



Research Article

Analysis of mold reduction and quality characteristics in fermented sausages treated with clove extract spray

클로브 추출액 분무처리를 활용한 발효소시지의 곰팡이 저감 효과 및 품질 특성 분석

Eun-seon Lee, Jong-hui Kim, Bu-min Kim, Mi-hwa Oh*

이은선 · 김종희 · 김부민 · 오미화*

Animal Products Research and Development Division, National Institute of Animal Science, Wanju 55365, Korea

국립축산과학원 축산물이용과

Abstract This study investigated the antimicrobial and quality-preserving effects of clove extract in the production of fermented sausage. To evaluate these effects, microbial counts (total bacteria and fungi) and various quality parameters, including proximate composition (moisture, protein, fat), salt, collagen, pH, water activity, and eugenol content were measured. The results revealed that fermented sausages treated with clove extract exhibited a significant reduction in microbial contamination compared to the control group ($p < 0.05$). After 28 days of fermentation, total bacterial counts were reduced by up to 74.4%, and fungal counts decreased by approximately 67% by week 3. Quality analysis indicated that water activity and pH remained stable throughout the fermentation process, similar to the control. As fermentation progressed, a reduction in moisture content led to an increase in solid components, such as protein and fat, which were comparable to the control group. These findings suggest that clove extract can effectively suppress microbial contamination and contribute to maintaining the quality of fermented sausages. Furthermore, the residual eugenol concentration in the final product was approximately 20% higher in the clove-treated sausages compared to the control, without adversely affecting flavor. Overall, clove extract demonstrates potential as a natural preservative, providing both antimicrobial properties and quality preservation in meat processing.

Keywords fermented sausage, clove, fungi, aerobic bacteria, reduction effect



OPEN ACCESS

Citation: Lee E, Kim J, Kim B, Oh M. Analysis of mold reduction and quality characteristics in fermented sausages treated with clove extract spray. Food Sci. Preserv., 32(4), 709-716 (2025)

Received: December 24, 2024

Revised: February 19, 2025

Accepted: February 24, 2025

*Corresponding author

Mi-hwa Oh
Tel: +82-63-238-7376
E-mail: moh@korea.kr

Copyright © 2025 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

발효육제품은 한국의 김치처럼 오랜 역사를 지닌 서양의 전통 발효식품이다. 이러한 발효육제품은 원래 돼지 뒷다리와 같은 비선호 부위를 가공을 통해 제품을 고급화하고 부가가치를 증대시켜 경제적 효용성을 높여왔다. 제조 과정에서 사용되는 천연 향신료는 제품의 풍미를 더욱 향상시킬 뿐만 아니라 항균 효과도 가지고 있다. 또한, 유산균을 이용한 발효 공정은 부패로 인한 식품 오염을 방지하고 장기적인 보존을 가능하게 하는 효과적인 방법으로 오랜 기간 활용되어 왔다. 발효와 부패는 미생물이 유기물을 분해하는 동일한 과정이지만, 생성되는 대사산물과 발생하는 미생물의 성장에 따라 그 결과가 달라진다(Gänzle, 2015; Toldrá, 2007). 발효는 다양한 미생물이 증식하기에 적합한 환경을 제공하기 때문에 제조 전 과정에 걸쳐 철저한 안전 관리가 요구된다. 특히 발효소시지는 발효 생협과는 달리 pH 조절을 위한 스타터 유산균과 풍미 증진을 위한 효모나 곰팡이를 인위적으로 접종하고 있어, 생산 공정 중 적절한 위생관리가 이루어지지 않는다면 유해미생물의 오염이 불가피하다

(Barbuti와 Parolari, 2002; Leroy 등, 2006). 이 과정에서 유익한 미생물만 번식하도록 유도하는 것이 바람직하지만, 발효에 적합한 환경은 유해 미생물의 증식 또한 촉진할 수 있어 추가적인 관리가 필요하다. 이에 따라 현재 업계에서는 합성 보존료나 방부제를 사용하여 제품의 변질과 부패를 예방하는 방식이 일반적이다. 그러나 소비자들의 소득이 증가되고 생활 수준이 높아짐에 따라 소비를 결정하는 요소들 중 식품 안전에 대한 우선순위가 매우 상승하였다(Kwon, 1996). 또한 안심하고 섭취할 수 있는 천연 성분을 활용한 안전한 식품 관리가 요구되고 있다(Quinto 등, 2019; Teshome 등, 2022). 특히, 발효소시지는 비가열처리 식품으로서 추가적인 살균 공정 없이 바로 섭취하기 때문에 더욱 철저한 위생 관리가 필수적이다. 이에 따라 천연물 기반의 보존제 사용이 주목받고 있으며, 국내·외에서는 식품 내 유해 미생물 오염을 예방하기 위한 방안으로 자몽 종자추출물, 코리엔더, 생강 등의 천연물 연구가 진행된 바 있다(Choi 등, 2020; Smith와 Clark, 2022). 여러 천연물 중 클로브는 발효소시지를 비롯하여 다양한 육가공품에서 향신료로서 원재료와 혼합 시 활용되어 풍미를 증진시키는 역할을 한다(Al-Jalay 등, 1987; Moawad 등, 2020). 클로브는 세포막을 파괴하여 세포 내 효소 등의 용출을 유도하고, 단백질 합성을 방해하는 메커니즘을 통해 항염증 및 항균 성질을 지닌 천연물로 알려져 있다(Cui 등, 2018; Rhayour 등, 2003). 이와 관련하여 클로브 오일이 *Listeria monocytogenes*의 세포막 파괴를 통해 DNA를 용출시켜 균의 핵산 합성을 저해한다는 연구 결과도 있다(Cui 등, 2018). 또한 클로브는 다양한 요리에서 향신료로 사용되며 일부 적용 연구에서는 식품 보존 효과와 유해 미생물 억제 기능이 입증된 바 있다(de Almeida 등, 2023; Pierini 등, 2022; Silva 등, 2024). 더불어 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration)은 클로브 에센셜 오일을 식품, 의약품, 화장품, 위생용품 등에 사용되어도 안전한 천연 첨가물로서 허용되어 있어 식품에서 다양하게 사용이 가능하다(Silva 등, 2024). 이러한 기능들을 토대로 본 연구에서는 클로브 추출물 적용을 통해 발효소시지 제조 과정 중 미생물의 오염도와 제품 품질을 함께 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 채취 및 미생물 동정

