 효소적 항산화제와 비효소적 항산화제로 나누기도 한다(73). 지질과산화물이나 과산화수소로부터 지질과산화를 유도하는 free radical의 생성을 막아주는 system I의 항산화제로서는 ceruloplasmin, lactoferrin, transferrin, glutathione peroxidase, catalase 등이 있으며, vitamin E, vitamin C, uric acid, superoxide dismutase 등은 지질과산화의 유도반응을 저해하거나 지질과산화의 증폭반응을 정지시켜 일종의 radical 소거제로 작용하는 system II의 항산화제이다(74). 이러한 system II에 속하는 ascorbic acid 함량은 Fig. 6에서 보는바와 같이 솔잎 추출물에 비하여 녹차 추출물이 높았으며, 특히 녹차 에탄올 추출물이 16.71 mg/100g 으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이는 Nha와 Yang(75)의 보고에서 밤 21.8 mg/100 g, Kim(76)의 고추잎 25.7 mg/100 g 과 Kim 등(77)의 명일엽 전초 20.2 mg/100 g 보다는 전반적으로 낮은 수치를 나타내었으며, Park 등(78)의 감잎 13.1 mg/100 g 보다는 높은 값을 나타내었다.



**Fig. 6. Contents of ascorbic acid in plant extracts.**  
PW: pine needle hot water extract, PE: pine needle ethanol extract, GW: Green tea hot water extract, GE: Green tea ethanol extract.

#### 4) 항산화제와의 전자공여능 비교

항산화 특성의 중요한 요인은 oxidative free radical과의 반응성에 기초를 둔 것으로 아미노산, 토코페롤, BHA, 갈변물질등 여러 가지 항산화 물질에 대하여 보고되고 있는(79, 80) 전자공여능을 솔잎, 녹차 추출물과 각종 항산화제와의 DPPH ( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl)에 대하여 살펴본 결과 농도가 증가함에 따라 다소 높은 활성을 나타내었으며, 솔잎과 녹차 추출물은 추출방법에 관계없이 50% 이상의 높은 활성을 나타내었다. 식물체 에탄올 추출물은 열수 추출물 보다 전자공여능이 높게 나타났으며, 특히 0.1%의 솔잎과 녹차 에탄올 추출물은 각각 84.4%, 74.9%로 각종 항산화제보다도 높은 활성도를 나타내었다. 이는 Kang 등(81)의 솔잎 열수추출물과 70% acetone 추출물의 전자공여능이 80.9%, 82.6%로 보고된 값과 유사하였으며, Lee 등(82)의 diethylether로 추출한 양송이버섯이 33.8%, 표고버섯 38.4%의 전자공여능 보다는 높은 활성을 나타내었다(Table 5).

**Table 5. The comparison of electron donating ability of plant extracts with various antioxidants depending on concentration (0.1%, 0.3%)**

	Concentration(%)	
	0.1	0.3
	-----Electron donating ability(%)-----	
PW	55.2±2.30 <sup>e</sup>	58.5±0.82 <sup>e</sup>
PE	84.4±0.69 <sup>a</sup>	86.7±0.55 <sup>a</sup>
GW	53.2±2.46 <sup>e</sup>	57.7±0.56 <sup>e</sup>
GE	74.9±0.87 <sup>b</sup>	76.4±0.66 <sup>b</sup>
VC	67.0±1.10 <sup>c</sup>	68.7±0.72 <sup>c</sup>
VE	10.7±0.66 <sup>g</sup>	11.2±0.45 <sup>h</sup>
CA	48.0±1.47 <sup>f</sup>	48.2±1.00 <sup>f</sup>
TY	4.1±0.42 <sup>n</sup>	14.5±0.81 <sup>g</sup>
GSH	60.1±1.33 <sup>d</sup>	61.9±0.92 <sup>d</sup>

PW: pine needle hot water extract, PE: pine needle ethanol extract, GW: Green tea hot water extract, GE: Green tea ethanol extract, VC: vitamin C, VE: vitamin E, CA: Carnosine, TY: Tyrosine, GSH: Glutathione.

<sup>a-g</sup> Means in the same column bearing different superscript are significantly different(P<0.05).

##### 5) pH별 항산화제와의 아질산염 소거작용 비교

아질산염은 육색의 발색 및 안정화(8) 뿐만 아니라, *Clostridium botulinum*에 대한 정균작용(9), 육제품의 풍미 향상(10), 산패취 발생감소(11-14) 등을 개선하는데 중요한 역할을 한다. 그러나, 식품 및 생체내의 잔존 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내며 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중에 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키며(15), 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 함유되어 있는 2급 및 3급 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성하는 것으로 알려져 있다(16, 17). 또한, 니트로사민의 전구물질인 아질산염과 아민은 식품내에 존재하고 있으므로 이들을 함유하고 있는 식품을 동시에 섭취하였을 때 니트로사민의 생성가능성은 매우 높다.

따라서, 식물체 추출물과 항산화제와의 아질산염 소거작용을 비교한 결과 Fig. 7과 같이 pH의 감소에 따라 높은 소거능을 나타내었다. 전반적으로 에탄올 추출물보다는 열수 추출물이 아질산염 소거작용이 높게 나타났으며, pH 1.2에서 0.3% 농도의 솔잎과 녹차 열수 추출물이 95.9%, 96.7%의 소거작용을 나타내었다. 항산화제 중에서 환원제로 작용하는 ascorbic acid와 glutathione은 pH에 관계없이 80% 이상의 소거능을 나타내었으며, 농도의 증가에 따른 식물체 추출물들의 아질산염 소거작용은 미미하게 증가하였다. 또한, 솔잎과 녹차 열수추출물은 pH 3.0까지 아질산염의 소거인자인 ascorbic acid와 유사한 값을 나타내어, 아질산염 소거작용을 목적으로 첨가되는 ascorbic acid의 대체물질로서의 이용가능성을 시사하고 있다.

이상의 결과 솔잎과 녹차추출물은 이미 알려진 각종 항산화제와의 항산화력 비교에서도 우수한 결과를 나타내었을 뿐만 아니라, 아질산염 소거작용에서도 우수한 작용을 나타낸 것으로 보아 인체에 안전한 천연물로서 식품첨가물이나 식품보존제로서의 이용이 가능할 것으로 판단되며, 육제품 제조시 첨가되는 아질산염의 소거제로서의 사용도 가능할 것으로 판단된다.

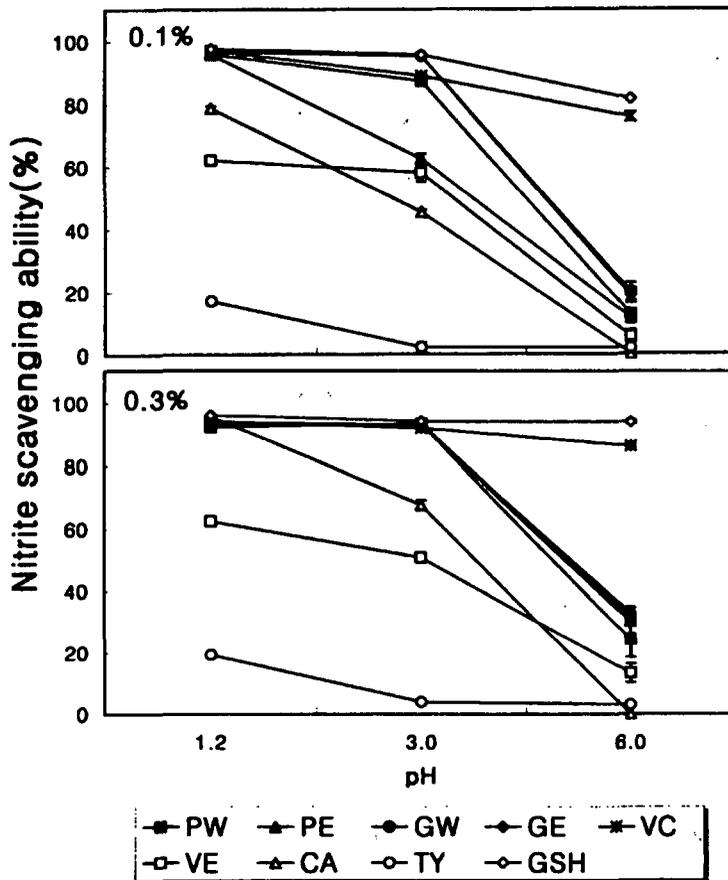


Fig. 7. Nitrite scavenging ability of plant extracts and various antioxidants at 0.1% and 0.3%. PW: pine needle hot water extract, PE: pine needle ethanol extract, GW: Green tea hot water extract, GE: Green tea ethanol extract, VC: vitamin C, VE: vitamin E, CA: Carnosine, TY: Tyrosine, GSH: Glutathione.

나. 술잎, 녹차 추출물을 이용한 소시지의 기능적 특성 및 저장성 검토

1) pH의 변화

Table 6은 저장기간에 따른 sausage의 pH를 나타낸 것으로 저장초기의 pH 값은 대조구 6.07에 비하여 술잎과 녹차 및 술잎+녹차 복합 첨가구가 각각 5.91,

5.97, 5.99로 다소 낮은 값을 나타내었다. 저장기간이 경과함에 따라 모든 처리구는 온도에 관계없이 저장 10일~20일째까지 감소하는 경향이나, 저장 30일째부터 약간 증가하는 경향이였다. 이는 저장기간의 경과에 따라 pH의 감소는 미생물의 성장에 따른 젖산생성으로 pH가 감소한다는 Langlois와 Kemp(83)의 보고와 일치하였으며, 저장 20일~40일까지의 pH의 상승은 Deymer와 Vandekerckove(84)가 보고한 대로 단백질의 완충물질의 변화, 전해질 해리의 저하 및 아미노산이 분해되어 염기성기가 노출되기 때문인 것으로 사료된다.

**Table 6. Changes of sausage pH depending on plant extracts addition during storage at 10°C and 30°C**

		Storage time(days)						
		0	1	3	10	20	30	40
CON	10°C	6.07	6.06	6.05	6.01	6.07	6.08	6.15
	30°C	6.07	6.07	6.06	6.05	6.10	6.31	6.35
PN	10°C	5.91	5.91	5.90	5.90	5.88	5.93	6.10
	30°C	5.91	5.91	5.90	5.88	6.01	6.10	6.20
GT	10°C	5.97	5.97	5.96	5.94	5.94	6.01	6.07
	30°C	5.97	5.95	5.93	5.91	6.09	6.11	6.13
PN+GT	10°C	5.99	5.98	5.97	5.96	6.00	6.00	6.03
	30°C	5.99	5.99	5.99	5.95	6.04	6.20	6.22

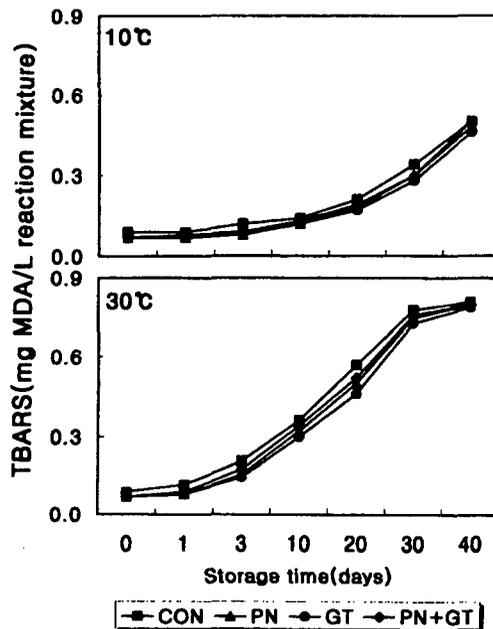
CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle+Green tea.

## 2) 지방산화도의 변화

지방산화가 진행되면 malonaldehyde, acetal 화합물등이 증가하는데 이에 2-thiobarbituric acid를 반응시켜, 발색된 색의 정도로부터 이들의 유리화합물량, 즉 산화의 촉진정도를 측정하고 있다. 특히, 우유 및 육제품 등에 지방산화도를 측정하는데 널리 사용되고 있는(85), TBA는 육의 관능검사와 밀접한 상관관계가 있다고 하였으며(86), Rogar 등(87)과 Tarladgis(88)는 육제품의 지방산패에 따른 malonaldehyde 생성은 부패취 생성과 상관관계가 높아 육제품의 신선도를 판정하는 지표가 된다고 보고하였다.

따라서, 소시지의 지방산화정도를 판정하기 위하여 온도별 저장기간동안 지방산화도를 TBARS값으로 측정한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 10℃ 저장의 경우 저장 0일째 대조구 0.09 MDA ppm에 비하여 솔잎, 녹차 그리고 솔잎+녹차 복합 첨가구가 모두 0.07 MDA ppm으로 약간 낮은 TBARS값을 나타내었다. 또한, 저장기간이 경과할수록 TBARS 값은 서서히 증가하여, 저장 40일째 대조구 0.50 MDA ppm에 비하여 솔잎 0.48 MDA ppm, 녹차 0.46 MDA ppm으로 약간 낮은 TBARS값을 나타내었다. 30℃ 저장의 경우는 모든 처리구가 저장 20일째까지는 서서히 증가하다가 저장 20일째 이후부터는 급격히 증가하는 경향이였다. 그러나, 10℃저장의 경우 대조구에 비하여 식물체 추출물 첨가구가 저장기간이 경과함에 따라 약간 낮은 TBARS값을 나타내었다.

TBA치를 이용한 가식한계의 판단에서 Suh(89)는 TBA치가 1이상일 때는 산패도가 높아서 먹을 수 없으며, 생육의 경우 최대 TBA치는 0.7~1.0정도이고, 가열된 돈육의 경우에는 0.1~0.2정도이면 양호하다고 보고한 바 있다. 이러한 기준으로 보아 소시지의 가식한계는 10℃ 저장시 저장 40일째까지, 30℃ 저장시 저장 20일째까지 가식범위에 있는 것으로 판단된다.



**Fig. 8. Changes of sausage TBARS depending on plant extracts addition during storage at 10℃ and 30℃. CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle +Green tea.**

### 3) 잔존 아질산염 함량의 변화

염지육의 발색에 대하여 Fox와 Thomson 등(90)이 육색의 발색고정 기작을 보고한 이래, Wesley 등(91)은 발색과 풍미향상만을 위한  $\text{NaNO}_2$ 의 적정첨가수준은 50~100 ppm으로도 충분하다고 제시하였다. 그러나, Lee와 Song(92)은 아질산염의 첨가제에 의한 염지육의 풍미 및 육색은 아질산염의 첨가량이 많아질수록 좋아진다고 하였다. 또한, 세균성장 억제효과에 대하여 연구자들 간에 견해 차이가 있으나, 대부분의 연구자들은 아질산염은 세균의 성장과 독소생성을 억제시킨다고 하여, 이에 필요한 아질산염의 수준은 150~200 ppm으로 제시하였다(93). 특히, 미국에서는 *Cl. botulinum* 억제에 필요한 최소량은 150 ppm으로 권장하고 있고, 첨가허용량은 아질산염 200 ppm, 질산염은 500 ppm을 초과하지 않도록 권고하고 있다<sup>(94)</sup>. 그러나, 아질산염의 과잉첨가시에는 육색을 녹색(94)으로 만들어 소비자들에게 바람직하지 못한 육색을 나타내며, nitrosamine의 생성<sup>(95)</sup>을 유리하게하여 암의 유발을 초래할 수 있다. 이와같이 아질산염은 천연 식물체에 질산염 상태로 많이 존재하고 있기 때문에 가공식품의 아질산염 첨가량을 최소화 해야하며, 우리나라 식품위생법규에서는 제품의 잔존량을 70 ppm 이하로 규정하고 있다.

이러한, 소시지의 저장기간별 잔존 아질산염 함량의 변화는 Fig. 9와 같다. 저장 10℃의 경우 저장기간의 경과에 따라 단계적으로 서서히 감소하였으나, 30℃ 저장은 저장 10일째까지 감소의 폭이 컸으나, 저장 10일째 이후부터는 서서히 감소하였다. 이러한 결과는 Lee와 Cassen(96)이 보고한 온도가 상승함에 따라 잔존 아질산염 함량을 낮춘다는 결과와 일치하였다. 저장 0일째 대조구 120.9 ppm에 비하여 솔잎, 녹차 및 솔잎+녹차 복합 첨가구가 각각 120.2 ppm, 118.3 ppm, 120.6 ppm으로 녹차 첨가구가 약간 낮은 값을 나타내었다. 또한, 저장기간이 경과함에 따라 온도에 관계없이 녹차에 비하여 솔잎 첨가구가 낮은 값을 나타내었다. 이러한 식물체 추출물 첨가구의 잔존 아질산염 함량이 낮은 것은 솔잎과 녹차 속에 들어 있는 ascorbic acid와 iron의 작용인 것으로 사료된다.

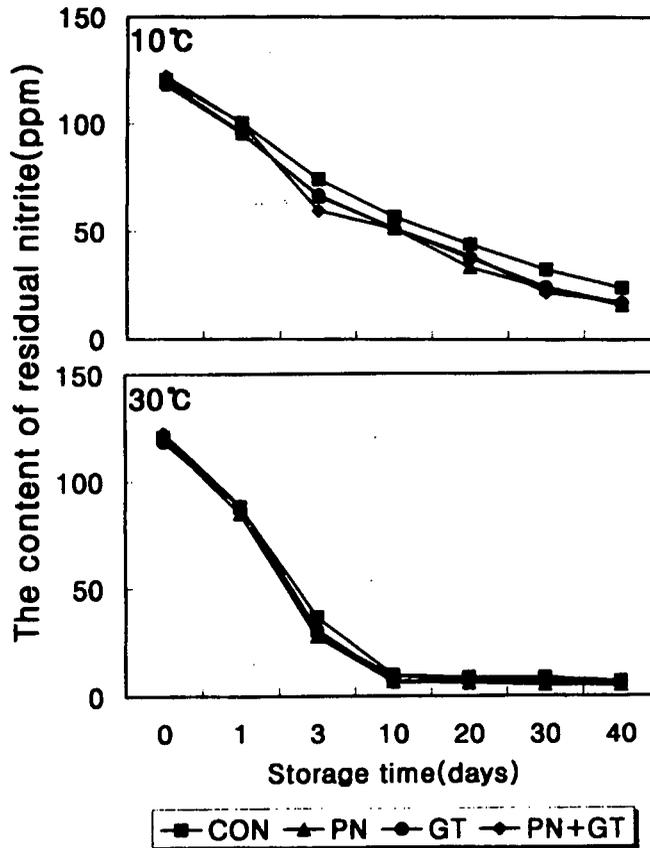


Fig. 9. Changes of sausage residual nitrite content depending on plant extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle+Green tea.

#### 4) Volatile Basic Nitrogen(VBN) 함량의 변화

육제품은 저장중 근육단백질이 아미노산과 그 외에 여러 가지 무기태 질소로 분해가 되는데 이는 단백질의 가수분해에 따른 아미노산과 펩타이드의 증가에 의해서 휘발성 염기태 질소가 증가하기 때문이다. 이러한, 단백질의 산패정도를 분석하기 위해서는 휘발성염기태 질소(VBN)법이 이용되고 있다(59). 또한, 저장기간에 따른 돈육의 VBN 함량은 증가하며, 이것은 세균의 증식 정도와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다(97). 저장기간에 따른 휘발성 염기태질소가 상승하

는 것은 단백질 chain의 일부가 절단되면서 유리아미노산, 핵산관련물질, 아민류, 암모니아, 크레아틴 등 비단백태 질소화합물의 상승에 의하여 육의 독특한 맛과 향을 내고 동시에 이상취를 발생한다고 하였다(98).

저장기간중 식물체 추출물 첨가구 소시지의 휘발성 염기태질소(VBN)의 함량을 측정한 결과는 Fig. 10과 같다. 저장기간이 경과함에 따라 온도에 관계없이 증가하는 경향이었으며, 10℃ 저장보다는 30℃저장의 경우가 큰 폭으로 증가하는 경향이였다. 또한, 10℃ 저장의 경우 저장기간에 따라 서서히 증가하는 반면, 30℃저장은 저장 20일째까지 급격히 증가하다가 그 이후부터 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 그리고, 저장기간의 경과함에 따라 대조구에 비하여 식물체 추출물 첨가구가 낮은 VBN 함량을 나타내었으며, 식물체중 솔잎과 녹차 복합추출물의 VBN 함량이 가장 낮은 값을 나타내었다. 식품공전상(99) 원료육 및 포장육의 경우 VBN 함량이 20 mg% 이하이어야 가식이 가능한 것으로 명시되어 있으며, 高坂(59)은 육가공 제품의 경우 VBN 함량이 30 mg% 일때도 변패라고 할 수 없다고 하였다. 따라서, 본 실험의 결과로 보아 10℃저장의 경우는 저장 40일이상 가식권에 포함되며, 30℃저장의 경우 대조구는 저장 20일까지, 식물체 추출물 첨가구는 저장 40일까지 가식권 범위내에 있는 것으로 판단된다.

##### 5) 총균수의 변화

총균수의 측정은 전반적인 미생물 오염과 위생상 취급의 적부를 판정하는 기준이 되며, 또한 그 후의 세균에 의한 변화를 추정할 수 있다. 저장기간에 따른 소시지의 총균수의 변화는 Fig. 11과 같다. 10℃ 저장의 경우  $2.2 \times 10^1 \sim 3.3 \times 10^2$  CFU/g 으로 증가하였으며, 30℃ 저장의 경우는  $2.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^6$  CFU/g 으로 10℃ 저장에 비하여 증가의 폭이 높게 나타났다. 또한, 10℃ 저장의 경우는 모든 처리구가 저장 10일째까지 세균의 증가가 없었으며, 저장 20일째부터 대조구에 비하여 추출물첨가구가 다소 낮은 값을 나타내었다. 30℃ 저장시 대조구는 저장 1일째부터 총균수가 급격히 증가하는 경향을 보였으며, 추출물 첨가구는 저장 3일째까지  $2.7 \times 10^1$  CFU/g 을 나타내어; 대조구에 비하여 추출물 첨가구가 저장 3일째까지 항균력이 있는 것으로 나타났다.

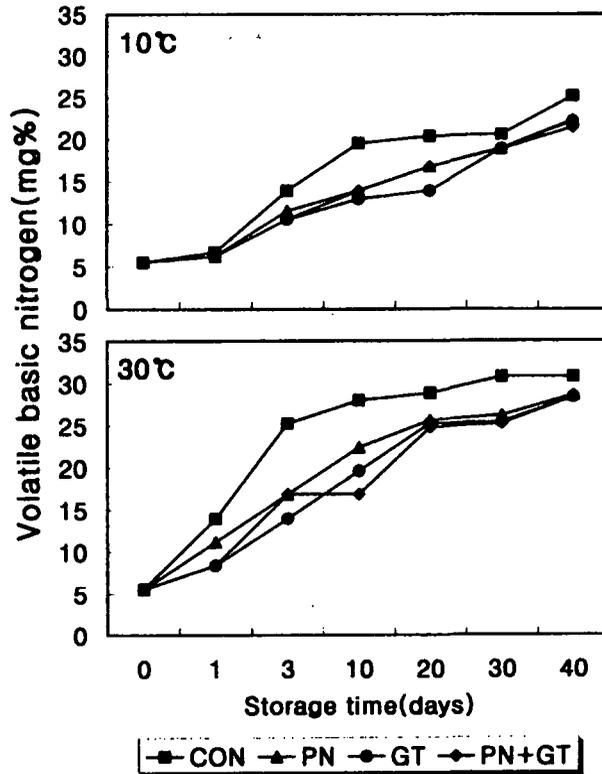


Fig. 10. Changes of sausage volatile basic nitrogen (VBN) depending on plant extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle+Green tea.

우리나라의 경우 식육제품이나 소시지에 대한 규격기준에서 세균수는 설정되어 있지 않으며, 국제식품미생물규격위원회(International Committee on Microbiological Specification:ICMSF)에서는 냉장지육, 냉동식육 및 가공육에 대하여 미생물 규격을(100)설정하고 있다. 즉, 냉동식육(소, 돼지 및 양)인 경우 세균수 한도는 2 단계 평가법(n, c 및 m값)에서는  $5 \times 10^5$ /g, 그리고 3단계 평가법(n, c, m 및 M 값)에서는  $10^7$ CFU/g으로 규정하고 있다. Lamkey 등(101)은 소시지 시료가 부적합한 경우를 세균수가  $10^8$ CFU/g으로 보았으며, 이 수준은 일반적으로 식품에서 관능적으로 부패 냄새가 나게 되어 먹지 못하게 되는 수준이다. 따라서 본 실험에서는 10°C 저장시에는 저장 40일째까지 양호하였으며, 30°C 저장의 경우 대조구는 저장 20일 이후 세균수 한도를 넘는 것으로 나타났다.

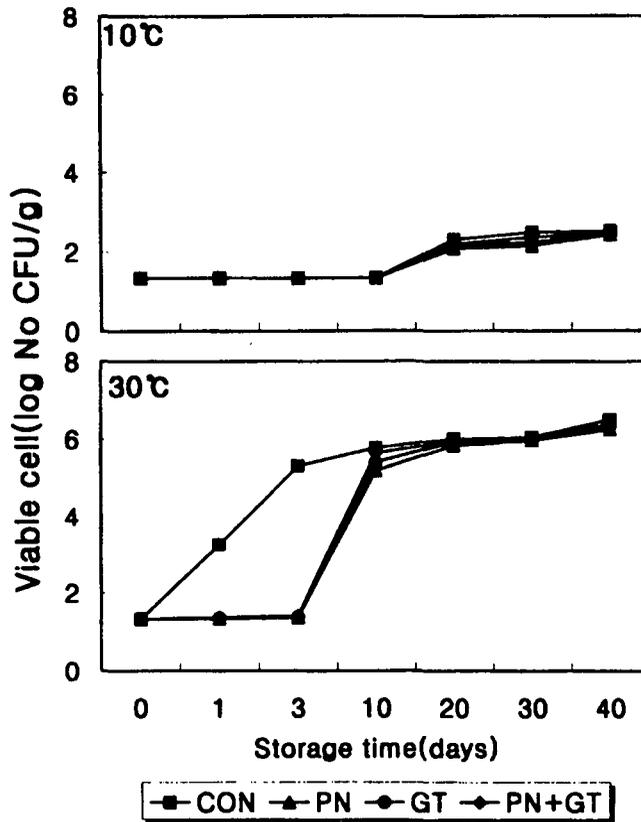


Fig. 11. Changes of sausage total bacteria depending on plant extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle+Green tea.

#### 6) 색차의 변화

육제품의 색깔은 소비자의 제품 선택시 기준이 되는 중요한 요인이다. 따라서, 온도별 저장기간에 따른 명도의 변화는 Fig. 12와 같다. 10°C 저장의 경우 저장기간에 따라 거의 변화가 없었으며, 30°C 저장의 경우 저장기간이 경과함에 따라 명도가 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 온도에 관계없이 대조구에 비하여 추출물 첨가구가 다소 높은 명도를 나타내었으며, 솔잎 추출물이 가장 밝은 육색을 나타내었다. 그리고, 적색도를 나타내는 redness의 변화는 Fig. 13과 같다. 10°C 저장의 경우 저장기간이 경과함에 따라 서서히 증가하였으며, 30°C

의 경우 저장 10일째까지 서서히 증가하는 경향이, 그 이후 상당한 증가현상을 나타내었다. 그러나, 적색도는 명도와는 달리 대조구에 비하여 추출물 첨가구가 낮은 값을 나타내었으며, 솔잎+녹차 복합추출물 첨가구가 가장 낮은 값을 나타내었다.

이러한 결과는 발색제로 첨가된 nitrite가 NO로 환원되어 육색소단백질인 myoglobin과 반응함으로써 nitrosylmyoglobin이 형성(102)되어 육색을 붉게 나타낸 결과이며, 이러한 육색발달의 원인물질인 nitrite를 솔잎과 녹차추출물이 어느정도 소거시킴으로서 적색도가 대조구에 비하여 낮아진 것으로 추측된다.

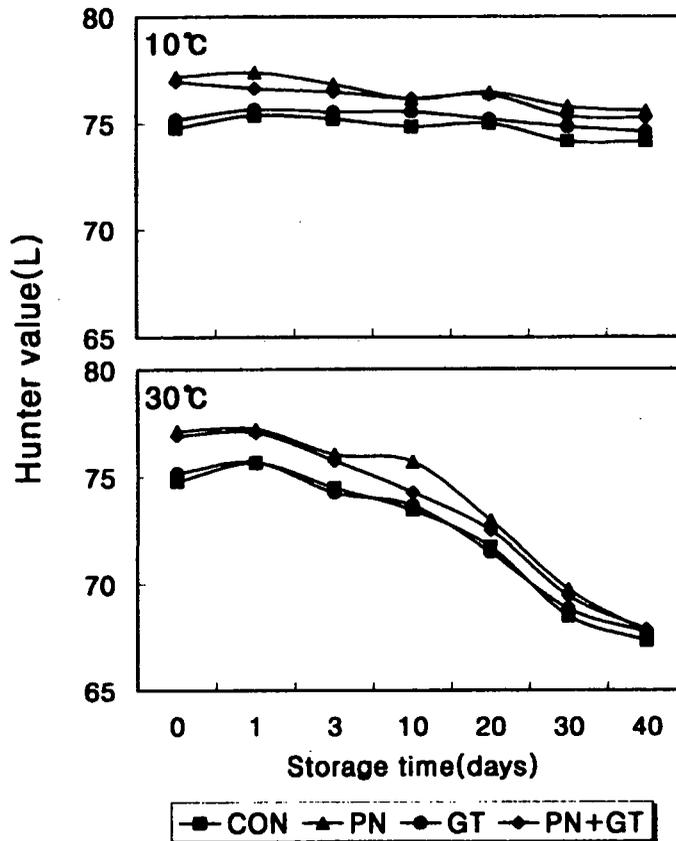


Fig. 12. Changes of sausage lightness depending on plant extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle+Green tea.

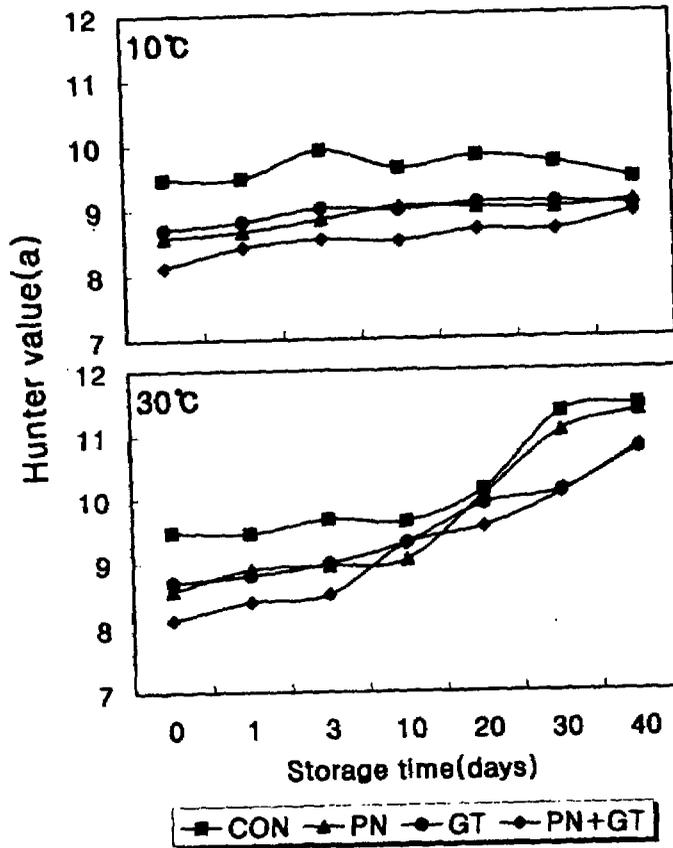


Fig. 13. Changes of sausage redness depending on plant extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle+Green tea.

### 7) 관능검사

관능검사는 기호도 검사법(5점법)을 이용하여 소시지의 색, 풍미, 조직감, 맛을 조사하였다. 각 항목당 1~5점을 주도록 하였으며, 1점 : 아주 나쁘다, 2점 : 나쁘다, 3점 : 보통이다, 4점 : 좋다, 5점 : 아주 좋다로 각 시료를 평가하였다. Fig. 14는 온도별 저장기간에 따른 소시지의 색과 풍미를 평가한 결과 온도에 관계없이 저장기간에 따라 감소하는 경향이였으며, 30°C 저장 20일째 이후부터는 상당히 감소하였다. 소시지의 조직감과 맛의 관능검사 결과도 Fig. 15에서

보는 바와같이 색과 풍미의 경우와 같은 경향이였다. 이상의 결과로 보아 대조구와 추출물첨가구의 관능검사 결과는 대조구에 비하여 색은 낮은 값을 나타낸 반면, 조직감은 높게 나타났으며, 슬릿 추출물 첨가구의 경우 온도에 관계없이 대조구에 비하여 풍미, 조직감, 맛에서 높은 값을 나타내었다.

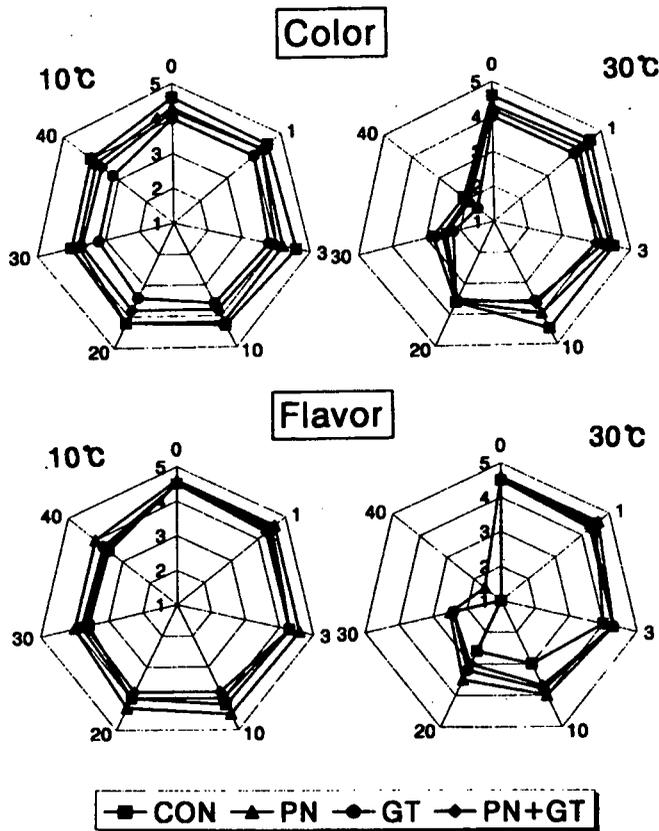


Fig. 14. Changes of sausage color and flavor evaluation depending on plant extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle+Green tea.

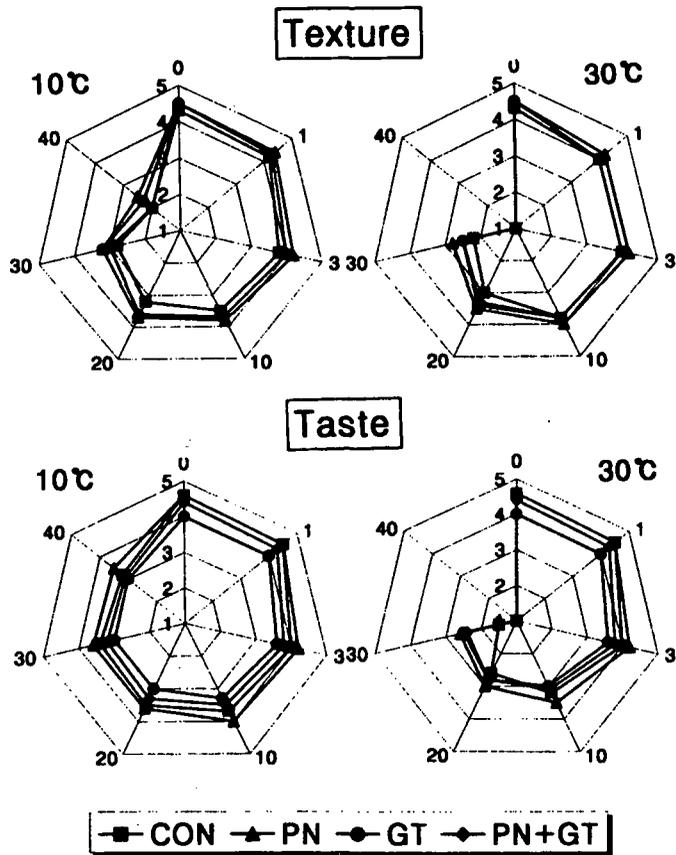


Fig. 15. Changes of sausage texture and taste evaluation depending on plant extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: Control, PN: Pine needle, GT: Green tea, PN+GT: pine needle+Green tea.

#### 4. 요약

솔잎과 녹차추출물을 이용하여 free radical 반응 및 지방산화에 미치는 영향과 nitrosamine 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 솔잎과 녹차 열수추출물의 소거작용을 저장기간에 따라 검토하였다.

##### 가. 솔잎, 녹차 추출물의 기능성 검토

지방산화 촉진제인 iron sources와 oxygen species에 대한 oil 종류별 민감도를 검토한 결과 모든 처리구에서 fish oil이 가장 높은 TBARS값을 나타내어 솔잎과 녹차추출물의 항산화성 검토는 fish oil을 사용하였다.

각종 항산화제와 항산화력 비교 연구에서 추출물농도별 지방산화 억제능력은 0.1%보다는 0.3%가 낮은 TBARS값을 나타내었고, iron sources에 대한 binding 능력은 열수추출물이 우수하였다. 그러나, 산소종에 대한 추출물의 포집능력은 에탄올 추출물이 우수하였다. 특히, ferrous iron binding 능력은 GSH를 제외한 모든 처리구가 우수하였으며, copper ion에 대한 binding 능력도 처리구가 대조구보다 우수하였다. Hemoglobin에 대한 항산화능력은 솔잎과 녹차추출물이 항산화제보다 약간 높은 경향이었으며, 활성산소인 superoxide, hydrogen peroxide와 hydroxyl radical에 대한 추출물의 포집능력은 없는 것으로 나타났다.

Deoxyribose상에서의 hydroxyl radical 포집능력은 솔잎과 녹차 에탄올추출물이 0.1%와 0.3%에서 대조구 보다 낮은 TBARS값을 나타내었다. 동시에, 솔잎과 녹차 에탄올 추출물은 0.3%의 농도에서 다른 항산화제와의 비교에서도 낮은 TBARS값을 나타내었다.

추출물의 iron 함량은 솔잎 에탄올 추출물이 가장 높은 함량을 나타내었으며, ascorbic acid 함량은 녹차의 열수와 에탄올 추출물에서 높은 값을 나타내었다.

전자공여능은 농도가 높을수록 활성이 높았으며, 열수추출 보다는 에탄올 추출물이 높은 활성을 나타내었다. 또한 솔잎과 녹차추출물은 각종 항산화제에 비하여 높은 전자공여능을 나타내었다.

아질산염 소거작용은 pH의 감소에 따라 높게 나타났으며, 0.3%의 솔잎과 녹차 추출물은 pH 1.2와 pH 3.0에서 95%이상의 소거능을 나타내었으며, ascorbic acid 자체보다도 높은 소거능을 나타내었다.

#### 나. 솔잎, 녹차 추출물을 이용한 소시지의 기능적 특성 및 저장성 검토

소시지의 pH값의 변화는 대조구 비하여 솔잎과 녹차 및 솔잎+녹차 복합 첨가구가 다소 낮은 값을 나타내었다. 저장기간이 경과함에 따라 모든 처리구는 온도에 관계없이 저장 10일~20일까지 감소하다가 저장 30일부터 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

지방산화도의 변화는 10℃ 저장의 경우 저장 0일째 대조구 0.09 MDA ppm에 비하여 솔잎, 녹차 그리고 솔잎+녹차 복합 첨가구 모두 0.07 MDA ppm으로 약간 낮은 TBARS 값을 나타내어 대조구에 비하여 식물체 추출물 첨가구의 약한 항산화력을 나타내었다. 또한, 저장기간이 경과할수록 TBARS 값은 서서히 증가하는 경향이였으며, 저장 40일째 대조구 0.50 MDA ppm에 비하여 솔잎 0.48 MDA ppm, 녹차 0.46 MDA ppm으로 약간 낮은 TBARS 값을 나타내었다. 그러나, 30℃ 저장의 경우 모든 처리구가 저장 20일까지 서서히 증가하는 경향이나 저장 20일째 이후 상당히 증가하는 경향이였다.

