Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 22, No. 5, 544-549 (1994)

발효소시지로부터 유산생성균의 분리 및 동정

고명수[1]* · 이명섭 · 김창한
건국대학교 축산가공학과, [1]동남보건전문대학 식품가공과

Isolation and Identification of Lactobacilli from Fermented Sausages

Ko, Myung-Soo[1]*, Myung-Sub Ree and Chang-Han Kim
Department of Animal Products Science, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea
[1]Department of Food Technology, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

Abstract — Lactobacilli proliferating in fermented sausages of the specific ripening conditions were isolated from fermented sausages, manufactured in the absence of an added starter, during ripening under controlled temperature-humidity conditions. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics and carbohydrate fermentation of isolated strains, three strains of isolates were identified as *Lactobacillus curvatus*, two strains as *Lactobacillus sake*. Optimal temperature and pH for growth of isolated strains were 30℃ and pH 6.0~7.0, respectively. These strains were salt tolerant, multiplying in the presense of 6~8% NaCl.

발효소시지는 세절된 육 및 등지방과 식염, 발색제, 당류 및 향신료 등을 혼합하고, 유산균을 주체로 한 스타아터를 첨가하여 케이싱에 충전시킨 후 발효 및 건조 공정에 의하여 유해균의 오염을 방지하고 풍미와 보존성을 높인 제품이다(1, 2). 발효소시지에 이용되는 스타아터 미생물에 대해서는 1940년에 치즈 발효에 스타아터를 성공적으로 이용하게 됨에 따라 Jensen과 Paddock(3)이 처음으로 *Lactobacillus plantarum, L. brevis* 및 *L. fermenti*를 단일종 또는 2종 이상 혼합하여 발효육제품용 스타아터로서 이용하였고, 1950년대에 이미 Deibel과 Niven(4)은 당시 미국에서 일반적으로 보급되고 있던 발효소시지의 제조를 위하여 적당한 균주로서 *Pediococcus cerevisiae*를 제안하였으며, Niinivaara 등(5)은 유럽형의 발효소시지에 대하여 *Micrococcus* M53을 중심으로 한 *Micrococcus* sp.가 적당하다고 제안하였다. 그 후 오늘날까지 스타아터로서 육제품에 성공적으로 이용되어 온 주된 미생물은 *Pediococcus* sp.(4), *Lactobacillus* sp.(6-8), *Micrococcus* sp.(6) 및 *Staphylococcus* sp.(9) 등이며, 이들은 단일종 또는 2종 이상의 혼합균주로 발효소시지의 제조에 이용되고 있다(9). 이들 스타아터는 발효 및 건조 공정 중에 유산이나 각종 풍미성분을 생산하고 숙성기간을 단축시키며 조직과 색택 등 제품의 품질을 개선시킬 뿐만 아니라 유해균의 오염을 방지하여 보존성을 향상시킨다고 알려져 있다(11, 12). 이와 같이 구미의 여러 나라에서는 발효육제품에 이용되는 스타아터 미생물에 대해서는 물론 이들을 이용한 제품에 이르기까지 다양하게 연구되어 오고 있으며, 특히 유산균 중에서도 25℃ 이상의 높은 온도에서 발효가 왕성한 *Pediococcus acidilactis*나 *Lactobacillus plantarum*이 최근까지 발효소시지의 제조에 이용되어 온 대표적인 스타아터 유산균으로 알려져 있다(13). 이러한 스타아터의 필요조건은 6%의 식염이나 100 ppm의 아질산염의 존재하에서도 잘 생육하고, 최적 생육온도가 32℃로서 homo 발효형, 비독성으로 이상풍미를 생산하지 않으며, 단백질과 지방의 분해성이 없어야 한다고 알려져 있다(10).

따라서 본 연구에서는 발효소시지의 특유의 숙성환경에서 잘 생육하고 저온 발효에 적합한 스타아터 유산균을 분리하기 위하여 발효소시지를 20~22℃의 발효 온도에서 상법에 따라 제조한 후 숙성시키면서 유산균을 분리하여 형태적, 생리·생화학적 특성 및 당발효성에 따라 동정하였다.