국내에서 생산된 농가형 발효소시지(남원, 장수, 해남)의 케이싱 표면과 내부에 존재하는 곰팡이를 함께 분석하고자 숙성·건조 시간별로 시료를 채취하였다. 이때, 시료 10 g을 채취하고 샘플백(whirl-Pak Filter sterilized bags, Nasco, Pleasant Prairie, WI, USA)에 90 mL의 희석수(Huko FS, Seoul, Korea)를 첨가하여 1분간 스토마킹 하였다. 혼합된 시료 용액 1 mL를 채취한 후 9 mL의 희석수(3M, Saint Paul, MN, USA)에 10배 희석하

여 PDA 배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하였다. 균이 접종된 배지는 25°C에서 3-5일간 배양한 후, 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 단일 균주는 균사를 포함하여 일회용 루프(SPL, Pocheon, Korea)로 긁어 900 µL 증류수(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 현탁한 후 100°C에서 1분간 끓였다. 전처리한 시료는 솔젠트(Solgent, Daejeon, Korea)에 시퀀싱을 의뢰하였다. 시료의 DNA는 ITS1(5'-GTA GGT GAA CCT GCG G-3')와 ITS4(5'-TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') universal primer에 의해 증폭되었으며, PCR product는 ABI PRISM 3730LX DNA 분석기(Applied Biosystems, Bedford, MA, USA)를 통해 분석되었다(Lee 등, 2022).

2.2. 미생물 접종 및 소시지 제조

발효소시지는 원료육 분쇄, 향신료와의 혼합, 케이싱 충전, 발효 및 건조·숙성 순으로 제조하였으며, 이때 사용된 재료 및 성분은 Table 1에 제시하였다. 케이싱에 충전한 이후 제조 후 항온항습기에 거치하여 시기별로 시료를 10 g씩 채취하였다. 동정된 페니실리움(4종) 혼합액을 스펀지 스틱(Sponge-stick neutralizing buffer, 3M)을 활용하여 발효소시지 표면에 접종하였다. 표면에 곰팡이가 도포된 소시지를 상대습도 95%, 23-25°C 조건에서 3일간 발효한 후, 남은 기간 동안 상대습도 75-80%, 10°C의 조건에서 숙성·건조하였다(Fig. 1).

2.3. 클로브 추출액 제조 및 처리

클로브의 유효성분을 추출하기 위해 우리나라에서 제조된 건조 클로브(Barunmigak, Wonju, Korea)를 구매하여 제조하였다. 클로브 추출은 Lee 등(2013)에서 사용한 추출방식을 참고하였으며, 향곰팡이능이 우수한 최적 조건을 선정한 후 클로브를 추출하였다. 먼저, 건조 클로브를 25 g 채취한 후 500 mL의 75% 에탄올에 첨가하고 항온 진탕배양기에서 70°C로 유지하며 1시간가량 추출하였다. 이후 클로브 추출액은 여과지

Table 1. Ingredient of fermented sausages

Ingredient	Content (%)
Pork shank	95.69
Salt	1
Sugar	1
Sodium nitrite	0.25
Black pepper	1
Spices	1
Mixed lactic acid bacteria (21 species) ¹⁾	0.06

¹⁾Commercial product of lactic acid bacteria (Huonsnatural, Chuncheon, Korea).



Fig. 1. Dry maturation of fermented sausages in a chamber.

(Whatman No. 1, Buckinghamshire, UK)를 활용하여 클로브 분말을 여과한 후 추출액만 활용하였다. 충전된 발효소시지의 표면에 대상 균액을 스펀지 스틱(Sponge-stick with neutralizing buffer, 3M)로 도포한 후 추출된 클로브액 5 mL를 0, 1, 2, 3, 4주에 걸쳐서 5회 표면 분무처리 하였다.