소시지의 저장기간별 잔존 아질산염 함량은 저장 10℃의 경우 저장기간의 경과에 따라 단계적으로 서서히 감소하였으나, 30℃ 저장은 저장 10일째 상당히 감소하다가 그 이후 서서히 감소하였다. 온도에 관계없이 저장기간이 경과함에 따라 녹차에 비해 솔잎 첨가구가 다소 낮은 잔존 아질산염 함량을 나타내었다.

휘발성 염기태질소(VBN)함량은 온도에 관계없이 저장기간이 경과함에 따라 증가하는 경향이였다. 10℃ 저장보다는 30℃저장의 경우가 큰 폭으로 증가하는 경향이였다. 또한, 10℃ 저장의 경우 저장기간에 따라 서서히 증가하는 반면, 30℃저장은 저장 20일까지 상당히 증가하다가 그 이후부터 서서히 증가하는 경향이였다. 그리고, 저장기간이 경과함에 따라 대조구에 비하여 식물체 추출물 첨가구가 낮은 VBN 함량을 나타내었으며, 식물체중 솔잎과 녹차 복합추출물의 VBN 함량이 가장 낮은 값을 나타내었다.

총균수의 변화는 10℃ 저장의 경우  $2.2 \times 10^1 \sim 3.3 \times 10^2$  CFU/g으로 증가하였으며, 30℃ 저장의 경우는  $2.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^6$  CFU/g으로 10℃ 저장에 비하여 증가의 폭이 높게 나타났다. 또한, 10℃ 저장의 경우는 모든 처리구가 저장 10일까지 세균의 증가가 없었으며, 저장 20일부터 대조구에 비하여 추출물 첨가구가 약간 낮은 값을 나타내었다. 30℃ 저장시 대조구는 저장 1일째부터 총균수가 급격히 증가하는 경향이였으며, 추출물 첨가구는 저장 3일까지  $2.7 \times 10^1$  CFU/g을

나타내어, 대조구에 비하여 추출물 첨가구가 저장 3일까지 항균력이 있는 것으로 나타났다.

소시지의 명도는 10℃ 저장시 저장기간에 따라 거의 변화가 없었으며, 30℃의 경우 저장기간이 경과함에 따라 명도가 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 온도에 관계없이 대조구에 비하여 추출물 첨가구가 다소 높은 명도를 나타내었으며, 솔잎 추출물이 가장 밝은 색깔을 나타내었다. 그리고, 적색도는 명도와는 달리 대조구에 비하여 추출물 첨가구가 낮은 값을 나타내었으며, 솔잎+녹차 복합 추출물 첨가구가 가장 낮은 값을 나타내었다.

관능검사 결과 소시지의 색과 풍미는 온도에 관계없이 저장기간에 따라 감소하는 경향이였으며, 30℃ 저장 20일 이후부터는 상당히 감소하였다. 소시지의 조직감과 풍미 관능검사 결과도 같은 경향이였다. 결론적으로, 솔잎과 녹차추출물의 기능적 특성은 우수한 것으로 나타났으며 특히, 솔잎추출물의 효과가 우수하였다. 이를 이용하여 제조한 소시지의 저장성도 우수하였다.

## 5. 문 헌

1. Akaike, T., Ijiri, S., Sato, K., Katsuki, T. and Maeda, H.: Determination of peroxy radical-scavenging activity in food by using bactericidal action of alkyl peroxy radical. *J. Agr. Food Chem.*, **43**, 1864(1995)
2. Warner, H.R.: Overview: Mechanisms of antioxidant action on life span. *Toxicol. Ind. Health*, **9**, 151(1993)
3. Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S. and Aruoma, O.I.: Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**(1&2), 7(1995)
4. Thomas, M.J.: The role of free radicals and antioxidants: How do you know that they are working? *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**(1&2), 21 (1995)
5. King, D.L., Hahn, T.S. and Min, D.B.: Chemistry of antioxidants in relation to shelf life of foods. In "Shelf life studies of foods and beverages". Charalambous, G(ed), Elsevier, p.629(1993)
6. Lim, D.K., Choi, U. and Shin, D.H.: Antioxidative activity of some solvent extracts from *Caesalpinia sappan* L. *Korean J. of Food Sci. Technol.*, **28**(1), 77(1996)
7. Han, J.S., Moon, S.Y. and Ahn, S.Y.: Effect of oil refining processes on oxidative stability and antioxidative substances of sesame oil. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(1), 15(1997)
8. Jeong, Y.S., Hong, J.H., Kim, I.S. and Byun, D.S.: Effect of phospholipid extract from squid viscera on lipid oxidation of fish oil. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**(3), 378(1995)
9. Lee, K.T., Park, S.M., Hwang, Y.G. and Kang, O.J.: Relationship between physical and chemical properties of frying vegetable oils. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**(4), 654(1994)
10. Yang, J.H., Chang, Y.S. and Shin, H.S.: Relative effectiveness of some antioxidants on storage stability of instant noodle(Ramyon) fried by palm oil and beef tallow. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**(4), 569(1988)
11. Branen, A.I.: Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole

- and butylated hydroxy toluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59(1975)
12. Hiroe, Kikuzaki and Nobuji Nakatani: Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 519(1989)
  13. Fennema, O.R.: Food chemistry 2nd ed., Marcel Dekker Inc. New York and Basel, p.176(1985)
  14. Love, J.D.: The role heme iron in the oxidation of lipid in red meat. *Food Technol.*, **37**(7), 117(1983)
  15. Decker, E.A. and Schanus.: Catalysis of linoleate oxidation by nonheme- and heme-soluble chicken muscle protein. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 1991(1986)
  16. Lie, H. and Watt, B.M.: Catalysis of lipid peroxidation in meat 3. Catalysis of oxidative rancidity in meats. *J. Food Sci.*, **35**, 596(1970)
  17. Green, B.E. and Prince, I.G.: Oxidative induced color and flavor changes in meats. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 164(1975)
  18. Lewis, S.E. and Willis, E.D.: Inhibition of autoxidation of unsaturated fatty acids by hematin protein. *Biochem. Biophys. Acta.*, **70**, 336(1963)
  19. Kunsman, J.E., Field, R.A. and Kazantzis, D.: Lipid oxidation in mechanically deboned red meat. *J. Food Sci.*, **43**, 1375(1978)
  20. Keller, J.D. and Kinsella. J.E: *J. Food Sci.*, **38**, 1200(1973).
  21. Younathan, M.T. and Watts, B.M.: *Food Res.*, **25**, 538(1960).
  22. Igeene, J.O. and Pearson, A.M.: *J. Food Sci.*, **44**, 1285(1979).
  23. Zipser, M.W., Kwon, T. and Watts, B.M.: *J. Agr. Food Chem.*, **12**, 105 (1964).
  24. Sato, K. and Hegarty, G.R.: *J. Food Sci.*, **36**, 1098(1971)
  25. Wills, E.D.: *Biochem. J.*, **99**, 667(1966)
  26. Younathan, M.T. and Watts, B.M.: *Food Res.*, **24**, 728(1959)
  27. Liu, H. and Watts, B.M.: *J. Food Sci.*, **35**, 596(1970)
  28. Greene, B.E. and Price, L.G.: *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 164(1975)
  29. Mottram, D.S., Edwards, R.A. and Masfie, H.J.H.: *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 771(1982)
  30. Ahn, B.W., Lee, D.H., Yeo, S.G., Kang, J.H., Do, J.R., Kim, S.B. and

- Park, Y.H.: Inhibitory action of natural food components on the formation of carcinogenic nitrosamine. *Bull. Korean Fish Soc.*, **26**(4), 289(1993)
31. Fox, J.B.: The chemistry of meat pigments. *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 207(1967)
  32. Pivnick, H., Rubin, L.J., Barnett, H.W., Nordin, H.R., Ferguson, P.A. and Perrin, H.: Effect of sodium nitrite and temperature on toxinogenesis by *Clostridium botulinum* in perishable cooked meats vacuum-packed in air-impermeable plastic pouches. *Food Technol.*, **21**, 100(1967)
  33. Macdougall, D.B., Mottran, D.S. and Rhodes, D.N.: Contribution of nitrite and nitrate to the color and flavor of cured meats. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1743(1975)
  34. Duncan, C.L. and Foster, E.M.: Effect of sodium chloride and sodium nitrate on germination and out growth of anaerobic spores. *Appl. Microbiol.*, **16**, 406(1968a)
  35. Jhonston, M.A., Pivnick, H. and Samson, J.M.: Inhibition of *Clostridium botulinum* by sodium nitrite in a bacteriological medium and in meat. *Can. Inst. Food Technol. J.*, **2**, 52(1969)
  36. William, L.: Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*, **225**, 21(1970)
  37. Roberts, T.A.: The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1735(1975)
  38. Peter F.S.: The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Food Agric.*, **26**, 1761(1975)
  39. Crosby, N.T. and Sawyer, R.: N-nitrosamines: A review of chemical and biological properties and their estimation in food stuffs. In "Advances in food research" Chrichster, C.o.(ed.), Academic Press, New York, **21**, 1(1976)
  40. Fiddler, W., Pensabene, J.W., Piotrowski, E.G., Doerr, R.C. and Wasserman, A.E.: Use of sodium ascorbate or erythrobrate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters. *J. Food Sci.*, **38**,

1084(1973)

41. Moon, B.S., Kim, B.S., and Woo, S.K., Studies on Nitrosamine(II): Contents of nitrate, nitrite and dimethylamine in various foods. *Report of NIH KOREA*, **11**, 181-189(1974)
42. Sung, N.J., Yang, H.C. and Lee, J.H.: Studies on N-Nitrosamine in the Fermented Foods, I. N-Nitrosamine In the Fermented Fish. *J. Gyeong Sang Nat. Univ.*, **21**(2), 145-150(1982)
43. 우순자, 이해준: 식품중의 아질산염과 N-Nitrosamine에 관한 고찰. 대한가정학회지, **23**(3), 85-101(1985)
44. Kanner, J.: S-nitrosocysteine(RSNO), An effective antioxidant in cured meat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 74(1970)
45. Fiddler, W., Pensabene, J.W., Piotrowski, E.G., Phillips, J.G., Keating, J., Mergens, W.J., and Newmark, H.L.: Inhibition of formation of volatile nitrosamines in fried bacon by the use of curcuminolubilized  $\alpha$ -tocopherol. *J. Agr. Food Chem.*, **26**, 653
46. Sofos, J.N. and F.F.: Alternatives to the use of nitrite as an antibotulinal agent. *Food Technol.* **34**(5), 244(1980)
47. Tanaka, K., Chung, K.C., Hayatsu, H., and Kada, T.: Inhibition of nitrosamine formation in vitro by sorbic acid. *Food Cosmet. Toxicol.* **16**, 209(1978)
48. Rust, R.E.: "Sausage and processed meats manufacturing." AMI center for continuing education, american meat institute. Chicago, IL.(1975)
49. Tompkin, R.B., Christiansen, L.N. and Shaparis, A.B.: Effect of prior refrigeration on botulinal outgrowth in perishable canned cured meat when temperature abused. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 863(1978c)
50. Olsman, W.J.: About the mechanism of nitrite loss during storage of cooked meat products. In Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prod. p.129, Krol. B. and Tinbergen, B.J.(Ed.) Pudoc. Wageningen, The Netherlands.(1974)
51. Gray, J.I., Macdonald, B., Pearson, A.M. and Morton, I.D.: *J. Food Prot.*, **44**, 302(1981)

52. Lee, B.J. and Hendricks, D.G.: Antioxidant effects of L-carnosine on liposomes and beef homogenates. *J. Food Sci.*, **62**(5), 931(1997)
53. Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, **105**, 302(1978)
54. Gutteridge, J.M.C.: Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.*, **224**, 761(1984)
55. Carter, P.: Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent(ferrozine). *Anal. Biochem.*, **40**, 450 (1971)
56. Sikic, B.I., Mimnaugh, E.G., Litterst, C.L., and Gram, T.E.: The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. and Biophys.* **179**, 663(1977)
57. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1198(1958)
58. Kato, H., Lee., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol.Chem.*, **51**, 1333(1987)
59. 高坂和久: 肉製品の鮮度保持よ測定. 食品工業. **18**, 105(1975)
60. AHPA: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. edited by Carl Vanderzant p 80-87(1992)
61. 이영춘, 김광옥: 식품의 관능검사. 학연사, p.179(1989)
62. Choi, E.Y. and Cha, J.H.: Lipid oxidation stability of powdered milk. *Korean Agric. Chem. Biotechnol.*, **38**(3), 259-262(1995)
63. Cheigh, H.S., Lee, J.S., Moon, G.S. and Park, K.Y.: Antioxidative characteristics of fermented soybean sauce on the oxidation of fatty acid mixture. *Korean Food Sci. Technol.*, **22**(3), 332-336(1990)
64. Keneko, J.J.: Clinical biochemistry of domestic animals, 3rd ed, Academic Press. p649-669(1980)
65. Martin, D.W., Mates, P.A. and Ridwell, V.W.: Haper' s review of

- biochemistry, 18th ed., Lange Medical Pub., p559-581(1983)
66. DeLuca, H.F.: Handbook of lipid research. 2. The fat-soluble vitamins, Plenum press, New York, p.141(1978)
  67. Rose, C.S. and Gyorgy, P.: Tocopherol requirements of rats by means of the hemolytic test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 411-415(1950)
  68. Oski, F.A. and Barness, L.A.: Vitamin E deficiency: A previously unrecognized cause of hemolytic anemia in the premature infant. *J. Ped.*, **70**, 211-220(1967)
  69. Rief, D.W.: Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Rad. Biol. Med.*, **12**, 417(1992)
  70. Braugher, J.M., Duncan, L.A. and Chase, R.L.: The involvement of iron in lipid peroxidation. *Biochem.*, **261**, 10282(1986)
  71. Ando, N.: "Some compounds influencing color formation." Korl, B. and Tinbergen, J.(Ed.), p.149. Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prod. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.(1974)
  72. Lee, M., Cassens, R.G. and Fennema, O.R.: Effect of metal ions on residual nitrite. *J. Food Process. Preserv.*, **5**, 191(1981)
  73. 정해영: 활성산소, 암, 노화. *의학총설*, **2(4)**, 25-53(1991)
  74. Tappel, A.L.: Vitamin E and selenium protection from *in vivo* lipid peroxidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **355**, 18-31(1980)
  75. Nha, Y.A. and Yang, C.B.: Changes of constituent components in chestnut during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28(6)**, 1164(1996)
  76. Kim, K.O.: Rapid determination of ascorbic acid in red pepper leaves by near-infrared reflectance spectroscopic analysis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27(3)**, 393(1998)
  77. Kim, O.K., Kung, S.S., Park, W.B., Lee, M.W. and Ham, S.S.: The national components of aerial whole plant and juice of *Angelica keiskei* Koidz. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **24(6)**, 592(1992)
  78. Park, Y.J., Kang, M.H., Kim, J.I., Park, O.J., Lee, M.S. and Jang, H.D.: Changes of vitamin C and superoxide dismutase(SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition.

- Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(3), 281(1995)
79. 김상달, 도재호, 오훈일: 고려인삼 갈변물질의 항산화효과. *한국농화학학회지*, 24, 161(1981)
  80. 이정수: 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성에 관한 연구. 부산대학교 석사학위논문(1989)
  81. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D.: Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort Extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(6), 978(1995)
  82. Lee, G.D., Chang, H.G. and Kim, H.K.: Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(3), 432(1997)
  83. Langlois, B.E. and Kemp, J.D.: Microflora of fresh and dry-cured hams and affected by fresh ham storage. *J. Animal Sci.*, 38(3), 525(1974)
  84. Deymer, D.I. and Vandekerckhove, P.: Compounds determining pH in dry sausage. *Meat Sci.*, 3, 161(1979)
  85. Han, S.K. and Park, H.K.: A study on the preservation of meat products with water extracted propolis(WEP). *Korean J. Anim. Sci.*, 38(6), 605-612(1996)
  86. Turner, F.W., Paynter, W.D., Montie, E.J., Bassert, M.W., Struck, G.W. and Olson, F.C.: Use of 2-thibarbituric acid reagent to measure rancidity of frozen pork. *Food Technol.*, 8, 326(1954)
  87. Rogar, P.J. and Robert, W.R.: Effect of shelf temperatures, storage periods and rehydration solution on the acceptability and chemical composition of free-dried precooked commercially cured ham. *J. Ani. Sci.*, 32, 624(1971)
  88. Tarladgis, B.G., Betty, M.W. and Margaret, T.Y.: A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancide foods. *Amer. oil Chem. Soc.*, 37, 44(1960)
  89. Suh, K.D.: The production of boneless ham and the role of additives in processing. *Korean Soc. Meat Technol.*, 5, 41(1984)
  90. Fox, J.B.Jr. and Thomson, J.S.: Formation of bovine nitrosylmyoglobin.

- Biochem.*, 2, 465(1964).
91. Wesley, R.L., Marion, W.W. and Sebrandek, J.G.: Effects of sodium nitrite concentration sodium erythorbate and storage time on the quality of Franks Manufactured from Mechanically Deboned turkey. *F. Food Sci.*, 47, 1626(1982)
  92. Lee, M.H. and Song, K.Y.: Effects of different levels of sodium nitrite, ascorbic acid and sodium chloride on characteristics of ground meat. *Korean J. Anim. Sci.*, 25, 288(1983)
  93. Buchanan, R.L. and Solberg, M.: Interaction of sodium nitrate, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.*, 37, 81(1972)
  94. Forrest, J.C., Aberle, E.D., Hedrick, H.B., Judge, M.D. and Merkel, R.A.: Principles of meat science. H. freeman & Co. San Francisco. p.179-180 (1975)
  95. Jeong, H.G. and Kim, Z.U.: A study on the effects of sodium nitrite on lipid oxidation of pork during cooking. *J. korean Agric. Chem. Soc.*, 29(2), 148-158(1986)
  96. Lee, M.H. and Cassens, R.G.: Effect of heating rate on residual nitrite. *Korean J. Anim. Sci.*, 25(6), 675-679(1983)
  97. 野崎 義孝: 鶏肉の鮮度管理. 食肉の科學. 33, 191(1992)
  98. Coresopo, F.L. Millan, R. and Moreno, A.S.: Chemical changes during ripening of spanish dry sausage. III.Changes in water soluble N-compounds. A archivos de Zootechia, 27, 105(1978)
  99. 식품공전: 식품별 기준 및 규격 식품가공-109. 보건사회부.(1988)
  100. 한국식품연구소: 식품위생관련 국제식품규격 및 제외국의 규격기준에 관한 연구. pp.1056-1062(1991)
  101. Lamkey, J.K., Leak, F.W., Tiley, W.B., Johnson, D.D. and West, R.L.: Assessment of sodium lactate addition to fresh pork sausage. *J. Food Sci.*, 56(1), 220-223(1991)
  102. Cassens, R.G., Greaser, M.L., Ito, T. and Lee, M.: Reactions of nitrite in meat. *Food Technol.*, 33, 46(1979)

### 제 3 절 폐자원(게껍질, 감귤껍질, 참깨박) 추출물을 이용한 기능성 소시지 개발에 관한 연구

## A study on development of functional sausage using waste resources

#### Abstract

These studies were carried out to develop the functional meat products using extracts from waste resources. The changes of pH were tended to be a little decreased from pH 6.4 to pH 6.0. At the same time, the moisture content showed the same tendency as 62~60%. The water holding capacity of functional sausage gradually were tended to be a little more decreased during storage at 30 °C, compared to 10 °C. The changes of salt content also have a same tendency, except the treatments of vitamin C. The treatments using natural resources revealed a low TBARS value. But they were not significantly different( $P>0.05$ ). The nitrite scavenging ability of extracts from *Schizandra chinensis* were the most highest, compared to other extracts. As storage time goes by, the nitrite contents of sausage product gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. The lightness of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. But they were not significantly different( $P>0.05$ ). The redness of sausage color also had very similar tendency to the lightness of sausage color in spite of redness of sausage color was a little increased during storage until 10 days. Sensory test suggested that the changes of sausage color, flavor, texture and taste were tended to be decreased gradually, but there was not significantly different during storage at 10 °C and 30 °C( $P>0.05$ ). However, the sensory scores of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of stored at 10 °C. In conclusion, sausage treated sesamol extracted from sesame meal was the most effective natural resources on the basis of the functional properties.

## 1. 서 론

국내에서 소비하는 소시지양은 1970년대 중반부터 크게 증가하기 시작하여 1990년대에는 전 생산량의 47%에 달하는 생산규모로 발전하였으며, 앞으로도 소시지의 생산시장은 계속 확대되고 있다(1). 그러나 육제품 제조시 첨가되는 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내며 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중에 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키며(2), 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 함유되어 있는 2급 및 3급 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성하는 것으로 알려져 있다(3, 4). 이러한 식품가공 공정중 첨가제로 인한 피해를 줄이기 위하여 갑각류에서 얻어지는 chitosan(5), 플라보노이드는 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항암성 등의 활성을 갖고 있는 감귤류(6) 그리고, 산화방지, 유지의 산패방지, 콜레스테롤 강화작용, 화학적 유발 유방암 예방효과, 피부미용 및 노화방지 등 다양한 생리통병 치료와 예방효과를 지니고 있는 참깨(7)의 부산물인 참깨박 등의 폐자원을 추출하여 free radical 반응 및 지방산화 억제에 미치는 영향과 니트로사민 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 폐자원의 분해효과를 검토함으로써 기능성 소시지 개발을 시도하고자 본 실험을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재 료

Table 1. Sausage formulation.

Ingredients	Absolute value(g)	Contents(%)
Pork	3000	} 100
Fat	1000	
Ice	1000	
NaCl	80	1.6
MSG	15	0.3
Sugar	15	0.3
Sodium phosphate	15	0.3
Nitrite	0.75	0.015
L-ascorbic acid	2.5	0.05
Casein	50	1.0
White pepper	15	0.3
Allspice	5	0.1
Nutmeg	2.5	0.05
Sage	2.5	0.05
ISP	50	1.0
Starch	50	1.0
waste resources	25	0.5
ascorbic acid 0.5%	25	0.5
ascorbic acid 1.0%	50	1.0
potassium sorbate 0.5%	25	0.5
potassium sorbate 1.0%	50	1.0

## 나. 실험방법

### 1) 시료 조제

시료 조제는 소시지에 3배의 증류수를 가하여 유회기로 분쇄 한 다음 50 ml 시험관에 옮기고 다시 Brinkman Polytron(Type PT 10/35)으로 2초간 최고 속도로 분쇄시켰다. 4 ml의 분쇄물을 polyethylene 시험관(17×100 mm)에 옮겨 실험에 사용하였다.

### 2) 포장재

실험에 사용된 소시지 포장재는 polyvinylidene chloride(PVDC) coating(3.7  $\mu$ m)을 사용하였으며, 포장재의 크기는 100 × 62(가로 × 세로) mm 로 사용하였다.

### 3) pH 측정

pH는 일반적인 방법에 따라 시료 5g 을 3배의 증류수를 가해 homogenate 한 후 pH meter(Model DP-135M)로 측정하였다.

### 4) 수분 측정

수분측정은 육 분쇄기로 분쇄한 소시지 약 1g 을 취하여 수분측정기(Shimadzu, HA-300) 로 측정하였다.

### 5) 보수력 측정

보수력 측정은 이와 성(8)의 압착법(press method)으로 측정하였다. 마쇄한 소시지 0.5g을 Whatman No. 1에 올려놓고 압착기로 35~50 Kg/cm<sup>2</sup>의 압력으로 2분간 압착한 후 고기조직이 묻어있는 부위의 면적과 젖어있는 부위의 면적을 planimeter로 측정하였다.

$$\text{보수력 지수(\%)} = \frac{\text{고기조직이 묻어있는 면적}}{\text{젖어있는 부위면적}} \times 100$$

#### 6) 염도 측정

염도측정은 시료에 3배의 증류수를 가하여 18,000 rpm 에서 2 분 homogenate 한 후 염도계(Takemura TM-30D, Japan)로 측정하였다.

#### 7) Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(9)을 약간 수정하여 측정하였다. 1 ml 반응 혼합물에 50  $\mu$ l dibutylhydroxytoluene (BHT) 7.2 % 를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000 $\times$ g 의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도(HITACHI UV-2001) 531 nm 에서 측정하였고, 공시료는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해서  $\mu$ g malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

#### 8) 아질산염 함량측정

아질산염 함량은 Kato 등(10)의 방법을 약간 수정하여 각 시료를 증류수로 5 배희석 한후 1 ml 를 취하여 2 % 초산용액 2 ml 와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1 % sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml 를 가한 후 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 함량은 표준곡선에 대입하여 ppm 단위로 나타내었다.

#### 9) 색차 측정

소시지의 색은 시료를 직경 3 cm, 높이 2.4 cm 의 크기로 자른 후 1개 시료당 9개를 coring 하여 30분간 공기 중에 노출시켜 발색시킨 후 polyethylene 필름으로 한 겹 포장하여 색차계(Color difference meter, Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 Hunter 값(L=명도, a=적색도)으로 표시하였다. 이때 사용된 표준색판은 기기의 manual 에 따라 Y=94.95, a=0.3132, b=0.3203 으로 하였으며, 6회 반복하여 평균값을 구하였다.

### 10) 관능검사

관능검사는 소시지의 저장기간(0, 1, 5, 10, 20, 30, 40일) 중에 일어나는 변화를 알아보기 위하여 소시지를 10℃, 30℃에서 저장하면서 색, 향, 조직감 그리고 맛을 평가하였다. 선정된 관능요원은 충분한 훈련을 거쳐 소시지의 품질차이를 식별할 수 있는 능력이 갖추었다고 여겨지는 8명으로 구성되었다. 평가방법은 5점법으로 기호도 검사법(11)으로 실시하였으며, 맛, 조직감 그리고 색은 아주 나쁘다 : 1점, 나쁘다 : 2점, 보통이다 : 3점, 좋다 : 4점, 아주 좋다 : 5점으로 각 시료를 평가하였다.

### 11) 통계처리

통계처리는 각각의 시료에 대해 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 분산분석을 한 후  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

선발된 천연물(오미자, 계집질, 참깨박, 감귤껍질) 0.5% 첨가와 소시지 제조시 저장기간 연장을 목적으로 첨가되는 potassium sorbate(0.5%, 1.0%)와 첨가된 nitrite 감소를 위하여 첨가되는 ascorbic acid의 농도(0.5%, 1.0%)를 조정하여 천연물 첨가 소시지의 저장성과 잔존 nitrite 함량을 비교 실험하였다.

### 가. pH의 변화

소시지 제조 후 각 온도별(10℃, 30℃) 저장기간 40일 동안 pH의 변화를 측정한 결과 Fig. 1과 같이 10℃ 저장의 경우 대조구 pH 6.3에 비하여 폐자원(chitosan, sesamol, 감귤껍질) 첨가구는 pH 6.4로 약간 높게 나타났으며, ascorbic acid 1.0% 첨가구가 pH 5.2로 가장 낮은 값을 나타내었다. 또한, 30℃ 저장의 경우도 같은 경향이었으며, 저장온도가 높을수록 pH는 낮게 나타났으며, 본 실험의 저장 중 pH의 감소는 저장기간이 경과함에 따라 미생물의 성장에 따른 유산균의 작용에 의하여 생성된 젖산으로 인하여 pH가 감소(12)한다는 보고와 일치하는 것이다.

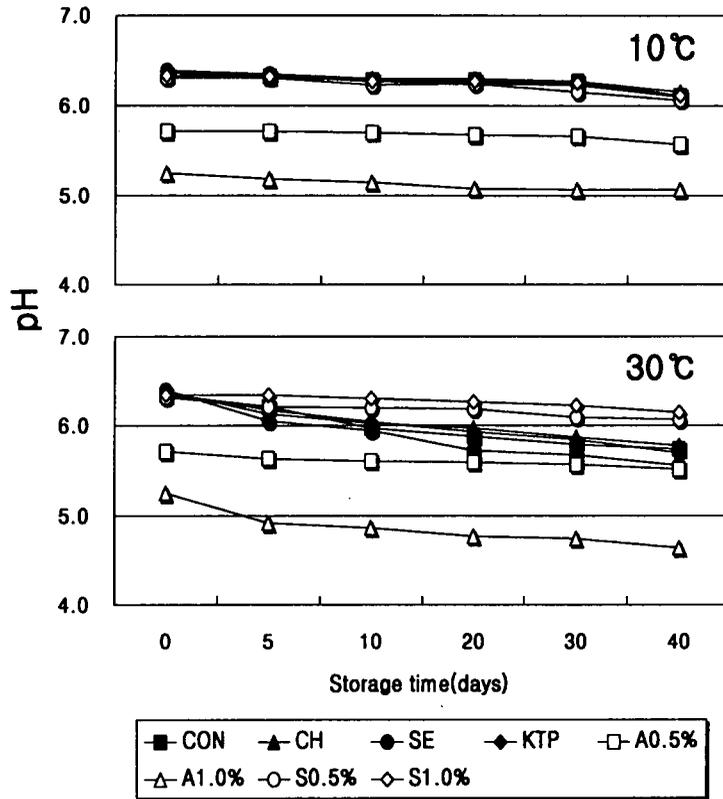
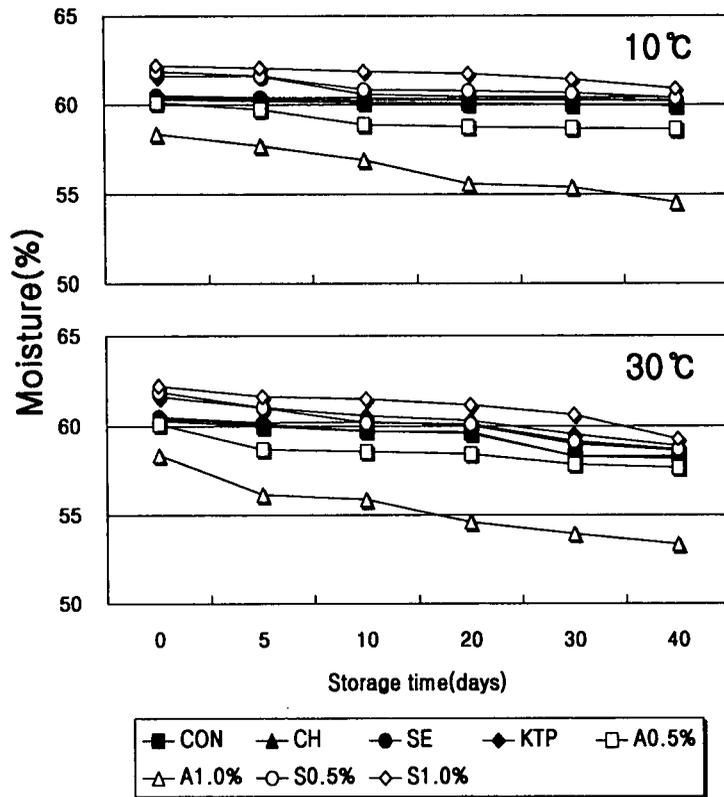


Fig. 1. Changes of sausage pH depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 나. 수분의 변화

저장기간별 온도에 따른 소시지의 수분함량의 변화는 Fig. 2와 같이 10°C와 30°C 저장 모두 저장기간이 경과함에 따라 감소하는 경향이었으며, 10°C 저장 보다는 30°C 저장이 저장 10일째부터 다소 수분함량의 감소가 증가하는 경향이 있었다. 10°C와 30°C 저장시 수분함량은 62~60% 범위로 나타내었다.



**Fig. 2. Changes of sausage moisture depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C.** CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 다. 보수력의 변화

천연물 첨가 소시지의 보수력의 변화는 Fig. 3 과 같이 저장기간의 경과함에 따라 30 °C 저장에 비하여 10 °C 저장이 서서히 감소하였으며, 대부분 59~43 %의 좁은 폭으로 감소하였다. 그러나, ascorbic acid 첨가구는 52~33 %로 다소 큰 폭으로 감소하는 현상을 나타내었다.

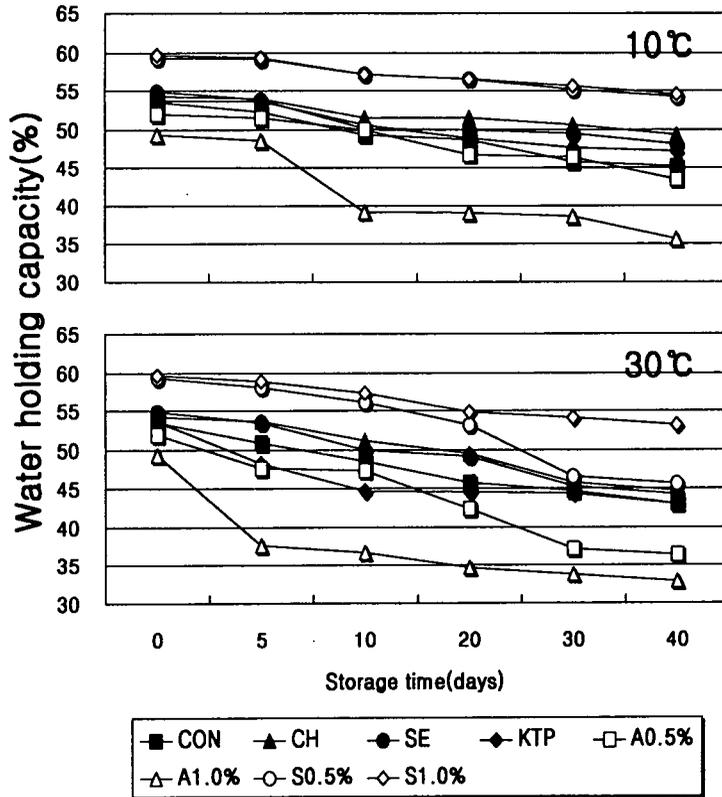


Fig. 3. Changes of sausage water holding capacity depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 라. 염도의 변화

온도별 저장기간에 따른 염도의 변화(Fig. 4)의 범위는 ascorbic acid 첨가구를 제외하고는 유사한 경향이었으며, 10°C와 30°C 저장 모두 저장초기 2.3~1.8%에서 저장기간이 경과함에 따라 서서히 감소하여 저장 40일째 2.0~1.7%를 나타내었다. 저장기간의 경과에 따라 염도가 증가한다는 Park 등의 보고와는 상반되나, 이는 포장재(PVDC)의 차이에 의한 것이라 사료된다.

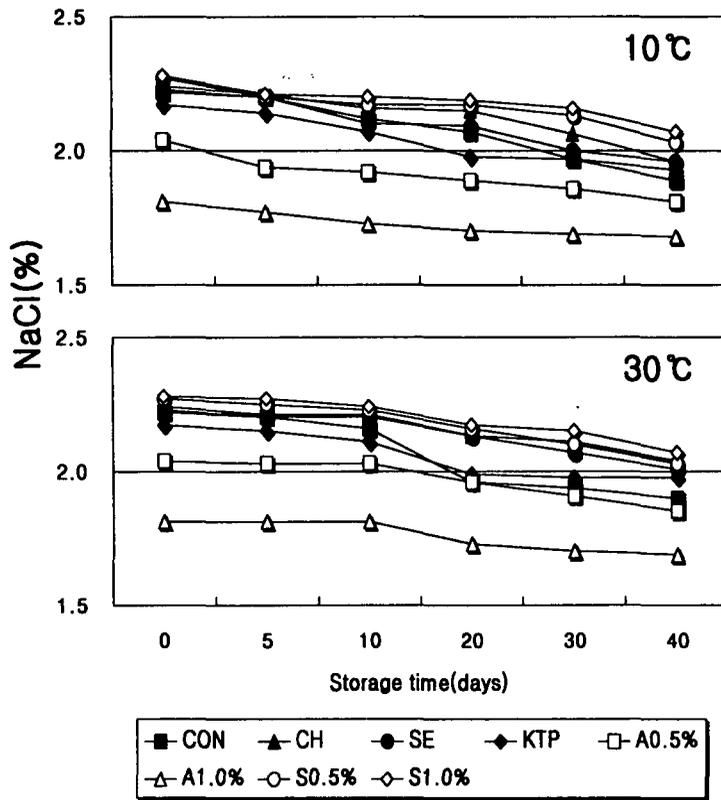
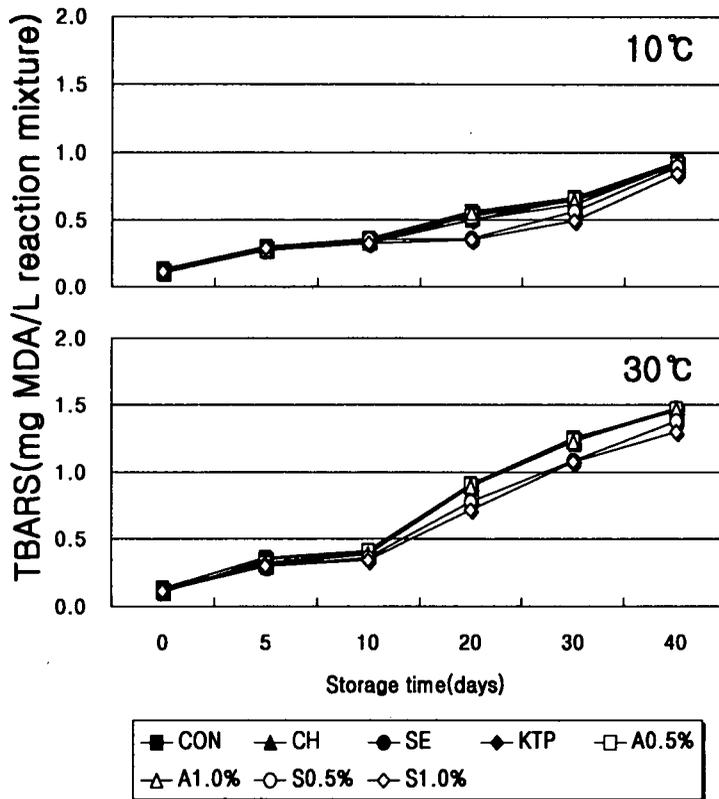


Fig. 4. Changes of sausage NaCl depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

마. 지방산화에 미치는 영향

저장기간에 따른 소시지의 TBRAS값의 변화는 Fig. 5와 같이 10°C 저장의 경우 저장 0일째 대조구 0.13 MDA ppm에 비하여 천연물 첨가구인 chitosan 0.11 MDA ppm, sesamol 0.12 MDA ppm, 감귤껍질 0.11 MDA ppm으로 다소 낮은 값을 나타내었으며, 저장기간이 경과할수록 TBARS 값은 서서히 증가하였다. 30°C 저장의 경우도 저장 10일째까지 서서히 TBARS 값이 증가하였으나, 저장 20일째부터는 급격히 증가하였다. 10°C 저장과 30°C 저장 모두 대조구에

비하여 천연물 첨가구가 다소 낮은 TBARS 값을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다( $P>0.05$ ). 또한, 저장성 비교를 위한 potassium sorbate 첨가구는 대조구와 천연물첨가구에 비하여 낮은 TBARS 값을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다.



**Fig. 5. Changes of sausage TBARS depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C.** CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

바. 잔존 아질산염 함량의 변화

잔존 아질산염 함량의 변화(Fig. 6)는 저장 10℃의 경우 저장기간의 경과에 따라 단계적으로 서서히 감소하였으나, 30℃ 저장은 저장 5일째까지 급속히 감소하다가 저장 10일째부터는 서서히 감소하였다. Ascorbic acid 첨가구는 온도에 관계없이 저장 0일째부터 대조구 86.8 ppm에 비하여 ascorbic acid 0.5% 첨가구 23.9 ppm, ascorbic acid 1.0% 첨가구 21.4 ppm으로 잔존 아질산염 함량을 낮추었으며, 저장기간이 경과할수록 서서히 감소하였다.