Key words: Fermented sausage, starter, *Lactobacillus curvatus, Lactobacillus sake*
*Corresponding author

재료 및 방법

발효소시지의 제조

신선한 돈육과 등지방을 선별 구입하여 5×3×3 cm로 절단한 후, −20℃에서 1주일간 동결시켰다

가 가공 직전 세절이 용이하도록 −1∼−3℃로 온도를 조절하였다. 세절 및 혼합은 silent cutter(Seydelmann, Germany)에 원료육과 등지방 순으로 넣어 세절한 후, 원료육에 대하여 식염 2.8%, 포도당 1.2%, 질산염 0.02%, 아질산염 0.01% 및 white pepper 0.25%의 비율로 배합된 첨가물 및 향신료를 가하여 혼합하였다. 세절혼합육은 fibrous casing(Hoechst type-s, ϕ 45 mm)에 약 200 g 씩 충전시킨 후 항온항습 chamber(Korea Manhattan Co.)에서 제조 직후부터 3일 동안은 온도와 상대습도를 각각 21±2℃, 93±2%, 4일째부터 17일까지는 온도를 18℃, 상대습도를 88%에서 78%까지 서서히 낮추면서 숙성시켰다.

유산균수, pH 및 수분활성도의 측정

숙성 중인 발효소시지를 경시적으로 취하여 무균적으로 케이싱을 제거시킨 후 시료 10 g을 균일하게 채취하여 90 ml의 멸균생리식염수와 함께 stomacher용 PVDC 용기에 넣어 혼합하고 stomacher(Lab. blender 80. U.K.)를 이용하여 2분간 균질시켰다. 그 균질액을 10배 희석법으로 단계 희석하여, MRS agar배지(Difco)에 희석시료 0.1 ml 씩을 도말하여 Gas Pak anaerobic system(BBL)의 혐기적 조건에서 30℃, 48시간 배양한 후 출현한 집락의 수를 측정하여 유산균 수로 하였다. pH는 시료 10 g에 2배량의 증류수를 가하여 homogenizer(Nihonseiki Kaisha, Japan)로 균질한 후 유리전극 pH meter(Knick Portamess, Germany)를 이용하여 측정하였다. 수분활성도(water activity, Aw)는 3개의 sensor와 온도조절장치 및 평형상대습도 기록계가 부착된 Novasina electronic hygrometer(EEJA-3, Switzland)를 이용하여 25℃에서 각 시료에 대하여 3회씩 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

유산균의 분리

유산균을 분리하기 위하여 유산균 수의 측정에 이용된 희석 시료를 lactobacilli의 선택배지인 Logosa SL agar 배지(14)에 도말한 후, 호기성 세균의 출현을 억제하기 위한 Gas Pak anaerobic system(BBL)을 이용하여 30℃, 7일간 혐기적으로 배양하였다. 배양 중에 평판상에 나타난 우점의 집락을 분리하여 MRS agar 배지(Difco)에서 순수분리하고, Gram 염색과 형태 관찰을 행한 후 MRS agar 배지에 고층배양하여 4℃에 보존하면서 분리균주의 동정에 사용하였다.

분리균주의 동정

분리균주 중에서 그람 염색 양성 및 catalase 음성반응을 나타내는 유산간균을 The Prokaryotes(15)와 Mitsuoka(16)의 분류방법에 따라서 glucose로부터 CO_2 생성여부, 15℃와 45℃에서의 생육여부 및 ribose와 gluconate의 발효성 등으로부터 *Lactobacillus* subgenus level 즉, *Thermobacterium, Streptobacterium* 및 *Betabacterium*으로 분류하였다. 이들 중에서 *Lactobacillus* subgenus streptobacteria 5균주를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(14) 및 기타의 동정서(15, 16)에 따라서 형태적, 생리·생화학적 특성 및 당 발효성 등을 조사하여 동정하였다.