2.4. 미생물 분석

발효소시지의 미생물(일반세균, 곰팡이) 변화는 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35일에 발효·숙성 일자별로 시료를 채취하여 분석을 수행하였다. 시료는 10 g씩 채취하여 90 mL의 희석수(Huko FS, Seoul, Korea)에 10배씩 희석한 후 1 mL 채취하여 선택배지에 접종하였다. 일반세균은 aerobic bacteria 필름배지(3M, Saint Paul, MN, USA)를 사용하였고, 곰팡이는 PDA(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였다.

2.5. 품질 분석

2.5.1. 일반성분, pH 및 수분활성도 측정

발효소시지의 pH는 발효·숙성 기간에 따라서 미생물 분석과 동일하게 측정되었으며, 이때 시료는 고체 pH meter(Model Testo 205; Testo, Lenzkirch, Germany)를 활용하여 측정되었다. 동시에 일반성분(수분, 단백질, 지방), 염분, 콜라겐은 Food scan(Foss Tecator Co., Hillerød, Denmark)을 사용하여 측정되었다. 수분활성도는 25°C에서 AW SPRINT-TH 300 measuring instrument(Novasiva, Pfaffikon, Switzerland)를 활용하여 측

정하였다.

2.5.2. 유제놀(Eugenol, 14-Allyl-2-methoxyphenol) 분석

본 연구에서 사용된 발효소시지 중 초기 소시지와 최종제품에서의 잔류 유제놀 성분을 분석하고자 하였다. 시료는 한국품질시험원(Suwon, Korea)에 분석 의뢰하였다. 유제놀의 정량분석을 위해 GC-MS(Shimadzu GCMS QP 2020, Kyoto, Japan)를 사용하였다. 분석용 칼럼은 DB-35MS UI(30 m length, 0.25 mm diameter, 0.25 µm film thickness)을 사용하였다. 분석을 위한 자세한 분석 조건은 Table 2에 표기하였다.

2.6. 통계처리

미생물 저감 효과 및 품질 특성을 분석하기 위한 실험은 모두 3회 이상 반복되었으며, SAS Enterprise Guide 7.1(SAS institute, Cary, NC, USA)의 ANOVA 분석을 통해 유의성($p < 0.05$)을 평가하였다. 유의적인 차이가 있는 결과값에 대해서는 Duncan's multiple range test를 통해서 그룹핑을 하여 윗첨자로 표기하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미생물 동정

발효소시지에서 분리한 균주들 중 검출빈도가 높은 것을 대상으로, GeneBank의 데이터베이스와 비교·분석하여, 99%의 높은 유사도의 *Penicillium chrysogenum*(GenBank No. MK140686.1), *Penicillium commune*(GenBank accession No. MW881072.1), *Penicillium oxalicum*(GenBank No. MT530069.1), *Penicillium solitum*(GenBank accession No. MK761050.1)으로 동정하였다(Table 3). *Penicillia*는 숙성과정 중 발효육제품

Table 2. GC-MS operating conditions for analysis of eugenol (4-Allyl-2-methoxyphenol)

Instrument	SHIMADZU GCMS QP 2020
Column	DB-35MS UI (30 m length, 0.25 mm diameter, 0.25 µm film thickness)
Temp.	Column temperature: 100°C (1 min) → 10°C/min, 300°C (4 min) Injection temperature: 250°C
Carrier gas	Helium
Gas flow rate	1.2 mL/min
Injection vol.	1.0 µL
Ion source temp.	250°C
Detection mode	Scan mode: 40-300 m/z SIM ¹⁾ mode: 164, 149, 103, 131 m/z

¹⁾SIM, selected ion monitoring.

Table 3. Fungal microorganisms with homologous internal transcribed spacer (ITS) sequences (Genbank, NCBI)

Potential microorganism	Similarity (%)	Accession No.
<i>Penicillium chrysogenum</i>	99	MK140686.1
<i>Penicillium commune</i>	99	MW881072.1
<i>Penicillium oxalicum</i>	99	MT530069.1
<i>Penicillium solitum</i>	99	MK761050.1

의 표면에서 50-90% 정도로 다수 검출되며, 주요 검출되는 종으로는 *Penicillium nalgiovense*, *P. chrysogenum*, *P. commune* 등이 있다(Andersen, 1995; Asefa 등, 2009; Lozano-Ojalvo 등, 2015; Papagianni 등, 2007). 또한, *Penicillium*은 다른 종에 비해서 저온이나 염분이 있는 극한 환경에서도 상대적으로 잘 생존할 뿐만 아니라, 표면에서 *Cladosporium* 종과 함께 발효소시지 표면에 검은 반점을 형성하여 품질을 저하시킬 뿐만 아니라 *Penicillium*과 *Ochraceus* 속은 주로 곰팡이 독소를 생산할 가능성이 있어 소비자들에게 잠재적 위해요소가 될 수 있다(Alapont 등, 2014; Lee 등, 2021; Lozano-Ojalvo 등, 2015). 본 연구에서 발효소시지 내 검출된 주요 오염 균주들 중 *P. commune*, *P. chrysogenum*은 곰팡이 독소인 ochratoxin A(OTA)를 생산할 수 있으며, 특히 *P. commune*는 발효과정 중 신경독인 cyclopiazonic acid를 생산한다(Alapont 등, 2014; Nguyen 등, 2021). *P. solitum*은 독소를 형성하지 않는 균이나 관련 연구는 많이 부족한 상황이며 *P. oxalicum*과 함께 전통 소시지에서 많이 검출되는 균으로 공기 중에 산발적으로 존재하여 오염문제를 일으킬 수 있다(Papagianni 등, 2007). 이에 따라 발효소시지에서 선발된 4종의 균주를 혼합하여 인위적으로 고농도의 균액(7-8 log CFU/mL)을 표면에 도포한 후 항곰팡이능을 검증하였다.