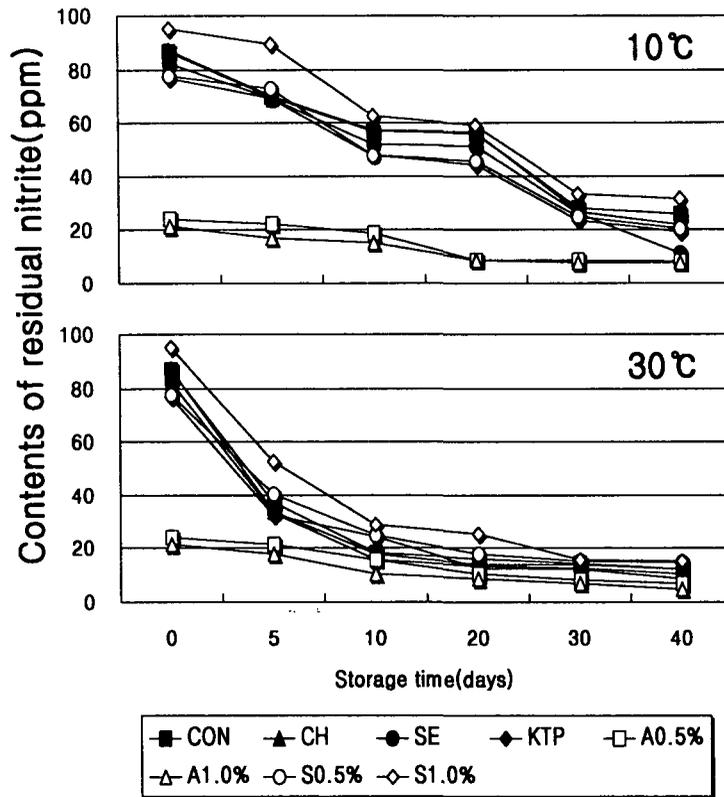


Fig. 6. Changes of sausage residual nitrite content depending on natural extracts addition during storage at 10℃ and 30℃. CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

사. 색차 및 소시지 단면의 변화

온도별 저장기간에 따른 lightness의 변화는 Fig. 7 과 같다. 10 ℃ 저장은 저장 20 일째부터 lightness가 감소하였으며, 30 ℃ 저장은 저장 5일째부터 lightness의 감소를 나타내어 소시지 밝기는 10 ℃ 저장보다 30 ℃ 저장시 빨리 감소함을 나타내었다. 또한, 각 처리구별 유의성은 인정되지 않았다( $P>0.05$ ). Redness는 (Fig. 8) lightness와 달리 10 ℃와 30 ℃ 저장 모두 저장 10 일째까지 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과 저장기간에 따른 색차의 변화는 저장기간이 경과함에 따라 lightness는 감소하며, redness는 증가하다가 다시 감소한다는 Kim 등(13)과 Park 등(14)의 보고와 일치하였다.

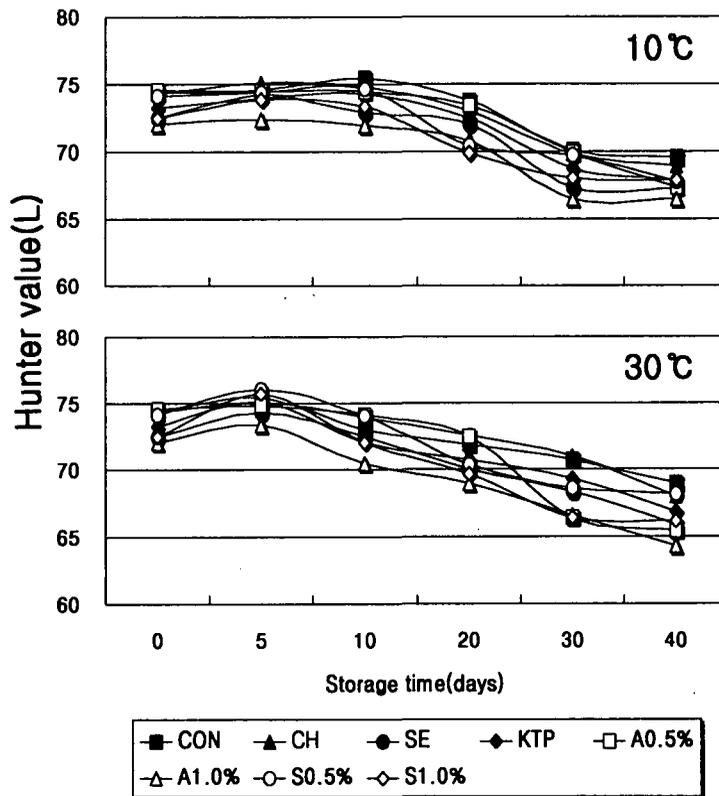


Fig. 7. Changes of sausage hunter value(L) depending on natural extracts addition during storage at 10℃ and 30℃. CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

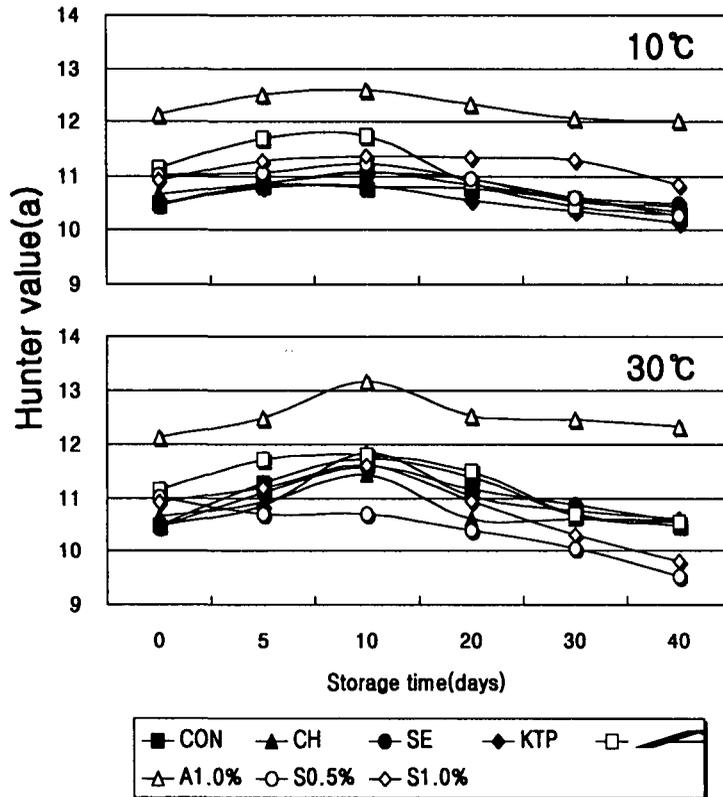
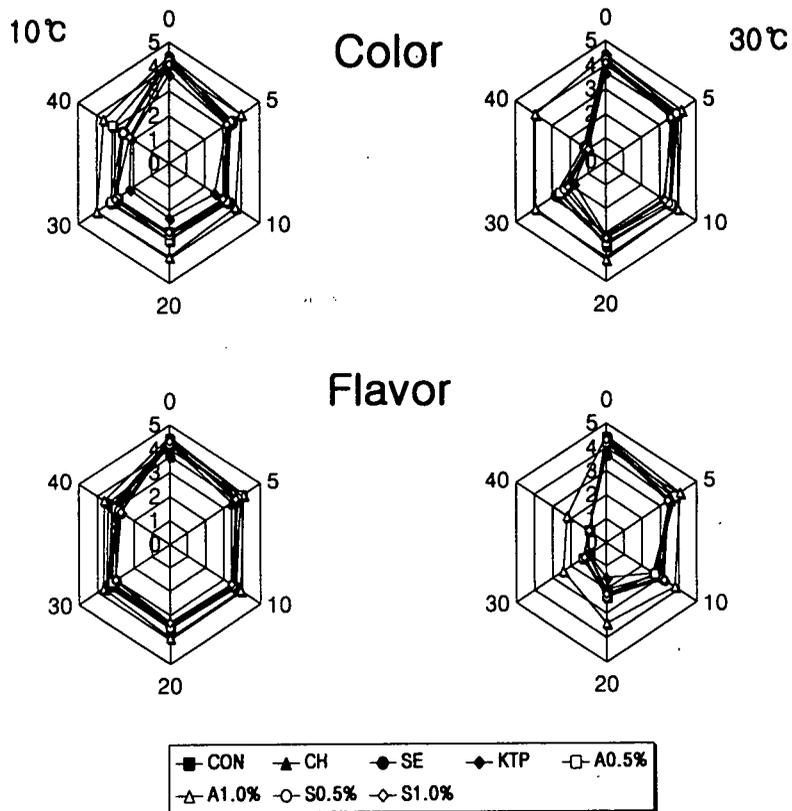


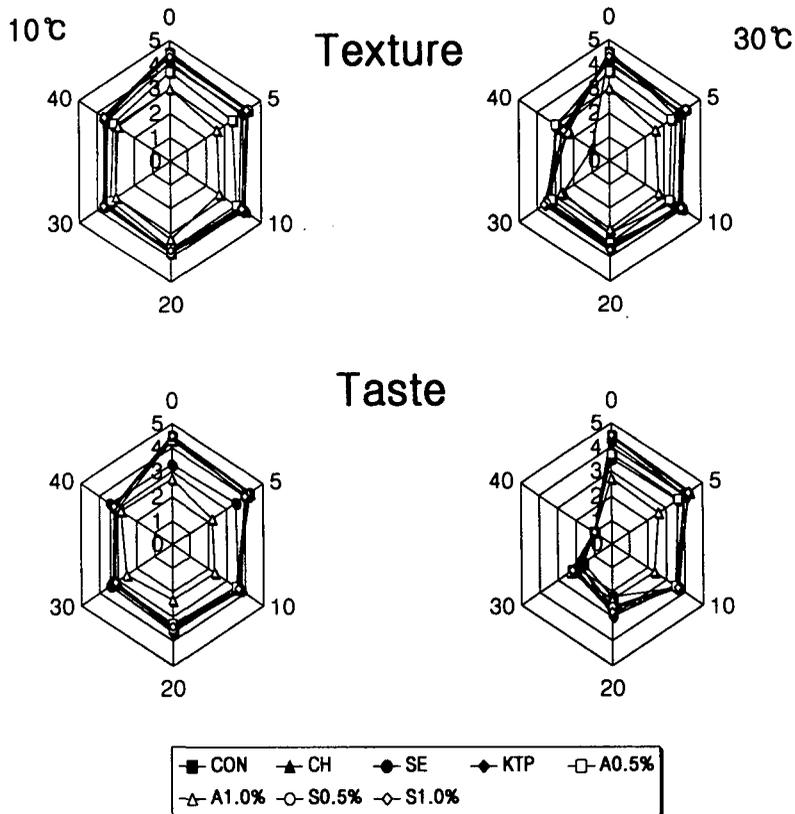
Fig. 8. Changes of sausage hunter value(a) depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 아. 관능검사

소시지를 10°C 와 30°C 에서 저장하면서 저장기간동안 색, 향, 조직감 그리고 맛을 기호도 검사법(5점법)으로 평가한 결과 Fig. 9, 10 과 같이 저장기간이 경과함에 따라 색, 향, 조직감 그리고, 맛은 감소하는 경향이였으며, 10°C 보다는 30°C 저장이 큰 폭으로 감소하였다. 10°C 저장의 경우 색, 향, 조직감 그리고 맛은 저장 40일까지 관능평가가 3점 이상이였으며, 30°C 저장은 저장 20일까지로 나타났다. 즉, 저장기간은 10°C는 40일 이상, 30°C는 20일까지가 저장이 가능함을 확인하였다. 또한, 전반적으로 대조구와 첨가구의 비교에서는 큰 차이를 나타내지 않았다.



**Fig. 9. Changes of sausage color and flavor depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.**



**Fig. 10. Changes of sausage texture and taste depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, CH: chitosan 0.5%, SE: sesamol 0.5%, KTP: dry korean tangrine peel 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.**

#### 4. 요약

페자원 추출물 첨가 소시지의 pH의 변화는 10 ℃저장의 경우 대조구 pH 6.3에 비하여 페자원(chitosan, sesamol, 감귤껍질) 첨가구는 pH 6.4로 약간 높게 나타났으며, 수분은 10℃ 저장보다는 30 ℃저장이 저장 10일째부터 다소 수분함량의 감소가 증가하는 경향이였다. 보수력은 저장기간이 경과함에 따라 30 ℃ 저장에 비하여 10 ℃저장이 서서히 감소하였으며, 대부분 59~43%의 범위를 나타내었다. 엽도의 변화는 ascorbic acid 첨가구를 제외하고는 유사한 경향이였으며, 지방산화도는 10℃ 저장과 30 ℃ 저장 모두 대조구에 비하여 천연물 첨가구가 다소 낮은 TBARS 값을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 또한, 저장성 비교를 위한 potassium sorbate 첨가구는 대조구와 천연물 첨가구에 비하여 낮은 TBARS 값을 나타내었으나, 역시 유의성은 인정되지 않았다. 아질산염 함량은 저장 10 ℃의 경우 저장기간이 경과함에 따라 단계적으로 서서히 감소하였으나, 30 ℃ 저장은 저장 5일째까지 급속히 감소하였으나 저장 10일째부터는 서서히 감소하는 경향이였다. 10 ℃ 저장 중 색차의 변화는 저장 20일째부터 lightness가 감소하였으며, 30 ℃ 저장은 저장 5일째부터 lightness의 감소를 나타내었다. 그러나, redness는 lightness와 달리 10 ℃와 30 ℃ 저장 모두 저장 10일째까지 증가하다가 서서히 감소하는 경향이였다. 관능검사 결과 색, 향, 조직감 그리고 맛은 저장기간이 경과함에 따라 감소하는 경향이였으며, 10 ℃ 보다는 30 ℃ 저장이 큰 폭으로 감소하였다. 관능평가 결과, 10 ℃ 저장은 40일까지, 30 ℃ 저장은 저장 20일까지 저장기간이 가능한 것으로 판단되었다. 따라서, 페자원으로부터 추출한 sesamol이 소시지의 저장성과 아질산염 소거작용이 우수함으로 이의 사용 가능성이 효과적일 것으로 판단된다.

## 5. 문 헌

1. Kim, H.Y., Lee, M.G., Jang, K.A. and Kim, K.O.: Development of definition of parameters and reference scales for texture profiling of frankfurter sausage. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(1), 1(1995)
2. Peter F.S.: The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Food Agric.*, **26**, 1761(1975)
3. Crosby, N.T. and Sawyer, R.: N-nitrosamines: A review of chemical and biological properties and their estimation in food stuffs. In "Advances in food research" Chrichster, C.o.(ed.), Academic Press, New York, **21**, 1(1976)
4. Fiddler, W., Pensabene, J.W., Piotrowski, E.G., Doerr, R.C. and Wasserman, A.E.: Use of sodium ascorbate or erythrobate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters. *J. Food Sci.*, **38**, 1084(1973)
5. Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.*, Volume, p.85(1984)
6. Eun, J.B., Jung, Y.M. and Woo, G.J.: Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of korean tangerine(*Citrus aurantium var.*). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(2), 371(1996)
7. Ryu, S.N., Kang, C.W., Lee, J.I., Lee, S.T., Kim, K.S. and Ahn, B.O.: Perspectives of utilization and function of antioxidants in sesame. *Korean J. crop. Sci.*, **41**, 94(1996)
8. 이유방, 성삼경: 식육과 육제품의 분석실험. 선진문화사. p.128(1996)
9. Buege, J. A. and Aust, S. D. : Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol.*, **105**, 302(1978).
10. Kato, H., Lee., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. : Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol.Chem.*, **51**, 1333(1987).
11. 이영춘, 김광옥 : 식품의 관능검사. 학연사, p.179(1989).
12. Langlois, B.E. and Kemp, J.D.: Microflora of fresh and dry-cured hams

- and affected by fresh ham storage. *J. Animal Sci.*, **38**(3), 525 (1974)
13. Kim, C.H., Ko, M.S., Lee, K.H., Park, W.M., Yoo, I.J. and Lee, C.H.: Changes of palatability traits of mold fermented sausage during ripening. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **18**(1), 57(1998)
  14. Park, W.M., Choi, W.H., Yoo, I.J., Ji, J.R. and Jeon, K.H.: Effects of mixed starter cultures on the physico-chemical properties of fermented sausages. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **17**(2), 91(1997)

## 제 4 절 분리 유산균의 발효 육제품의 starter로서의 특성

### Cultural characteristics of mixed starter made by isolated lactic acid bacteria during meat fermentation

#### Abstract

The characteristics of *L. plantarum* N-2, N-9, and *P. pentosaceus* N-3, N-4 selected among 10 strains isolated from *kimchi* were studied to develop meat starter. The selected strains survived in artificial gastric juice(pH 2.5) after incubation for 3 hrs at 37°C. The strains also survived in artificial bile juice containing 1% oxagall for 24 hrs at 37°C. Nitrite depletion ratio of four kinds of mixed starter made by selected strains was above 95% in MRS broth containing 200 $\mu$ g/ml nitrite after incubation for 48 hrs at 32°C. Two kinds of mixed starter(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3 and *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4) showed 100% nitrite depletion ratio in the same condition. The two kinds of mixed starter showed growth in MRS broth containing 8% NaCl. and survived after heat treatment for 20min at 60°C.

#### 1. 서 론

오래 전부터 인류에게 유익하게 이용되고 있는 유산균은 유산을 생성하여 식품의 맛을 개선하며, 영양분의 흡수촉진, 정장작용 등 유익한 기능이 알려져 발효식품제조나 유산균제재의 제조에 이용되고 있다. 이외에도 유산균의 대사산물이 인체의 영양 강화능과 여러 가지 생리 활성을 가지고 있음이 밝혀지고 있다(Gilliland, 1990). 유산균의 대표적인 생리 활성으로는 장내에 정착하여 장의 기능을 강화시키는 정장작용을 들 수 있는데 정장작용을 위해서는 장관까지 생존하여 가는 것이 중요하나 장내에서 분리한 유산균 이외에는 장관까지 생존하여 갈 수 있는 유산균이 많지 않다(Floch, 1972; Sandine, 1979). 이러한 여러

유익한 기능으로 인해 유산균은 식품 제조의 starter나 생균제로 널리 이용되고 있다(강, 1986).

건조 및 반건조 소시지 내에서 유산균의 역할은 첨가한 당을 이용하여 유산을 생성하는 것이다. 유산은 pH를 낮추어 특이한 맛과 발효취를 내게 하며 단백질 변성시켜서 조직과 맛을 향상시킨다(Kandler, 1983; Whitaker, 1978). 발효 육제품의 starter로 사용되는 유산균이 갖추어야 할 조건은 소금 6%와 아질산염 100ppm에서 견딜 수 있어야 하며 성장적온 27~43℃, 대사과정에서 이취나 독소를 생산하지 않아야 하고 균 자체가 단백질이나 지방분해 효소를 분비하지 않아야 한다(Smith등, 1981). 또한 유산균은 반 호기성 상태에서도 성장할 수 있어야 하고 이산화탄소, 아질산염, 혼연, 소금 및 낮은 pH에도 저항이 강한 것을 이용해야 한다(Egan, 1983).

본 실험에서는 발효 소시지 제조용 starter culture로서 사용가능성을 검토하기 위하여 김치에서 분리 선발되어 동정된 유산균 중 *L. plantarum*과 *P. pentosaceus* 각각 2균주를 이용하여 인공위액과 인공 담즙액에 대한 내성을 조사하였으며 이들을 4종류의 혼합 starter로 제조한 후 아질산염 소거능과 염내성, 열내성 등을 측정하여 향후 발효 소시지 제조용 starter로서의 사용가능성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 분리 유산균의 인공 위액, 인공 담즙액에 대한 내성 측정

분리 선발한 유산균 4종에 대한 인공 위액에 대한 내성을 측정하기 위하여 인공 위액은 Kobayashi 등(1973)의 방법에 따라 0.1N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS broth에 pepsin 1%를 첨가하여 사용하였다. 인공 위액에서의 내성 균주 선발은 분리된 유산균을 MRS broth에서 2회 이상 계대 배양하여 활력을 높인 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액은 버리고 균체만을 회수한 후 37℃로 유지된 인공위액을 첨가하여 37℃에서 3시간 진탕 배양하였다. 3시간 후 0.1% 멸균 peptone수를 이용하여 적정 희석한 후 MRS agar에 접종하여 37℃에서 48시간 배양한 후 생성된 colony를 계측하여 배양전의 생균수와 비교하였다. 인공 담즙액은 MRS broth에 1% pancreatin을 첨가하여 멸균한

후 여과하여 제공된 10% oxagall(Difco,USA)용액을 배지의 1% 첨가하여 pH를 6.8로 조정된 후 사용하였다. 분리유산균의 인공담즙에 대한 내성은 인공위액에서 3시간 동안 배양 후 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액은 버리고 균체만 회수하여 인공 담즙액을 상등액과 동량으로 첨가하여 37℃에서 24시간 진탕 배양 후 생균수를 측정하였다.

#### 나. 혼합 균주의 아질산염 소거능 측정

분리된 2종의 유산균 4균주를 각각 starter I (*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3), starter II(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4), starter III(*L. plantarum* N-9 + *P. pentosaceus* N-3), starter IV(*L. plantarum* N-9 + *P. pentosaceus* N-4)로 제조한 후 혼합 균주에 의한 아질산염 소거능의 측정은 Dodds와 Collins-Thompson(1984)의 방법에 따라 실시하였다. MRS broth 9ml에 2mg/ml의 nitrite slon. 1ml를 첨가하여 최종농도가 200 $\mu$ g/ml가 되게 하여 멸균한 배지에 24시간 배양시킨 선발 유산균을 각각 5:5의 양으로 접종하여 32℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 시료를 채취하여 잔존 아질산염양을 측정하였다.

#### 다. 혼합 균주의 염내성 측정

혼합 균주의 NaCl에 대한 내성을 조사하기 위하여 각각 0, 8, 10%의 NaCl로 농도 조정된 MRS broth에 24시간 배양한 선발 유산균 배양액으로 각각 starter I, II, III, IV를 접종한 후 6시간 간격으로 pH meter와 spectrophotometer를 이용하여 pH와 흡광도를 측정하였다.

#### 라. 혼합 균주의 열내성 측정

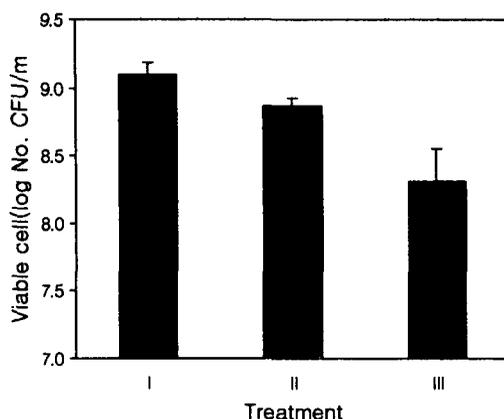
starter I, II의 유산균주를 37℃에서 계대 배양한 후 2ml gold band ampoule(Weaton Co., U.S.A)에 분주하여 밀봉한 다음 60℃에서 10, 20분간 열처리한 후 즉시 냉각시켜 MRS agar를 사용하여 생균수를 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

가. 분리 유산균의 인공 위액, 인공 담즙액에 대한 내성

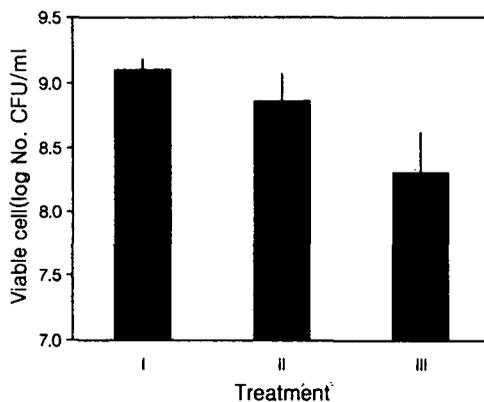
김치에서 분리한 유산균인 *L. plantarum*(N-2, N-9), *P. pentosaceus*(N-3, N-4)를 인공 위액에서 3시간 배양한 후의 생존 정도를 측정한 결과는 다음과 같다(Fig 1, 2, 3, 4). 분리 유산균 모두 인공 위액에서 3시간 배양한 후의 생존수는 균주마다 1 log cycle 정도의 차이는 있었으나  $10^9$  CFU/ml 정도의 성장도를 보여 대조구와 유사한 경향을 나타내었다. 특히 *P. pentosaceus*(N-3)균주와 *P. pentosaceus*(N-4)균주는 인공 위액에서 3시간 배양 후의 생존수가 거의 변화가 없어 가장 강한 내성을 나타내었다. 식품을 통해 인체 내로 섭취된 대부분의 외부 미생물들이 생존상태로 위장을 통과하지 못하고 사멸시키는 살균작용을 하는 것이 위액이며 이것은 위산의 낮은 pH 때문이다(Dare 등, 1972). 이로 인하여 유산균 등 정장작용이 가능한 미생물은 장내까지 도달하지 못하여 그 생리적 기능을 발휘하지 못하는 경우가 많다. 따라서 유산균의 장내 생리적 기능, 즉 probiotics로의 작용을 하기 위해서는 위액에서 생존할 수 있는 산성에 내성이 있는 균주의 선발이 중요하다 하겠다.

인공위액에서 3시간 배양한 후 시험 균주의 인공 담즙액에 대한 내성을 측정한 결과를 보면 공시 균주 모두 인공 담즙액에서의 생존수가  $10^8$  CFU/ml 이상을 나타내어 생존이 가능한 것으로 관찰되었다. 일반적으로 음식물은 위에서 머무는 시간이 비교적 짧기 때문에 위액에서의 내성을 가진 유산균은 위와 십이지장을 거쳐 생존력이 높은 것들만이 장에 도달할 수 있다(노, 1997). 이러한 미생물이 생존하여 장관에 도달하려면 췌장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 대한 내성이 있어야 한다. Gilliland 등(1984)은 유산균이 probiotics로 작용하기 위해서는 oxagal이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있을 정도의 내성을 가져야 한다고 보고한 바 있다. 그러나 일부 연구자들은 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis* 등의 장내 유래 유산균은 담즙에 대한 내성이 강한 편이나 장내에서 유래하지 않은 유산균들은 0.15% oxagal이 함유된 배지에서도 성장이 불가능하였다고 보고한 바 있다(Gilliland 등, 19984; Sandine, 1979). 본 실험에서 분리된 김치 유래 유산균은 장내에서 유래되지 않았음에도 불구하고 인공 위액과 인공 담즙액에서의 강한 내성을 보여 인체에 섭취되었을 경우 정장작용 등 장내에서 여러 가지 생리적 기능을 수행할 수 있을 것으로 판단되었다.



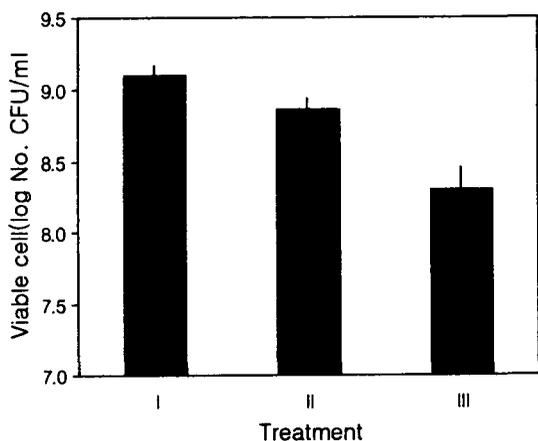
I ; Before incubation in artificial gastric juice  
 II ; After incubation for 3 hrs in artificial gastric juice  
 III ; After incubation for 24 hrs in artificial bile juice

**Fig 1. Survival of N-2(*L. plantarum*) isolated from *kimchi* in artificial gastric juice(pH 2.5) for 3 hrs and artificial bile juice for 24 hrs after treatment with gastric juice for 3 hrs at 37°C**



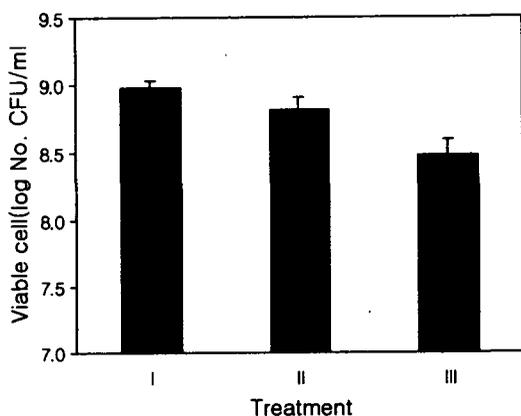
I ; Before incubation in artificial gastric juice  
 II ; After incubation for 3 hrs in artificial gastric juice  
 III ; After incubation for 24 hrs in artificial bile juice

**Fig 2. Survival of N-3(*P. pentosaceus*) isolated from *kimchi* in artificial gastric juice(pH 2.5) for 3 hrs and artificial bile juice for 24 hrs after treatment with gastric juice for 3 hrs at 37°C**



I ; Before incubation in artificial gastric juice  
 II ; After incubation for 3 hrs in artificial gastric juice  
 III ; After incubation for 24 hrs in artificial bile juice

**Fig 3. Survival of N-4(*P. pentosaceus*) isolated from *kimchi* in artificial gastric juice(pH 2.5) for 3 hrs and artificial bile juice for 24 hrs after treatment with gastric juice for 3 hrs at 37°C**



I ; Before incubation in artificial gastric juice  
 II ; After incubation for 3 hrs in artificial gastric juice  
 III ; After incubation for 24 hrs in artificial bile juice

**Fig 4. Survival of N-9(*L. plantarum*) isolated from *kimchi* in artificial gastric juice(pH 2.5) for 3 hrs and artificial bile juice for 24 hrs after treatment with gastric juice for 3 hrs at 37°C.**

나. 혼합 균주의 아질산염 소거능 측정

분리한 유산균을 혼합 균주로 사용하기 위하여 혼합하였을 때의 아질산염 소거능을 검토한 결과는 Table 1과 같다. 단독 균주의 아질산염 소거능과 거의 유사한 경향을 보여 혼합 starter 모두 95% 이상의 소거능을 나타내었으며 특히 starter I과 starter II는 48시간 배양했을 때 100%의 아질산염 소거능을 나타내었다. 현재 발효 육제품의 제조는 미국에서는 주로 *Pediococci*나 *Lactobacilli*를 사용하여 고온 단시간 발효를 진행시켜 최종 pH를 4.6~5.1로 낮게 하고 있으며 이에 반해 유럽에서는 *Micrococci*를 주로 사용하거나 다른 균과 혼합하여 발효 온도인 23.9℃ 이하에서 최종 pH를 5.2~5.6으로 비교적 높게 하는 것이 특징이다(Bacus, 1984). 따라서 본 실험에서는 분리 동정된 유산균인 *L. plantarum*과 *P. pentosaceus*를 혼합 사용하여 발효 소시지 제조 시 이용한다면 소시지내의 산 생성을 빠르게 유도하여 발효시간과 제조공정을 단축시킴과 동시에 발암성 물질의 전구체인 아질산염의 소거율도 높아 새로운 육제품 starter로서의 사용이 가능하다고 판단되었다.

Table 1. Depletion of nitrite in MRS broth by various starter after incubation for 48 hrs at 37℃

Kinds of starter*	nitrite scavenging ratio, %
Starter I	100
Starter II	100
Starter III	97.0
Starter IV	97.0

\* starter I ; *L. plantarum*(N-2) + *P. pentosaceus*(N-3)  
 starter II ; *L. plantarum*(N-2) + *P. pentosaceus*(N-4)  
 starter III ; *L. plantarum*(N-9) + *P. pentosaceus*(N-3)  
 starter IV ; *L. plantarum*(N-9) + *P. pentosaceus*(N-4)

다. 혼합 균주의 염내성 측정

분리 유산균은 발효 소시지 제조시 혼합 starter로 사용하기 위하여 아질산염 소거능이 뛰어난 *L. plantarum*(N-2)와 *P. pentosaceus*(N-3)를 혼합한 starter I 과 *L. plantarum*(N-2)와 *P. pentosaceus*(N-4)를 혼합한 starter II를 선발하여 그 염내성을 측정하였다. 분리 균주의 염내성은 0, 8, 10%의 NaCl이 첨가된 MRS broth에 24시간 배양한 유산균을 1:1로 접종하여 배양하면서 흡광도와 pH를 측정하여 조사한 결과는 table 2에 나타난 바와 같다. 혼합 균주의 염내성은 배양 48시간 후에 8%의 염 농도에서도 성장이 가능한 것으로 나타났으며 pH 또한 배양 24시간 이후로 4이하로 감소되었다. 10%의 염 농도에서도 미약하지만 성장이 다소 이루어지는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 실험에서 분리한 유산균을 혼합하여 사용한다면 단독 균주보다 염내성이 뛰어날 것으로 판단되었다.

Table 2. Growth of starter cultures in various NaCl concentration at 37°C.

		Starter culture*	Incubation time(hrs)	0%	8%	10%
O. D. (600nm)	I		0	0.039	0.039	0.039
			24	1.845	0.998	0.019
			48	2.128	1.252	0.259
	II		0	0.039	0.039	0.039
			24	1.983	0.869	0.030
			48	2.162	1.339	0.675
pH	I		0	6.79	6.79	6.79
			24	3.02	3.68	5.25
			48	2.84	3.36	5.12
	II		0	6.79	6.79	6.79
			24	3.06	3.66	5.20
			48	2.78	3.07	4.84

\*starter I : *L. plantarum*(N-2) + *P. pentosaceus*(N-3)  
 starter II : *L. plantarum*(N-2) + *P. pentosaceus*(N-4)

라. 혼합 균주의 열내성 측정

*L. plantarum*과 *P. pentosaceus* 혼합 균주의 열내성을 측정한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 60℃에서 10, 20분 동안 열처리 후 즉시 냉각하여 생균수를 측정한 결과, 시간이 경과할수록 생균수는 줄어들었으나 열에 의해 완전히 사멸되지는 않는 것으로 관찰되었다. 향후 본 실험에서 분리한 starter를 이용하여 ham을 제조하게 될 경우 염지 과정 시 아질산염을 소거시킬 뿐 아니라 향미를 위한 훈연과정을 거치게 되더라도 그 과정 중 유산균은 사멸하지 않고 남아 발효 육제품을 섭취했을 경우 장내에서 정상작용(정, 1984)을 할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 3. Effect of heat treatment on the starter cultures

(log No. CFU/ml)			
Temp	Time(min)	starter I <sup>†</sup>	starter II
control	0	8.65 ± 0.08*	8.84 ± 0.06
60℃	10	3.37 ± 0.09	4.59 ± 0.19
	20	2.94 ± 0.08	3.50 ± 0.43

\* : Mean(log<sub>10</sub>) ± standard deviation

<sup>†</sup> starter I : *L. plantarum*(N-2) + *P. pentosaceus*(N-3)

starter II : *L. plantarum*(N-2) + *P. pentosaceus*(N-4)

#### 4. 요약

김치에서 분리 선발되어 동정된 유산균 중 발효 소시지 제조용 starter로서의 사용 가능성을 검토하기 위하여 *L. plantarum*과 *P. pentosaceus*를 이용하여 인공 위액과 인공 담즙액에 대한 내성과 이 두 균주를 이용하여 혼합 균주를 제조한 후 아질산염 소거능과 염내성, 열내성 등을 측정하였다.

1. 분리 유산균의 인공 위액, 인공 담즙액에 대한 내성을 측정한 결과 4균주 모두 위액에서 3시간 배양 후  $10^9$  CFU/ml 이상의 생균수를 나타내어 생존이 가능하였으며 담즙액에서도 균주마다 정도의 차이는 있으나  $10^8$  CFU/ml 이상의 생균수를 나타내어 위액과 담즙액에 내성이 있는 것으로 판단되었다.
2. 분리 유산균의 혼합 균주로 사용하기 위하여 혼합한 후 아질산염 소거능을 측정한 결과 배양 48시간 이후에 *L. plantarum*(N-2)과 *P. pentosaceus*(N-3)를 혼합한 starter I과 *L. plantarum*(N-2)과 *P. pentosaceus*(N-4)을 혼합한 starter II의 경우 100%의 아질산염 소거능을 나타내어 단독 균주일 때 보다 효과가 좋은 것으로 판단되었다.
3. 혼합 균주의 염내성을 측정한 결과 8%의 염 농도에서도 성장이 가능했으며 배양 48시간 이후 pH 4이하를 나타내어 산 생성에도 영향이 없는 것으로 관찰되었다.
4. 혼합 균주의 열내성을 측정한 결과 열처리 시간이 경과할수록 생균수는 감소하였으나 열에 의해 완전히 사멸되지는 않는 것으로 관찰되어 혼연과정을 거치는 육제품 제조 시에 사용 가능할 것으로 기대되었다.

## 5. 문 헌

1. Dare, R., J. T. Magee and G. E. Mathison. 1975. In vitro studies on the bacteriocidal properties of natural and synthetic gastric juices. J. Med. Microbiol., 5, 395.
2. Dodds, K. L. and D. L. Collins-Thompson, 1984. Incidence of nitrite-depletion lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter cultures. J. Food Prot., 47, 7.
3. Floch, M. H., M. S. Henry, J. Binder, M. D. Betrice, B. S. Filburn and M. S. William. 1972. The effect of bile acid on intestinal microflora. Am. J. Clin-Nutri., 125, 1428.
4. Gilliland, S. E., T. E. Staley and L. T. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci., 67, 3045.
5. Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 49, 209.
6. Kobayashi, Y., K. Tohyama and T. Terashima. 1973. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. Nipon Yakult Institute Bulletin. 4, 84.
7. Sandine, W. E., 1979. Role of *Lactobacillus* in the intestinal tract. J. Food Prot., 42, 259.
8. Whitaker, J. R. 1978. Biochemical changes occurring during the fermentation of high protein foods. Food Technol., 32, 175.
9. 노명자. 1997. 김치에서 분리한 유산균의 생리적 특성에 관한 연구. 대구가톨릭대학교 석사학위논문.
10. 정영건. 1984. 유산균 접종에 의한 염지 ham의 이화학 및 조직학적 특성에 관한 연구. 경상대학교 박사학위논문.

제 5 절 Starter 첨가시기가 염지 공정 중 염지육의  
미생물학적 이화학적 특성에 미치는 영향  
Effect of addition time of mixed starter on the  
changes of microbiological and physico-chemical  
characteristics of meat during curing

Abstract

The change of residual nitrite content, pH, color, lactic acid bacteria and coliform bacteria during fermentation for 72 hrs at 32°C was examined to investigate the effect of mixed starter on curing of pork meat. Nitrite depletion ratio showed above 90% in starter inoculated meat and about 70% in control after 72 hrs incubation at 32°C. the growth of coliform bacteria inhibited significantly in mixed starter inoculated meat compared to control. The number of coliform bacteria was 5.98 (log CFU/ml) in control, 2.85 (log CFU/ml) in starter I (*Pediococcus pentosaceus* N-3+ *Lactobacillus plantarum* N-2) inoculated meat and 3.06 (log CFU/ml) in starter II (*P. pentosaceus* N-4 + *L. plantarum* N-2 ) inoculated meat after fermentation for 72 hrs at 32°C. The effect of addition time of mixed starter on changes of nitrite depletion and coliform bacteria was also investigated. Nitrite depletion ratio of cured meat after fermentation for 72 hrs at 32°C showed 97.0 % of starter added meat before curing and 96.8% of starter added meat after 2 days pre-curing, respectively. The starter added before curing was better than after pre-curing for 2 days in changes of coliform bacteria, pH and nitrite depletion ratio during fermentation of sausages for 72 hrs at 32°C.