분리균주의 생육 특성

MRS broth 배지에 각 균배양액을 2%(v/v) 씩 접종하여 온도를 5℃에서 45℃ 사이의 범위에서 5℃ 간격으로 48시간 배양한 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 각 분리균주의 생육온도를 조사하였고, 생육 pH를 3.0에서 9.0까지 1.0 단위로 조절한 MRS broth 배지에, NaCl에 대한 저항성은 NaCl을 0, 2, 4, 6, 8 및 10%(w/v)의 농도가 되도록 조제한 MRS broth 배지에 각각 균배양액을 2%(v/v) 씩 접종하여 최적 생육온도인 30℃에서 48시간 배양한 후 600 nm에서 측정한 흡광도로 나타내었다.

결과 및 고찰

유산균수, pH 및 수분활성도의 경시적 변화

발효소시지의 숙성 중에 유산균 수, pH 및 수분활성도의 경시적 변화는 Fig. 1과 같다. Gas Pak anaerobic system(BBL)에 의한 혐기적 배양조건하에서 측정한 유산균 수의 경시적 변화를 보면 소시지 제조 직후에는 5.5×10^4 CFU/g였으나 숙성이 진행됨에 따라 점차 증가하여 숙성 9일째에는 3.3×10^8 CFU/g로서 최고 균수에 달하였으며, 숙성 12일 이후에는 완만하게 감소하였으나 숙성말기까지 비교적 높은 수준을 유지하였다. pH는 소시지 제조 직후의 pH 5.8에서 숙성이 진행됨에 따라 점차 하강하여 숙성 3일째에는 pH 5.0이었고, 그 이후 9일까지 완만하게 저하하였다. 수분활성도는 소시지 제조 직후의 0.97에서 숙성이 진행됨에 따라 점차 저하하여 숙성말기에는 0.88이었다. Nurmi(6)는 독일의 전통적인 방법에 의하여 스타아터를 첨가하지 않고 제조한 발효소시지에서 유산균 수는 숙성 7일째에 6.3×10^7 CFU/g로서 최고균수에 달하였고 pH는 제조 직후 pH 5.74에서 숙성 14일째에 pH 5.18로 완만하게 저하하였다고 보고하였고, Metaxopoulos 등(17)은 이탈리아 유형의 스타아터를 첨가하지 않고 제조한 발효소시지에서