3.2. 미생물 저감 효과

이전 연구에서 여러 천연물들 중 클로브가 항산화능 및 항진균능이 우수한 것을 확인하였으며, 이의 유효성분을 추출하여 발효소시지 제조과정에서 분무 방식으로 적용하였다(Lee 등, 2022). 발효소시지에 클로브 추출액을 분무처리한 후 시간에 따른 미생물 변화를 비교, 분석하였다(Fig. 2). 실제 현장에서 활용할 경우 단회 처리만으로도 미생물 저해 효과가 지속적으로 유지되는지, 숙성 기간 동안 반복적으로 분무할 경우 차이가 발생하는지를 본 연구에서 비교·분석하고자 주 단위별로 5회에 걸쳐 분무하였다. 두 처리구에 미생물이 7일 차를 기준으로 유의적으로 증가하다가 점차 감소하는 경향을 보였다. 일반세균의 경우 초기 3.40 log CFU/g에서 7일 차까지 8 log CFU/g 가까이 유의적으로 증가하다가($p<0.05$) 일정하게 유지되는 경향을 보였다(14-35일, $p>0.05$). 발효소시지의 경우 제조가 완료되면 총균수가 7-8 log 수준에 도달하는 게 일반적이며, 스타터로 사용되는 유산균과 풍미 향상을 위해 성장한 곰팡이가 발효기간 중 급증하여 전체적으로 그 수가 증가하는 양상을 보인다(Lee 등, 2009). 곰팡이에서도 초기 4.02 log CFU/g에서 평균 8.56 log CFU/g까지 유의적으로 증가하다가($p<0.05$) 2주 이후부터 일반세균과 유사한 양상을 보였다. 클로브 추출액의 분무 횟수의 차이를 주 단위로 통계분석한 결과 대조구와 처리구 모두에서 1주 차 이후 유의적으로 감소하였으며, 특히 일반세균에서 2주 차 이후부터는 처리구에서 유의미한 차이를 확인하기 어려웠다($p>0.05$). 현장에서는 추출액의 사용량, 작업자의 업무 효율성 등을 고려하여, 소시지 충전 이후 곰팡이가 피기 전에 분무하는 것이 가장 효율적이라 사료된다. 클로브 추출액의 효과는 곰팡이보다 일반세균에서 더 높았으며, 특히 최종 제품인 5주 차에서 대조구 대비 최대 74.6%까지 감소하여 유의적인 차이를 확인하였다($p<0.05$). 곰팡이의 경우 최종제품에서는 처리구와 통계상 차이는 없었으나, 수치적으로 약 0.5 log

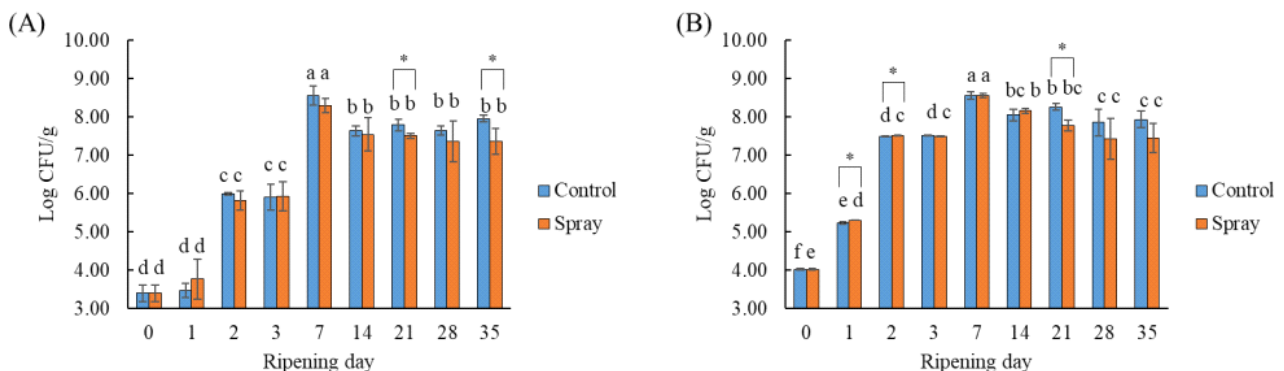


Fig. 2. Changes in aerobic bacteria (A) and fungi (B) count during ripening period of fermented sausages. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Different superscript letters (^{a-c}) on the bars indicate significant differences among samples during the aging period, and * indicates significant differences between two groups within the same aging period, determined by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