## 1. 서 론

최근 우리 나라는 경제 성장에 힘입어 육류의 소비가 증가하고 있으며 이에 따라 육가공 제품의 소비 또한 증가하는 경향이다. 가공 육제품은 주로 돈육의 일부를 가공하여 주로 햄, 베이컨, 소시지 등으로 소비되고 있는데 그 소비가 증대된 만큼 가공 육제품은 국민건강에도 깊이 관여한다 하겠다. 따라서 위생적이고 안전한 육제품 생산이 중요한 문제로 대두되면서 육제품 제조시 사용되는 아질산염에 관심이 집중되어 염지 효과 및 안전성에 대한 과학적이고 체계적인 연구가 1950년대부터 활발하게 진행되어 왔다. 육제품 제조시 첨가되는 아질산염은 nitric oxide로 분해되는데 이때 생성된 nitric oxide가 myoglobin과 결합하여 육제품의 육색을 부여한다(Zaika 등, 1976). 이외에도 아질산염은 *Staphylococcus aureus*와 *Clostridium botulinum*과 같은 식중독균의 증식을 억제하는 데에도 관여하며 산화에 의한 산패취의 생성억제, 풍미의 생성 등에 기여하는 것으로 알려져 있어 육제품 제조에 있어서 없어서는 안 되는 첨가물로 인식되어 왔다 (Kromlich 등, 1983; Poter, 1975). 박 등(1982)이 소시지 제품에서 아질산염 잔류량이 8.7~10.2 ppm 검출되었다고 보고한 것처럼 육 내의 잔류 아질산염이 육류의 분해과정에서 생성될 수 있는 amine류와 결합하여 N-nitrosamine이라는 발암성 물질이 생성될 수 있다는 사실이 최근 알려지면서 아질산염의 안전성에 대한 문제가 대두되기 시작하였다(Crosby 등, 1976). 발암성 물질인 nitrosamine은 식품에서는 극히 적은 함량이 검출되고 있으나 Heath(1962)에 의하면 dimethyl-nitrosamine은 쥐에서 간암을 유발시킬 가능성이 있다고 하였다. 그러나 현재 까지 아질산염을 대체하여 사용할 수 있는 첨가물이 개발되지 않은 상황에서 아질산염을 사용하지 않고 육제품을 생산한다는 것은 발암성 물질 전구체라는 문제보다 더 큰 여러 가지 문제를 야기시킬 수 있으므로 아질산염의 사용량을 규제하는 방법 이외에는 대체방법이 없는 것이 사실이다. 따라서 여러 가지 측면을 고려할 때 최소의 양을 사용하여 아질산염의 여러 가지 효과는 수행하면서 역할이외에 육제품에 잔존하는 아질산염을 성공적으로 분해시키는 것이 중요하다고 하겠다.

본 실험은 발효 소시지 제조 시 아질산염의 고유기능인 육색 발현은 가능하게 하면서 나머지 발암성 물질의 전구체가 되는 잔존 아질산염은 소거시켜 감소시킬 수 있는 starter 첨가 시기를 결정하기 위하여 4℃에서 2일간 염지한 후

starter를 접종한 것과 starter와 염지제를 동시에 첨가한 후 육의 아질산염의 변화, 육색, pH의 변화, 미생물학적 변화를 관찰하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 혼합 starter 첨가에 의한 육의 변화

혼합 starter 첨가에 의한 발효 중 육의 변화를 측정하기 위하여 혼합 starter를 3% 접종하여 32℃에서 72시간 저장하면서 잔존 아질산염, 미생물의 변화, pH, 육색의 변화를 관찰하였다.

#### 1) 시료준비

하양시내 정육점에서 구입한 돈육을 30g씩 절단하여 사용하였다.

#### 2) 혼합 starter 조제

유산균 과 *Lactobacillus plantarum* 1종과 *Pediococcus pentosaceus* 2종을 각각 37℃에서 24시간 배양한 후 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 후 혼합하여 starter I(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3), starter II(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4)를 조제하여 균의 농도가 약  $10^7$ CFU/ml가 되도록 적정 희석한 후 사용하였다.

#### 3) 염지제의 조제

염지제는 sodium chloride 4%, sugar 2%, sodium nitrite 0.02%를 혼합한 후 조제하여 사용하였다(박, 1999)

#### 4) 혼합 균주 starter 첨가에 의한 염지육의 미생물학적 변화

염지육의 미생물 검사는 시료 10g을 일정시간 간격으로 무균적으로 채취하여 0.1% peptone solution 90ml를 첨가하여 stomacher(Lab blender model 400, TMC Co.)로 균질화 한 후 그 액 1ml를 적정 희석한 후 유산균수는 0.02% sodium azide를 포함한 MRS agar, coliform bacteria는 violet red bile agar에 각각 접종하여 37℃에서 48시간 배양한 후 나타난 colony수를 계측하여 대조구와 비교하였다.

5) 혼합 균주 starter 첨가에 의한 염지육의 pH 변화 측정

염지육의 pH 변화 검사는 시료 10g을 12시간 간격으로 무균적으로 채취하여 0.1% peptone solution 90ml를 첨가하여 균질화 시킨 후 그 액을 시료로 하여 pH meter로 측정하였다.

6) 혼합 균주 starter 첨가에 의한 염지육 내의 잔존 아질산염 측정

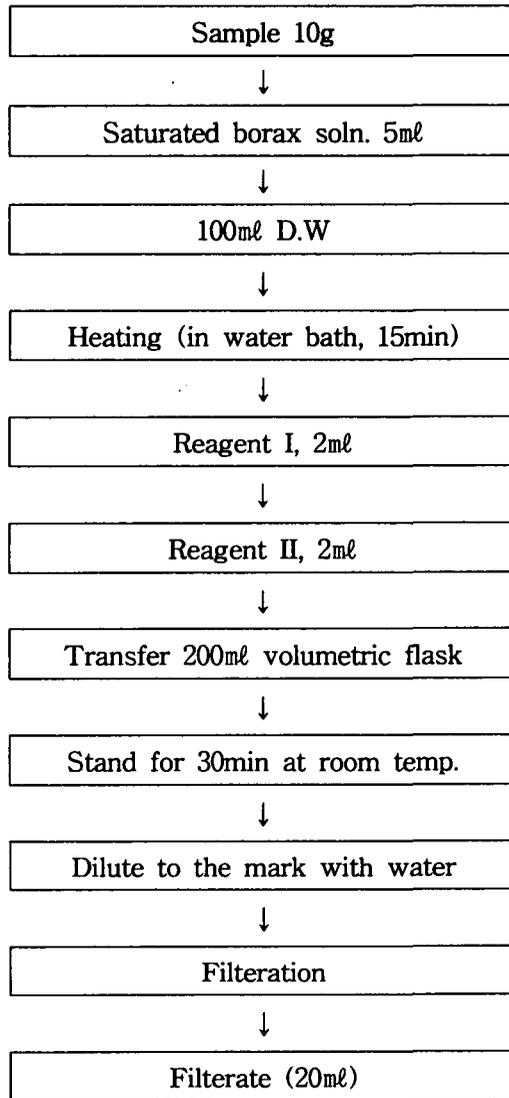
염지육 내의 잔존 아질산염의 측정은 Ito 등(1979)의 방법에 따라 비색 정량하였으며 시약조제와 시료 전처리는 Table 1, Scheme 1.과 같이 실시하였다.

7) 염지육의 육색 측정

육색 표면을 색차계(CR 200, Minolta)로 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였으며 측정값은 lightness와 redness로 나타내었고 이때의 표준판을 Y=94.5, a=0.3132, y=0.3203의 백색 calibration plate를 사용하였다.

Table 1. Preparation of reagent using sample pre-treatment

Reagent	Procedure
Reagent I	Dissolve 106g of potassium ferrocyanide trihydrate( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ) in water and dilute to 1,000ml
Reagent II	Dissolve 220g of zinc acetate dihydrate( $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ) and 30ml of glacial acetic acid in water and dilute to 1,000ml
Borax solution	Dissolve 50g of sodium tetraborate decahydrate( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) in 1,000ml of tepid water and cool to room temperature



**Scheme 1. Preparation of curing meat before chemical analysis.**

나. 혼합 균주 starter의 첨가시기에 따른 육의 변화

혼합 균주 starter의 첨가시기에 따른 발효 과정 중의 변화를 측정하기 위하여 염지 과정 없이 염지제와 starter를 같이 첨가한 경우와 4℃에서 2일간 염지 공정을 거친 후 육에 대해 혼합 starter를 3% 접종하여 32℃에서 72시간 발효 하면서 잔존 아질산염, 미생물의 변화, pH, 육색의 변화를 관찰하였다. 혼합 starter의 조제와 시료처리, 실험방법은 위와 동일하였다.

#### 다. 통계처리

통계처리는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 Duncan's multiple test에 따라 유의성을 검정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 혼합 starter 첨가에 의한 육의 변화

##### 1) 혼합 starter 첨가에 의한 육의 미생물학적 변화

혼합 균주 starter의 첨가에 의한 유산균과 대장균군의 변화는 Table 2, Table 3에서 보는 바와 같다. 유산균수의 변화(table 1)은 starter를 첨가한 경우 발효 초기  $10^6$  CFU/ml ~  $10^8$  CFU/ml의 접종량에서 발효 72시간째까지  $10^8$  CFU/ml를 유지하면서 유산균 성장에는 별다른 저해가 없었다. starter 무첨가구에서는 발효 초기에 유산균수가  $10^2$  CFU/ml 정도로 낮게 나타났는데 이는 육에 존재하는 유산균수인 것으로 사료되며 발효가 진행될수록 그 수는  $10^7$  CFU/ml까지 증가하는 경향을 나타내다가 발효 72시간째에는 그 수가 조금 감소하는 경향을 보였다. Table 3의 염지 과정 중 대장균군수의 변화를 관찰한 바, starter를 첨가한 경우의 초기 대장균군수는  $10^2$  CFU/ml 정도로 유사하였으나 발효가 진행됨에 따라 starter 첨가구는 대장균군수가  $10^2$  CFU/ml 전후로 유지되고 발효 72시간째에는 그 수가 감소되는 경향을 나타내었으나 starter를 첨가하지 않은 경우에는 대장균군수가 점차 증가하는 것으로 나타났다. Collins(1961)와 Gilliland 등(1969)의 보고에 의하면 유산균이 생성하는 유산에 의해 pH가 감소되어 낮은 pH에서의 대장균군의 성장은 억제된다고 하였다. 본 실험 결과 대장균군이  $10^1$  CFU/ml 정도 성장하기는 하였으나 starter 무첨가구와 비교할 때  $10^3$  CFU/ml 정도의 유의적인 차이를 나타내어 그 성장이 억제되는 것으로 판단되었다. starter를 첨가하지 않은 경우, 유산균수는 발효 후기 어느 정도 증가하였으나 그에 따른 유산의 생성은 starter 첨가구 보다 미약하기 때문에 대장균군의 효과적인 저해가 이루어지지 않은 것으로 판단되었다. 유산균수와 대장균군의 변화 결과에서 starter I과 starter II 처리구는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 본 실험에서 초기 대장균군수가 다소 높게 나타난 것은 사실이나 이는 원료육을 분쇄하는 과정 중 대장균군의 오염이 다소 높았던 때

문이라 사료된다. 따라서 미생물학적으로 안전한 염지육 생산을 위해서는 염지 과정중의 위생상태와 마찬가지로 원료육의 상태도 중요한 요인이 되는 것으로 판단되었다.

**Table 2. Effect of mixed starter on the changes of lactic acid bacteria during fermentation for 72 hrs at 32°C.**

(log No CFU/ml)

Incubation time(hrs)	No starter	starter I	starter II
0	2.60±0.22 <sup>*a</sup>	6.78±0.26 <sup>b</sup>	6.95±0.21 <sup>b</sup>
12	4.38±0.15 <sup>a</sup>	7.85±0.16 <sup>b</sup>	7.19±0.09 <sup>b</sup>
18	5.98±0.13 <sup>a</sup>	8.26±0.05 <sup>b</sup>	8.33±0.24 <sup>b</sup>
24	5.98±0.18 <sup>a</sup>	8.54±0.14 <sup>b</sup>	8.19±0.08 <sup>b</sup>
36	6.97±0.18 <sup>a</sup>	8.51±0.21 <sup>b</sup>	8.68±0.07 <sup>b</sup>
48	7.31±0.14 <sup>a</sup>	8.83±0.09 <sup>b</sup>	8.45±0.20 <sup>b</sup>
60	7.62±0.31 <sup>a</sup>	8.61±0.09 <sup>b</sup>	8.90±0.10 <sup>b</sup>
72	6.93±0.06 <sup>a</sup>	8.26±0.08 <sup>b</sup>	8.37±0.03 <sup>b</sup>

Starter I : *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3

Starter II : *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4

\* : means ± standard deviation

<sup>a-c</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

**Table 3. Effect of mixed starter on the changes of coliform bacteria during fermentation for 72 hrs at 32°C.**

(log No CFU/ml)

Incubation time(hrs)	No starter	starter I	starter II
0	1.64±0.13 <sup>*a</sup>	1.97±0.09 <sup>ab</sup>	1.84±0.09 <sup>a</sup>
12	3.02±0.07 <sup>a</sup>	2.86±0.10 <sup>a</sup>	2.22±0.09 <sup>b</sup>
18	3.74±0.13 <sup>c</sup>	2.26±0.09 <sup>a</sup>	2.74±0.09 <sup>b</sup>
24	4.01±0.15 <sup>c</sup>	2.52±0.17 <sup>a</sup>	2.80±0.10 <sup>b</sup>
36	4.74±0.12 <sup>b</sup>	2.63±0.14 <sup>a</sup>	2.67±0.22 <sup>a</sup>
48	4.98±0.10 <sup>b</sup>	2.97±0.12 <sup>a</sup>	3.07±0.04 <sup>a</sup>
60	5.38±0.08 <sup>c</sup>	3.07±0.11 <sup>a</sup>	3.18±0.06 <sup>b</sup>
72	5.98±0.08 <sup>b</sup>	2.95±0.32 <sup>a</sup>	3.06±0.26 <sup>a</sup>

all abbreviations are the same as Table 2.

\* : means ± standard deviation

<sup>a-c</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

2) 혼합 균주 starter 첨가에 의한 육의 pH 변화

혼합 균주 starter 첨가에 의한 육의 pH 변화를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 초기 pH는 모든 실험구에서 유사하게 나타났으나 발효 시간이 경과할수록 starter를 첨가하지 않은 경우, pH는 6정도를 유지한 반면 starter 첨가구에서 발효 36시간이 지나면서부터 pH가 5이하로 감소하기 시작하여 발효 72시간까지 5이하의 pH를 유지하였고 발효 72시간째 다소 pH가 증가하는 것이 관찰되었다. 발효 초기 starter 첨가구의 pH가 감소한 이유는 starter로 사용된 유산균이 성장하면서 생성한 유산에 의해서이며 이 결과로 인하여 식중독 균을 비롯한 혐기성 내의 부패균의 성장이 억제되는 것으로 판단되었다. 또한 72시간째 육의 pH가 다소 증가하는 것은 단백질의 완충물질의 변화, 전해질 해리의 감소 및 암모니아 생성 때문인 것으로 Deymer 등(1979)에 의해 보고된 바 있다. 일반적으로 아질산염은 낮은 pH와 높은 조리 온도에서 분해, 소실이 더욱 촉진된다는 보고(Scopes, 1970; Greenberg, 1972; 오, 1986)들로 미루어 볼 때 starter 첨가에 의한 육의 pH 저하는 아질산염의 분해를 촉진시키고 육색을 고정시키는 데 긍정적으로 작용하는 것으로 판단되었다.

Table 4. Effect of mixed starter on the changes of pH during fermentation for 72 hrs at 32°C.

Incubation time(hrs)	No starter	starter I	starter II
0	6.63±0.10 <sup>a</sup>	6.60±0.21 <sup>a</sup>	6.61±0.09 <sup>a</sup>
12	6.80±0.16 <sup>b</sup>	6.14±0.34 <sup>a</sup>	6.22±0.21 <sup>a</sup>
18	7.01±0.30 <sup>c</sup>	6.14±0.17 <sup>a</sup>	5.78±0.22 <sup>b</sup>
24	6.72±0.08 <sup>b</sup>	5.01±0.05 <sup>a</sup>	5.13±0.08 <sup>a</sup>
36	6.51±0.10 <sup>b</sup>	4.92±0.18 <sup>a</sup>	4.80±0.43 <sup>a</sup>
48	6.64±0.15 <sup>b</sup>	4.77±0.11 <sup>a</sup>	4.85±0.15 <sup>a</sup>
60	6.71±0.05 <sup>b</sup>	4.66±0.10 <sup>a</sup>	4.75±0.15 <sup>a</sup>
72	6.47±0.06 <sup>b</sup>	4.78±0.06 <sup>a</sup>	4.84±0.09 <sup>a</sup>

all abbreviations are the same as Table 2.

\* : pH value ± standard deviation

<sup>a-c</sup> Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

### 3) 혼합 균주 starter 첨가에 의한 육 내의 잔존 아질산염 소거율

혼합 균주 starter 첨가에 의한 육 내의 잔존 아질산염의 소거율을 나타낸 결과는 table 5와 같다. starter를 첨가한 경우 아질산염의 소거가 발효 12시간째 부터 85% 이상의 아질산염 소거율을 나타내어 발효 72시간째에는 95% 이상의 아질산염 소거율을 나타내었다.

Nordin(1969)은 많은 유산균들이 pH를 저하시켜 nitrite의 nitrate로의 전환비를 증가시킬 뿐 아니라 nitrite를 감소시키는 enzyme을 가진다고 하였다. 또한 Fournaud 등(1964, 1966)은 유제품에서 분리한 유산균의 nitrite reductase enzyme system에 대하여 보고하기도 하였다. 따라서 유산균의 아질산염 소거능은 화학적 원인도 작용을 하지만 얼마간은 아질산염을 소거하는 enzyme에 의한다고 볼 수 있겠다. 반면 starter를 첨가하지 않은 경우에는 아질산염 소거율이 발효 초기부터 증가하기는 하였으나 발효 말기 70% 정도의 소거능만을 보여 완전한 아질산염의 소거가 이루어지지 않은 것으로 판단되었으며 전 발효 기간 동안 처리구와는 유의적인 차이는 나타내었다. 가내에서 제조한 발효 소시지내의 아질산염 함량은 저장 50일째 36ppm 이상 잔존하며 특히 햄의 경우 저장 35일째 67ppm 이상의 아질산염이 잔존한다는 연구결과(우 등, 1983)가 보고되어 육 내에 아질산염이 잔존할 경우 발암성 물질인 nitrosamine의 생성확률이 그 만큼 높다고 하겠다. 염지육 내에 잔존하는 아질산염은 nitrosamine의 생성과 밀접한 관계가 있는데 Sen 등(1984)에 따르면 nitrosamine의 생성량은 아질산염 농도의 곱에 비례한다고 보고하였으며 이러한 nitrosamine은 아질산염과 함께 ascorbate 또는 erythrobate를 함께 사용하는 것이 nitrosamine 생성량을 억제한다는 연구결과도 보고되고 있다(Sen 등, 1979).

Table 5. Effect of mixed starter on the changes of nitrite depletion rate during fermentation for 72 hrs at 32°C.

(%)

Incubation time(hrs)	No starter	starter I	starter II
0	0	0	0
12	23.46±0.17 <sup>a</sup>	85.60±1.57 <sup>b</sup>	86.62±0.77 <sup>b</sup>
18	35.22±1.74 <sup>a</sup>	87.79±1.08 <sup>b</sup>	86.86±0.94 <sup>b</sup>
24	49.53±1.16 <sup>a</sup>	92.74±0.99 <sup>c</sup>	90.87±1.72 <sup>b</sup>
36	60.06±0.85 <sup>a</sup>	92.10±0.61 <sup>b</sup>	94.62±0.60 <sup>c</sup>
48	68.05±0.60 <sup>a</sup>	96.18±0.55 <sup>c</sup>	94.72±1.00 <sup>b</sup>
60	70.19±0.54 <sup>a</sup>	96.86±0.62 <sup>b</sup>	97.42±1.57 <sup>c</sup>
72	70.64±1.02 <sup>a</sup>	97.00±0.66 <sup>b</sup>	98.54±0.77 <sup>c</sup>

all abbreviations are the same as Table 2.

\* : means±standard deviation

<sup>a-c</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

#### 4) 혼합 균주 starter를 첨가한 육색의 변화 측정

혼합 균주 starter 첨가에 의한 육색 변화를 측정된 결과는 다음과 같다(Table 6, 7). starter 첨가에 의한 L 값의 변화 결과를 보면 대조구와 starter 첨가구 모두 발효가 진행될수록 약간의 증가 경향을 나타내었고 대조구와 처리구간의 유의적인 차이는 없었다. 발효 72시간째 대조구의 L 값이 다소 낮은 경향을 나타내어 처리구와의 유의적인 차이가 관찰되었다. a 값 변화의 경우에는 실험구 모두 초기부터 a 값이 낮았으나 대조구의 경우 발효가 진행됨에 따라 발색이 되었고 starter를 첨가한 경우 발효 48시간째에 7.24와 7.48을 나타내어 대조구와 유사한 경향을 나타내었으나 발효 60시간째 이후 적색도가 다소 감소하였다. 대조구보다 starter 첨가구의 적색도가 전반적으로 낮은 이유는 starter가 육 내의 일부 아질산염을 소거하기 때문인 것으로 판단되나 어느 정도의 발색은 가능한 것으로 관찰되었다. 발효 중 적색도의 증가는 근육 내 pH 저하와 수분유리로 인해 육색의 농도가 진해지며 또 첨가한 NO<sub>2</sub>가 분해하여 최종 염지 육색의 고정에 영향을 받았기 때문이라는 보고(이, 1986)와 일치하는 경향을 나타내었다. 그러나 48시간 이후로는 그 값이 감소하여 발색이 둔화되었다. 이는 높은 온도에서 2일 이상 실험하였기 때문에 육이 변성하여 나타난 것으로 사료되었다.

**Table 6. Effect of mixed starter on the changes of value L(lightness) during fermentation for 72 hrs at 32°C.**

Incubation time(hrs)	No starter	starter I	starter II
0	35.00±1.06 <sup>*a</sup>	33.67±0.95 <sup>a</sup>	34.22±0.97 <sup>a</sup>
12	35.44±0.32 <sup>b</sup>	34.44±0.76 <sup>ab</sup>	33.77±1.11 <sup>a</sup>
18	35.01±0.41 <sup>a</sup>	35.05±0.24 <sup>a</sup>	35.15±1.37 <sup>a</sup>
24	35.06±0.85 <sup>a</sup>	36.88±0.88 <sup>b</sup>	35.62±0.46 <sup>ab</sup>
36	36.90±1.47 <sup>a</sup>	35.61±0.90 <sup>a</sup>	36.40±0.62 <sup>a</sup>
48	35.21±1.99 <sup>a</sup>	36.99±0.67 <sup>a</sup>	38.41±1.01 <sup>a</sup>
60	33.88±1.18 <sup>a</sup>	37.72±2.06 <sup>a</sup>	37.77±0.53 <sup>a</sup>
72	35.13±0.13 <sup>a</sup>	37.42±0.77 <sup>b</sup>	38.16±1.14 <sup>b</sup>

all abbreviations are the same as Table 2.

\* : L value ± standard deviation

<sup>a-c</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

**Table 7. Effect of mixed starter on the changes of value a(redness) during fermentation for 72 hrs at 32°C.**

Incubation time(hrs)	No starter	starter I	starter II
0	6.62±0.09 <sup>*a</sup>	6.54±0.05 <sup>b</sup>	6.64±0.02 <sup>ab</sup>
12	6.81±0.14 <sup>a</sup>	6.90±0.10 <sup>a</sup>	6.77±0.04 <sup>a</sup>
18	7.13±0.12 <sup>a</sup>	7.15±0.09 <sup>a</sup>	6.88±0.13 <sup>a</sup>
24	7.14±0.11 <sup>a</sup>	7.29±0.13 <sup>a</sup>	7.54±0.13 <sup>ab</sup>
36	7.24±0.11 <sup>a</sup>	7.33±0.03 <sup>a</sup>	7.51±0.02 <sup>a</sup>
48	7.62±0.24 <sup>c</sup>	7.24±0.08 <sup>a</sup>	7.48±0.12 <sup>ab</sup>
60	7.59±0.08 <sup>b</sup>	7.17±0.12 <sup>a</sup>	7.26±0.15 <sup>a</sup>
72	7.38±0.05 <sup>b</sup>	7.17±0.17 <sup>a</sup>	7.28±0.11 <sup>ab</sup>

all abbreviations are the same as Table 2.

\* : a value ± standard deviation

<sup>a-c</sup>Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

나. 혼합 균주 starter의 첨가시기에 따른 육의 변화

혼합 균주 starter의 첨가시기를 결정하기 위하여 염지 과정 없이 염지제와 starter를 같이 첨가한 경우와 4℃에서 2일간 염지 공정을 거친 후 혼합 starter를 접종하여 32℃에서 72시간 발효시키면서 잔존 아질산염, 미생물의 변화, pH, 육색의 변화를 관찰하였다.

1) Starter 첨가시기에 따른 육의 미생물학적 변화

Starter 첨가시기에 따른 육의 유산균수와 대장균군의 변화를 나타낸 결과는 다음과 같다(Table 8, 9). Table 8에서 보는 바와 같이 유산균수의 경우 염지 시작과 동시에 starter를 접종한 경우 발효 초기  $10^6$  CFU/ml를 나타내었으나 염지 과정 후 starter를 접종한 경우에는  $10^7$  CFU/ml의 유산균수를 나타내었다. 발효가 진행될수록 유산균수는 증가하여  $10^8$  CFU/ml를 나타내었고 유의차는 크지 않은 것으로 판단되었다. 대장균군수의 경우(Table 9)에는 starter 첨가로 인하여 대장균군수의 증가가 크지 않았으나 발효 초기 대장균군수는 염지 과정을 거친 후 starter를 접종한 육의 경우  $10^2$  CFU/ml로 나타나 염지 시작과 동시에 starter를 접종한 경우보다  $10^1$  CFU/ml보다 높게 나타났다. 이는 염지 과정을 거치면서 대장균군수가 증가하여 나타난 결과로 판단되었다.

Table 8. Changes of lactic acid bacteria in meat according to addition time of starter during fermentation for 72 hrs at 32℃.

(log No CFU/ml)

Fermentation time(hrs)	Starter I		Starter II	
	A	B	A	B
0	6.78±0.26 <sup>a</sup>	7.32±0.24 <sup>b</sup>	6.95±0.21 <sup>a</sup>	7.22±0.12 <sup>b</sup>
24	8.54±0.14 <sup>b</sup>	8.31±0.19 <sup>a</sup>	8.19±0.08 <sup>b</sup>	8.02±0.06 <sup>a</sup>
48	8.83±0.09 <sup>b</sup>	8.24±0.09 <sup>a</sup>	8.45±0.20 <sup>a</sup>	8.47±0.13 <sup>a</sup>
72	8.26±0.08 <sup>b</sup>	8.50±0.06 <sup>a</sup>	8.37±0.03 <sup>a</sup>	8.60±0.09 <sup>a</sup>

Starter I : *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3

Starter II : *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4

A : Addition of starter without curing

B : Addition of starter after pre-curing for 2 days at 4℃

\*Means ± standard deviation

<sup>a,b</sup> Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

**Table 9. Changes of coliform bacteria in meat according to addition time during fermentation for 72 hrs at 32°C.**

Fermentation time(hrs)	Starter I		Starter II	
	A	B	A	B
0	1.97±0.09 <sup>a</sup>	2.18±0.09 <sup>b</sup>	1.84±0.21 <sup>a</sup>	2.51±0.16 <sup>b</sup>
24	2.52±0.17 <sup>b</sup>	2.36±0.09 <sup>a</sup>	2.80±0.08 <sup>b</sup>	2.30±0.15 <sup>a</sup>
48	2.97±0.12 <sup>b</sup>	2.44±0.16 <sup>a</sup>	3.07±0.20 <sup>b</sup>	2.87±0.07 <sup>a</sup>
72	2.95±0.32 <sup>b</sup>	2.85±0.14 <sup>a</sup>	3.06±0.03 <sup>b</sup>	3.06±0.17 <sup>a</sup>

all abbreviations are the same as Table 8.

\*Means ± standard deviation

<sup>a,b</sup> Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

2) Starter 첨가시기에 따른 육의 pH 변화

Starter 첨가시기에 따른 육의 pH 변화를 나타낸 결과는 Table 10와 같다. 실험구 모두 발효 초기 pH는 6.6 정도로 나타났으며 발효가 진행될수록 pH는 5 이하로 감소되었다. 그러나 발효 말기 염지 시작과 동시에 starter를 첨가한 경우가 염지 과정을 거친 후 starter를 첨가한 경우보다 pH가 유의적으로 낮게 나타나 염지와 동시에 starter를 첨가하여 sausage를 제조한다면 발효 초기에 유산균의 성장으로 인한 유산의 생성으로 아질산염 분해와 육색 고정, 오염 미생물의 성장억제 등에 유리한 육 내의 조건을 조성할 것으로 판단되었다.

**Table 10. Changes of pH in meat according to addition time of starter during fermentation for 72 hrs at 32°C.**

Fermentation time(hrs)	Starter I		Starter II	
	A	B	A	B
0	6.65±0.13 <sup>b</sup>	6.43±0.05 <sup>a</sup>	6.61±0.09 <sup>b</sup>	6.49±0.16 <sup>a</sup>
24	4.91±0.09 <sup>a</sup>	5.20±0.12 <sup>b</sup>	5.05±0.08 <sup>a</sup>	5.47±0.15 <sup>b</sup>
48	4.73±0.15 <sup>a</sup>	4.71±0.05 <sup>a</sup>	4.81±0.15 <sup>a</sup>	4.81±0.07 <sup>a</sup>
72	4.65±0.06 <sup>a</sup>	4.83±0.09 <sup>b</sup>	4.69±0.09 <sup>a</sup>	4.79±0.17 <sup>b</sup>

all abbreviations are the same as Table 8.

\*Means ± standard deviation

<sup>a,b</sup> Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

### 3) Starter 첨가시기에 따른 잔존 아질산염 양의 변화

Starter 첨가시기에 따른 잔존 아질산염의 변화 결과는 Table 11에 나타난 바와 같다. 발효 24시간째 starter를 첨가함으로써 아질산염은 90%이상 소거되었으며 발효 72시간째에는 실험구 모두 잔존 아질산염의 양이 7 ppm이하를 나타내었다. 48시간의 염지 과정 후 아질산염 소거율은 85%이상을 나타내어 육내의 잔존 아질산염이 염지시 발색을 위하여 소거된 것으로 관찰되었으며 염지 후 starter를 접종하여 24시간 발효 후의 아질산염 소거율은 94%이상을 나타내었다. starter와 염지제를 함께 첨가한 경우 발효 24시간째 90%이상의 아질산염 소거율을 나타내었으며 발효가 진행될수록 증가하였다. 발효 72시간째 starter와 염지제를 함께 첨가한 실험구와 2일간 염지한 후 starter를 첨가한 실험구의 아질산염 소거율은 97%이상으로 거의 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 염지 과정 없이 starter를 바로 첨가하여도 발색은 되면서 나머지 잔존 아질산염은 효과적으로 소거할 수 있을 것으로 판단되었다. Eakes 등(1975)은 발효함에 1.5% NO<sub>3</sub>를 건염시켜 숙성 100일 동안 잔존질산염이 100 ppm이하로 줄어들었다고 하였으며 또 Salem 등(1983)은 소시지에 NaNO<sub>3</sub>를 300 ppm 넣고 4℃에 30일간 저장하였는데 이때 125 ppm이하의 질산염이 잔존하였다는 유사한 보고를 하였다.

**Table 11. Changes of nitrite depletion rate in meat according to addition time of starter during fermentation for 72 hrs at 32℃.**

(%)

Fermentation time(hrs)	Starter I		Starter II	
	A	B	A	B
0	0	87.14±1.21	0	88.00±1.19
24	92.74±1.07 <sup>a</sup>	88.48±1.31 <sup>b</sup>	94.72±1.42 <sup>a</sup>	94.33±1.65 <sup>a</sup>
48	97.18±0.55 <sup>a</sup>	95.81±1.12 <sup>b</sup>	94.46±1.98 <sup>b</sup>	96.85±1.43 <sup>a</sup>
72	97.00±1.11 <sup>a</sup>	96.88±0.98 <sup>a</sup>	98.54±1.55 <sup>a</sup>	97.98±1.24 <sup>a</sup>

all abbreviations are the same as Table 8.

<sup>\*</sup>Means ± standard deviation

<sup>a,b</sup> Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

4) Starter 첨가시기에 따른 육색의 변화

Starter 첨가시기에 따른 육색의 변화를 나타낸 결과는 Table 12, 13과 같다. Table 11에 나타난 L 값의 변화를 보면 염지 과정 후 starter를 첨가한 경우 L 값이 염지 시작과 동시에 starter를 첨가한 경우보다 높은 값을 나타내었으며 a 값의 경우 발효 초기 염지와 동시에 starter를 접종한 경우 6.61을 나타내었고 염지 후 starter를 접종한 경우에는 7.12를 나타내어 염지에 의해 발색이 된 것으로 판단되었다. 그러나 발효가 진행됨에 따라 starter 첨가시기에 상관없이 적색도가 증가하였다. L 값의 경우에는 다소 차이를 보였으나 발색도는 starter 첨가시기에 따른 차이는 없는 것으로 판단되어 정 (1984)의 연구 결과와 동일하게 염지를 필요로 하는 육제품 제조시 염지 시작과 동시에 본 실험 분리 유산균을 접종한다면 잔존 아질산염은 적절히 감소시키면서 발색은 그대로 유지시킬 것으로 기대된다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 향후 발효 소시지 제조시 김치에서 분리한 유산균 starter를 염지제 첨가시 동시에 접종하여 제조하여도 발효 소시지의 품질에는 무방할 것으로 판단되었다.

**Table 12. Changes of vale L in meat according to addition time of starter during fermentation for 72 hrs at 32°C.**

Fermentation time(hrs)	Starter I		Starter II	
	A	B	A	B
0	33.67±0.95 <sup>a</sup>	39.82±0.34 <sup>b</sup>	34.22±0.97 <sup>a</sup>	40.77±0.49 <sup>b</sup>
24	41.88±0.88 <sup>a</sup>	42.89±0.81 <sup>b</sup>	42.62±0.46 <sup>a</sup>	43.14±0.58 <sup>b</sup>
48	42.02±0.67 <sup>a</sup>	43.51±1.35 <sup>b</sup>	43.01±1.01 <sup>a</sup>	45.18±0.68 <sup>b</sup>
72	42.42±0.77 <sup>a</sup>	43.97±1.49 <sup>b</sup>	43.16±1.14 <sup>a</sup>	45.52±0.52 <sup>b</sup>

all abbreviations are the same as Table 8.

<sup>a</sup>means ± standard deviation

<sup>a,b</sup> Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

**Table 13. Changes of vale a in meat according to addition time of starter during fermentation for 72 hrs at 32°C.**

Fermentation time(hrs)	Starter I		Starter II	
	A	B	A	B
0	6.61±0.05 <sup>a</sup>	7.12±0.06 <sup>a</sup>	6.73±0.02 <sup>a</sup>	6.89±0.05 <sup>b</sup>
24	7.29±0.13 <sup>a</sup>	7.61±0.17 <sup>b</sup>	7.54±0.13 <sup>b</sup>	7.99±0.14 <sup>b</sup>
48	7.24±0.08 <sup>a</sup>	7.24±0.09 <sup>a</sup>	7.48±0.12 <sup>b</sup>	7.27±0.08 <sup>a</sup>
72	6.00±0.17 <sup>a</sup>	6.31±0.04 <sup>b</sup>	6.03±0.11 <sup>a</sup>	6.05±0.14 <sup>a</sup>

all abbreviations are the same as Table 8.

<sup>a</sup>means ± standard deviation

<sup>a,b</sup> Means within each column with no common superscripts are significantly different(P<0.05)

#### 4. 요약

발효소시지 제조를 위해 혼합 유산균 starter의 첨가에 의한 염지 중 육의 변화를 조사하고 starter의 뛰어난 아질산염 소거능을 기초로 하여 아질산염의 고유기능인 육색 발현은 가능하게 하면서 나머지 발암성 물질의 전구체가 되는 잔존 아질산염은 분해시킬 수 있는 방안을 모색코자 starter의 첨가시기를 달리 하여 염지 과정 중의 유산균에 의한 아질산염 잔존량의 변화와 육색, 미생물학적 변화 등을 관찰하였다.

##### 1. Starter 첨가에 의한 육의 변화를 관찰하였다.

- starter를 첨가한 경우 발효 말기까지  $10^8$  CFU/ml까지 유산균이 성장하였다. 대장균군수의 변화를 보면 발효가 진행됨에 따라 starter 첨가구는 대장균군수가  $10^2$  CFU/ml 전후로 유지되고 발효 72시간째에는 그 수가 감소되는 경향을 나타내었으나 무첨가구의 경우에는 대장균군수는 점차 증가하는 것으로 나타났다.
- pH의 변화의 경우 초기 pH는 모든 실험구에서 유사하게 나타났으나 발효 시간이 경과할 수록 starter 무첨가구의 pH는 6정도를 유지한 반면 starter 첨가구에서 발효 36시간이 지나면서부터 pH가 5이하로 감소하였다.
- 잔존 아질산염의 소거율의 결과는 starter 처리구의 경우 발효 12시간째부터 시작되어 72시간째에는 95% 이상의 아질산염 소거율을 나타낸 반면 starter 무첨가구에서는 아질산염 소거율이 배양초기부터 증가하기는 하였으나 배양 말기 70% 정도의 소거능만을 보였다.
- 육색의 변화는 발효 시간이 지날수록 L 값과 a 값이 증가하였다.

##### 2. Starter의 첨가시기에 따른 육의 변화를 관찰하였다.

- 유산균수의 변화는 starter 첨가시기에 상관없이 증가하였으며 대장균군수는 염지 과정을 거친 후 starter를 접종한 경우 육의 대장균군수가 다소 높았으나 발효가 진행됨에 따라 대장균군의 성장은 억제되었다.
- pH의 변화를 보면 starter 첨가시기에 관계없이 발효 말기 pH가 5이하로 감소되는 경향을 나타내었다.
- 잔존 아질산염 소거율은 starter 첨가시기와 상관없이 발효 말기 97% 이상의 소거율을 나타내어 잔존 아질산염의 양이 10ppm 이하로 나타났다.
- 육색의 경우 L 값의 변화를 보면 발효 말기 starter 첨가시기에 상관없이 증가하는 경향을 나타내었으며 a 값의 경우 발효 초기 염지 후 starter를 첨가한 경우 적색도가 다소 높았으나 발효가 진행됨에 따라 염지와 동시에 starter를 첨가한 경우와 유사한 경향을 나타내었다.

## 5. 문헌

1. Collins, E. B., 1961. Domination among strains of lactic streptococci with attention to antibiotic production, *Appl. Microbiol.*, 9, 200.
2. Crosby, N. T. and R. Sawyer. 1976. N-nitrosamines : A review of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. "advances in food research"(C. O Chichstered.) J. Academic Pres., 21, 1.
3. Deymer, D. I. and P. vandekerckhove. 1979. compounds determining pH in dry sausage. *Meat Sci.*, 3, 161.
4. Fournaud, J., P. raibaud, and G. Mocquot. 1964. Etude de la reduction des nitrites par une souche de *Lactobacillus lactis*. Mise en evidence de ce metabolisme chez d'autres bacteries due genre *Lactobacillus*. *Ann. Inst. Pasteur de Lille*. 15, 213.
5. Fournaud, J., M. G. Mocquot. 1966. Etude de la reduction de l'ion nitrite par certains lactobacilles. *C. R. Acad. Sc. Paris* 262, 230.
6. Gilliland, S. E. and M. L. Speck, 1969. Biological response of lactic streptococci and lactobacilli to catalase. *Appl. Micorbiol.*, 17, 797.
7. Greenberg, R. A. 1972. Nitrite in control of *Clostridium botulinum*. *Proc. Meat ind. Res. Conf.*, 25.
8. Heath, D. F., 1962. The decomposition and toxicity of dialkylnitrosamine in rats. *Biochem. J.* 85, 72.
9. Ito, Y., M. Yodoshi, J. I. Tanaka and M. Iwaida, 1979. Comparison of two methods and improvements for colorimetric determination of nitrite in cod roe. *J. Food Prot.* 42, 715.
10. Kromlich, W. E., A. M. Prason and F. W. Tanber. 1983. "Processed meat". The AVI Publishing Company. Inc. Westport. Connecticut. 40.
11. Nordin, H. R. 1969. The depletion of added sodium nitrite in ham. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 2, 79.
12. Poter, F. S., 1975. The toxicology of nitrate, nitrite and N-Nitroso-compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1761.
13. Salem, F. A., H. K. EL-Manawaty, A. A. EL-Dashlouty, A. A. Askar, and A. I. Khazbak. 1983. Effect of nitrate level on the chemical and microbiological properties of sausage and microbiological properties of sausage during its storage. *Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers*. I, C/1.30(29), 366.