유산균수는 숙성 3일에 5.0×10^8 CFU/g의 수준으로 급속히 증가하였고 이에 따라 pH는 제조 직후 pH 6.1

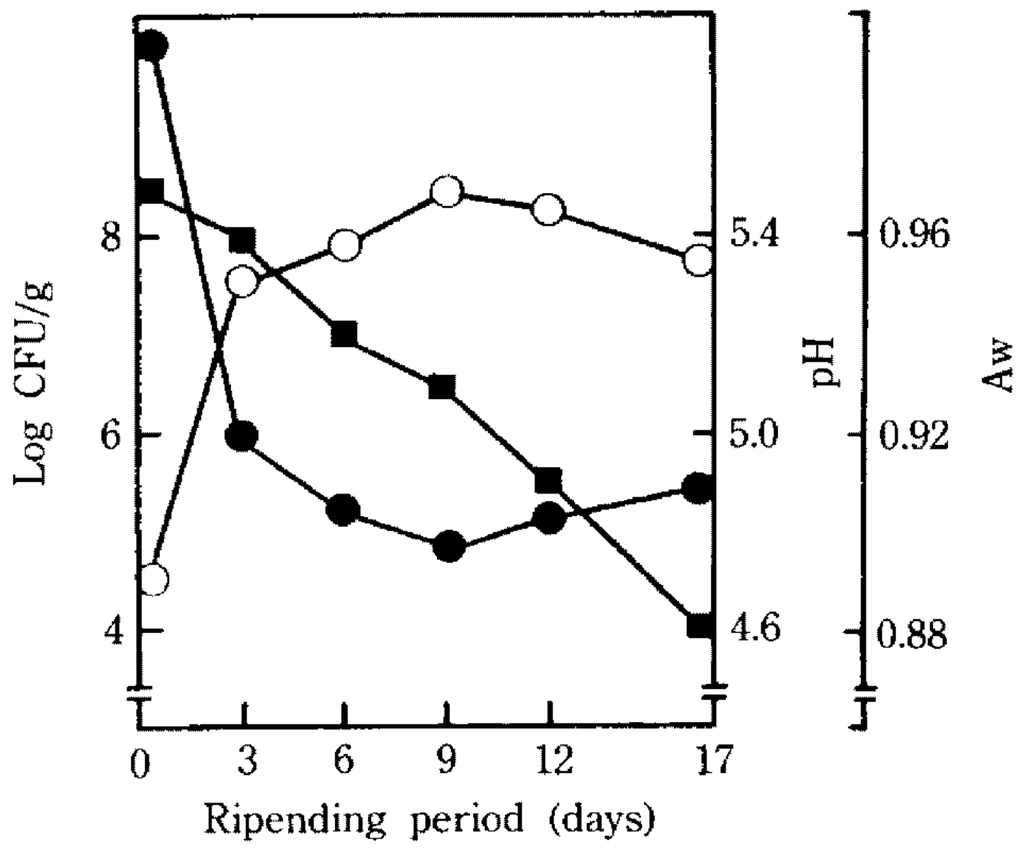

Fig. 1. Changes in lactic acid bacterial counts, pH and Aw during ripening of fermented sausages.
○−○; lactic acid bacterial counts, ●−●; pH, ■−■; Aw

에서 숙성 7일째에 pH 5.0으로 하강하였다고 보고하였다. 이와 같이 유산균수 및 pH의 경시적인 변화는 이들에 관한 보고(6, 17)와 거의 유사한 경향을 보였으나 다소 차이를 보인 것은 첨가된 당의 농도, 원료육의 종류와 초기 pH 및 숙성조건 등에 기인하는 것(18)으로 사료된다. 또한 숙성 12일 이후에 유산균수가 완만하게 감소한 것은 유산균의 대사과정에서 생성된 유산의 축적 및 수분활성도의 저하와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

분리균주의 동정

숙성 중인 발효소시지로부터 시료를 경시적으로 채취하여 Gas Pak anaerobic system(BBL)에 의한 혐기적 배양조건하에서 Rogosa SL 배지를 이용하여 평판 배양한 후 나타난 집락으로부터 우점의 집락을 선정하여 순수분리하였다. 순수분리한 유산균 중에서 포도당으로부터 CO_2 생성 여부 및 생육 온도에 따라 *Lactobacillus* subgenus streptobacteria 5균주를 선발하였다. 분리된 5균주는 모두 그람 양성, catalase 음성

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of lactobacilli isolated from fermented sausages

Characteristics	Species and strain No.				
	Lactobacillus curvatus			*Lactobacillus sake*	
	K3-2	K12-3	K17-5	K6-2	K12-9
Cell form	rod	rod	rod	rod	rod
Cell size(μm)	0.7~0.9×1~2	0.7~0.9×1~2	0.7~0.9×1~2	0.6~0.8×2~3	0.6~0.8×2~3
Cell arrangement	pairs, short chains	pairs, short chains	pairs, short chains	singly, short chains	singly, short chains
Gram stain	+	+	+	+	+
Motility	−	−	−	−	−
Spore formation	−	−	−	−	−
CO_2 from glucose	−	−	−	−	−
Catalase					
hematin-free medium	−	−	−	−	−
medium containing hematin	−	−	−	+	+
Nitrate reduction	−	−	−	−	−
H_2O_2-production	+	+	+	+	+
CO_2 from gluconate	+	+	+	+	+
NH_3 from arginine	−	−	−	−	−
Growth at 4℃	+	+	−	+	+
15℃	+	+	+	+	+
45℃	−	−	−	−	−
Growth in 8.0% NaCl	−	+	+	−	+
10.0% NaCl	−	−	−	−	−
Lactic acid isomer	DL	DL	DL	DL	DL
meso-DAP in cell wall peptidoglycan	−	−	−	−	−