CFU/g(68.1%) 감소하였으며 숙성 3주 차에 곰팡이와 일반세균 모두에서 대조구 대비 유의적 차이가 있었다($p<0.05$). Moawad 등(2020)의 연구에서도 클로브 추출액을 첨가하여 제조된 닭고기 소시지에서 12일 차에 총균수, 저온세균, 장내세균이 대조구 대비 0.58-1.22 log CFU/g 감소한 것을 확인할 수 있었다. 클로브의 항균 효과는 추출물이 함유하고 있는 페놀 화합물 성분이 세포질 막의 투과성을 변화시켜 단백질의 용출을 야기하는 원리로 발생한다(Cui 등, 2018; Moawad 등, 2020). 주요 오염 식중독균 중 하나인 *Listeria monocytogenes*의 경우 클로브 오일 처리 시 세포 내 단백질이 40.25% 용출되었으며, 이는 균의 핵산 합성에 영향을 미치는 것으로 보고 있다(Cui 등, 2018). 본 연구에서 확인한 항균효과도 이와 같은 원리에 의한 것으로 사료된다.

3.3. 품질 특성

발효소시지의 발효·숙성에 따른 일반성분(수분, 단백질, 지방), 콜라겐, 염분, 수분활성도의 변화는 Table 4, 5와 같다. 클로브 추출액을 분무한 소시지와 그렇지 않은 소시지의 경우 제조 직후 수분함량은 59.8%에서 숙성 35일 차에 각각 20.67%, 20.69%로 시간이 지남에 따라 감소하였다. 더불어 수분활성도는 초기 0.91에 비해 모든 시험구에서 0.83-0.85로 감소하였다. 반면에 발효소시지 제조 시 첨가되었던 식염의 농도는 상대적

으로 증가하였다(평균 1.50% → 2.63%)(Table 5). 일반적으로 발효소시지 내 염분은 4% 이하 수준으로 제조되고 있다(Toldrá, 2007). 따라서 본 연구에서 제조된 소시지 처리구가 대조구와 유의적 차이가 있으나, 제품의 품질에 유의미한 영향을 미친다고 보기 어렵다. 식염의 첨가는 일반적으로 맛뿐만 아니라 부패균이 생육하기 어려운 환경을 조성하며, 낮은 수분활성도 역시 동일한 역할을 한다. 일반적으로 발효육제품의 수분활성도 범위는 0.84-0.96이며, 수분활성도 값이 0.8 정도일 때 제품의 저장·유통 시 안정적으로 유지될 수 있는 것으로 보고 있다(Toldrá, 2007). 그러나 곰팡이의 경우, 세균이 생육가능한 조건보다 낮은 수분활성도에서도 잘 자라 생존 범위에 대한 스펙트럼이 넓다. 일반 성분 중 단백질 함량은 제조 직후 16.41%에서 35일 차에 처리구와 대조구가 각각 33.10%, 31.38%까지 점차 증가하였으며 지방 함량도 유사하게 16.87%에서 33.49%, 33.24%까지 증가하였다. 수분, 단백질, 콜라겐, 염분 분석결과 제품이 최종 완료되는 시기인 35일차에서 대조구와 처리구간에 유의적인 차이가 없었으나($p>0.05$), 지방에서는 최종 제품에서 유의적인 차이를 확인하였다($p<0.05$). 그러나 소시지의 지방함량은 제품군에 따라 5-70% 정도로 다양하며(Toldrá, 2007), 본 연구에서 제조된 대조구와 처리구간의 지방함량 차이(0.2%)가 제품의 특성에 특별한 영향을 미친다고 보기 어렵다.

발효소시지 제조 중 pH 변화는 Table 6에 제시하였다. pH는

Table 4. Changes in proximate composition and collagen content of fermented sausage during ripening with clove ethanol extract spray

Sample	Moisture (%)							
	0 day	1 day	2 day	3 day	7 day	14 day	21 day	35 day
Control	59.80±0.01 ^{1)aA}	57.67±0.04 ^{bB}	60.08±0.21 ^{cA}	58.98±0.02 ^{dB}	54.40±0.11 ^{cB}	41.83±0.30 ^{fA}	34.17±0.03 ^{gA}	20.69±0.10 ^{hA}
Spray	59.80±0.01 ^{aA}	60.12±0.06 ^{bA}	59.20±0.06 ^{cB}	59.75±0.02 ^{aA}	55.52±0.06 ^{dA}	38.36±0.09 ^{cB}	30.19±0.15 ^{fB}	20.67±0.07 ^{gA}
Sample	Protein (%)							
	0 day	1 day	2 day	3 day	7 day	14 day	21 day	35 day
Control	16.41±0.07 ^{aA}	16.71±0.01 ^{aA}	15.06±0.08 ^{bB}	16.36±0.04 ^{aA}	17.96±0.02 ^{cB}	19.11±0.10 ^{dB}	26.57±0.08 ^{cB}	31.48±1.38 ^{fA}
Spray	16.41±0.07 ^{aA}	15.80±0.08 ^{bB}	16.15±0.07 ^{cA}	16.28±0.03 ^{dA}	18.08±0.03 ^{cA}	24.54±0.03 ^{fA}	27.29±0.11 ^{gA}	33.10±0.09 ^{hA}
Sample	Fat (%)							
	0 day	1 day	2 day	3 day	7 day	14 day	21 day	35 day
Control	16.87±0.04 ^{aA}	17.87±0.03 ^{bA}	17.14±0.18 ^{cB}	16.86±0.02 ^{aA}	19.30±0.04 ^{dA}	23.31±0.18 ^{cB}	26.82±0.12 ^{fB}	33.24±0.05 ^{gB}
Spray	16.87±0.04 ^{aA}	16.32±0.11 ^{bB}	17.73±0.07 ^{cA}	16.37±0.03 ^{bB}	18.42±0.07 ^{dB}	25.42±0.07 ^{cA}	29.06±0.22 ^{fA}	33.49±0.03 ^{gA}
Sample	Collagen (%)							
	0 day	1 day	2 day	3 day	7 day	14 day	21 day	35 day
Control	0.92±0.06 ^{aA}	0.58±0.05 ^{cA}	0.33±0.04 ^{cA}	0.33±0.04 ^{dA}	0.82±0.02 ^{bA}	0.88±0.01 ^{abB}	1.63±0.08 ^{cB}	1.02±0.09 ^{fA}
Spray	0.92±0.06 ^{aA}	0.55±0.01 ^{bA}	0.35±0.01 ^{cA}	0.30±0.02 ^{cA}	0.70±0.09 ^{dA}	1.30±0.02 ^{cA}	2.28±0.04 ^{fA}	1.10±0.09 ^{gA}