14. Sen, N. P., J. R. Lyengar, B. A. Donaldson and T. Panalaks, 1984. Effect of sodium nitrite concentration on the formation of nitrosopyrrolidine and dimethylnitrosamines in fried bacon. *J. Agric. Food Chem.*, 22, 540.
15. Sen, N. P., S. Seaman and W. F. Miles. 1979. Volatile nitrosamines in various cured meat products : Effect of cooking and recent trends. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1354.
16. Scopes, R. K. 1970. Characterization and study of sarcoplasmic proteins. In "The physiology and biochemistry of muscle as a food. E. J. Brisky, R. G. Cassens and B. B. Marsh, ed. Wisconsin Press, Madison. 2, 471.
17. Zaika, L. L., T. E. Zell, J. L. Smith, S. A. Palumbo, and J. C. Kissinger. 1976. The rate of nitrite and nitrate in lebanon-bologna, a fermented sausage. *J. Food Sci.* 41, 1457.
18. 박나영, 1999. 김치에서 분리한 유산균의 생리적 특성과 그 이용에 관한 연구. 대구가톨릭대학교 석사학위논문.
19. 박형기, 오동준. 1982. 식육가공의 염지제에 관한 연구(I). 전북대농대논문집, 8, 147.
20. 오동환, 1986. 식육가공의 염지육 특성에 관한 연구. 전북대학교 박사학위논문.
21. 우순자, 맹영선. 1983. 돈육가공저장식품의 nitrite 잔존량과 지방산화 - 가내 제조한 dry sausage와 dry ham의 지방산패 및 저장성과 dry ham의 기호도에 관하여 -. *한국식품과학회지*, 15, 1.
22. 이성기, 1986. 유산균에 의한 발효육의 숙성에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문.
23. 정영건, 1984. 유산균 접종에 의한 염지 ham의 이화학 및 조직학적 특성에 관한 연구. 경상대학교 박사학위논문.

# 제 4 장

여 백

## 제 4 장 (3차년도)

### 제 1 절 오미자 추출물을 이용한 기능성 소시지 개발 Development of functional sausage using extracts from *Schizandra chinensis*

#### Abstract

These studies were carried out to develop the functional meat products using extracts from *Schizandra chinensis*. The changes of pH were tended to be a little decreased from pH 6.4 to pH 6.0. At the same time, the moisture content of functional sausage showed range from 62 to 60%. The water holding capacity of functional sausage gradually were tended to be a little more decreased during storage at 30 °C, compared to storage at 10 °C. The changes of salt content also have a same tendency, except the treatments of *Schizandra chinensis* and ascorbic acid. The treatments using natural resources revealed a low TBARS value. But, they were not significantly different( $P>0.05$ ). The nitrite scavenging ability of extracts from *Schizandra chinensis* were the most highest, compared to other extracts. As storage time goes by, the nitrite contents of sausage product gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. The lightness of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. But they were not significantly different( $P>0.05$ ). The redness of sausage color also had very similar tendency to the lightness of sausage color in spite of redness of sausage color was a little increased during storage until 10 days. Especially, the sausage with extracts from *Schizandra chinensis* and sausage with ascorbic acid had a higher red color than those of other treatments. But, there were not significantly different( $P>0.05$ ), depending on each treatments. Sensory tests suggested that the changes of sausage color, flavor, texture and taste were tended to be decreased gradually, but there was not

significantly different during storage at 10 °C and 30 °C ( $P>0.05$ ). However, the sensory scores of sausage color gradually were a little more decreased during storage at 30 °C than those of stored at 10 °C. In conclusion, these research suggested that *Schizandra chinensis* was the most effective plant extracts on the basis of the functional properties(antioxidants and nitrite scavenging ability). But, it is desirable to add under 0.5% extracts powder of *Schizandra chinensis* on the basis of texture.

## 1. 서 론

오늘날 현대인에게 육제품을 저장하는데 미치는 화학적 식품첨가물의 피해는 날이 갈수록 심각해짐을 절실히 느끼게 된다. 육제품은 저장기간에 따라 변질, 변패되고 미생물이 발육하기 때문에 이를 방지하기 위하여 식품보존제를 첨가하여 변질을 지연시키고 있으며, 통상의 경우 식품보존제로서 화학약품인 보존제(potassium sorbate)를 사용함으로써 인체에 대한 유해성 야기가 논란이 되고 있다. 또한, 식품의 가공·저장 및 조리중 식품성분들의 상호반응으로 식품의 저장성과 기호성 향상을 목적으로 첨가되는 식품첨가물과 식품성분과의 반응에 의하여 돌연변이 유발작용이나 발암작용을 갖는 유전독성물질의 생성이 식품의 안전성 측면에서 중요한 문제로 대두되고 있다(1). 그 대표적인 예로 육제품이나 수산가공품 등에 발색제로 첨가되는 질산염이나 아질산염은 육색의 발색 및 안정화(2) 뿐만 아니라, *Clostridium botulinum*에 대한 정균작용(3), 육제품의 풍미 향상(4), 산패취 발생감소(5~8) 등을 개선하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 식품 및 생체내의 잔존 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내며 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중에 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키며(9), 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 함유되어 있는 2급 및 3급 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성하는 것으로 알려져 있다(10, 11). 이러한, nitrite는 높은 온도, 산성 pH 또는 ascorbate 존재하에 염지액(12)이나 염지육(13, 14)에서 감소한다는 보고를 토대로, 많은 연구가 진행되어 왔으나, 실제적으로 육제품에 적용하여 nitrite 소거작용을 검토한 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 본 실험은 소시지

제조사 오미자 추출물을 첨가하여 니트로사민 생성의 직접적인 영향자인 아질산염에 대한 분해효과와 potassium sorbate와의 저장성을 검토함으로써 기능성 소시지 개발을 시도하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 오미자 추출물 제조

20 g의 수세 건조한 오미자를 증류수 100 ml를 가하여 85 ℃에서 3시간 동안 2회 반복 추출하고, Whatman No. 1로 여과한 후 열수추출물을 동결건조기 (FD5510SPT)를 사용하여 Temp. -60℃, Vac. 10 mmTorr 조건하에서 동결건조 하여 사용하였다.

### 나. 소시지 배합비율

소시지의 배합비율은 Table 1과 같다.

**Table 1. Sausage formulation**

Ingredients	Absolute value(g)	Contents(%)
Pork	3000	} 100
Fat	1000	
Ice	1000	
NaCl	80	1.6
MSG	15	0.3
Sugar	15	0.3
Sodium phosphate	15	0.3
Nitrite	0.75	0.015
L-ascorbic acid	2.5	0.05
Casein	50	1.0
White pepper	15	0.3
Allspice	5	0.1
Nutmeg	2.5	0.05
Sage	2.5	0.05
ISP	50	1.0
Starch	50	1.0
<i>Schizandra chinensis</i>	25	0.5
ascorbic acid 0.5 %	25	0.5
ascorbic acid 1.0 %	50	1.0
potassium sorbate 0.5 %	25	0.5
potassium sorbate 1.0 %	50	1.0

#### 다. Sausage 제조 공정

Sausage의 제조공정은 Fig. 1과 같다.

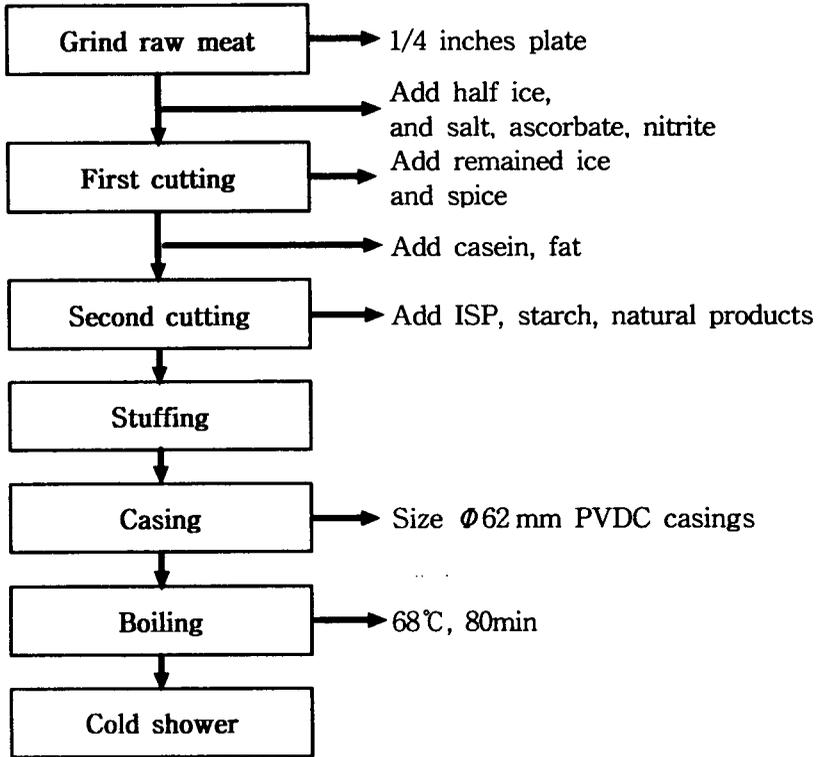


Fig. 1. Preparation process of sausage.

#### 라. 포장재 및 시료

시험에 사용된 소시지 포장재는 polyvinylidene chloride(PVDC) coating( $3.7\mu\text{m}$ )을 사용하였으며, 포장재의 크기는  $\phi 62\text{mm}$ 로 사용하여 충전하고, 소시지의 크기는  $100\times 62\text{mm}$ (가로×세로)로 조제하여 각각  $10^\circ\text{C}$ 와  $30^\circ\text{C}$ 에 40일간 보관하면서 시료로 사용하였다.

#### 마. pH 측정

pH는 일반적인 방법에 따라 시료 5g을 3배의 증류수를 가해 homogenate한 후 pH meter(Model DP-135M)로 측정하였다.

#### 바. 수분 측정

수분측정은 육분쇄기로 분쇄한 소시지 약 1g을 취하여 수분측정기(Shimadzu, HA-300)로 측정하였다.

#### 사. 보수력 측정

보수력 측정은 이와 성(15)의 압착법(press method)으로 측정하였다. 마쇄한 소시지 0.5g을 whatman No. 1에 올려놓고 압착기로 35~50 Kg/cm<sup>2</sup>의 압력으로 2분간 압착한 후 고기조직이 묻어있는 부위의 면적과 젖어있는 부위의 면적을 planimeter로 측정하였다.

$$\text{보수력 지수(\%)} = \frac{\text{고기조직이 묻어있는 면적}}{\text{젖어있는 부위면적}} \times 100$$

#### 아. 염도 측정

염도측정은 시료에 3배의 증류수를 가하여 18,000 rpm에서 2분간 homogenate 한 후 염도계(Takemura TM-30D, Japan)로 측정하였다.

#### 자. Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(16)을 약간 수정하여 측정하였다. 1 ml 반응 혼합물에 50  $\mu$ l dibutylhydroxytoluene (BHT) 7.2 %를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000 $\times$ g의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도(HITACHI UV-2001) 531 nm에서 측정하였고, 공시료는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해서  $\mu$ g malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

#### 차. 아질산염 함량측정

아질산염 함량은 Kato 등(17)의 방법을 약간 수정하여 각 시료를 증류수로 5 배희석 한후 1 ml를 취하여 2% 초산용액 2 ml와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml를 가한 후 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 함량은 표준곡선에 대입하여 ppm 단위로 나타내었다.

#### 카. 색차 측정

소시지의 색은 시료를 직경 3 cm, 높이 2.4 cm 의 크기로 자른 후 1개 시료당 9개를 coring 하여 30분간 공기 중에 노출시켜 발색시킨 후 polyethylene 필름으로 한 겹 포장하여 색차계(Color difference meter, Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 Hunter 값(L=명도, a=적색도)으로 표시하였다. 이때 사용된 표준색판은 기기의 manual 에 따라  $Y=94.95$ ,  $a=0.3132$ ,  $b=0.3203$  으로 하였으며, 6회 반복하여 평균값을 구하였다.

#### 타. 관능검사

관능검사는 소시지의 저장기간(0, 1, 5, 10, 20, 30, 40일) 중에 일어나는 변화를 알아보기 위하여 소시지를 10℃, 30℃에서 저장하면서 색, 향, 조직감 그리고 맛을 평가하였다. 선정된 관능요원은 충분한 훈련을 거쳐 소시지의 품질차이를 식별할 수 있는 능력이 갖추었다고 여겨지는 8명으로 구성되었다. 평가방법은 5점법으로 기호도 검사법(18)으로 실시하였으며, 맛, 조직감 그리고 색은 아주 나쁘다 : 1점, 나쁘다 : 2점, 보통이다 : 3점, 좋다 : 4점, 아주 좋다 : 5점으로 각 시료를 평가하였다.

#### 파. 통계처리

통계처리는 각각의 시료에 대해 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 분산분석을 한 후  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple test 에 따라 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 저장기간별 pH의 변화

소시지 제조 후 각 온도별(10℃, 30℃) 저장기간 40 일 동안 pH의 변화를 측정 한 결과 Table 2와 같이 온도에 관계없이 저장기간이 경과함에 따라 pH는 감소하였다. 10℃ 저장의 경우 오미자와 ascorbic acid 첨가구는 저장초기 pH 5.7~5.2로 낮은 pH를 나타내었으며, ascorbic acid 1.0% 첨가구가 pH 5.2로 가장 낮은 값을 나타내었다. 또한, 30℃ 저장의 경우도 같은 경향이었으며, 저장온

도가 높을수록 pH는 낮게 나타났으며, 본 실험의 저장 중 pH의 감소는 저장기간이 경과함에 따라 미생물의 성장에 따른 유산균의 작용에 의하여 생성된 젖산으로 인하여 pH가 감소(19)한다는 보고와 일치하는 것이다.

**Table 2. Changes of sausage pH depending on addition of *Schizandra chinensis* extract during storage at 10°C and 30°C**

Treat.	Storage Temp. (°C)	Storage time(days)					
		0	5	10	20	30	40
CON	10	6.34±0.023	6.33±0.031	6.29±0.062	6.29±0.053	6.27±0.032	6.12±0.041
	30	6.34±0.023	6.21±0.047	5.98±0.025	5.88±0.048	5.79±0.062	5.74±0.033
SC	10	5.66±0.034	5.63±0.062	5.51±0.089	5.49±0.036	5.29±0.072	5.24±0.054
	30	5.66±0.034	5.58±0.025	5.43±0.052	5.30±0.033	5.28±0.018	5.27±0.062
A 0.5%	10	5.71±0.072	5.71±0.063	5.70±0.092	5.67±0.021	5.66±0.042	5.56±0.073
	30	5.71±0.072	5.63±0.011	5.61±0.046	5.59±0.038	5.56±0.055	5.51±0.037
A 1.0%	10	5.25±0.021	5.18±0.055	5.15±0.043	5.08±0.088	5.07±0.010	5.06±0.066
	30	5.25±0.021	4.92±0.087	4.87±0.076	4.77±0.102	4.75±0.011	4.65±0.062
S 0.5%	10	6.31±0.033	6.31±0.068	6.24±0.056	6.25±0.017	6.16±0.037	6.07±0.033
	30	6.31±0.033	6.21±0.077	6.20±0.062	6.18±0.036	6.09±0.015	6.07±0.019
S 1.0%	10	6.34±0.043	6.33±0.014	6.27±0.035	6.27±0.019	6.26±0.017	6.12±0.036
	30	6.34±0.043	6.34±0.011	6.30±0.014	6.26±0.011	6.22±0.041	6.14±0.057

CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 나. 수분의 변화

저장기간별 온도에 따른 소시지의 수분함량의 변화는 Table 3과 같이 10°C와 30°C 저장 모두 저장기간이 경과함에 따라 감소하는 경향이었으며, 10°C 저장보다는 30°C 저장이 저장 10일째부터 다소 수분함량의 감소가 증가하는 경향이였다. 10°C와 30°C 저장시 저장 0일째 62~60% 범위의 수분함량을 나타내었으나, 오미자와 ascorbic acid 첨가구는 60~53%의 범위를 나타내었다. 이러한 결과는 Table 2의 결과와 같이 오미자와 ascorbic acid 첨가구의 낮은 pH로 소시지의 보수력 저하가 원인인 것으로 사료된다.

Table 3. Changes of sausage moisture content depending on *Schizandra chinensis* extract addition during storage at 10°C and 30°C

Treat.	Storage Temp. (°C)	Storage time(days)					
		0	5	10	20	30	40
CON	10	60.33±0.175	60.21±0.162	60.16±0.138	60.08±0.116	60.00±0.146	59.93±0.033
	30	60.33±0.175	60.00±0.142	59.75±0.176	59.58±0.127	58.26±0.164	58.17±0.154
SC	10	59.67±0.094	59.25±0.163	58.93±0.068	58.39±0.146	58.36±0.208	58.22±0.126
	30	59.67±0.094	58.41±0.133	58.31±0.234	56.37±0.162	56.13±0.027	55.25±0.132
A 0.5%	10	60.13±0.211	59.73±0.206	58.86±0.167	58.77±0.191	58.66±0.161	58.63±0.173
	30	60.13±0.211	58.69±0.132	58.53±0.143	58.42±0.094	57.83±0.131	57.61±0.116
A 1.0%	10	58.34±0.141	57.67±0.067	56.93±0.111	55.62±0.223	55.37±0.167	54.51±0.209
	30	58.34±0.141	56.11±0.108	55.83±0.196	54.61±0.153	53.93±0.174	53.33±0.186
S 0.5%	10	61.89±0.166	61.65±0.184	60.83±0.188	60.78±0.169	60.66±0.103	60.37±0.192
	30	61.89±0.166	61.08±0.061	60.23±0.163	60.12±0.139	59.17±0.122	58.66±0.025
S 1.0%	10	62.21±0.201	62.10±0.169	61.93±0.217	61.76±0.237	61.43±0.138	60.89±0.134
	30	62.21±0.201	61.63±0.173	61.54±0.218	61.17±0.106	60.66±0.149	59.29±0.176

CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 다. 보수력의 변화

오미자 첨가 소시지의 보수력의 변화는 Table 4와 같이 저장기간의 경과함에 따라 30 °C 저장에 비하여 10 °C 저장이 서서히 감소하였으며, 대부분 59~43%의 좁은 폭으로 감소하였다. 그러나, 오미자와 ascorbic acid 첨가구는 52~33%로 다소 큰 폭으로 감소하는 현상을 나타내었다. 이는 오미자와 ascorbic acid 첨가구의 pH가 등전점인 5.0~5.1에 가까워 ⊕전하를 가진 활성기의 수와 ⊖전하를 가진 활성기의 수가 동일하게 되어 서로간에 잡아당기게 됨으로, net charge는 0에 가깝게 된다. 그러므로, 물분자와 결합할 수 있는 단백질 분자중의 활성기 수가 대단히 적어져서 보수력이 저하된 것으로 사료된다.

**Table 4. Changes in water holding capacity of sausage depending on *Schizandra chinensis* extract addition during storage at 10°C and 30°C (%)**

Treat.	Storage Temp. (°C)	Storage time(days)					
		0	5	10	20	30	40
CON	10	53.51±0.236	52.33±0.103	49.30±0.282	48.79±0.107	45.80±0.167	45.17±0.103
	30	53.51±0.236	50.92±0.115	48.50±0.193	45.83±0.059	44.70±0.354	43.10±0.158
SC	10	50.13±0.288	49.10±0.269	45.80±0.261	43.00±0.184	42.76±0.398	39.43±0.306
	30	50.13±0.288	48.57±0.107	38.53±0.124	37.70±0.134	36.86±0.146	36.00±0.119
A 0.5%	10	52.01±0.144	51.47±0.183	50.00±0.291	46.70±0.157	46.47±0.237	43.47±0.395
	30	52.01±0.144	47.67±0.112	47.27±0.374	42.47±0.169	37.20±0.161	36.50±0.135
A 1.0%	10	49.31±0.139	48.57±0.184	39.24±0.118	39.00±0.148	38.57±0.329	35.67±0.247
	30	49.31±0.139	37.73±0.129	36.70±0.265	34.77±0.128	33.77±0.133	32.90±0.171
S 0.5%	10	59.33±0.112	59.10±0.100	57.12±0.256	56.57±0.149	55.20±0.144	54.33±0.228
	30	59.33±0.112	58.10±0.104	56.05±0.383	53.20±0.214	46.60±0.207	45.67±0.151
S 1.0%	10	59.63±0.298	59.30±0.284	57.16±0.345	56.62±0.242	55.70±0.136	54.55±0.163
	30	59.63±0.298	58.80±0.279	57.37±0.339	54.80±0.324	54.05±0.122	53.15±0.157

CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

**라. 염도의 변화**

온도별 저장기간에 따른 염도의 변화의 범위는 오미자와 ascorbic acid 첨가구를 제외하고는 유사한 경향이었으며, 10 °C 와 30 °C 저장 모두 저장초기 2.3~1.8 % 에서 저장기간이 경과함에 따라 서서히 감소하여 저장 40 일째 2.0~1.7 % 를 나타내었다(Table 5). 저장기간의 경과에 따라 염도가 증가한다는 Park 등(20)의 보고와는 상반되나, 이는 포장재(PVDC)의 차이에 의한 것이라 사료된다.

**Table 5. Changes in NaCl content of sausage depending on *Schizandra chinensis* extract addition during storage at 10°C and 30°C**

(%)

Treat.	Storage Temp. (°C)	Storage time(days)					
		0	5	10	20	30	40
CON	10	2.22±0.123	2.20±0.031	2.12±0.094	2.07±0.041	1.97±0.061	1.89±0.062
	30	2.22±0.123	2.20±0.029	2.16±0.025	1.96±0.035	1.94±0.112	1.90±0.059
SC	10	1.81±0.075	1.81±0.057	1.80±0.029	1.78±0.025	1.73±0.022	1.71±0.049
	30	1.81±0.075	1.81±0.062	1.80±0.073	1.75±0.077	1.74±0.029	1.72±0.104
A 0.5%	10	2.04±0.034	1.94±0.041	1.92±0.017	1.89±0.062	1.86±0.034	1.81±0.017
	30	2.04±0.034	2.03±0.061	2.03±0.104	1.96±0.088	1.91±0.065	1.85±0.027
A 1.0%	10	1.81±0.065	1.77±0.047	1.73±0.025	1.70±0.009	1.69±0.092	1.68±0.063
	30	1.81±0.065	1.81±0.086	1.81±0.037	1.73±0.016	1.70±0.081	1.69±0.071
S 0.5%	10	2.27±0.086	2.20±0.035	2.17±0.019	2.17±0.047	2.13±0.047	2.03±0.053
	30	2.27±0.086	2.25±0.094	2.23±0.084	2.16±0.036	2.10±0.014	2.03±0.078
S 1.0%	10	2.28±0.047	2.21±0.102	2.20±0.039	2.19±0.085	2.16±0.096	2.07±0.064
	30	2.28±0.047	2.27±0.085	2.24±0.064	2.17±0.015	2.15±0.093	2.07±0.093

CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5 %, A0.5%: ascorbic acid 0.5 %, A1.0%: ascorbic acid 1.0 %, S0.5%: potassium sorbate 0.5 %, S1.0%: potassium sorbate 1.0 %.

마. 지방산화에 미치는 영향

저장기간에 따른 소시지의 TBRAS값의 변화는 Fig. 2와 같이 10 °C 저장과 30 °C 저장 모두 저장 0일째 대조구 0.13 MDA ppm 에 비하여 오미자 첨가구, ascorbic acid 첨가구와 potassium sorbate 첨가구 모두 다소 낮은 값을 나타내었으며, 저장기간이 경과할수록 TBARS 값은 서서히 증가하였다. 30 °C 저장의 경우도 저장 10 일째까지 서서히 TBARS 값이 증가하였으나, 저장 20 일째부터는 급격히 증가하였다. 또한, 저장성 비교를 위해 첨가한 potassium sorbate 첨가구는 대조구와 다른 첨가구에 비해 저장기간에 따라 다소 낮은 TBARS 값을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다(P>0.05). 이는 Han과 Park(21)의 지방함량 20 % 에 potassium sorbate 0.28 % 첨가한 소시지는 저장기간별 대조구와 저장 2 주째부터 지방산화 정도에 차이를 나타내며, 유의성이 인정된다는 보고와는 부분적으로 일치하지 않았다. 이러한 원인은 소시지 제조시 첨가되는 향신료의 차이와 이의 작용에 의한 것으로 사료된다.

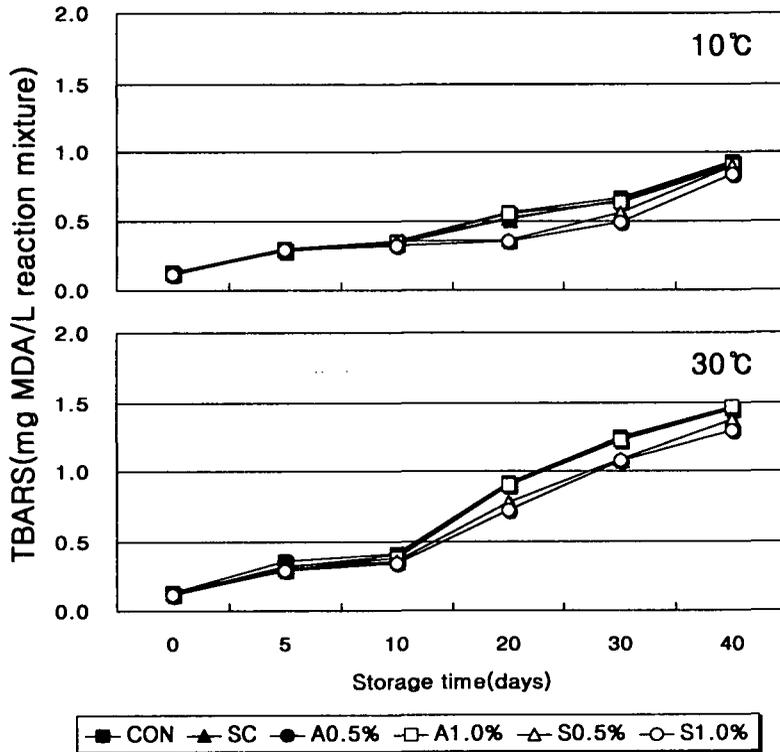
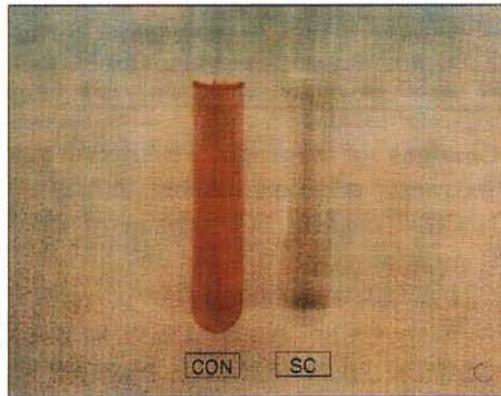


Fig. 2. Changes of sausage TBARS depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 바. 잔존 아질산염 함량의 변화

소시지 제조시 첨가한 오미자 추출물의 아질산염 소거작용을 in vitro상에서 검토한 결과 Fig. 3과 같이 대조구는 붉은색인 반면 오미자 첨가구는 무색을 나타내 오미자 추출물의 아질산염 소거 가능성을 시사하는 것이다. 잔존 아질산염 함량의 변화는 저장 10°C의 경우 저장기간의 경과에 따라 단계적으로 서서히 감소하였으나, 30°C 저장은 저장 5일째까지 급속히 감소하다가 저장 10일째부터는 서서히 감소하였다(Fig. 4). 이러한 아질산염 함량 변화는 온도, 산성 pH 또는 ascorbate 존재하에 염지액(12)이나 염치육(13, 14)에서 감소한다는 보고와

일치하였다. 또한, 오미자와 ascorbic acid 첨가구는 온도에 관계없이 저장 0 일  
 째부터 대조구 86.8 ppm 에 비하여 오미자 첨가구가 25.4 ppm, ascorbic acid 0.5  
 % 첨가구 23.9 ppm, ascorbic acid 1.0 % 첨가구 21.4 ppm 으로 잔존 아질산염  
 함량을 낮추었으며, 저장기간이 경과할수록 서서히 감소하였다. 이러한 오미자  
 첨가구 소시지의 잔존 아질산염 함량이 낮은 이유는 ascorbate 존재하에 ferrous  
 와 ferric iron은 *in vitro* 상에서 아질산염 함량을 감소시켰다는 Ando(22)의 보  
 고를 근거로 오미자 추출물 속의 높은 iron 함량일 것으로 사료된다. 아질산염  
 은 가공중이거나 육제품 저장시에도 계속 분해 소실되며, 그 정도는 가공시간,  
 온도, 식염의 농도, 아질산염 첨가량, 육의 pH와 이화학적 상태 및 육내의 미생  
 물에 따라 다르다(23)고 하였으며, 저장온도가 높을수록(24), pH가 낮을수록(25),  
 염농도가 높을수록(26) 잔존 아질산염 함량이 낮아진다는 연구결과는 본 실험의  
 결과를 뒷받침하고 있다.



**Fig. 3. Effects of *Schizandra chinensis* reacted with nitrite in presence of ascorbic acid on nitrite scavenging ability.** 150ppm: nitrite, 500ppm: ascorbic acid CON: without *Schizandra chinensis*, SC: with *Schizandra chinensis*

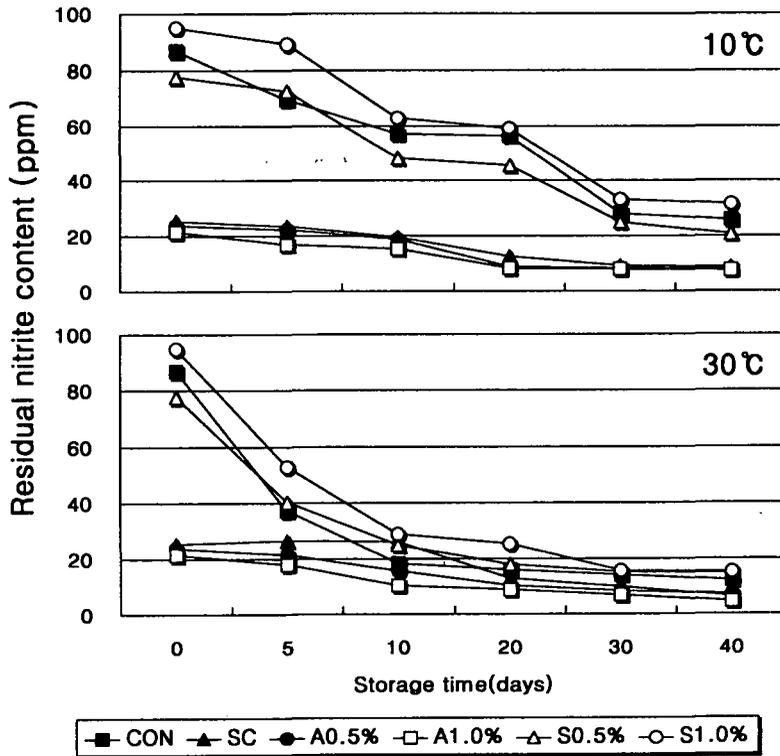


Fig. 4. Changes of sausage residual nitrite content depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 사. 색차의 변화

온도별 저장기간에 따른 lightness의 변화는 Fig. 5와 같이 10°C 저장은 저장 20 일째부터 lightness가 감소하였으며, 30°C 저장은 저장 5 일째부터 lightness의 감소를 나타내어 소시지 밝기는 10°C 저장보다 30°C 저장시 빨리 감소함을 나타내었다. 또한, 각 처리구별 유의성은 인정되지 않았다( $P>0.05$ ). Redness는 lightness와 달리 10°C와 30°C 저장 모두 저장 10 일째까지 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 6). 이 결과 저장기간에 따른 색차의 변화는 저장기간이 경과함에 따라 lightness는 감소하며, redness는 증가하다가 다시 감소한

다는 Kim 등(27)과 Park 등(28)의 보고와 일치하였다. 특히, 오미자와 ascorbic acid 첨가구의 redness 가 대조구와 다른 첨가구들에 비하여 높은 값을 나타내었다. 이는 저장기간동안 10 ℃ 보다는 30 ℃ 가 붉은색을 나타내었으며, 그 중에서도 오미자와 ascorbic acid 첨가구가 다른 첨가구에 비하여 높은 붉은색을 나타내어 소시지 색은 오미자와 ascorbic acid 첨가구가 우수하였다.

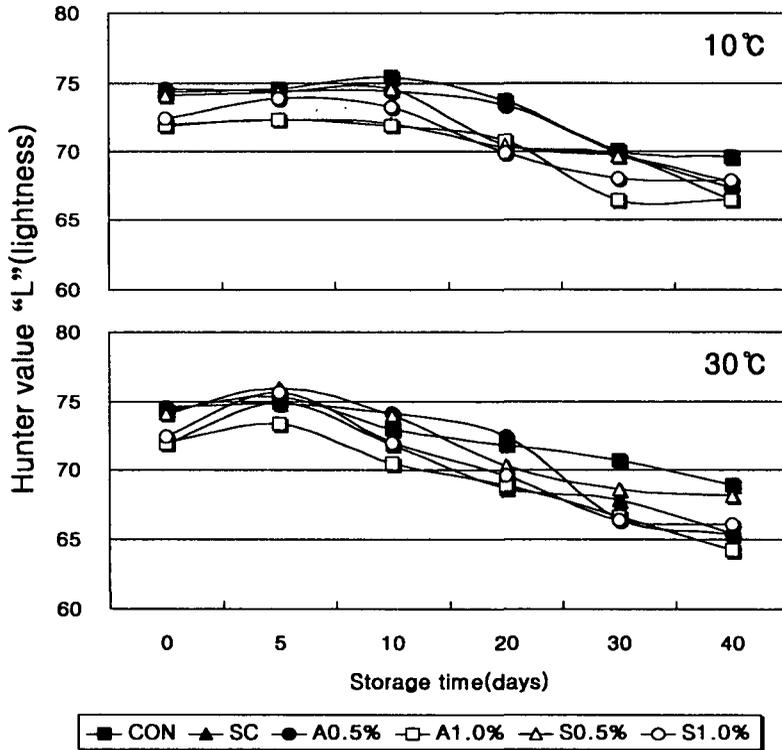


Fig. 5. Changes of sausage hunter value(L) depending on natural extracts addition during storage at 10℃ and 30℃. CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

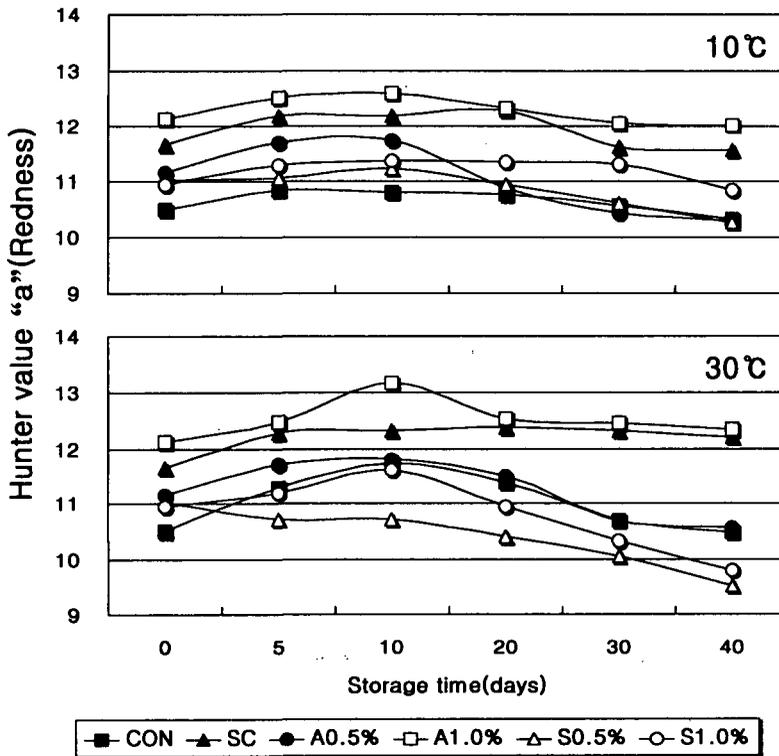


Fig. 6. Changes of sausage hunter value(a) depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

#### 아. 관능검사

저장기간동안 색, 향, 조직감 그리고 맛을 기호도 검사법으로 평가한 결과 Fig. 7, 8과 같이 저장기간이 경과함에 따라 색, 향, 조직감 그리고, 맛은 감소하는 경향이었으며, 10°C 보다는 30°C 저장이 큰 폭으로 감소하였다. 10°C 저장의 경우 색, 향, 조직감 그리고 맛은 저장 40일까지 관능평가가 3점 이상이었으며, 30°C 저장은 저장 20일까지로 나타났다. 즉, 저장기간은 10°C는 40일 이상, 30°C는 20일까지가 저장이 가능함을 확인하였다. 또한, 전반적으로 대조구와 첨가구의 비교에서는 큰 차이를 나타내지 않았으나, 오미자와 ascorbic acid 첨

가구는 보수력의 저하로 조직감과 맛에서 약간 낮은 값을 나타내었다. 대조구와 오미자 첨가 소시지의 단면을 비교한 결과 Fig 9와 같이 대조구에 비하여 오미자 첨가 소시지의 단면은 단단하지 못하고 거칠게 나타났다. 따라서, 오미자 첨가 소시지는 항산화성과 아질산염 소거작용은 우수하나 조직감이 저하되기 때문에 소시지 제조시 첨가 농도를 0.5% 이하로 낮추는 것이 바람직하다고 사료된다.

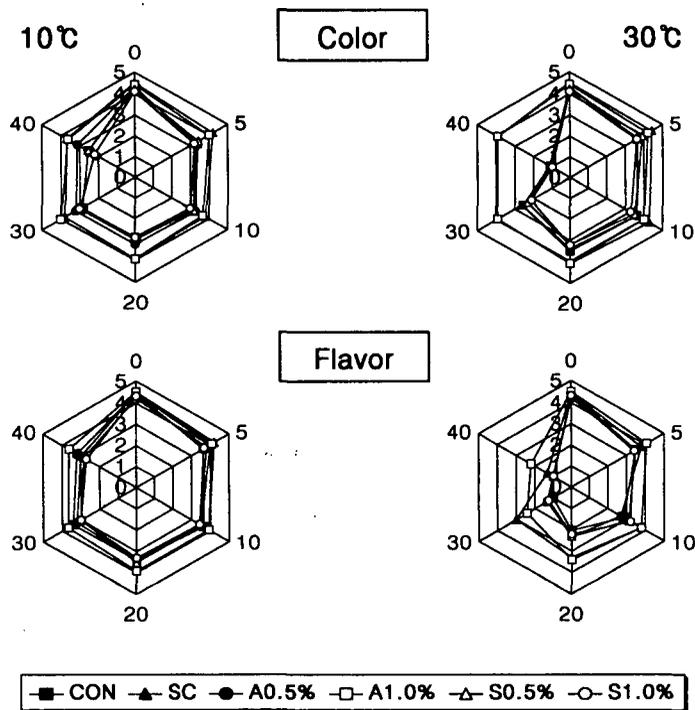


Fig. 7. Changes of sausage color and flavor depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, SC: *schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.