및 포도당으로부터 CO_2를 생성하지 않고 homo 유산 발효를 하는 간균으로서 nitrate 환원력이 없고, arginine으로부터 암모니아를 생성하지 않으며, 15℃ 에서는 생육하나 45℃ 에서는 생육을 못하는 *Lactobacillus* subgenus streptobacteria의 특징을 나타내었으며, 각 균주의 형태적, 생리·생화학적 특성 및 당 발효성을 조사한 결과는 Table 1 및 2와 같다. 즉, 분리균주 K3-2, K12-3 및 K17-5는 모두 0.7~0.9×1~2 μm 정도 크기의 단간균으로서 2연 또는 단연쇄상의 커브형이었으며, 네 세포의 폐쇄환 또는 편자 형태가 관찰되었고, DL형의 유산을 생성하며, 세포벽에 meso-DAP를 갖고 있지 않았다. 또한 이들 세 균주는 시험 당류 중에서 cellobiose, esculin, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-gluconate, D-mannose 및 D-ribose로부터 산을 생성하나, 그 외의 당으로부터 산을 생성하지 않는 점이 Bergey의 *Lactobacillus curvatus*에 대한 기재(14)와 거의 일치하였고, 특히 cellobiose로부터 산을 생성하나 D-mannitol과 D-melibiose로부터 산을 생성하지 않으므로 *Lactobacillus curvatus*로 동정되었으며, 세 균주 간에는 D-salicin 및 D-sucrose로부터의 산 생성능에 있어서 약간의 차이를 보이고 Bergey의 기재(14)와 다르나, 이와 일치하는 보고(16, 18)도 있어서 서로 다른 *Lactobacillus curvatus*의 유연균으로 분류되었다.

Table 2. Acid production from carbohydrates of lactobacilli isolated from fermented sausages

Carbohydrates	Species and strain No.				
	Lactobacillus curvatus			*Lactobacillus sake*	
	K3-2	K12-3	K17-5	K6-2	K12-9
Amygdalin	−	−	−	+	+
L-Arabinose	−	−	−	+	−
Cellobiose	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+
D-Gluconate	+	+	+	+	+
Inulin	−	−	−	−	+
D-Lactose	−	−	−	−	−
D-Maltose	−	−	−	−	−
D-Mannitol	−	−	−	−	−
D-Mannose	+	+	+	+	+
D-Melezitose	−	−	−	−	−
D-Melibiose	−	−	−	+	+
Raffinose	−	−	−	−	−
L-Rhamnose	−	−	−	−	−
D-Ribose	+	+	+	+	+
D-Salicin	−	−	+	−	−
Sorbitol	−	−	−	−	−
D-Sucrose	−	+	+	+	+
D-Trehalose	−	−	−	+	+
D-Xylose	−	−	−	−	−

한편, 분리균주 K6-2와 K12-9는 0.6~0.8×2~3 μm 정도 크기의 단연쇄상 간균이나 배양시간이 경과함에 따라 장연쇄상의 형태가 관찰되었고, hematin 함유 배지에서 catalase 양성반응을 보여 음성반응을 나타내는 이상의 세 균주와 구별되었으며(19), DL형의 유산을 생성하고, 세포벽에 meso-DAP를 갖고 있지 않았다. 또한 이들 두 균주는 시험 당류 중에서 amygdalin, L-arabinose, cellobiose, esculin, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-gluconate, D-mannose, D-melibiose, D-ribose, D-sucrose 및 D-trehalose로부터