¹⁾All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters (^{a-h}) in each row and (^{A-B}) in each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

Table 5. Changes in salt concentration and water activity of sausages during ripening after clove ethanol extract spray

Ripening days	Salt con. (%)		Aw	
	Control	Spray	Control	Spray
0	1.70±0.02 ^{1jaA}	1.29±0.02 ^{ab}	0.914±0.000 ^{aA}	0.914±0.000 ^{aA}
35	2.64±0.06 ^{ba}	2.61±0.02 ^{ba}	0.851±0.006 ^{ba}	0.829±0.006 ^{bb}

¹⁾All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters (^{a,b}) in each column and (^{A,B}) in each row indicate significant differences by Duncan's multiple range test (p<0.05).

초기 5.59에서 최종 4.60-4.75로 감소하였으며, 대조구와 처리구간에 유의적 차이가 없었다(p>0.05). 일반적으로 발효소시지의 수분활성도는 0.90 이하로 낮게 유지되고, pH가 4.5-6.2의 범위에 있다(Buckenhuskas, 1993; Mataragas 등, 2015). *L. monocytogenes*의 경우 pH≤5.0이고, 수분활성도가 ≤0.94인 상황에서는 미생물의 생육이 제대로 이뤄지지 않는다고 보고 있다. 특히 낮은 수분활성도(≤0.87)는 호기성 미생물의 생육을 억제하며, 발효소시지의 제조 과정 중 호기성인 식중독균이 일반적으로 생육하기 어려운 환경을 조성한다고 볼 수 있다 (Mataragas 등, 2015; Tapia 등, 2020). 다른 연구 결과와 비교하였을 때, 본 연구에서 제조한 발효소시지의 건조와 발효가 적절히 이루어져 pH와 수분활성도의 결과 범위가 안전한 범위에 위치한다고 볼 수 있다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 소시지의 발효·숙성시기에 따른 일반성분, 염분, 수분활성도, pH 등의 분석에서 클로브 추출액 분무처리가 최종제품의 품질에 영향을 미치지 않아 실제로 제품 제조 시 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

3.4. 유제놀(Eugenol, 4-allyl-2-methoxyphenol)

유제놀은 클로브 에센셜오일의 여러 가지 구성 성분들 중 약

80-86%를 차지하고 있으며, 이 성분이 주로 항염증, 항산화능, 항균능에 대한 기능을 보유하고 있다(de Almeida 등, 2023; Silva 등, 2024). 이에 따라 클로브 추출액과 분무처리된 발효소시지, 그리고 무처리된 발효소시지의 유제놀 성분을 비교, 분석하였다. 최종적으로 클로브 추출액에 존재하는 휘발성 향기 성분인 유제놀을 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 클로브 에센셜 오일에 비해서 클로브 추출액 자체에는 유제놀이 6,689 µg/mL (약 0.67%)의 농도로 매우 낮았으나, 고농도로 사용할 경우 소시지에 클로브 특유의 향이 강해서 기호성을 떨어뜨릴 수 있다. Ahmed 등(2021)의 연구에 따르면 0.05%의 클로브 오일을 처리한 치즈에서 숙성기간이 길어짐에 따라 쓴맛과 강한 향으로 인해 전체적인 기호도가 감소하였다. 종종 강한 향을 지닌 에센셜 오일의 식품 내 적용은 제품의 맛과 향미를 좋지 않게 변화시키면서 그 정도가 소비자가 허용가능한 수준을 뛰어넘기도 한다(Ahmed 등, 2021). 본 연구에서 활용된 클로브 추출액을 분무 처리한 직후 소시지에 함유되어 있는 유제놀의 초기 값이 98 µg/g으로 68.3배 정도 적어졌으나, 건조·숙성 중 수분 함량이 약 30%로 줄어들며 따라서 최종 제품에서는 338(대조구), 404(처리구) µg/g까지 증가하는 것을 확인하였다. 최종적으로 발효소시지에 함유되어 있는 유제놀의 농도는 0.03-0.04% 수준으로 제품의 풍미에 영향을 미치지 않는 수준이었다. 이 결과는 처리구 소시지가 기존 제품과 유사한 풍미를 유지하면서도 유제놀 함량이 대조구 대비 약 20% 이상 함유되어 있어, 평균