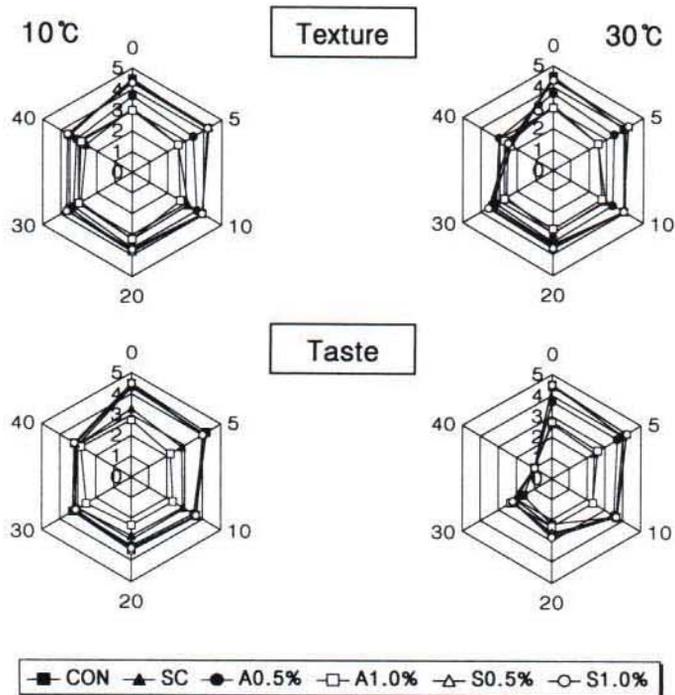


Fig. 8. Changes of sausage texture and taste depending on natural extracts addition during storage at 10°C and 30°C. CON: control, SC: *Schizandra chinensis* 0.5%, A0.5%: ascorbic acid 0.5%, A1.0%: ascorbic acid 1.0%, S0.5%: potassium sorbate 0.5%, S1.0%: potassium sorbate 1.0%.



Fig. 9. Comparison of sausage section made from *Schizandra chinensis* extracts. CON: control, SC: *Schizandra chinensis* 0.5%.

#### 4. 요약

소시지 제조시 저장기간 연장을 목적으로 첨가되는 potassium sorbate(0.5%, 1.0%)와 nitrite 감소를 위하여 첨가되는 ascorbic acid의 농도(0.5%, 1.0%)를 조정하여 오미자 추출물 첨가 소시지의 저장성과 잔존 아질산염 함량을 10℃와 30℃에서 저장하면서 관찰한 결과 온도에 관계없이 pH, 수분, 보수력, 염도, TBARS, 색차, 관능검사 모두 저장기간이 경과함에 따라 낮은 값을 나타내었다 ( $P>0.05$ ). 그러나, 오미자 첨가 소시지의 잔존 nitrite 함량의 변화는 대조구에 비해 낮은 값을 나타내어, 아질산염이 감소된 기능성 소시지의 개발 가능성을 시사하고 있다. 그러나 pH의 감소로 인한 보수력의 저하로 조직감이 떨어져 소시지 제조시 첨가 농도를 0.5% 이하로 낮추는 것이 바람직하다고 사료된다.

#### 5. 문헌

1. Ahn, B. W., Lee, D. H., Yeo, S. G., Kang, J. H., Do, J. R., Kim, S. B. and Park, Y. H. : Inhibitory action of natural food components on the formation of carcinogenic nitrosamine. *Bull. Korean Fish Soc.*, **26**(4), 289(1993).
2. Fox, J. B. : The chemistry of meat pigments. *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 207(1967).
3. Pivnick, H., Rubin, L. J., Barnett, H. W., Nordin, H. R., Ferguson, P. A. and Perrin, H. : Effect of sodium nitrite and temperature on toxinogenesis by *Clostridium botulinum* in perishable cooked meats vacuum-packed in air-impermeable plastic pouches. *Food Technol.*, **21**, 100(1967).
4. Macdougall, D. B., Mottran, D. S. and Rhodes, D. N. : Contribution of nitrite and nitrate to the color and flavor of cured meats. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1743(1975).
5. Duncan, C. L. and Foster, E. M. : Effect of sodium chloride and sodium nitrate on germination and out growth of anaerobic spores. *Appl.*

- Microbiol.*, **16**, 406(1968).
6. Jhonston, M. A., Pivnick, H. and Samson, J. M. : Inhibition of *Clostridium botulinum* by sodium nitrite in a bacteriological medium and in meat. *Can. Inst. Food Technol. J.*, **2**, 52(1969).
  7. William, L. : Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*, **225**, 21(1970).
  8. Roberts, T. A. : The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1735(1975).
  9. Peter F. S. : The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Food Agric.*, **26**, 1761(1975).
  10. Crosby, N. T. and Sawyer, R. : N-nitrosamines: A review of chemical and biological properties and their estimation in food stuffs. In *Advances in food research* Chrichster, C.o.(ed.), Academic Press, New York, **21**, 1(1976).
  11. Fiddler, W., Pensabene, J. W., Piotrowski, E. G., Doerr, R. C. and Wasserman, A. E. : Use of sodium ascorbate or erythrostate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters. *J. Food Sci.*, **38**, 1084(1973).
  12. Rust, R. E. : "Sausage and processed meats manufacturing." AMI center for continuing education. american meat institute, Chicago, IL(1975).
  13. Tompkin, R. B., Christiansen, L. N. and Shaparis, A. B. : Effect of prior refrigeration on botulinal outgrowth in perishable canned cured meat when temperature abused. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 863(1978).
  14. Olsman, W. J. : About the mechanism of nitrite loss during storage of cooked meat products. In Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prod. p.129, Krol, B. and Tinbergen, B.J.(Ed.) Pudoc. Wageningen, The Netherlands(1974).
  15. 이유방, 성삼경 : 식육과 육제품의 분석실험. 선진문화사, p.128(1996).
  16. Buege, J. A. and Aust, S. D. : Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, **105**, 302(1978).
  17. Kato, H., Lee., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. : Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol.Chem.*,

51, 1333(1987).

18. 이영춘, 김광옥 : 식품의 관능검사. 학연사, p.179(1989).
19. Langlois, B. E. and Kemp, J. D. : Microflora of fresh and dry-cured hams and affected by fresh ham storage. *J. Animal Sci.*, **38**(3), 525(1974).
20. Park, W. M., Choi, W. H., Yoo, I. J., Ji, J. R. and Jeon, K. H. : Effects of mixed starter cultures on the physico-chemical properties of fermented sausages. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **17**(2), 91(1997).
21. Han, S. K. and Park, H. K. : A study on the preservation of meat products with water extracted propolis(WEP). *Korean J. Anim. Sci.*, **38**(6), 605(1996).
22. Ando, N. : "Some compounds influencing color formation." Kori, B. and Tinbergen, J.(Ed.), p.149. Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prod. Pudoc, Wageningen, The Netherlands(1974).
23. Fox, J. B. Jr. and Nichalas, R. A. : Nitrite in meat. Effects of various compound on loss of nitrite. *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 302(1974).
24. Nordin, H. R. : The depletion of added sodium nitrite in ham. *Can. Inst. Food Tech. J.*, **2**, 79(1969).
25. Sebranek, J. B. : Studies on the ultimate fate and distribution of nitrite in a cured meat products. *pH. D. Thesis University of Wisconsin. U.S.A.*(1974).
26. Lee, M. and Cassens, R. G. : Effect of sodium chloride on residual nitrite. *J. Food Sci.*, **45**, 267(1980).
27. Kim, C. H., Ko, M. S., Lee, K. H., Park, W. M., Yoo, I. J. and Lee, C. H. : Changes of palatability traits of mold fermented sausage during ripening. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **18**(1), 57(1998).
28. Park, W. M., Choi, W. H., Yoo, I. J., Ji, J. R. and Jeon, K. H. : Effects of mixed starter cultures on the physico-chemical properties of fermented sausages. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **17**(2), 91(1997).

## 제 2 절 소시지의 특성에 미치는 농도별 오미자 추출물 첨가의 영향

### Effects of *Schizandra chinensis* concentration on sausage characteristic

#### Abstract

Nitrite was well known to generate nitrosamine in case of reacted with amine and acted as carcinogen. These studies were carried out to develop the functional sausage products using extracts from *Schizandra chinensis* depending on concentration(0.1%,0.3%). At the same time, the nitrite scavenging ability depending on the concentration of *Schizandra chinensis* extracts were determined. The pH values were tended to be low as the concentration of *Schizandra chinensis* was increased during storage time. As storage time goes by, pH change of sausage product were a little more dropped during storage at 30 °C than those of storage at 10 °C. The residue nitrite contents were tended to be decreased as the concentration of *Schizandra chinensis* was increased. As storage time goes by, the residue nitrite contents were lowed in case of addition of *Schizandra chinensis*, compared to those of control, irrespective of temperature. And also, the sausage added *Schizandra chinensis* had a low TBARS value than that of control, in which revealed antioxidant ability of *Schizandra chinensis* against rancidity during storage time.

## 1. 서 론

아질산염은 B.C 13세기경 중국에서 암염을 이용 육 보존제로 사용하였고, 로마에서는 소시지 가공에 염과 질산염을 첨가하였다(1). 고대로부터 현재에 이르기까지 염지방법에 별다른 변화 없이 수 십세기 동안 질산염과 아질산염의 첨가가 사용되어 왔으며, 오늘날 사용되고 있는 방법도 오래전부터 연구되어 1890년대에 이미 학문적으로 체계화되고 염지육에 대한 기작도 밝혀졌으며, Polenske(2)는 염지로 첨가되는 질산염은 세균의 작용을 받아 아질산염으로 전환되어 염지효과를 나타낸다고 하였으며, Anonymous(1)는 암염이나 질산염을 첨가한 육제품에서 아질산염의 축적을 확인하였다.

염지육의 육색발달은 아질산염의 작용에 의해서 일어나고, 질산염에 의해서는 성립되지 않으며, 아질산염 없이 질산염만을 가지고 염지한 육제품은 갈색으로 발색되나, 아질산염을 첨가하여 염지한 육제품은 더욱 좋은 육색으로 발색되었다고 하였다(3, 4). Haldane(5)에 의하면 육색발달은 육색소와 nitric oxide의 결합으로 이루어진다고 하였고, Kerr 등(6)은 육 100 lbs당 아질산염 1/4 ounce 첨가로 가능하다고 하였다. 또한, Hoagland 등(7)은 염을 첨가한 육에서 질산염 대신 아질산염 대체가 이상적이라고 하였다.

한국인의 일일 질산염( $\text{NO}_3$ ) 섭취량이 WHO의 질산염 일일섭취허용량인 ADI (Acceptable Daily Intake) 219 mg / 60 kg 보다 1.77 배 내지 3.37 배나 많고, 일일  $\text{NO}_3$  섭취량의 90.6~95.1%를 채소를 통해 섭취한다는 보고(8)가 알려진 후 채소내  $\text{NO}_3$  함량, 허용기준치 및 일일 섭취량 등에 대한 관심이 고조되고 있다.

성인의 경우 유아와는 달리  $\text{NO}_3$  섭취가 청색증을 야기하지는 않으나, 오줌으로 배설되는 85% 이외의  $\text{NO}_3$ 는 구강타액으로 재분비 되고, 이 중 15~25%가 아질산( $\text{NO}_2$ )으로 환원되어 위액 분비시 강산성 조건하에서  $\text{NO}_2$  가로 전환되어 amine 류와 결합하면 nitrosoamine 을 생성할 수 있다(9, 10). 谷村(11)은  $\text{NO}_3$  섭취량과 인구 10 만명당 위암 사망률과의 관계를 분석하면서  $\text{NO}_3$  섭취량이 높을수록 위암에 의한 사망률이 증가하는 정의 상관관계를 나타낸다고 보고하였으며, 서구 각국보다 채소 섭취량이 많은 일본인의 위암 사망률이 약 2~8배로 높음을 지적하였다.

Maugh(12)는 “한달에 핫도그를 12 개 이상 먹는 아이는 핫도그를 먹지 않는 아이에 비해 백혈병에 걸릴 확률이 9 배 높다”는 보고와 혈관 확장 기능에 대한

복용량은 0.03~0.12 g 인데 비하여 1 g 을 섭취하게 되면 사망(13)한다고 하였다. 이러한 아질산염의 위해성에 대해 미국에서는 1990년대 초부터 USDA(미농무성)에 의해 엄격히 규제되어 왔으며, 최고허용기준은 156 ppm(1/4 oz or 7.09 g/100 lb of meat)으로 정하고, 실제적으로는 120 ppm 이나 그 이하로 사용하며, 환원제(ascorbate, erythorbate)와 같이 염지공정에 사용하도록 규제하고 있다 (14). 따라서 본 연구는 아질산염의 위해성을 없애기 위하여 아질산염의 소거작용이 있는 오미자 추출물을 소시지 제조시 농도별로 첨가하여 소시지의 특성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 시료제조

오미자를 열수(85℃, 3hr)로 추출, 여과하여 동결건조한 후 분말을 다시 농도별 (0.1%, 0.3%)로 제조하여 사용하였다.

### 나. 일반분석(수분, 단백질, 지방) 측정

A.O.A.C. 방법으로 측정하였다.

### 다. pH측정

pH는 일반적인 방법에 따라 시료 5 g 을 3배의 증류수를 가해 homogenize 한 후 pH meter(Model DP-135M)로 측정하였다.

### 라. 물성검사

물성검사는 Rheometer(Model CR-100, SUN SCIENTIFIC Co. Japan)를 사용하여 hardness, springness, cohesiveness, strength를 측정하였다.

### 마. 아질산염 함량측정

아질산염 함량은 Kato 등(15)의 방법을 약간 수정하여 각 시료를 증류수로 5 배 희석한 후 1 ml 를 취하여 2% 초산용액 2 ml 와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 ml 를 가한

후 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 함량은 표준곡선에 대입하여 ppm 단위로 나타내었다.

#### 바. 색차 측정

소시지의 색은 시료를 직경 3 cm, 높이 2.4 cm 의 크기로 자른 후 1개 시료당 9개를 coring 하여 30분간 공기 중에 노출시켜 발색시킨 후 polyethylene 필름으로 한 겹 포장하여 색차계(Color. difference meter, Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 Hunter 값(L=명도, a=적색도)으로 표시하였다. 이때 사용된 표준색판은 기기의 manual 에 따라 Y=94.95, a=0.3132, b=0.3203 으로 하였으며, 6회 반복하여 평균값을 구하였다.

#### 사. 지방산과 유리아미노산 측정

지방산은 Morrison과 Smith(16), 그리고, A.O.A.C.(17) 방법에 준하여 분석하였다. 분쇄된 시료 1g 당 혼합추출 유기용매(chloroform:methanol=2:1) 60ml를 가한 후 균질기로 3분간 교반하고 여지(whatman No 2)로 여과하여 지질을 추출하는 과정을 3회 반복하였다. 추출된 여액의 1/3에 해당하는 증류수를 가한 다음 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하였으며, 하층 용액은 40°C 이하에서 감압농축시킨 후 얻은 10mg의 순수한 지방을 0.5N methanol-NaOH용액(2g NaOH/100ml methanol) 2ml를 가한 후 5분간 가열하여 냉각하였다. 냉각된 시료에 BF<sub>3</sub>-methanol 용액 4ml를 가하고 다시 30분간 가열한 후 실온에서 완전히 냉각한 다음, 2ml의 2,2,4-trimethyl pentane을 가하여 교반하고 NaCl 포화용액 5ml를 가하여 1분간 혼합하고 30분간 정치한 후 상층액을 취하여 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 수분을 제거한 후 GC에 주입하여 분석하였다. 각 지방산의 동정은 표준지방산(Sigma, U.S.A.)을 사용하여 머무름 시간과 비교하였다. 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

**Table 1. Specification and operating conditions of GC for fatty acid analysis.**

Instrument	DS 6200(Donam, Korea)
Column	DB-FFAP(0.53mm×30m)
Detector	Flame Ionization Detector
Oven temperature	165℃ ~ 3℃/min ~ 230℃(3min)
Injector temperature	250℃
Detector temperature	270℃
Carrier gas · flow rate	N <sub>2</sub> (10psi)
Injection volume	0.6μl
Software	dsCHROM plus

유리아미노산 함량은 amino acid analyzer로 측정하였다.

#### 아. Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(18)을 약간 수정하여 측정하였다. 1 ml 반응 혼합물에 50 μl dibutylhydroxytoluene (BHT) 7.2 % 를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000×g 의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도(HITACHI UV-2001) 531 nm 에서 측정하였고, 공시료는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해서 μg malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 저장기간별 오미자 소시지의 일반성분의 변화

저장온도를 달리한 소시지의 저장기간별 일반성분의 변화는 Table 2와 같다. 전반적으로 수분과 염도는 감소하는 경향이었으며, 지방과 단백질의 함량은 증가하는 경향이였다. 오미자 첨가 소시지는 대조구에 비하여 저장기간별 수분과 염도의 감소가 미미하였으며, 단백질과 지방의 함량은 저장기간과 온도에 관계없이 약간 증가하는 경향이였다. 따라서, 오미자첨가 소시지는 농도에 관계없이 저장기간 동안 일반성분의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

**Table 2. Changes of chemical analysis of sausage depending on *Schizandra chinensis* addition during storage at 10 °C and 30 °C**

Days	Temp	Sample	Moisure(%)	Protein(%)	Fat(%)	NaCl(%)
0		CON	58.4	18.2	22.7	2.5
		0.1%	59.5	18.6	22.8	2.6
		0.3%	60.8	18.7	24.6	2.7
10	10°C	CON	57.8	18.5	25.5	2.0
		0.1%	59.4	18.9	25.5	2.2
		0.3%	59.6	19.0	25.7	2.3
	30°C	CON	57.4	18.6	25.5	2.4
		0.1%	58.6	19.2	26.1	2.5
		0.3%	59.3	19.4	26.3	2.5
20	10°C	CON	57.6	20.1	21.8	1.9
		0.1%	59.1	21.3	21.9	2.0
		0.3%	59.3	21.6	21.9	2.0
	30°C	CON	56.8	21.3	21.1	2.2
		0.1%	58.1	22.4	21.2	2.4
		0.3%	58.7	22.5	21.9	2.4
30	10°C	CON	57.2	22.3	22.1	1.9
		0.1%	58.6	24.2	22.5	2.0
		0.3%	58.9	24.3	23.1	2.1
	30°C	CON	53.4	24.3	27.6	2.0
		0.1%	54.2	24.3	27.8	2.2
		0.3%	54.8	25.6	28.2	2.2
40	10°C	CON	56.9	27.3	23.3	1.6
		0.1%	57.9	28.8	23.1	1.8
		0.3%	58.4	29.3	24.6	1.8
	30°C	CON	49.2	28.7	29.4	2.0
		0.1%	50.1	29.6	30.8	2.2
		0.3%	50.8	29.7	31.9	2.2

CON: control, 0.1%: *Schizandra chinensis* 0.1%, 0.3%: *Schizandra chinensis* 0.3%.

#### 나. 저장기간별 오미자 소시지의 pH의 변화

저장기간별 pH의 변화는 Table 3과 같이 대조구에 비하여 오미자의 농도가 높을수록 pH는 낮게 나타나는 경향이나 큰 변화는 없었으며, 저장기간에 따른 pH의 변화도 미미하였다. 다만 전반적으로 오미자 첨가구가 약간 낮은 pH를 나타낸 것은 오미자 추출물 자체의 pH가 낮기 때문인 것으로 사료된다.

**Table 3. Changes of pH of sausage depending on *Schizandra chinensis* addition during storage at 10 ℃ and 30℃**

Temp. Storage(day)	10℃			30℃		
	CON	0.1%	0.3%	CON	0.1%	0.3%
0	6.57	6.55	6.50	6.57	6.55	6.50
10	6.48	6.45	6.43	6.36	6.33	6.32
20	6.35	6.32	6.21	6.21	6.20	6.12
30	6.19	6.17	6.08	6.01	6.00	5.88
40	6.03	5.98	5.97	5.95	5.87	5.76

CON: control, 0.1%: *Schizandra chinensis* 0.1%, 0.3%: *Schizandra chinensis* 0.3%.

다. 저장기간별 오미자소시지의 물성변화

저장기간별 소시지의 물성의 변화는 Table 4와 같다. 대조구에 비하여 오미자 첨가소시지의 농도가 증가함에 따라 hardness가 증가하는 경향이나 미미한 수준이었다. 저장기간중에도 오미자 첨가 소시지의 hardness 변화에는 큰 차이가 없었다.

라. 저장기간중 오미자 소시지의 잔존아질산염 함량변화

잔존아질산염의 함량은 저장초기 대조구 98.50ppm, 오미자 0.1%첨가구 98.20ppm, 오미자 0.3%첨가구 79.50ppm으로 대조구에 비하여 다소 낮게 나타났으며, 오미자의 농도가 증가함에 따라 잔존아질산염의 함량이 감소하는 것을 나타내었다. 이것은 오미자의 아질산염소거능 효과를 입증하는 것이다. 또한, 저장기간이 경과함에 따라 온도에 관계없이 대조구에 비하여 오미자 첨가 소시지의 잔존아질산염 함량이 낮은 값을 나타내었다.

**Table 4. Changes of texture of sausage depending on *Schizandra chinensis* addition during storage at 10 °C and 30°C**

Storage	Temp.	sample	Hardeness (Kg)	Springiness (mm)	Cohesiveness	Strength
0		CON	5.86	84.78	72.21	2.68
		0.1%	6.00	84.33	70.32	2.21
		0.3%	6.12	82.62	68.36	2.11
10	10°C	CON	6.12	85.19	74.37	2.48
		0.1%	6.42	82.81	72.75	2.08
		0.3%	6.51	81.82	68.53	3.49
	30°C	CON	6.36	86.67	79.20	1.77
		0.1%	6.80	88.89	80.29	1.42
		0.3%	6.83	82.52	72.07	1.76
20	10°C	CON	6.47	96.23	96.81	1.73
		0.1%	6.38	91.49	87.04	1.68
		0.3%	6.09	92.00	89.14	1.37
	30°C	CON	6.80	89.08	81.02	2.43
		0.1%	6.82	85.97	80.40	1.06
		0.3%	6.78	71.73	62.18	1.32
30	10°C	CON	7.12	95.70	93.93	1.27
		0.1%	7.42	82.96	73.94	1.17
		0.3%	7.58	91.75	85.30	1.62
	30°C	CON	7.19	90.90	86.15	1.37
		0.1%	7.28	85.62	76.12	2.75
		0.3%	7.37	100.00	99.80	1.36
40	10°C	CON	7.78	85.36	79.74	1.42
		0.1%	7.80	82.65	72.97	1.93
		0.3%	7.82	94.82	94.40	1.01
	30°C	CON	7.65	87.91	82.40	1.27
		0.1%	7.74	82.65	72.81	1.57
		0.3%	7.04	74.63	65.63	1.01

CON: control, 0.1%: *Schizandra chinensis* 0.1%, 0.3%: *Schizandra chinensis* 0.3%.

**Table 5. Changes of residual nitrite content of sausage depending on *Schizandra chinensis* addition during storage at 10 °C and 30 °C**

Temp. Storage(day)	10°C			30°C		
	CON	0.1%	0.3%	CON	0.1%	0.3%
0	98.50	98.20	79.45	98.50	98.20	79.45
10	69.95	59.85	36.60	29.10	24.15	22.00
20	63.70	50.00	29.25	14.85	15.65	15.65
30	47.55	45.45	22.90	13.15	12.40	12.85
40	47.85	43.25	18.10	16.15	12.45	15.00

CON: control, 0.1%: *Schizandra chinensis* 0.1%, 0.3%: *Schizandra chinensis* 0.3%.

마. 저장기간중 오미자 소시지의 육색변화

육 및 육제품의 색도는 소비자에게 구매욕구를 자극시키는 일차적인 요인이 되고 있다. 본 실험에서 소시지의 저장기간동안 명도(L)의 변화는 전반적으로 증가하는 경향이었으며, 적색도(a)는 감소하는 경향이였다. 저장온도별 변화에서는 30°C저장이 10°C 저장 보다 저장기간이 경과함에 따라 적색도의 증가가 다소 빠르게 나타났다. 그러나, 오미자 첨가소시지의 경우 대조구에 비하여 명도의 변화는 전반적으로 높은 경향이나 그 차이는 미미하였으나, 적색도는 전반적으로 대조구에 비하여 낮은 경향이였다.

바. 저장기간중 오미자 소시지의 지방산변화

저장기간중 오미자의 저장중 지방산의 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0일과 저장 40일째의 지방산 조성변화를 측정하였다. 대조구의 경우 지방산의 변화는 저장기간이 경과할수록 포화지방산의 조성이 미미하게 증가하였으나, 오미자 첨가 소시지의 경우 포화지방산의 변화는 대조구와는 달리 약간 감소하는 경향이였다. 그러나, 불포화지방산의 조성은 미미하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이에 대한 오미자의 지방산 조성에 미치는 영향에 대해 좀 더 정밀한 연구가 요구된다.

**Table 6. Changes of color of sausage depending on *Schizandra chinensis* addition during storage at 10 °C and 30 °C**

Temp.	Storage time(day)						
		0	10	20	30	40	
L	10°C	CON	71.36	63.71	65.25	65.94	67.54
		0.1%	71.36	65.39	66.77	69.63	69.89
		0.3%	71.36	69.43	67.16	68.11	69.02
	30°C	CON	71.36	64.59	64.52	64.76	63.80
		0.1%	71.36	70.37	65.92	67.31	61.33
		0.3%	71.36	67.60	64.95	65.99	65.28
a	10°C	CON	6.83	7.47	6.45	7.55	7.48
		0.1%	6.83	7.29	7.57	6.36	6.87
		0.3%	6.83	6.38	7.37	7.19	7.22
	30°C	CON	6.83	7.33	6.19	6.99	7.41
		0.1%	6.83	4.70	5.70	7.70	8.26
		0.3%	6.83	6.47	7.81	6.70	7.04
b	10°C	CON	10.24	8.25	8.88	8.20	8.11
		0.1%	10.24	8.20	8.45	8.29	8.36
		0.3%	10.24	10.32	8.42	8.43	8.56
	30°C	CON	10.24	8.40	10.63	9.23	9.93
		0.1%	10.24	9.53	10.64	9.77	10.48
		0.3%	10.24	9.69	9.69	10.68	10.07

CON: control, 0.1%: *Schizandra chinensis* 0.1%, 0.3%: *Schizandra chinensis* 0.3%.

**Table 7. Changes of fatty acid of sausage depending on *Schizandra chinensis* addition during storage at 10 °C and 30 °C**

Sample	0			40		
	CON	0.1%	0.3%	CON	0.1%	0.3%
14:0	2.78	3.33	2.56	2.64	2.88	2.38
15:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16:0	49.18	54.10	42.79	48.97	52.58	41.72
16:1	1.27	0.40	1.31	1.88	0.62	1.20
18:0	6.52	23.76	19.54	12.29	25.14	19.84
18:1	20.27	14.85	29.28	27.24	16.37	31.70
18:2	12.01	3.55	2.56	5.48	0.80	2.10
18:3	6.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20:1	1.48	0.00	1.62	1.51	1.61	1.05
22:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
23:0	0.00	0.00	0.34	0.00	0.00	0.00
24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
22:6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SFA	58.48	81.20	65.23	63.89	80.60	63.94
USFA	41.52	18.80	34.77	36.11	19.40	36.06

CON: control, 0.1%: *Schizandra chinensis* 0.1%, 0.3%: *Schizandra chinensis* 0.3%. SFA: saturated fatty acid, USFA: unsaturated fatty acid

아. 저장기간 중 오미자 소시지의 유리아미노산변화

유리아미노산 함량은 Table 8과 같이 저장기간이 경과함에 따라 유리아미노산 함량은 증가하는 경향을 나타내었다. 저장초기 대조구에서는 glutamic acid, aspartic acid, leucine 순으로 높은 함량을 나타내었으며, 이는 정 등(19)의 보고와 일치하는 경향이였다. 저장기간이 경과함에 따라 오미자 첨가 소시지의 유리아미노산 함량이 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

**Table 8. Changes of free amino acid of sausage depending on *Schizandra chinensis* addition during storage at 10 ℃ and 30℃** (mg/g)

	0			40					
				10			30		
	CON	0.1	0.3	CON	0.1	0.3	CON	0.1	0.3
aspartic acid	1.94	1.83	1.41	2.30	1.97	1.69	2.71	1.99	1.94
threonine	0.89	1.08	0.94	1.33	0.99	0.83	2.28	2.60	1.56
serine	0.88	1.06	0.99	1.38	0.99	1.06	2.32	5.47	9.49
glutamic acid	3.23	3.62	3.58	4.44	4.67	4.31	4.22	5.48	4.26
proline	1.17	1.18	1.13	2.09	1.75	1.77	2.80	3.93	1.36
glycine	0.16	1.56	1.34	0.19	2.16	2.48	3.47	3.85	3.19
Alanine	1.14	1.15	1.18	1.33	1.41	1.21	1.24	1.23	1.86
valine	1.85	1.86	1.19	1.58	1.06	1.27	2.62	2.43	2.09
cystine	0.17	0.15	0.21	0.35	0.22	0.25	0.54	0.28	0.24
methionine	0.34	0.57	0.45	0.61	0.89	0.49	3.86	5.27	11.90
isoleucine	1.15	1.69	1.30	2.00	2.32	2.53	4.27	6.54	1.99
leucine	1.51	1.82	1.64	2.12	3.54	2.81	2.01	3.73	4.06
tyrosine	0.63	1.08	0.73	0.34	0.61	0.75	2.17	4.41	1.35
phenylalanine	1.39	2.30	1.47	1.78	1.26	1.52	3.32	3.72	2.34
lysine	1.33	1.65	1.12	1.92	2.37	2.61	5.66	6.69	6.06
histidine	0.37	0.69	0.37	0.68	0.89	0.84	0.20	3.69	1.59
arginine	0.92	1.36	1.07	1.07	1.04	1.08	0.20	3.06	0.74
<b>Total</b>	<b>19.07</b>	<b>24.65</b>	<b>20.12</b>	<b>25.51</b>	<b>28.14</b>	<b>27.5</b>	<b>43.89</b>	<b>64.37</b>	<b>56.02</b>

CON: control, 0.1%: *Schizandra chinensis* 0.1%, 0.3%: *Schizandra chinensis* 0.3%.

자. 저장기간중 오미자 소시지의 TBARS변화

농도별 오미자 첨가 소시지의 저장기간동안 지방산화도를 조사한 결과 table 9와 같이 10℃저장보다는 30℃저장이 TBARS의 값이 높게 나타났으며, 대조구에 비하여 오미자 첨가소시지가 온도에 관계없이 다소 낮은 TBARS값을 나타내어 오미자의 항산화력이 있음을 입증하였다. 이것은 오미자를 첨가함으로써 저장중 산패를 지연시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

**Table 9. Changes of TBARS of sausage depending on *Schizandra chinensis* addition during storage at 10 °C and 30 °C**

Temp.	Sample	Storage time(days)				
		0	10	20	30	40
		-----TBARS(mg MDA/L reaction mixture)-----				
10°C	con	0.11±0.004	0.27±0.043	0.53±0.120	0.68±0.133	0.83±0.084
	0.1	0.10±0.019	0.20±0.034	0.38±0.077	0.60±0.142	0.83±0.174
	0.3	0.10±0.039	0.21±0.036	0.36±0.086	0.60±0.163	0.82±0.099
30°C	con	0.11±0.004	0.43±0.071	1.12±0.223	1.52±0.330	1.76±0.321
	0.1	0.10±0.019	0.43±0.062	1.10±0.131	1.43±0.217	1.53±0.040
	0.3	0.10±0.039	0.43±0.063	1.04±0.139	1.44±0.304	1.50±0.211

CON: control, 0.1%: *Schizandra chinensis* 0.1%, 0.3%: *Schizandra chinensis* 0.3%.

#### 4. 요약

아질산염 소거작용이 있는 오미자 추출물을 농도별(0.1%, 0.3%)로 첨가하여 저장은도별(10°C, 30°C) 니트로사민 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 천연물의 분해효과와 저장성을 검토하였다. 저장기간별 pH의 변화는 대조구에 비하여 오미자의 농도가 높을수록 pH는 낮게 나타났으며, 저장기간이 경과함에 따라 10°C저장보다 30°C저장의 경우 pH가 약간 낮은 경향이였다. 잔존 아질산염의 함량은 저장초기 대조구 98.50ppm, 오미자 0.1% 첨가구 98.20ppm, 오미자 0.3% 첨가구 79.50ppm으로 대조구에 비하여 다소 낮게 나타났으며, 오미자의 농도가 증가함에 따라 잔존 아질산염의 함량이 감소하는 경향이였다. 또한 저장기간이 경과함에 따라 오미자 첨가 소시지의 유리아미노산 함량이 전반적으로 증가하는 경향이였다. 오미자 첨가 소시지의 경우 포화지방산의 변화는 약간 감소하나 불포화지방산은 미미하게 증가하는 경향이였다. 10°C저장보다는 30°C저장이 TBARS의 값이 높게 나타났으며, 대조구에 비하여 오미자 첨가소시지가 온도에 관계없이 다소 낮은 TBARS값을 나타내어 저장중 산패에 대한 항산화력이 약간 증가하는 경향이였다.

## 5. 문헌

1. Anonymous: Nitrites, nitrosamines and cancer. *Lancet*, **2**, 1071(1968)
2. Polenske, E.: Ueber den verlust, welchen das rindfleisch und nährwerth durch das pökeln erleidet, sowie über die veränderungen Saltpeterhaltiger pökellaken. *Arb. kais. Gesundh.* **7**, 471(1981)
3. Kisskalt, K.: Beiträge zur Kenntnis der Ursachen des Rothwerdens des Fleisches beim kochen, nebst einigen Versuchen über die Wirkung der Schwefligen Säure auf die Fleischfarbe. *Arch Hyg. Bd.*, **35**, 11(1899)
4. Lehmann, K.B.: Über das Haernorrkodin, ein neues weitverbreitetes Blutfarbstoffderivat. Sitz physikal. *Med. Ges. Würzburg*, **4**, 57(1899)
5. Haldane, J.: The red color of salted meat. *J. Hygiene.*, **1**, 115(1901)
6. Kerr, R.H., Marsh, T.N., Schroeder, W.F. and Boyer, E.A.: The use of sodium nitrite in the curing of meat. *J. Agr. Res.*, **33**, 41(1926)
7. Hoagland, R.: Coloring matter of raw and cooked salted meats. *J. Agr. Res.*, **3**, 211(1914)
8. 손상목: 채소를 통한 일일 NO<sub>3</sub> 섭취량과 안전농산물 NO<sub>3</sub> 함량 허용기준 설정. *한국유기농업학회지*, **2**, 45(1995)
9. 孫尙穆, 米山忠克: 野菜の硝酸: 作物の硝酸の生理, 集積, 人の攝取. *農業および園藝*. **71**(11), 1179(1996)
10. WHO Technical Report Series: Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, World Health Organization, Geneva. p.859(1995)
11. 谷村顯雄: 亞硝酸およびその關聯物質に關する最近の研究 *食品衛生研究*, **33**, 17(1983)
12. Maugh, T.H.: Study links hot dogs, cancer. *Washington Post*, June p.3 (1994)
13. NAS: "Toxicants occurring naturally in foods." *Natl. Acad. of Sciences, Natl. Acad. Press, Washington, D.C.*(1973)
14. Cassens, R.G.: Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technol.* July, p.72(1995)
15. Kato, H., Lee, Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. : Inhibition of

- nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol.Chem.*, 51, 1333(1987).
16. Morrison, W.R. and Smith, L.M.: Preperation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from loquid with boeon fluoride methanol. *J.Lipid Res.*, 5, 600(1964)
  17. A.O.A.C.: Official methods of meat analysis, 15th ed., Association of office Analytical chemists, Washington, D.C.(1990)
  18. Buege, J. A. and Aust, S. D. : Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, 105, 302(1978).
  19. 정인철, 문귀임, 이돈우, 문윤희: 가열온도와 시간이 돈육소시지의 특성에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, 23(5), 832(1994).

### 제 3 절 혼합 starter가 발효소시지 제조에 미치는 영향

## Effect of mixed starter on manufactured of fermented sausage

#### Abstract

Effect of mixing ratio of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from *kimchi* on fermentation of sausage was studied to select mixed starter. Several mixing ratio of *L. plantarum* and *P. pentosaceus*(8:2, 6:4, 5:5, 4:6 and 2:8) did not show significant difference in depletion of nitrite in MRS broth containing 200 ppm nitrite. Nitrite depletion ratio of two kinds of mixed starter(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3 and *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4) was higher than that of commercial meat starter (*Staphylococcus xylosus* + *P. pentosaceus*). The growth of *Listeria monocytogenes* Scott A, *Escherichia coli*, ATCC 11775, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 was inhibited by addition of the two kinds of mixed starter in artificially contaminated meat during curing for 48 hrs at 32°C.

#### 1. 서 론

발효 육제품 제조에 있어서 자연발효의 주체가 유산을 생성하는 미생물이라는 사실이 밝혀지면서 종래의 자연발효 방식에서 1940년대 초에 처음으로 유산균을 소시지에 접종하여 인위적 발효를 시도하였다(Jensen 등, 1940). 자연발효 소시지는 주로 *Lactobacilli*가 가장 많이 관여하는 것으로 알려졌으나(Deibel 등, 1961 ; Hofmann 등, 1980) Rheinbaben과 Hadlok(1979)은 시판중인 발효 소시지에서 분리해 낸 그람양성균과 catalase 양성균 중 94%가 *Staphylococci*였고 4.8%만이 *Micrococci*라 하였고 또 Fischer과 Schleifer(1980)는 61%가 *Staphylococci*였고 39%만이 *Micrococci*였다고 보고하였다. 그러나 생산제품의 균일성과 안전성을 향상시키고 발효시간을 단축시켜 상업화하기 위한 목적으로 유산균 접종에

의한 발효가 도입되어 발효 소시지의 발달이 가속화되었다(Deibel 등, 1957). 사용 가능한 starter로서 보고된 발효 미생물로는 *Lactobacilli*(Everson 등, 1970), *Pediococci* (Blickstad 등, 1981), *Micrococci*(Haymon, 1984)를 들 수 있으며 Pohja(1960)은 육제품과 염지액으로부터 분리한 *Micrococci*와 *Staphylococci*의 접종에 관하여 보고한 바 있으며 Nurmi(1966)는 *Micrococci*와 *Lactobacilli*의 혼합 starter로서 최적의 결과를 발견하였으며 그 결과 *Micrococci*와 *Lactobacilli*의 특수한 혼합 starter의 상업화가 가능하게 되었다. 그 후 Gryczka 등(1979)에 의해 *Lactobacillus plantarum*과 *Pediococci*에 *Micrococci*를 혼합한 균주를 이용하는 혼합배양에 대한 논문이 발표되기도 하였다.

본 실험은 전보에서 분리된 유산균 중 *L. plantarum*과 *P. pentosaceus*를 이용한 혼합 starter의 이용 가능성과 적정 혼합비를 구명하고 이들 혼합 starter의 병원성 미생물에 대한 항균성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 혼합 균주의 starter 제조

전보에서 선발된 *Lactobacillus plantarum* N-2, *Pediococcus pentosaceus* N-3, *P. pentosaceus* N-4를 이용하여 Table 1, Table 2와 같이 배합하여 혼합 균주 starter를 제조하였다.

Table 1. Ratio of lactic acid bacteria as starter I

	<i>Lactobacillus plantarum</i> (N-2)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> I(N-3)
I	8	2
II	6	4
III	5	5
IV	4	6
V	2	8

Table 2. Ratio of lactic acid bacteria as starter II

	<i>Lactobacillus plantarum</i> (N-2)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> II(N-4)
I	8	2
II	6	4
III	5	5
IV	4	6
V	2	8

나. 혼합 균주 starter의 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능이 가장 뛰어난 5:5 배합비의 starter I과 starter II와 Christian Hansen Co.(Denmark)로부터 구입한 SP(*Staphylococcus xylosus* + *Pediococcus pentosaceus*)에 의한 아질산염 소거능의 측정은 Dodds와 Collins-Thompson(1984)의 방법에 따라 실시하였다. MRS broth 9ml에 2mg/ml의 nitrite slon. 1ml를 첨가하여 최종농도가 200µg/ml가 되게 하여 멸균한 배지에 24시간 배양시킨 starter를 각각 접종하여 32℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 시료를 채취하여 잔존 아질산염양을 측정하였다.

다. 혼합 균주 starter의 항균성 측정

혼합 균주 starter의 병원성균에 대한 염지육 내에서의 항균효과를 측정하기 위하여 혼합 균주 starter를 첨가한 분쇄 돈육을 병원성균에 인위적으로 오염시킨 후 32℃에서 저장하면서 염지육의 변화를 측정하였다.