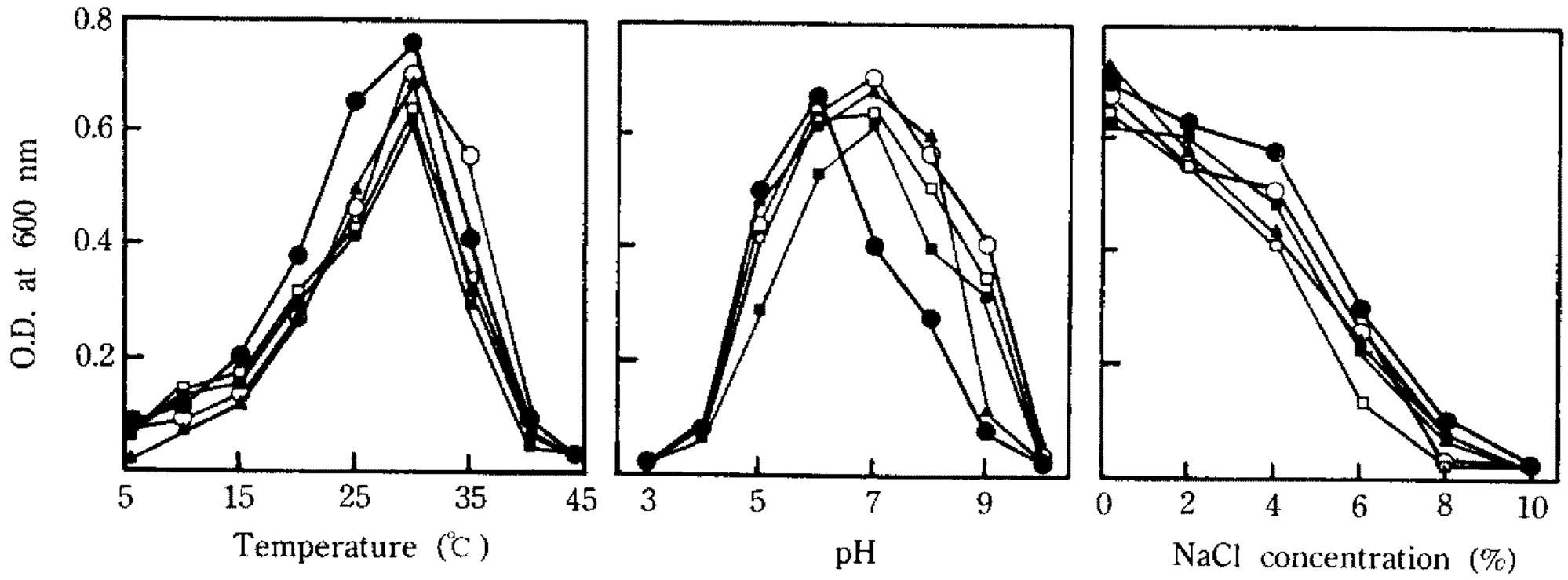

Fig. 2. Effect of temperature, pH and NaCl concentration on the growth of isolated strains.
○−○; *Lactobacillus curvatus* K3-2, ●−●; *Lactobacillus curvatus* K12-3, ▲−▲; *Lactobacillus curvatus* K17-5, □−□; *Lactobacillus sake* K6-2, ■−■; *Lactobacillus sake* K12-9

산을 생성하나, 그외의 당으로부터 산을 생성하지 않으며, 특히 cellobiose와 D-melibiose로부터 산을 생성하나, D-mannitol, D-melezitose, raffinose 및 sorbitol로부터 산을 생성하지 않는 점으로 보아 *Lactobacillus sake*의 특징을 나타내었으므로 *Lactobacillus sake*로 동정되었으며, 두 균주 간에는 L-arabinose와 inulin으로부터의 산 생성능에 있어서 약간의 차이를 보여 서로 다른 *Lactobacillus sake*의 유연균으로 분류되었다.

분리균주의 생육 특성

각 분리균주의 생육 특성을 검토하기 위하여 생육 온도, 생육 pH 및 내염성 등을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 각 분리균주의 생육 온도는 5℃ 에서 45℃ 까지의 온도 범위에서 600 nm에서의 흡광도를 측정한 결과, 분리균주는 모두 30℃ 에서 가장 생육이 왕성하였고, 45℃ 에서는 생육을 못하였으며, 분리균주 중 *L. curvatus* K17-5를 제외한 네 균주는 5℃ 와 40℃ 에서 미약하게 생육하였으나, *L. curvatus* K17-5는 5℃ 에서는 생육을 못하였다. pH 3.0에서 pH 9.0까지의 범위에서 생육 pH를 조사한 결과, 분리균주는 모두 pH 6.0~7.0에서 생육이 가장 좋았고, pH 4.0에서 pH 8.0의 범위에서 생육이 가능하였다. 또한 NaCl에 대한 저항성을 조사한 결과, 분리균주는 모두 식염농도 4%까지는 생육이 왕성하였으나, 6% 이상의 식염농도에서는 생육이 크게 억제되었으며, *L. curvatus* K12-3, *L. curvatus* K17-5 및 *L. sake* K12-9는 식염농도 8%까지 생육이 가능하였으나, *L. curvatus* K3-2와 *L. sake* K6-2는 8%의 식염농도에서는 생육을 못하였다.