Table 6. Changes in pH of sausages during ripening

Ripening days	Control	Spray treatment
0	5.59±0.20 ^{1a}	5.59±0.20 ^a
1	5.55±0.04 ^a	5.53±0.13 ^a
2	5.10±0.04 ^b	5.08±0.03 ^b
3	4.97±0.05 ^b	4.97±0.01 ^{bc}
7	4.91±0.01 ^{bc}	4.90±0.05 ^{bc}
14	4.86±0.06 ^{bc}	4.87±0.06 ^{bc}
21	4.87±0.02 ^{bc}	4.86±0.02 ^{bc}
28	4.87±0.10 ^{bc}	4.85±0.12 ^{bc}
35	4.60±0.48 ^c	4.75±0.23 ^c

¹⁾All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters (^{a-c}) in each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (p<0.05).

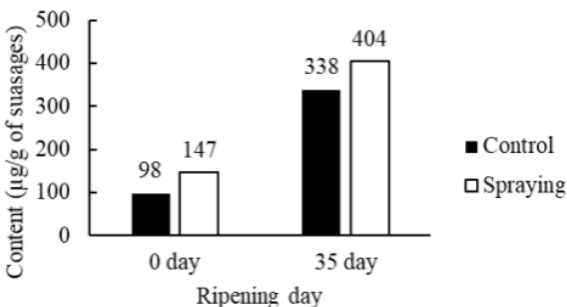


Fig. 3. Eugenol content of fermented sausages treated with clove ethanol extract analyzed by GC-MS.

효과가 더 우수한 것을 확인할 수 있었다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 유제놀의 1일 섭취허용량을 체중 1 kg 당 2.5 mg으로 설정하고 있다(Cortés-Rojas 등, 2014). 시중에서 판매되는 발효소시지의 1팩(50 g)을 기준으로 할 때, 클로브 추출물이 처리된 제품의 유제놀 함량은 약 2 mg/50 g 정도이다. 이를 고려하면, 어린이부터 성인까지 하루에 1팩씩 발효소시지를 섭취하더라도 WHO의 권장 섭취량을 초과하지 않으며, 안전성 측면에서 무리가 없을 것으로 판단된다.

4. 요약

본 연구는 클로브 추출액을 활용하여 발효소시지 제조 시 미생물 오염 저감 및 품질 특성을 분석하고자 하였다. 이를 위하여 발효소시지를 주 단위로 일반세균과 곰팡이 수를 분석하고, 품질 특성 분석을 위해 일반성분(수분, 단백질, 지방), 콜라겐, 염분, pH, 수분활성도, 유제놀 함량 분석을 수행하였다. 연구 결과, 클로브 추출액을 분무 처리한 발효소시지의 경우 대조구 대비 일반세균과 곰팡이 수가 유의적으로 감소했으며($p<0.05$), 28일 숙성 후 일반세균은 최대 74.4% 이상 감소하였으며, 곰팡이는 5주 차에 약 68% 감소하였다. 품질특성 분석 결과, 수분활성도와 pH는 발효 과정에서 대조구와 같이 안정적으로 유지되었다. 일반성분에서는 시간이 지나면서 수분함량이 줄어들어 따라, 고형분인 단백질, 지방 등 주요 성분이 증가하였고, 대조구와 유사한 수준을 보였다. 이는 향후 클로브 추출액을 실제 육가공업체에서 사용했을 때, 안정적으로 품질을 유지하면서 항균력을 보유할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 클로브 추출물 항균 효과의 유효성분인 유제놀의 잔류량은 최종 제품에서 대조구 대비 약 20% 높았으나, 풍미에 영향을 미치지 않는 수준으로 나타났다. 본 연구결과에서 도출된 결과는 클로브 추출액이 발효소시지 제조 과정에서 미생물 오염을 효과적으로 억제하고, 품질 유지에 기여할 수 있음을 확인하였다. 또한 클로브 추출액은 화학적 제제가 아닌 천연물의 사용으로 소비자들에게 안전한 육가공품을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

Funding

This work was supported by the Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (Project No. PJ015942) from the National Institute of Animal Science, Rural Development Administration (Korea).