1) 시료의 처리

하양시내 정육점에서 구입한 분쇄 돈육에 sodium chloride 4%, sugar 2%, sodium nitrite 0.02%(박, 1999)를 혼합한 염지체를 첨가하여 사용하였으며 분리 유산균은 MRS broth에서 37℃에서 24시간 배양시킨 후 원심분리(3000rpm, 20min)하여 phosphate buffer(pH 7.0)로 cell을 2회 세척하여 균의 농도가 약 10<sup>7</sup>CFU/ml가 되도록 적정 희석하여 starter로 사용하였다.

2) 인위적으로 오염시킨 염지육의 염지 중 미생물의 변화

염지육의 염지 과정 중 오염균의 회수율을 측정하기 위하여 시료 10g에 24, 48시간 간격으로 무균적으로 채취하여 0.1% peptone solution 90ml를 첨가, stomacher(Lab blender, model 400, TMC Co.)를 이용하여 균질화한 후 그 액 1ml를 적정 희석한 후 pour plate method로 오염 미생물의 수를 측정하였다. 오염 미생물의 종류와 사용배지 및 배양조건은 Table 3에서 보는바와 같다.

**Table 3. Media and condition of incubation for contaminated microorganisms**

Microorganism	Medium	Incubation
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Macbride listeria agar	37°C, 48hr
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	EMB agar	37°C, 48hr
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Bismuth sulphate agar	37°C, 48hr
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737	Staphylococcus 110 medium	37°C, 48hr

3) 염지육의 pH 변화 측정

염지 중 염지육의 pH 변화는 시료 10g을 24시간 간격으로 무균적으로 채취하여 0.1% peptone solution 90ml를 첨가하고 stomacher(Lab blender, model 400, TMC Co.)를 이용하여 균질화 시킨 후 그 액을 pH meter로 측정하였다.

**3. 결과 및 고찰**

가. 균주 배합비에 따른 아질산염 소거능

발효 소시지 제조 시 사용하는 혼합 균주의 배합비를 결정하기 위하여 배합비에 따른 아질산염 소거능을 측정한 결과는 Fig 1, 2에 나타난 바와 같다. *L. plantarum*(N-2)과 *P. pentosaceus* I(N-3) 혼합 균주(starter I), *L. plantarum* (N-2)와 *P. pentosaceus* II(N-4) 혼합 균주(starter II)를 8:2, 6:4, 5:5, 4:6, 2:8의 비율로 각각 접종하여 48시간 배양 후 아질산염 소거능을 측정한 결과 2종의 starter 각각 배합 I의 경우 99.7%, II와 III의 경우 각각 99.7~99.8%, 배합 IV의 경우 99.3%, V의 경우 100%로 나타나 모든 배합비에서 99%이상의 높은 소거능을 나타내었으며 특히 V의 경우 아질산염을 100% 소거하여 가장 높은 효과

를 나타내었다. 그러나 배합비에 따른 아질산염의 소거능에는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 배양 48시간째에 잔존 아질산염이 배합비에 관계없이 거의 소거된 것으로 나타났다. 단독 균주의 아질산염 소거능은 전보에서 발표한 바와 같이 가장 높은 소거능을 나타낸 *L. plantarum*(N-2)의 경우 32℃에서 24시간 배양 후 99.12%를 나타내었고 나머지 균주는 97%정도의 소거능을 나타내어 단독 균주보다는 혼합 균주가 아질산염 소거능이 더 좋은 것으로 판단되었다. 또한 혼합 균주가 단독 균주보다 산 생성능도 더 우수한 것으로 판단되어 발효 소시지 제조시 단독 균주보다 혼합 균주 starter가 더 유리할 것으로 판단되었으며 starter의 배합비는 소시지 내의 아질산염 소거에는 별다른 차이가 없는 것으로 판단되었다. 또한 가장 아질산염 소거능이 뛰어난 배합비율인 5:5로 혼합한 starter I과 II를 상업용 균주인 SP starter의 아질산염 소거능과 비교한 결과는 fig 3과 같다. 상업용 균주인 SP starter의 아질산염 소거능은 배양 24시간 후 70.9%, 48시간 후에는 86.04%로 나타나 혼합 균주 starter의 아질산염 소거능보다 낮은 것으로 나타났다. 이는 SP starter의 성장 특성상 산 생성력이 약하여 유산의 생성이 느리기 때문인 것으로 판단되며 SP starter로 제조한 발효 소시지는 천천히 숙성되어 풍미가 좋은 특성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Bacus, 1986). 따라서 발효 소시지 제조시 starter로서의 2가지 균의 배합비는 5:5로 첨가하는 것이 무방할 것으로 판단되었다.

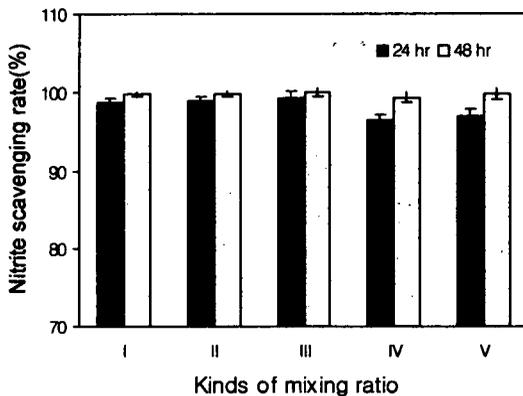
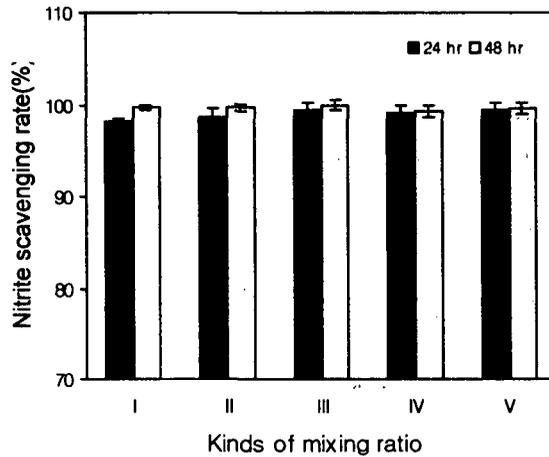
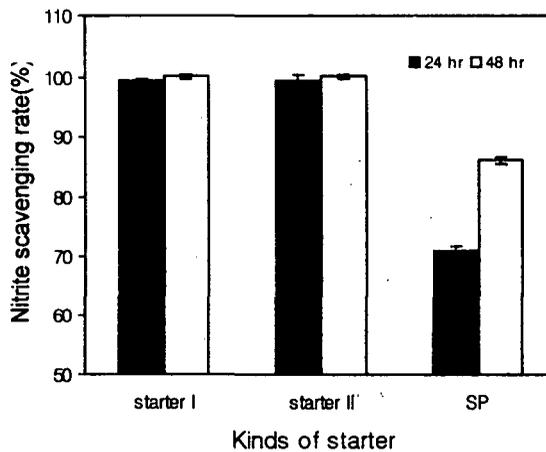


Fig 1. Effect of mixing ratio on rate of nitrite depletion of *L. plantarum* N-2 and *P. pentosaceus* N-3 (starter I) I ; 8:2, II ; 6:4, III ; 5:5, IV ; 4:6, V ; 2:8



**Fig 2. Effect of mixing ratio on rate of nitrite depletion of *L. plantarum* N-2 and *Ped. pentosaceus* N-4 (starter II) I ; 8:2, II ; 6:4, III ; 5:5, IV ; 4:6, V ; 2:8**



**Fig 3. Depletion of nitrite by starter I(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3), starter II(*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4) and SP(*Staph. carnosus* + *P. pentosaceus*).**

#### 나. 혼합 균주 starter의 항균성 측정

혼합 균주 starter의 항균성을 측정하기 위하여 염지육을 인위적으로 오염시킨 후 4종류의 starter 중에서 특히 아질산염 소거능이 뛰어난 2종의 starter를 선별하여 오염 염지육에 접종한 후 32℃에서 저장하면서 오염균의 회수율과 염지육의 pH를 측정하였다. 혼합 균주 starter의 첨가에 따른 염지육 내 오염균의 회수율과 pH를 측정한 결과는 다음과 같다. 염지육에 *Salmonella typhimurium*을 인위적으로 오염시킨 후 회수율과 pH를 측정한 결과(Fig 4), starter를 접종하지 않은 대조구는 배양 48시간까지  $10^5$  CFU/ml이상의 균수를 발효 전 기간 유지한 반면 starter를 접종한 염지육 내의 오염균 회수율은 배양 24시간부터 오염균수가 감소하기 시작하여 배양 48시간째에 1 log cycle의 감소를 나타내었다. pH의 변화는 대조구가 배양 전 기간 약간의 감소가 관찰된 반면 starter 첨가구의 경우 발효 48시간째 pH 5이하를 나타내었다. 이는 starter인 유산균이 성장하면서 생성한 유산이 염지육 내의 pH를 감소시켜 *Sal. typhimurim*의 성장을 억제하는 것으로 사료된다. 이는 Kang 등(1999)이 발효 육제품내의 starter culture가 생성한 diacetyl에 의해 *E. coli* O157:H7과 *Sal. typhimurium*의 성장억제를 한다고 보고한 바 있어 유산균에 의한 유산생성뿐만 다른 대사생성물질도 성장억제의 원인이 될 수 있을 것으로 사료된다.

Fig 5는 *Staphylococcus aureus*를 인위적으로 오염시킨 경우 오염균의 회수율과 pH를 나타낸 결과이다. *Staph. aureus*의 경우에도 *Sal. typhimurium*의 경우와 유사한 경향을 나타내어 starter 첨가구에서의 성장 억제율이 뚜렷하게 나타났다. 이는 Sameshima 등(1998)이 장내 유산균이 발효 소시지내의 *Staph. aureus*의 성장을 억제한다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다. Fig 6은 *Listeria monocytogenes*를 염지육에 오염시킨 후의 오염균 회수율과 pH를 나타낸 결과이다. *L. monocytogenes*의 경우 다른 경우와 유사한 경향을 나타내어 starter 첨가구가 대조구보다 *L. monocytogenes*의 회수율이 낮은 경향을 보였고 pH의 감소도 배양 48시간째 pH 5 이하로 나타났다. 이는 다른 유산균들의 listeria 성장 억제에 대한 보고들과 유사한 경향을 나타내었다(Aymerich 등, 2000; Hugas 등, 1995). Fig 7은 *Escherichia coli* 오염 염지육의 경우를 나타낸 결과이다. 위와 같이 유사한 경향을 나타내어 4가지 오염균 모두 starter 접종 염지육 내에서의 성장 억제효과를 나타낸다고 판단되었다.

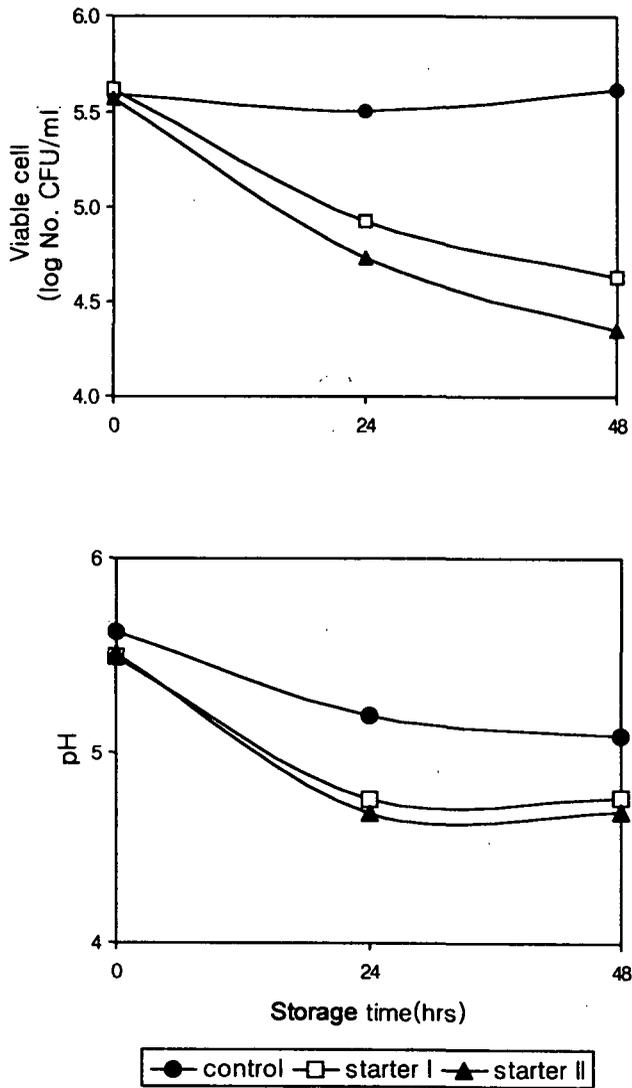
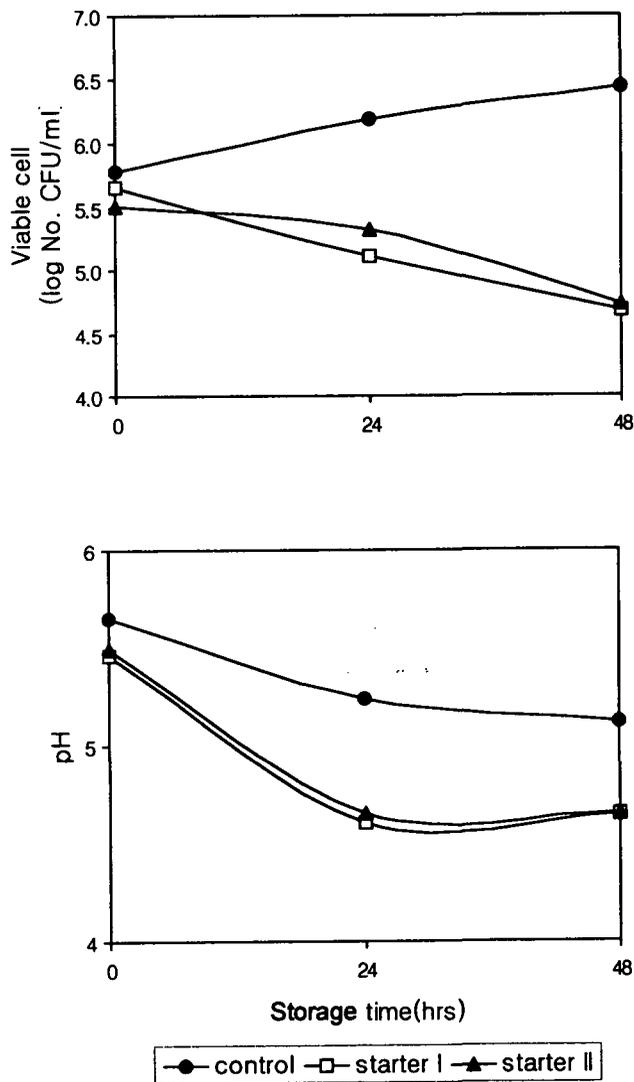
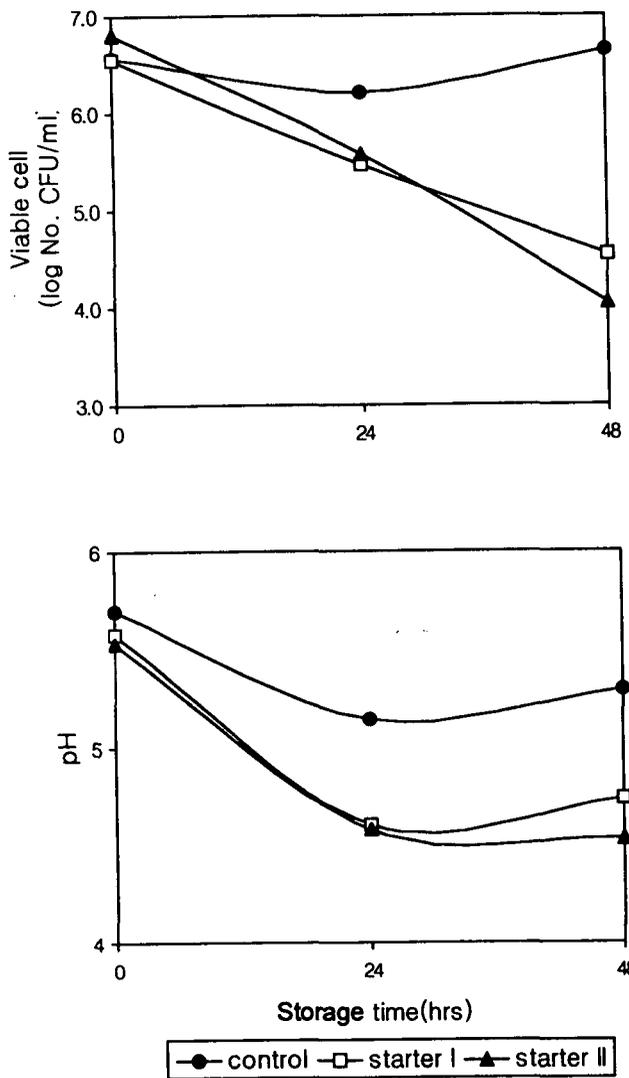


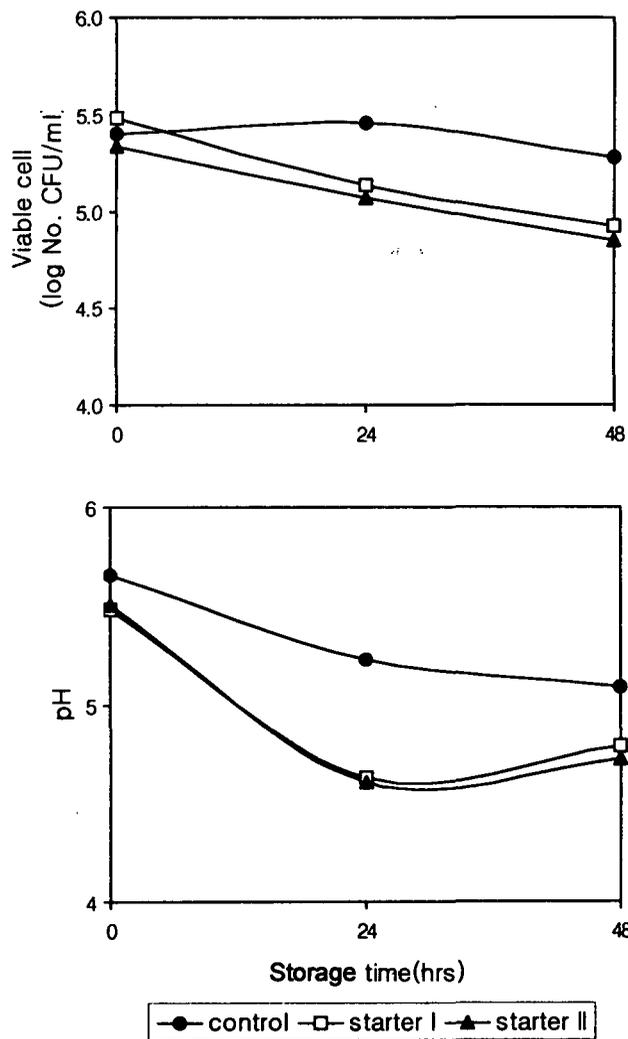
Fig 4. Effect of mixed starter on the growth of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 in artificially contaminated meat during curing for 48 hrs at 32°C.



**Fig 5. Effect of mixed starter on the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 in artificially contaminated meat during curing for 48 hrs at 32°C.**



**Fig 6. Effect of mixed starter on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in artificially contaminated meat during curing for 48 hrs at 32°C.**



**Fig 7. Effect of mixed starter on the growth of *Escherichia coli* ATCC 11775 in artificially contaminated meat during curing for 48 hrs at 32°C.**

## 5. 요약

본 실험은 전보에서 분리된 유산균 중 *L. plantarum*과 *P. pentosaceus*의 혼합 균주 starter를 발효 소시지에 제조에 적용하기 위한 전 단계 과정으로 아질산염 소거능이 뛰어난 2 균주의 배합비를 결정하고 인위적으로 병원성균에 오염시킨 염지육에 혼합 균주 starter를 접종하여 32℃에서 저장하면서 염지육에서의 오염균 회수율과 pH를 측정하여 starter의 항균성을 검토하였다.

1. 선발 유산균을 혼합 starter로 제조하기 위한 배합비 결정은 아질산염 소거능을 측정하여 선발하였다. 실험 결과 배합비율 모두 95% 이상의 뛰어난 아질산염 소거능을 나타내었으며 특히 5:5의 경우 100%의 아질산염 소거능을 나타내었다. 각각의 배합비 간의 아질산염 소거능은 유의적인 차이를 관찰할 수 없었으며 혼합 균주 starter는 상업용 균주인 SP starter 보다 아질산염 소거능이 좋은 것으로 관찰되었다.
2. 혼합 starter의 항균특성을 검토하기 위하여 염지육 내에 인위적으로 병원성균을 오염시킨 후 starter를 접종하여 오염균의 회수율과 pH를 측정한 결과 2종의 starter 모두 4종의 오염균에 대하여 배양 48시간 후 오염균수가 감소하였으며 pH 또한 감소하는 경향을 보였다.

## 5. 문헌

1. Aymerich, T., M. G. Artigas, M. Garriga, J. M. Monfort, M. Hugas, 2000. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. J. Appl. Microbiol., 88, 686.
2. Bacus, J. N., 1986. Fermented meat and poultry products ; starter cultures. in advanced in meat research. AVI, 2, 123.
3. Blickstad, E. and G. Molin. 1981. Growth and lactic acid production of

- Pediococcus pentosaceus* at different gas environments, temperatures, pH values and nitrite concentration. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13, 170.
4. Deibel, R. H. and Niven, C. F., 1957. *Pediococcus cerevisiae*; a starter culture for summer sausage products. J. Agri. Food Chem., 18, 570.
  5. Deibel, R. H., C. E. Niven, and G. D. Wilson. 1961. Microbiology of meat curing. III. Some microbiological aspects in the manufacture of fermented sausages. Appl. Microbiol. 9, 156.
  6. Dodds, K. L. and D. L. Collins-Thompson, 1984. Incidence of nitrite-depletion lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter cultures. J. Food Prot., 47, 7.
  7. Everson, C. W., W. D. Danner and P. A. Hammes. 1970. Bacterial starter cultures in sausage products. J. Agric. Food Chem. 18(4), 570.
  8. Fischer, U. and K. H. Schleifer. 1980. Presence of staphylococci and micrococci in dry sausage. Fleischwirtschaft. 60(5), 1046, 1051.
  9. Gryczka, A. J. and R. B. Shah. 1979. Process for the treatment of meat with compositions including *Micrococcus varians* and lactic acid producing bacteria. U. S. Patent. 4, 147, 807.
  10. Haymon, L. W. 1984. New developments in starter cultures. Proceedings of the meat industry Research Conference, American Meat Institute.
  11. Hofmann, H. P. and L. Scharner. 1980. Microbiological and organoleptic studies on the dynamics of ripening of raw ripened sausages. I. Changes in the microflora during ripening. Nahrung 24(3), 285.
  12. Hugas, M., M. Garriga, M. T. Aymerich, J. M. Monfort, 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. Int. J. Bacteriol., 79, 322.
  13. Ito, Y., M. Yodoshi, J. I. Tanaka and M. Iwaida, 1979. Comparison of two methods and improvements for colorimetric determination of nitrite in cod roe. J. Food Prot., 42, 715.
  14. Jesen, L. B. and Paddock, L. S., 1940. Sausage treatment. U. S. Patent 2225783.

15. Kandler, O. and N. Weiss. 1984. Lactobacillus. In bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, 2, 1209.
16. Kang, D. H. and D. Y. C. Fung. 1999. Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. J. Food Prot., 62, 975.
17. Nurmi, E., 1966. Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage. Acta Agralia Fennica, 108, 1.
18. Pohja, M. S., 1960. Micrococci in fermented meat products. Acta Agralia Fennica, 96, 1.
19. Rheinbaben, K. and R. Hadlok. 1979. Differentiation of microorganisms of the family Micrococcaceae isolated from raw sausages. Fleischwirtschaft. 59(9), 1321.
20. Sameshima, T., C. Magome, K. Takeshita, K. Arihara, M. Itoh, Y. Kondo, 1998. Effect of intestinal Lactobacillus starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. Int. J. Food Microbiol., 41, 1.

## 제 4 절 분리 유산균 첨가 발효 소시지의 숙성 중 미생물학적 이화학적 변화

### Effect of selected mixed starter on the changes of microbiological and physico-chemical characteristics during fermentation of sausage

#### Abstract

Three isolated lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* N-2, *Pedococcus pentosaceus* N-3, N-4) from *kimchi* were used to make mixed starter. Effect of the mixed starter on microbiological and physico-chemical changes during fermentation of sausage was investigated compare with commercial starter to develop meat starter. The selected starter II (*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4) and starter I (*L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3) showed lower coliform bacterial count and higher hardness and cohesiveness than commercial starter in early stage of fermentation(4-7 days). The activities of selected starter was similar to commercial starter in changes of weight loss, lactic bacteria,  $A_w$ , and residual nitrite content during fermentation for 21 days. But pH range was 4.2~4.5 in selected starter I and II added sausage and 4.5~4.7 in commercial starter added sausage during fermentation. The ratio of nitrite depletion was about 98% in all treatments after fermentation for 21 days. Content of essential amino acid such as threonine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine and histidine in starter II added sausage much higher than in commercial starter and starter I added sausage after fermentation. Content of palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid and linoleic acid in starter II added sausage was higher than commercial starter added sausage after fermentation.

## 1. 서 론

발효 소시지는 세절한 원료육과 등지방, 식염, 발색제, 당류 및 향신료 등을 혼합하여 천연 또는 인조 casing에 충전시킨 후 가열처리를 하지 않고 일정기간 동안 숙성, 건조시켜 장기간의 보존성을 부여한 육제품의 일종으로 raw sausage라고도 부른다. 유럽에서는 대표적인 육제품의 하나인 발효 소시지는 그 종류가 다양하며 가열살균을 한 것과 가열살균을 하지 않고 발효, 숙성, 건조시킨 dry sausage로 분류하고 있다. Dry sausage중에서도 건조의 정도에 따라 dry sausage와 semi-dry sausage로 크게 분류하고 있다(Campbell-platt, 1995). 발효 소시지는 수분함량이 50% 이하가 되고 pH가 4.8~5.2 정도가 되도록 건조시켜 상온에서 유통이 가능하며 열처리를 하지 않고 먹을 수 있게끔 만든 제품이다(Zeuthen, 1995; Baldini 등, 1983). 유산균이 소시지 내에 있는 당을 분해하여 제품의 pH가 5.0이하로 떨어져 새콤한 맛을 내고 육 단백질이 산성에서 응고되어 조직이 굳어지므로 씹는 맛이 생기게 된다. 또한 유산균이 생성한 유산은 제품의 pH를 육 단백질의 등전점까지 낮추어 주므로 쉽게 건조되어 수분함량이 다른 소시지에 비하여 낮아진다. 낮아진 pH는 다른 부패성 미생물의 성장을 억제시켜 제품의 안정성을 증가시키는 역할을 하며 아울러 육 자체에 존재하는 효소들과 미생물들은 지방과 단백질을 분해시켜 발효 소시지 특유의 새콤한 맛(tangy flavor)을 갖게 한다(Lücke, 1985). 이러한 육제품은 식염 첨가와 건조에 의하여 수분활성도가 저하되고 육 자체의 당과 첨가한 당이 유산균에 의하여 유산 등의 유기산으로 분해되어 pH가 낮아져 부패성 미생물의 성장을 억제하므로 미생물에 대해 안전한 식품이 된다(Hammes 등, 1994; Bacus 등, 1988). 또한 발효 육제품 내의 유산균들은 첨가한 아질산염의 함량에 상관없이 성장하며 육제품 내의 아질산염은 발효 중 복합적인 영향을 받아 급히 소실되는 것으로 알려졌다(Tanaka 등, 1985 ; Palumbo 등, 1981). 아질산염은 과다한 양의 섭취는 인체 내에서 발암성을 나타내지만 섹택 형성과 *Clostridium botulinum*같은 식중독 미생물을 억제하기 위해 꼭 첨가되어야 할 성분이다. Zaika 등(1976)은 발효 육제품에서 질산염은 starter(*L. plantarum* + *P. pentosaceus*)의 영향으로 아질산염으로 환원되고 아질산염은 그 이상 분해되어 매우 적은 량만 잔존하였는데 섹택 형성에 필요한 질산염은 100ppm만으로도 충분하다고 보고한 바 있다. 따라서 starter로 사용되는 유산균은 발효와 함께 육제품의 발색 가

능 아질산염 량 이외의 육제품에 잔존하는 아질산염을 소거시켜 균일한 발효 육제품 생산과 아질산염에 대한 육제품의 안전성을 높이는 유산균의 일식이조의 효과를 기대할 수 있다. 한편, 발효 소시지 제조에 사용되는 starter는 단일 균주를 사용하는 것보다 혼합 균주를 사용하는 것이 제품품질 향상에 더 유리한 것으로 보고되고 있다(Liepe, 1983; Vignolo 등, 1989). 사용되는 미생물은 주로 lactobacilli, pediococci, micrococci, non pathogenic staphylococci등이 단독, 또는 혼합되어 발효 육제품 생산에 이용된다(Bacus, 1986; Gunilla 등, 1994).

본 실험은 그 우수성이 이미 입증된 김치에서 분리한 유산균을 혼합 균주로 사용하여 발효 소시지를 제조한 후 숙성 및 건조기간 중의 미생물학적, 이화학적 변화를 외국에서 사용하고 있는 상업용 혼합 균주(*Staphylococcus xylosum*+*P.pentosaceus*)와 비교하여 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 혼합 starter 첨가 발효 소시지의 제조

#### 1) 실험재료

##### ① 시료

원료육인 돼지고기와 지방은 축협 공판장에서 도축 후 48시간 이내의 ham 부위와 등지방을 구입하여 정형한 후 원료육으로 사용하였으며 white pepper, coriander등의 첨가물은 지역소매상에서 구입하였고 casing은 fibrous casing을 사용하였다.

##### ② 사용균주

Starter는 분리된 유산균을 이용하여 *Lactobacillus plantarum* N-2와 *Pediococcus pentosaceus* N-3을 혼합한 starter I과 *L. plantarum* N-2와 *P. pentosaceus* N-4를 혼합한 starter II를 제조하여 사용하였다. 각각의 유산균은 37℃에서 24시간 배양한 후 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 후 buffer로 현탁액을 제조하였다. 현탁액을 이용

하여 2종류의 starter를 조제하였으며 균의 농도가 각각 약  $10^7$ CFU/ml가 되도록 조정된 후 사용하였다. 상업용 starter인 SP(*Staphylococcus xylosum* + *P. pentosaceus*)는 냉동상태에서 보관하였으며 실험 때마다  $10^7$ CFU/g의 균농도가 되도록 살균 phosphate buffer에 현탁시켜 사용하였다. 발효 소시지 제조시 사용한 starter 현탁액은 Fig 1에 나타내었다.



**Fig 1. Photographs of starters made by suspension of lactic acid bacteria isolated from *kimchi* for fermented sausage.**

## 2) 발효 소시지의 제조 및 숙성

원료육과 돼지 등지방을 각각  $5 \times 3 \times 3$ cm로 절단한 후  $-20^\circ\text{C}$ 에서 1주일 이상 냉동하였다가 가공 직전 세절이 용이하도록  $-5^\circ\text{C}$  전후로 조절하여 발효 소시지 제조에 사용하였다. 김치에서 분리한 유산균을 이용한 발효 소시지의 제조는 Table 1과 같은 배합으로 제조하였다. Tumbler에서 세절된 육과 향신료 등과 혼합된 소시지 혼합물에 각각의 준비한 starter를 접종시키고 stuffer를 이용하여 fibrous casing에 약 200g씩 충전시켰다. 그리고 신(1984)의 방법에 따라 온습도가 조절되는 chamber에서 21일간 숙성과 건조를 하였고 그 조건은 Table 2와 같다.

**Table 1. Formula used for the production of fermented sausage**

Ingredients	Amount(g)	Content(%)
Pork	10,000	80
Fat	2,500	20
NaCl	350	2.8
Glucose	125	1
NaNO <sub>2</sub>	1.875	0.015
L-ascorbic acid	6.25	0.05
White pepper	37.5	0.3
Allspice	12.5	0.1
Nutmeg	6.25	0.05
Sage	6.25	0.05
Starter culture		
Starter I	<i>Lactobacillus plantarum</i> N-2 + <i>Pediococcus pentosaceus</i> N-3	
Starter II	<i>Lactobacillus plantarum</i> N-2 + <i>Pediococcus pentosaceus</i> N-4	
SP	<i>Staphylococcus xylosum</i> + <i>Pediococcus pentosaceus</i>	

**Table 2. Ripening condition of dry sausage during fermentation**

Time(Days)	Temperature(℃)	Relative humidity(%)
1	22~24	94~96
2	21~22	90~92
3	18~20	85~88
4~21	12~15	75~80

나. 유산균 starter 첨가 발효 소시지의 숙성 중 미생물학적 변화 측정

시료 10g을 무균적으로 채취하여 90ml의 0.1% peptone solution을 넣고 stomacher(Lab blender model 400, TMC Co.)에서 균질시킨 다음 균질액 1ml를 무균적으로 적정 희석하여 유산균수는 MRS agar, coliform bacteria는 violet red bile agar를 이용하여 pour plate method로 37℃에서 24시간 배양하여 생성된 colony 수를 측정하였다.

다. 유산균 starter 첨가 발효 소시지의 숙성 중 이화학적 변화 측정

1) 숙성 중 중량감소를 변화

중량감소는 소시지 제조 직후의 중량과 경시적 측정시의 중량차를 백분율로 계산하여 산출하였다.

$$\text{무게감량(\%)} = \frac{\text{제조직후의 중량} - \text{측정시의 중량}}{\text{제조직후의 중량}} \times 100$$

2) 숙성 중 pH 변화

pH는 시료 10g에 90ml의 증류수를 넣고 stomacher에서 균질화한 후 pH meter로 측정하였다.

3) 숙성 중 수분활성도 변화

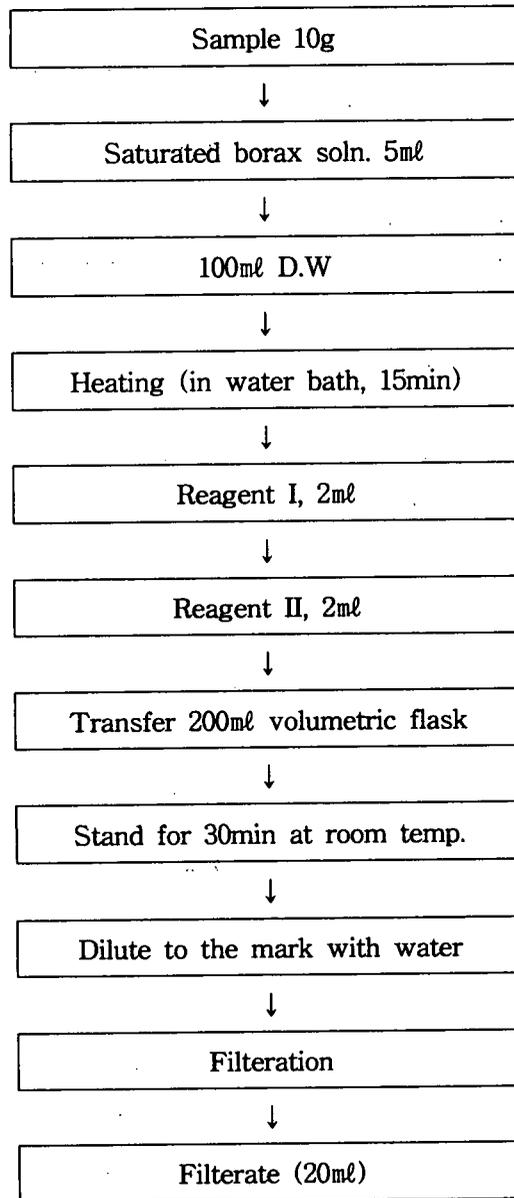
수분활성도는 시료를 균질한 후 Aw 측정기(Novasina Co., Switzerland)로 25℃에서 수분 분압에 의한 항량이 도달될 시 상대습도 값으로 측정하였다.

4) 숙성 중 잔존 아질산염 변화

발효 소시지 내의 잔존 아질산염 정량은 시료 10g을 전 처리하여 얻은 상등액 20ml를 sample로 하여 Ito 등(1979)의 방법에 따라 비색정량하였고 시약조제와 시료 전 처리를 Table 3, Scheme 1과 같이 실시하였다.

**Table 3. Preparation of reagent using sample pre-treatment**

Reagent	Procedure
Reagent I	Dissolve 106g of potassium ferrocyanide trihydrate( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ) in water and dilute to 1,000ml
Reagent II	Dissolve 220g of zinc acetate dihydrate( $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ) and 30ml of glacial acetic acid in water and dilute to 1,000ml
Borax solution	Dissolve 50g of sodium tetraborate decahydrate( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) in 1,000ml of tepid water and cool to room temperature



**Scheme 1. Preparation of fermented sausage for experiment.**

5) 숙성 중 육색 변화

육색은 세절한 시료를 color difference meter(CR 200 Minolta, Japan)를 이용하여 L, a 값을 측정하였다.

#### 6) 텍스처 측정

springiness(탄성), cohesiveness(응집성), hardness(견고성) 그리고 strength(강도) 등은 시료를 1cm 두께로 자른 다음 Rheometer(Model CR-100, SUN SCIENTIFIC Co. Japan)를 이용하여 측정하였다.

#### 7) 지방산과 유리아미노산 측정

지방산은 Morrison과 Smith 그리고, A.O.A.C. 방법에 준하여 분석하였다. 분쇄된 시료 1g 당 혼합추출 유기용매(chloroform:methanol=2:1) 60ml를 가한 후 균질기로 3분간 교반하고 여지(whatman No 2)로 여과하여 지질을 추출하는 과정을 3회 반복하였다. 추출된 여액의 1/3에 해당하는 증류수를 가한 다음 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하였으며, 하층 용액은 40℃ 이하에서 감압농축시킨 후 얻은 10mg의 순수한 지방을 0.5N methanol-NaOH용액(2g NaOH/100ml methanol) 2ml를 가한 후 5분간 가열하여 냉각하였다. 냉각된 시료에 BF<sub>3</sub>-methanol 용액 4ml를 가하고 다시 30분간 가열한 후 실온에서 완전히 냉각한 다음, 2ml의 2,2,4-trimethyl pentane을 가하여 교반하고 NaCl 포화용액 5ml를 가하여 1분간 혼합하고 30분간 정치한 후 상층액을 취하여 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 수분을 제거한 후 GC에 주입하여 분석하였다. 각 지방산의 동정은 표준지방산(Sigma, U.S.A.)을 사용하여 머무름 시간과 비교하였다. 분석조건은 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Specification and operating conditions of GC for fatty acid analysis.

Instrument	DS 6200(Donam, Korea)
Column	DB-FFAP(0.53mm×30m)
Detector	Flame Ionization Detector
Oven temperature	165℃ ~ 3℃/min ~ 230℃(3min)
Injector temperature	250℃
Detector temperature	270℃
Carrier gas · flow rate	N <sub>2</sub> (10psi)
Injection volume	0.6μl
Software	dsCHROM plus

유리아미노산 함량은 amino acid analyzer로 측정하였다.

다. 통계처리

통계처리는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 Duncan's multiple test에 따라 유의성을 검정하였다.