요 약

발효소시지 특유의 숙성환경에서 잘 생육하고 발효소시지의 제조에 적합한 스타아터 유산균을 분리하기 위하여 발효소시지를 스타아터 접종없이 상법에 따라 제조한 후, 일정한 온·습도 조건하에서 숙성시키면서 유산균을 분리하였다. 분리균주의 형태적, 생리·생화학적 특성 및 당 발효성 시험의 결과로부터 분리균주 K3-2, K12-3 및 K17-5는 *Lactobacillus curvatus*로 동정되었고, 분리균주 K6-2와 K12-9는 *Lactobacillus sake*로 동정되었다. 각 분리균주의 최적생육 온도는 30℃ 였고, 최적생육 pH는 pH 6.0~7.0이었으며, NaCl 6.0~8.0%의 농도까지 생육하는 NaCl에 대한 저항성을 가지고 있었다.

참고문헌

1. Lücke, F.K. 1985. Fermented sausages, Pp. 41-83. *In* B.B. Wood(ed.), *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 2, Elsevier Applied Sciense Publishers, London and New York.
2. Bacus, J.N. 1986. Fermented meat and poultry products, Pp. 123-164. *In* A.M. Pearson(ed.), *Advances in Meat Research*, Vol. 2, AVI Pubishing Co., Westport, CT.
3. Jensen, L.B. and L.S. Paddock. 1940. Sausage treatment. *U.S. patent.* 2, 225, 783.
4. Deibel, R.H. and C.F. Niven. 1957. *Pediococcus cerevisiae*: starter culture for summer sausage. *Bacteriol. Proc.* 14-15.
5. Niinivaara, F.P., M.S. Pohja, and E. Komulainen. 1964. Some aspects about using bacteria pure cultures in the manufacture of fermented sausages. *Food Technol.* **18**: 25-31.
6. Nurmi, E. 1966. Effect of bacterial inoculation on characteristics and microbial flora of dry sausage. *Acta Agralia Fennica.* **108**: 1-77.
7. Everson, C.W., W.E. Danner, and P.A. Hammes. 1970. Bacterial starter cultures in sausage products. *J. Agr. Food Chem.* **18**: 570-571.
8. Coretti, K. 1977. Starter cultures in the meat industry. *Die Fleischwirtsch.* **3**: 386-394.
9. Rheinbaben, K.V. and R. Hadlok. 1979. Differentiation of microorganisms of the family Micrococcaceae isolated from dry sausages. *Die Fleischwirtsch.* **59**: 1321-1324.
10. Smith, J.L. and S.A. Palumbo. 1983. Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot.* **46**: 997-1006.
11. Bacus, J.N. and W.L. Brown. 1981. Use of microbial cultures: meat products. *Food Technol.* **35**: 74-78.
12. Liepe, H.U. 1983. Starter cultures in meat production, Pp. 399-424. *In* H.J. Rehm, and G. Reed (eds.), *Biotechnology*, Vol. 5, Verlag Chemmie.
13. Gökalp, H.Y. and H.W. Ockerman. 1985. Turkish style fermented sausage (soudjouk) manufactured by adding different starter cultures and using different ripening temperatures. *Fleischwirtsch.* **65**: 1235-1240.
14. Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus*, Pp. 1209-1234. *In* P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt(eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Willkins Co., Baltimore.
15. Sharpe, M.E. 1981. The genus *Lactobacillus*, Pp. 1653-1679. *In* M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel(eds.), *The Prokaryotes*, Vol. 2, Springer-Verlag, New York.
16. Mitsuoka, T. 1984. Medical effect of lactic acid

bacteria and a new field of utilization. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **31**: 285-296.
17. Metaxopoulos, J., C. Genigeorgis, M.J. Fanelli, C. Franti, and E. Cosma. 1981. Production of Italian dry salami: Effect of starter culture and chemical acidulation on Staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 863-871.
18. Lücke, F.K. and H. Hechelmann. 1987. Starter cultures for dry sausages and raw ham: composition and effect. *Fleischwirtsch.* **67**: 307-314.
19. Wolf, G. and W.P. Hammes. 1988. Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Arch. Microbial.* **149**: 220-224.

(Received June 10, 1994)