Acknowledgements

None.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Lee E, Oh M. Methodology: Lee E, Kim J, Kim B. Formal analysis: Lee E. Validation: Lee E. Writing - original draft: Lee E. Writing - review & editing: Lee E.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Eun-seon Lee (First author)

<https://orcid.org/0000-0002-3957-0575>

Jong-hui Kim

<https://orcid.org/0000-0001-8669-993X>

Bu-min Kim

<https://orcid.org/0000-0001-7836-3360>

Mi-hwa Oh (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0001-7838-5260>

References

- Ahmed LI, Ibrahim N, Abdel-Salam AB, Fahim KM. Potential application of ginger, clove and thyme essential oils to improve soft cheese microbial safety and sensory characteristics. *Food Biosci*, 42, 101177 (2021)
- Alapont C, López-Mendoza MC, Gil JV, Martínez-Culebras PV. Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. *Food Addit Contam*, 31, 93-104 (2014)
- Al-Jalay B, Blank G, McConnell B, Al-Khayat M. Antioxidant activity of selected spices used in fermented meat sausage. *J Food Prot*, 50, 25-27 (1987)
- Andersen SJ. Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *J Food Prot*, 58, 426-429 (1995)
- Asefa DT, Gjerde RO, Sidhu MS, Langsrud S, Kure CF, Nesbakken T, Skaar I. Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol*, 128, 435-439 (2009)
- Barbuti S, Parolari G. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. *Meat Sci*, 62, 323-329 (2002)
- Buckenhuskes HJ. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol Rev*, 12, 253-271 (1993)
- Cortés-Rojas DF, de Souza CRF, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4, 90-96 (2014)

- Cui H, Zhang C, Li C, Lin L. Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Cont*, 94, 140-146 (2018)
- de Almeida JM, Crippa BL, de Souza VVMA, Alonso VPP, Júnior EDMS, Picone CSF, Prata AS, Silva NCC. Antimicrobial action of oregano, thyme, clove, cinnamon and black pepper essential oils free and encapsulated against foodborne pathogens. *Food Control*, 144, 109356 (2023)
- Gänzle MG. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr Opin Food Sci*, 2, 106-117 (2015)
- Garriga M, Aymerich T. The microbiology of fermentation and ripening. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, Toldrá F, Hui YH, Astiasarán I, Sebranek JG, Talon R (Editors), John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, USA, p 107-115 (2014)
- Go HY, Lee SH, Kim HY. The effect of hot-air dried *Lentinula edodes* on the quality and oranoleptic properties of rolled-dumplings. *Food Sci Anim Resour*, 42, 593-608 (2022)
- Kwon YD. Changes in marketing environments and prospect of cyber-agricultural market. *Korean J Agric Sci*, 23, 330-341 (1996)
- Lee CY, Kim KM, Son HS. Optimal extraction conditions to produce rosemary extracts with higher phenolic content and antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol*, 45, 501-507 (2013)
- Lee ES, Kim JH, Kim BM, Oh MH. Antioxidant and antifungal activities of essential oils against contaminating fungi isolated from fermented sausages. *J Korean Soc Food Cult*, 37, 446-453 (2022)
- Lee KT, Lee YK, Son SK, Choi SH, Lee SB. Changes in various quality characteristics of short-ripened salami during storage at chilled or room temperatures. *Food Sci Anim Resour*, 29, 24-33 (2009)
- Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int J Food Microbiol*, 106, 270-285 (2006)
- Mataragas M, Rantsiou K, Alessandria V, Cocolin L. Estimating the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages relative to temperature, pH and water activity. *Meat Sci*, 100, 171-178 (2015)
- Moawad RK, Mohamed OSS, Abdelmaguid NM. Shelf-life evaluation of raw chicken sausage incorporated with green tea and clove powder extracts at refrigerated storage. *Plant Arch*, 20, 8821-8830 (2020)
- Nguyen VT, Yu NH, Lee Y, Hwang IM, Bui HX, Kim JC. Nematicidal activity of cyclopiazonic acid derived from *Penicillium commune* against root-knot nematodes and optimization of the culture fermentation process. *Front Microbiol*, 12, 726504. (2021)
- Papagianni M, Ambrosiadis I, Filiouis G. Mould growth on traditional Greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat Sci*, 76, 653-657 (2007)
- Pierini GD, Bortolato SA, Robledo SN, Alcaraz, MR, Fernández H, Goicoechea HC, Zon MA. Second-order electrochemical data generation to quantify carvacrol in oregano essential oils. *Food Chem*, 368, 130840 (2022)
- Quinto EJ, Caro I, Villalobos-Delgado LH, Mateo J, De-Mateo-Silleras B, Redondo-Del-Río MP. Food safety through natural antimicrobials. *Antibiotics*, 8, 208 (2019)
- Rhayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K, Remmal A. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Essent Oil Res*, 15, 356-362 (2003)
- Silva MV, de Lima ADCA, Silva MG, Caetano VF, de Andrade MF, da Silva RGC, de Moraes Filho LEPT, de Lima Silva ID, Vinhas GM. Clove essential oil and eugenol: A review of their significance and uses. *Food Biosci*, 105112 (2024)
- Tapia MS, Alzamora SM, Chirife J. Effects of water activity (a_w) on microbial stability as a hurdle in food preservation. In: *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*, Barbosa-Cánovas GV, Fontana Jr. AJ, Schmidt SJ, Labuza TP (Editors), John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, USA, p 323-355 (2020)
- Teshome E, Forsido SF, Rupasinghe HV, Olika Keyata E. Potentials of natural preservatives to enhance food safety and shelf life: A review. *Sci World J*, 2022, 9901018 (2022)
- Toldrá F. Fermented meat and poultry (Vol. 422). In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, Hui YH, Guerrero-Legarreta I, Rosmini MR (Editors), Blackwell Publishing, Hoboken, New Jersey, USA, p 419-426 (2007)