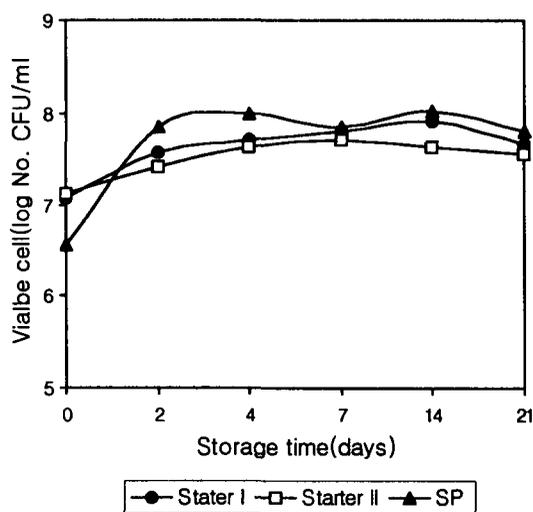
### 3. 결과 및 고찰

가. 유산균 starter 첨가 발효 소시지의 숙성 중 미생물학적 변화

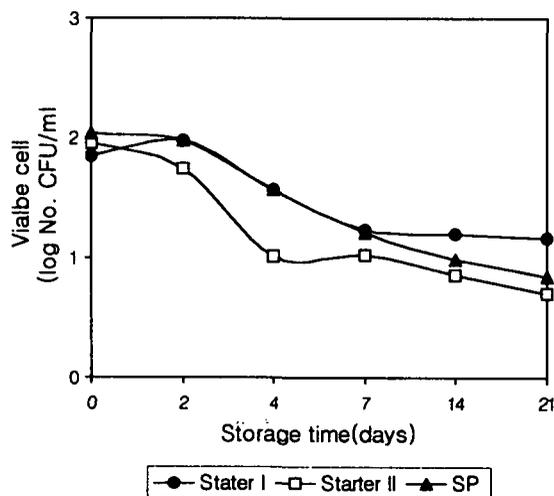
유산균 starter를 첨가하여 제조한 발효 소시지의 숙성 중 유산균수의 변화는 Fig 2.에서 보는 바와 같다. Starter 첨가구의 유산균수는 숙성 초기  $10^7$  CFU/ml를 나타내었고 숙성 말기까지 그 수가 다소의 증가가 보였으나 거의 일정하게 유지되는 것으로 관찰되었다.

Starter간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 Leistner 등 (1981)이 발효 소시지 숙성 초기 유산균의 빠른 증식이 소시지 숙성 초기에 오염균으로 우려되는 gram 음성 세균의 증식을 억제하므로 최종 육제품의 미생물학적 안전성에 기여한다는 보고를 한 바 있어 본 실험결과와 유사한 경향을 나타내었다. 유산균수는 숙성 초기에 그 수가  $10^3$  CFU/ml로 낮았으나 숙성 2일 후 증가하여 숙성말기에는  $10^7$  CFU/ml로 나타났으나 이는 육 내에 존재하는 유산균이 성장한 것으로 판단되었다.

발효 소시지 숙성 중의 대장균군수 변화를 나타낸 결과는 Fig 3과 같다. 숙성 초기 대장균군수는  $10^2$  CFU/ml로 모두 유사하게 나타났으나 숙성이 진행될수록 starter 첨가구의 대장균군수는 감소하는 경향을 보였다. 이는 대장균군이 낮은 pH에서는 성장이 불리하기 때문에 발효 소시지내의 starter에 의해 생성된 유산의 영향으로 성장이 억제되는 것으로 판단되었다(박, 1996). 이러한 결과는 Roca 등(1989)이 starter의 발효 소시지내의 Enterobacteriaceae에 대한 antagonistic effect를 가진다고 보고한 연구결과와 유사하였으며 또한 Ünlütürk 등(1991)이 보고한 터키의 발효소시지 종류인 Soudjuk 숙성동안 coliform의 수가 감소하였다는 연구결과와 동일한 경향을 나타내었다.



**Fig 2.** Changes in number of lactic acid bacteria in fermented sausage with different starter cultures during ripening for 21 days. Starter I ; *Lactobacillus plantarum* N-2 + *Pediococcus pentosaceus* N-3, Starter II ; *Lactobacillus plantarum* N-2 + *Pediococcus pentosaceus* N-4, SP ; *Staphylococcus xylosus* + *Pediococcus pentosaceus*



**Fig 3.** Changes in number of coliform bacteria in fermented sausage with different starter cultures during ripening for 21 days. all abbreviations are the same as Fig 1.

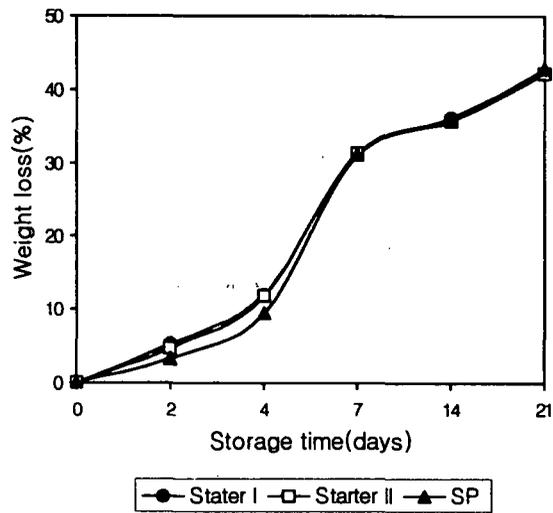
## 나. 유산균 starter 첨가 발효 소시지의 숙성 중 이화학적 변화

### 1) 숙성 중 중량감소율 변화

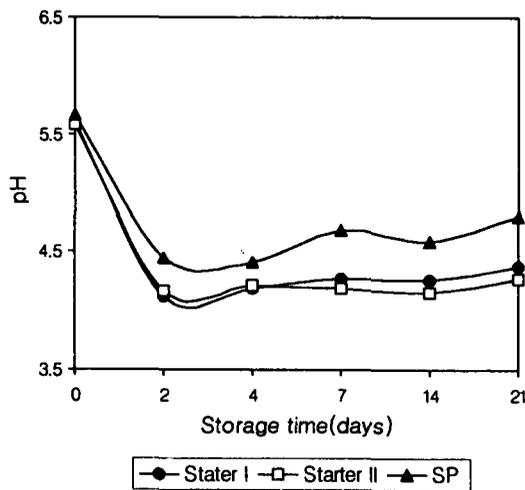
starter를 첨가하여 제조한 발효 소시지를 21일 동안 숙성시키면서 중량감소의 변화를 측정한 결과는 Fig 4와 같다. 숙성 2일째에는 중량감소율이 starter I, starter II를 첨가한 소시지의 경우 가장 높게 나타났으며 상업용 균주(SP)의 경우에는 더 낮게 나타났다. 발효 소시지는 숙성 중 pH가 낮아짐에 따라 보수력이 감소하므로 수분 활성도와 pH가 낮은 처리구일수록 중량감소 역시 높은 수치를 나타내었다. 이는 박(1996)의 연구결과와도 일치하는 결과였다.

### 2) 숙성 중 pH 변화

분리 유산균을 starter로 사용하여 제조한 발효 소시지의 숙성 중 pH 변화를 측정한 결과는 Fig 5와 같다. 숙성 초기 소시지의 pH는 5.6정도로 높게 나타났으나 숙성 2일째 starter I과 starter II 처리구는 급격히 감소하여 4.1정도를 나타내었으며 상업용 균주 처리구도 4.4정도로 pH가 감소하였다. 숙성 말기 21일째에는 starter I과 II로 제조한 소시지의 pH는 4.5이하를 유지한 반면 상업용 균주로 제조한 소시지의 pH는 4.5이상을 나타내었다. 이는 *Lactobacilli*가 비교적 빠른 산 생성을 유도하는 성장특성을 가지며 *pediococci*는 좋은 풍미를 유도하기는 하나 다소 높은 pH를 나타낸다는 Christian Hansen(1991)의 연구결과와 일치하였다. 따라서 starter I과 II를 starter로 사용하여 발효 소시지를 제조할 경우 빠른 발효를 유도하여 유산생성에 의한 유해 미생물의 성장 억제효과와 아울러 소시지 제조시간을 단축시킬 수 있을 것으로 사료된다.



**Fig 4. Change in weight loss of fermented sausage with different starter cultures during ripening for 21 days. all abbreviations are the same as Fig 1.**



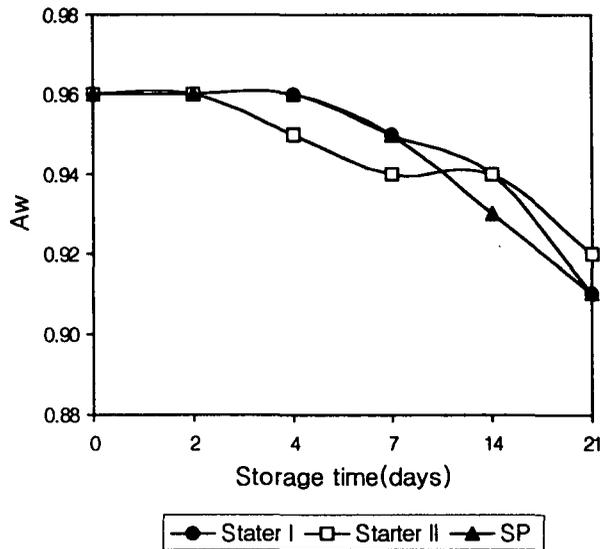
**Fig 5. Change in pH of fermented sausage with different starter cultures during ripening for 21 days. all abbreviations are the same as Fig 1.**

### 3) 숙성 중 수분 활성도 변화

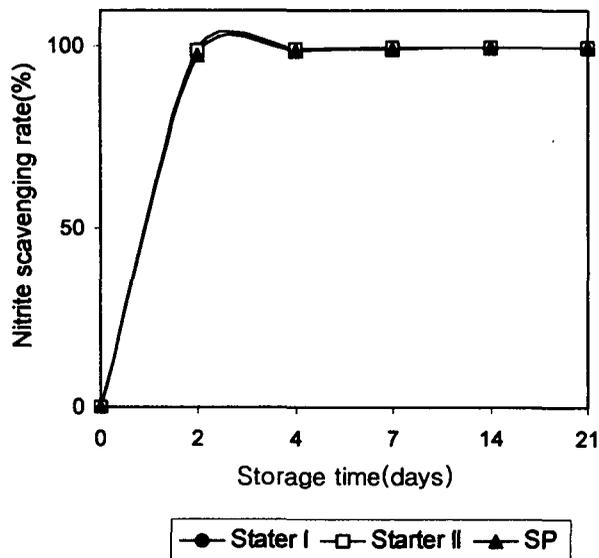
유산균 starter를 첨가하여 제조한 발효 소시지의 숙성 중 수분활성도 변화를 측정된 결과는 Fig 6에 나타난 바와 같다. 숙성 초기 모든 처리구가 0.96의 수분 활성도를 나타내었으나 숙성이 진행됨에 따라 그 수치는 감소되었다. 특히 starter II로 제조된 발효 소시지의 수분 활성도는 다른 starter 처리구의 발효 소시지의 수분활성도보다 숙성 7일째까지 낮은 경향을 보였으나 숙성말기 starter 처리구간의 유의적인 차이는 없었다. 수분 활성도는 pH가 감소됨에 따라 육의 보수력이 낮아져 건조가 더욱 용이하게 됨으로 인해 낮아진다. 따라서 pH가 낮은 발효 소시지가 수분 활성도도 낮게 나타난 것으로 판단되었다. 박 (1996)의 연구결과에 의하면 발효 소시지 숙성 21일째 수분활성도가 0.80까지 낮아진다고 하였으나 본 실험에서는 숙성 말기 수분 활성도가 약 0.9정도로 나타났다. 이는 사용한 starter의 종류가 달랐기 때문인 것으로 사료되었다.

### 4) 숙성 중 잔존 아질산염 변화

starter를 첨가하여 제조한 발효 소시지의 숙성 중 잔존 아질산염 소거율을 측정된 결과는 Fig 7에 나타난 바와 같다. 아질산염 소거율은 숙성 2일째 급격히 증가하여 starter I과 starter II의 경우 잔존 아질산염량은 2.47ppm으로 나타났으나 상업용 균주의 경우 5.47ppm을 나타내었다. 숙성 4일째 starter I과 starter II의 잔존 아질산염량은 각각 1.5ppm, 1.55 ppm으로 나타났으나 상업용 균주의 경우 2.54ppm으로 관찰되어 높은 경향을 보였다. 숙성 21일째 starter I, starter II, 상업용 균주의 경우 각각 0.88, 1.01, 1.17ppm으로 나타나 아질산염이 거의 소거된 것으로 판단되었다. 숙성 말기 starter간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.



**Fig 6.** Change in Aw of fermented sausage with different starter cultures during ripening for 21 days. all abbreviations are the same as Fig 1.



**Fig 7.** Change in residual nitrite content of fermented sausage with different starter cultures during ripening for 21 days. all abbreviations are the same as Fig 1.

### 5) 숙성 중 육색 변화

선발된 혼합 starter를 첨가하여 제조한 발효 sausage의 숙성 중 색의 변화는 Table 4에 나타난 바와 같다. L 값은 모든 starter에서 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였다. 숙성 말기 52.89, 54.22, 54.28로 나타나 숙성 말기 육색의 감소가 두드러졌다. a 값의 경우 숙성 2일째 starter 각각 11.29, 10.43, 11.09의 높은 적색도를 나타내었으나 숙성 4일째 적색도가 낮아져 숙성 14일째 10.35, 10.74, 10.95를 나타내어 상업용 균주와 분리 유산균 starter가 유사한 경향을 나타내었다.

**Table 4. Changes of color value in fermented sausages with different starter during ripening**

Color value	Starter culture*	Ripening time(days)			
		2	4	7	14
L	starter I	58.78 <sup>a</sup>	61.94 <sup>b</sup>	55.34 <sup>a</sup>	52.89 <sup>a</sup>
	starter II	61.52 <sup>c</sup>	58.71 <sup>a</sup>	58.01	54.22 <sup>b</sup>
	SP	60.06 <sup>b</sup>	61.88 <sup>b</sup>	55.47 <sup>b</sup>	54.28 <sup>b</sup>
a	starter I	11.29 <sup>c</sup>	10.94 <sup>b</sup>	10.93 <sup>b</sup>	10.35 <sup>a</sup>
	starter II	10.43 <sup>a</sup>	10.94 <sup>b</sup>	10.62 <sup>a</sup>	10.74 <sup>ab</sup>
	SP	11.09 <sup>b</sup>	10.74 <sup>a</sup>	11.40 <sup>c</sup>	10.95 <sup>b</sup>

\*starter I ; *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-3  
 starter II ; *L. plantarum* N-2 + *P. pentosaceus* N-4  
 SP ; *Staph. xylosus* + *P. pentosaceus*

### 6) 숙성 중 texture 변화

각 starter 별로 발효 소시지를 제조하여 14일 동안 조직감을 측정한 결과는 Table 5와 같다. Table 5에서 보는 바와 같이 모든 처리구에서 hardness, strength는 숙성이 진행됨에 따라 증가하는 경향을 나타내었고 springiness, cohesiveness의 경우에는 숙성 7일째까지 증가하다가 숙성 14일째 다소 감소하

는 경향을 보였다. hardness의 경우에는 숙성 초기 starter 각각 3.36, 3.56, 3.04를 나타내어 분리 유산균 starter가 상업용 균주보다 더 높은 경향을 보여 분리 유산균 starter가 유산 생성력이 다소 좋았기 때문인 것으로 판단되었다. Klettner와 List(1980) 발효 초기 산도의 증가가 hardness의 향상에 기여한다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 숙성 14일째는 8.66, 8.59, 8.69로 나타나 숙성이 진행됨에 따라 증가하는 경향을 나타내어 분리 유산균 starter와 상업용 균주와 유의적인 차이는 보이지 않았다.

**Table 5. Changes of texture in fermented sausages with different starter during ripening**

Ripening time (days)	Starter culture*	Hardness (Kg)	Springiness (mm)	Cohesiveness	Strength
4	starter I	3.36 <sup>b</sup>	67.70 <sup>a</sup>	59.50 <sup>a</sup>	1.62 <sup>c</sup>
	starter II	3.56 <sup>c</sup>	76.84 <sup>c</sup>	75.54 <sup>c</sup>	1.01 <sup>b</sup>
	SP	3.04 <sup>a</sup>	74.78 <sup>b</sup>	67.63 <sup>b</sup>	0.81 <sup>a</sup>
7	starter I	6.48 <sup>b</sup>	83.70 <sup>b</sup>	75.73 <sup>b</sup>	1.51 <sup>a</sup>
	starter II	6.86 <sup>c</sup>	84.30 <sup>c</sup>	76.02 <sup>c</sup>	2.49 <sup>c</sup>
	SP	6.25 <sup>a</sup>	83.00 <sup>a</sup>	73.64 <sup>a</sup>	1.88 <sup>b</sup>
14	starter I	8.66 <sup>a</sup>	77.78 <sup>c</sup>	72.63 <sup>b</sup>	2.34 <sup>b</sup>
	starter II	8.59 <sup>a</sup>	73.21 <sup>b</sup>	73.21 <sup>c</sup>	2.50 <sup>c</sup>
	SP	8.69 <sup>a</sup>	65.07 <sup>a</sup>	65.07 <sup>a</sup>	2.05 <sup>a</sup>

\*all abbreviations are the same as Table 4.

#### 7) 숙성 중 유리 아미노산 변화

각각의 starter를 첨가한 발효 소시지를 제조하여 숙성시키면서 발효 0일째와 14일째 유리 아미노산의 변화를 측정된 결과는 Table 6에 나타난 바와 같다. 숙성 14일째 유리 아미노산의 양을 측정된 결과 대부분의 유리 아미노산은 숙성

기간이 지날수록 증가하는 경향을 나타내었고 특히 starter II로 제조한 발효 소시지의 경우 상업용 균주를 사용한 경우보다 발효 14일째 필수 아미노산인 Threonine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, histidine의 증가가 두드러졌다. 특히 leucine, phenylalanine은 starter II가 상업용 균주보다 약 2배 많은 것으로 관찰되었다. 총 유리 아미노산의 경우에도 starter II이 발효 14일째 3398.43으로 가장 많은 양의 유리 아미노산을 나타내었으며 상업용 균주는 2135.63, starter I은 1975.79로 나타났다. 유리 아미노산은 육 단백질이 protease에 의하여 분해되어 생성되는 물질로서 발효 소시지의 풍미와 맛의 증진에 기여한다. 본 실험에서 유리 아미노산의 함량은 starter II, 상업용 균주, starter, starter I의 순으로 나타나 본 시험에서 분리한 유산균 starter의 정미성분 생성이 상업용 균주보다 더 좋은 것으로 판단되었다. 따라서 상업용 균주 대신 분리 유산균 starter로 발효 소시지를 제조하여도 무방할 것으로 판단되었다.

**Table 6. Changes of free amino acid composition in fermented sausages with different starter during ripening**

(unit : mg/100g)

Starter culture* AFF \ Days	Starter I		Starter II		SP	
	0	14	0	14	0	14
Aspartic acid	8.94	85.99	9.42	108.93	14.45	72.13
Threonine	11.82	93.19	14.05	148.28	15.52	102.45
Serine	14.46	64.64	19.23	111.91	20.98	81.36
Glutamic acid	25.19	220.57	43.18	406.60	38.85	294.68
Proline	14.54	33.51	30.48	56.88	28.57	34.48
Glycine	26.43	99.63	34.77	161.63	35.35	93.90
Alanine	77.28	213.27	112.26	290.39	106.47	219.44
Valine	13.51	88.65	16.12	191.58	18.06	127.06
Cystine	5.40	2.47	14.26	6.61	10.12	3.81
Methionine	14.82	111.35	16.28	233.65	19.64	119.66
Isoleucine	21.46	102.36	32.12	224.07	32.39	117.93
Leucine	32.44	260.94	41.00	456.61	44.38	314.34
Tyrosine	11.86	60.56	14.04	142.62	16.45	81.69
Phenylalanine	26.51	131.41	38.02	361.30	39.02	155.91
Lysine	23.22	215.66	27.51	333.53	27.74	249.76
Histidine	6.21	46.24	4.67	96.27	6.89	60.50
Arginine	15.40	147.82	19.65	167.57	5.77	6.55
Total	349.49	1975.79	487.02	3398.43	480.65	2135.63

\*all abbreviations are the same as Table 4.

#### 8) 숙성 중 지방산 변화

각 starter별로 발효 소시지를 제조하여 숙성과정을 거치면서 발효 0일째와 14일째 지방산의 변화를 측정된 결과는 Table 7과 같다. Palmitoleic acid의 경우 starter I, II의 경우 발효 초기에 비해 발효 말기에 증가한 경향을 나타내었으나 상업용 균주의 경우에는 감소하는 것으로 관찰되었다. 또한 stearic acid의 경우에도 starter I, II 모두 발효 말기 증가하였으나 상업용 균주의 경우에는 감소하여 가장 작은 양을 보였다. Oleic acid는 starter 모두 증가하는 경향을 나타내었으며 특히 starter II의 경우 가장 많은 양을 나타내었다. Linoleic acid의 경우, starter I의 경우 발효 말기에 감소한 반면, starter II와 상업용 균주는 발효 말기 증가하는 경향을 나타내었으며 특히 starter II가 많은 양을 나타내었다. 총 포화 지방산의 양은 starter I, II가 상업용 균주보다 많이 검출되었으나 불포화지방산은 상업용 균주의 경우 분리 유산균 starter보다 많은 경향을 나타내었다. 그러나 oleic acid와 필수 지방산인 linoleic acid의 경우 상업용 균주보다 starter II로 제조한 발효 소시지에서 오히려 더 많이 검출되었다. 정(1984)의 연구에서도 발효 ham에서 oleic acid가 가장 많이 검출되었다고 보고한 바 있어 본 실험과 동일한 결과를 나타내었다. 따라서 상업용 균주보다 본 실험에서 분리한 유산균 starter로 발효 소시지를 제조하는것이 필수 지방산의 생성량에 있어서 더 좋은 것으로 판단되었다. 유리 지방산은 ketone, aldehydes와 alcohol류 등으로 분해되어 발효 소시지의 맛과 향 증진에 기여한다(Stahnke, 1994). 발효 소시지에 있어서 지방산의 조성과 함량은 starter의 특성, 원부재료의 종류와 양 등에 따라서 많은 차이가 있는 것으로 Fernandez 등(1991)은 보고한 바 있다.

**Table 7. Changes of free fatty acid composition in fermented sausages with different starter during ripening**

(unit : %)

Starter culture* F.A\Days	starter I		starter II		SP	
	0	14	0	14	0	14
14:0	2.30	2.61	2.55	2.20	3.61	2.30
15:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16:0	37.25	43.03	42.08	35.90	59.62	38.16
16:1	0.30	1.37	0.78	1.50	1.45	0.68
18:0	18.80	21.71	15.98	18.19	30.35	0.61
18:1	11.15	27.43	0.96	37.56	1.75	19.99
18:2	3.00	0.20	0.22	3.90	0.31	3.49
18:3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20:1	27.21	2.00	36.91	0.76	2.92	34.77
22:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23:0	ND	1.65	0.51	ND	ND	ND
24:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SFA <sup>1)</sup>	58.34	69.00	61.12	56.28	93.58	41.07
USFA <sup>2)</sup>	41.66	31.00	38.88	43.72	6.42	58.93

\*all abbreviations are the same as Table 4.

<sup>1)</sup>SFA : saturated fatty acid

<sup>2)</sup>USFA : unsaturated fatty acid

ND : not detected

이상의 결과를 종합해 볼 때 김치에서 분리한 유산균 starter를 발효 소시지 제조에 사용할 경우 산 생성능이 뛰어나 상업용 균주로 제조하는 것 보다 발효 시간을 단축시키며 아질산염 잔존량도 발효 초기에 상업용 균주보다 낮은 것으로 나타났다. 또한 여러 다른 항목에서도 상업용 균주와 유사한 결과를 보여 유럽에서 많이 사용되는 상업용 균주인 SP starter에 못지 않은 기능을 갖춘 것으로 판단되어 현재 수입되어 사용되고 있는 발효 육제품 starter의 국산화에도 기여할 것으로 기대된다.

#### 4. 요약

본 실험은 그 우수성이 이미 입증된 김치에서 분리한 유산균을 혼합 균주로 사용하여 발효 소시지를 제조한 후 숙성 및 건조기간 중의 미생물학적, 이화학적 변화를 외국에서 사용하고 있는 상업용 혼합 균주(*Staphylococcus xylosus*+*Pediococcus pentosaceus*)와 비교하여 meat starter로서의 사용 가능성을 검토하기 위하여 수행되었다.

1. starter를 첨가하여 제조, 숙성한 발효 소시지의 미생물학적 변화를 관찰한 결과 유산균수의 경우 모든 발효 소시지에서 발효 2일째  $10^8$  CFU/ml를 나타내어 발효 전기간 그 수가 유지되었고 대장균군수의 경우 발효가 진행될수록 감소되는 경향을 보였다. 특히 starter II의 경우 발효 4일째  $10^1$  CFU/ml의 낮은 대장균군수를 나타내었다.
2. starter를 첨가하여 제조 숙성한 발효 소시지의 이화학적 변화를 관찰한 결과
  - 중량감소율은 발효 2일째까지 starter I과 starter II를 첨가하여 제조한 발효 소시지가 상업용 균주를 첨가하여 제조한 발효 소시지보다 중량 감소율이 큰 것으로 관찰되었으나 발효가 진행됨에 따라 유사한 경향을 보였다.
  - pH의 경우에는 발효 전 기간 상업용 균주, starter I, starter II의 순으로 낮은 경향을 보여 본 실험에서 분리한 유산균 starter가 뛰어난 유산 생성 능이 있는 것으로 판단되었다.
  - 수분활성도의 경우 발효 초기 유사한 경향을 보였으나 발효 4일째 부터 starter II로 제조한 발효 소시지의 수분활성도가 감소하여 발효 14일째 starter I과 유사한 경향을 보였으나 발효 말기에는 유의적 차를 보이지 않았다.
  - 아질산염 소거율은 발효 2일째 상업용 균주보다 starter I, starter II의 소거율이 다소 높았으나 유의적인 차이는 없었으며 발효 말기 아질산염 소거율은 거의 유사한 경향을 나타내었다.
  - 육색 변화는 적색도의 경우 발효 말기 분리 유산균 starter와 상업용 균주가 유사한 경향을 나타내었다.
  - Texture의 변화는 hardness의 경우 발효 초기 starter 첨가구가 상업용 균주보다 높은 것으로 관찰되어 발효 소시지 제조기간을 단축시킬 수 있을

것으로 판단되었다.

- 발효 14일 짜 유리 아미노산량의 경우 starter II로 제조한 발효 소시지가 상업용 균주로 제조한 것보다 필수 아미노산의 양이 더 많은 것으로 나타났다으며 starter I도 비교적 많은 것으로 관찰되었다.
- 발효 14일짜 유리 지방산을 측정된 결과 분리 유산균 starter가 oleic acid와 linoleic acid를 비롯한 myristic acid, palmitic acid, stearic acid의 양은 더 많은 것으로 관찰되었다.

## 5. 문 헌

1. Bacus, J. N. and W. L. Brown, 1981. Use of microbial cultures : meat products. Food Technol. 35(1), 74, 83.
2. Bacus, J. N. and W. L. Brown, 1988. The Lactobacilli ; Meat products. In bacterial starter cultures for food. CRC. 57.
3. Baldini, P., F. Palmia and R. G. Raczynski, 1983. Effect of chemical and physico-chemical properties of sausage mixed on decrease of pH and weight loss during ripening of typical Italian salamis, Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers, No, 29, 189.
4. Blickstad, E. and G. Molin. 1981. Growth and lactic acid production of *Pediococcus pentosaceus* at different gas environments, temperatures, pH values and nitrite concentration. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13, 170.
5. Campbell-platt, G., 1995. Fermented meats. A world perspective, Fermented meats, Blakie Academic & Professional Press, UK, 39.  
Chr. Hansen. 1991. FloraCarn meat cultures. GB-0691.
6. Dominguez Fernandez, M. C., J. M. Zumalacarregui Rodriguez. 1991. Lipolytic and oxidative change in 'Chorizo' during ripening. Meat Sci., 29, 99.
7. Egan, A. F. 1983. Lactic acid bacteria of meat and meat products. Antonie Van Leeuwenhoek. 49(3), 327.
8. Everson, C. W., W. D. Danner and P. A. Hammes. 1970. Bacterial starter cultures in sausage products. J. Agric. Food Chem. 18(4), 570.
9. Gryczka, A. J. and R. B. Shah. 1979. Process for the treatment of meat with compositions including *Micrococcus varians* and lactic acid

- producing bacteria. U. S. Patent. 4, 147, 807.
10. Gunilla Johansson, Berdague, J. L., M. Larsson, N. Tran and E. Borch. 1994. Lipolysis proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Sci*, 38, 203.
  11. Hammes, W. P. and Knauf, H. J., Starters in the processing of meat products. *Meat Sci.*, 36, 155.
  12. Haymon, L. W. 1984. New developments in starter cultures. Proceedings of the meat industry Research Conference, American Meat Institute.
  13. Ito, Y., M. Yodoshi, J. I. Tanaka and M. Iwaida, 1979. Comparison of two methods and improvements for colorimetric determination of nitrite in cod roe. *J. Food Prot.* 42, 715.
  14. Liepe, H. U. 1983. Starter cultures in meat production. *Biotechnology*, 5, 399.
  15. Lücke, F. K., 1984. Fermented sausages - Microbiology of fermented food. ed., by Wood B. J. B, Elsevier Applied Science Pub., London, 41.
  16. Nurmi, E., 1966. Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage. *Acta Agralia Fennica*, 108, 1.
  17. Pohja, M. S., 1960. Micrococci in fermented meat products. *Acta Agralia Fennica*, 96, 1.
  18. Smith, J. L. and S. A. Palumbo. 1981. Microorganisms as food additives. *J. Food Prot.* 44(12), 936.
  19. Stahnke, L. H., 1994. Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Sci.*, 38, 39.
  20. Vignolo, G. M., de Ruiz Holgado, A. P. and Oliver, G. 1989. Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages. *J. Food Prot.* 52, 787.
  21. Zeuthen, P., 1995. Historical aspects of meat fermentations, *Fermented meats*, Blakie Academic & Professional Press, UK, 55.
  22. 박우문, 1996. 발효식품으로부터 분리한 균주로 제조한 발효 소시지의 특성. 중앙대학교 박사학위논문.
  23. 신현길, 1984. Raw sausage(salami-type)의 제조, 한국식육연구회지. 5, 35.
  24. 정영건, 1984. 유산균 접종에 의한 염지 ham의 이화학 및 조직학적 특성에 관한 연구. 경상대학교 박사학위논문.

# 부 록

여 백

## 부 록

### 1. 선발된 천연추출물의 항산화성 및 항균성 검토

○ 항산화성(전자공여능을 중심으로)

선발된 천연추출물(솔잎, 녹차, 오미자)의 항산화성은 우수함.

표1. 농도별 천연 추출물의 전자공여능 비교

천연물	농도(%)	전자공여능(%)
솔잎(열수)	0.1	54.8±2.27
	0.3	58.8±1.08
솔잎(에탄올)	0.1	84.1±0.12
	0.3	85.7±0.82
녹차(열수)	0.1	53.9±2.08
	0.3	55.4±2.45
녹차(에탄올)	0.1	95.3±0.20
	0.3	96.9±0.90
오미자(열수)	0.1	50.3±1.86
	0.3	54.0±3.23
오미자(에탄올)	0.1	77.7±1.77
	0.3	80.7±3.41

○ 항균성

병원성 미생물에 대한 항균력은 에탄올 추출물(오미자, 솔잎, 녹차)에서 우수함

표2. 병원성 미생물에 대한 천연 추출물의 항균력

병원성 세균	오미자		솔잎		녹차	
	열수	에탄올	열수	에탄올	열수	에탄올
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	×	○	×	○	×	○
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775,	×	○	×	○	×	○
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19737	×	○	×	○	×	○
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	×	○	×	○	×	○
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	×	○	×	○	×	○

○:있음, ×: 없음

## 2. 고기능성 육제품의 가공적성 검토

- 천연물 첨가 소시지의 유화안정성  
천연추출물의 첨가량이 0.3% 농도로 첨가되어도 육제품의 가공적성에는 영향을 미치지 않음.
- 발효 소시지 제조용 종균 조건  
유산균 *L. plantarum*과 *P. pentosaceus*는 산 생성능과 염내성, 아질산염에 대한 내성이 우수하여 발효 소시지용 종균 조건에 적합함.

## 3. 고기능성 육제품 개발

가. 발효 소시지의 경우

### 1) 배합비

혼합 종균의 배합비는 1:1일 때 아질산염 소거능이 가장 높았음.

표3. 발효 소시지의 배합비

성분	중량(g)	백분율(%)
돼지고기	10,000	80
지방	2,500	20
소금	350	2.8
Glucose	125	1
아질산염	1.875	0.015
L-ascorbic acid	6.25	0.05
백후추	37.5	0.3
Allspice	12.5	0.1
Nutmeg	6.25	0.05
Sage	6.25	0.05
발효종균		
종균 I	<i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Pediococcus pentosaceus</i> N-3	
종균 II	<i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Pediococcus pentosaceus</i> N-4	

2) 제조공정

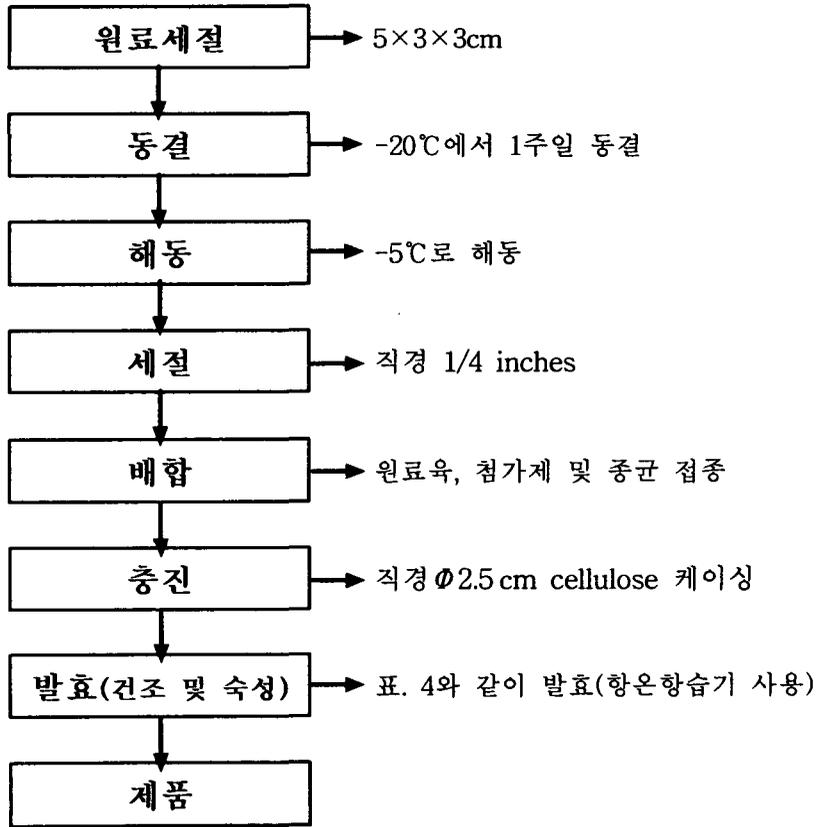


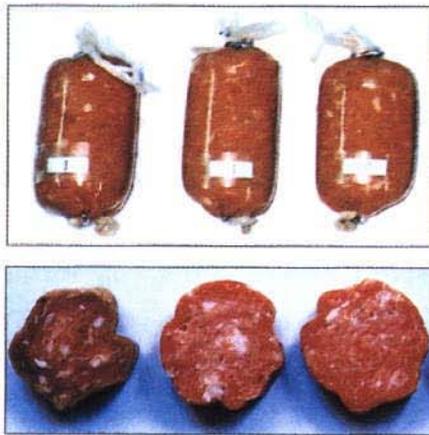
그림 1. 발효소시지 제조공정

표4. 발효소시지 숙성조건(항온항습기 사용)

시간(일)	온도(℃)	상대습도(%)
1	22~24	94~96
2	21~22	90~92
3	18~20	85~88
4-21	12~15	75~80



그림2. 발효소시지 숙성실 내부



제품 1      제품 2      제품 3

그림3. 발효소시지 제품과 단면도

제품 1 ; 상업용 균주

제품 2 ; 종균 I,

제품 3 ; 종균 II

본 실험에서 분리한 유산균 종균으로 제조한 발효 소시지와 상업용 균주를 사용한 발효 소시지의 품질 특성을 비교한 결과

- 유산균 종균으로 제조한 발효 소시지가 숙성 중 대장균군수의 증가가 적었고 잔존 아질산염의 소거능이 우수함. 동시에 상업용 균주보다 좋은 조직감을 나타냄.
- 총 유리 아미노산의 함량이 상업용 균주보다 많았으며 특히 필수 아미노산의 함량은 약 2배 정도임.  
유리 지방산의 경우에도 분리 유산균 종균으로 제조한 발효 소시지가 필수 지방산의 함량이 많았음.
- 김치에서 분리한 유산균으로 제조한 발효 소시지는 상업용 균주로 사용 가능성이 충분함.

나. 천연물을 이용한 기능성 소시지의 경우

1) 배합비

표5. 소시지 배합비

성분	중량(g)	백분율(%)
돼지고기	3000	} 100
지방	1000	
얼음	1000	
소금	80	1.6
MSG	15	0.3
설탕	15	0.3
인산염	15	0.3
아질산염	0.75	0.015
L-ascorbic acid	2.5	0.05
카제인	50	1.0
백후추	15	0.3
Allspice	5	0.1
Nutmeg	2.5	0.05
Sage	2.5	0.05
분리대두단백	50	1.0
전분	50	1.0
오미자	15	0.3

- 천연물의 아질산염 소거작용이 뛰어난 오미자 추출물 사용
- 오미자 첨가 농도가 0.3% 정도 내에서는 유효안정성이 인정됨.

2) 소시지의 제조 공정

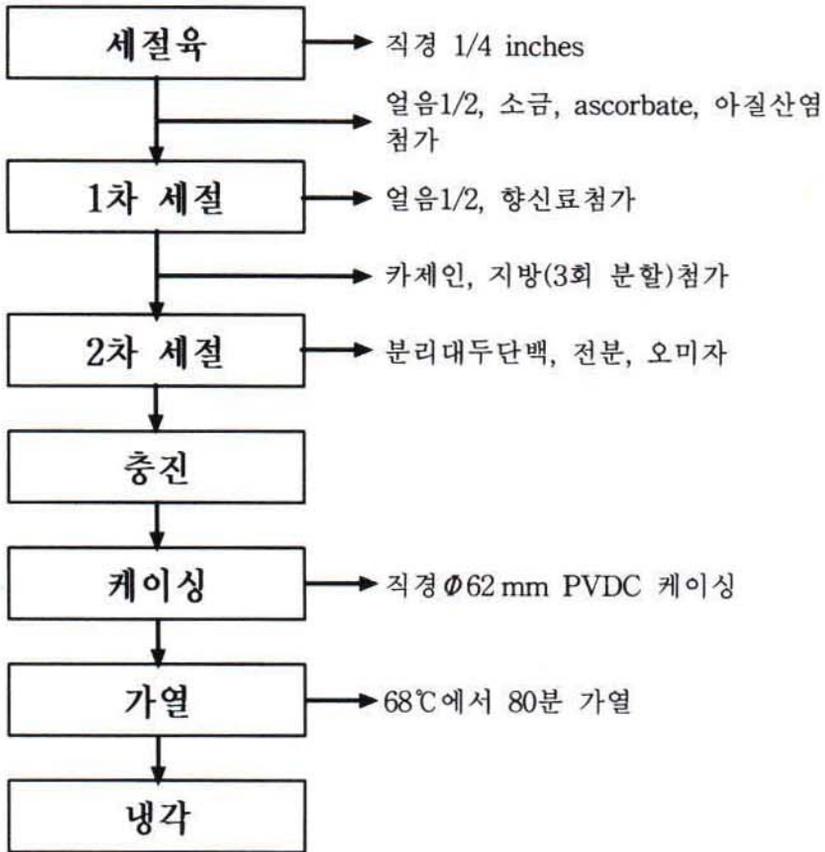


그림4. 소시지 제조공정



제품 1

제품 2

제품 3

그림5. 농도별 오미자 소시지의 단면

제품 1 : 오미자 무첨가 소시지

제품 2 : 오미자 0.1% 첨가 소시지

제품 3 : 오미자 0.3% 첨가 소시지