살라미 외피로부터 분리한 곰팡이의 동정

유영현¹ · 김대호¹ · 정구용^{2*} · 홍승범^{1*}¹국립농업과학원 농업미생물과, ²상지대학교 동물생명자원학부

Identification of Fungal Strains Isolated from Salami Casing

Young-Hyun You¹, Dae-Ho Kim¹, Ku-Yong Chung^{2*} and Seung-Beom Hong^{1*}¹Korean Agricultural Culture Collection, Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea²Department of Animal Science and Technology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

ABSTRACT : The fungi play an important role in smell and taste during the fermentation of salami. In this study, the fungi from the salami casing during the fermentation process in Korea were isolated. They were examined by morphological and molecular methods and were identified as *Aspergillus cibarius*, *Penicillium echinulatum*, *Cladosporium sphaerospermum*. Of these, *A. cibarius* formed white or light green conidial heads on salami casing and it was widely distributed through almost whole casing. *P. echinulatum* occurred sparsely on the casing of the salami and formed white masses. *C. sphaerospermum* occurred rarely and formed black spots. It is considered that additional studies on their roles on salami are required.

KEYWORDS : *Aspergillus cibarius*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium echinulatum*, Salami

살라미(Salami)는 돼지고기, 소고기, 닭고기 등의 각종 고기에 소금, 향신료 등의 양념을 추가하고 이를 잘게 갈아서 가늘고 긴 외피에 넣은 후에 수일 또는 수개월간 자연 발효시킨 소시지의 일종으로 salt의 이태리어인 sale에서 유래하였다. 지중해 연안의 기후적 특성이 살라미의 자연숙성과 건조에 적합하기 때문에 이태리 북부에서 처음 제조되어 헝가리, 독일 등을 통하여 전파되었으며 저장성이 우수한 특징 등으로 인하여 현재는 전 유럽에서 널리 생산, 이용되고 있다. 살라미의 자연발효 기간 동안에 외피에 다양한 곰팡이가 발생하는데 곰팡이는 표면의 산화방지, 빛으로부터

변색, 건조 방지 등의 역할을 하며 또한 살라미에 독특한 향과 맛을 준다. 유럽에서는 *Penicillium nalgiovense*를 종균으로 인위적으로 접종하기도 한다[1].

우리나라는 반도국가로서 국토의 64%가 산림지대로 살라미의 종주국 이탈리아와 유사한 자연환경을 갖고 있으나 다른 식생활 구조로 살라미에 대한 기술개발 및 상품성이 부족하여 아직까지는 시장형성이 되지 않고 있는 실정이다. 하지만 목우촌 등에서 한국형 발효 육제품의 개발을 위하여 노력하고 있으며, 국민의 식생활 변화와 글로벌화로 살라미의 소비량은 기하급수적으로 확대될 것으로 예상된다[2].

본 연구는 우리나라에서 제조과정 중에 있는 살라미 외피로부터 주요 곰팡이를 분리하여 동정하고 그 결과를 보고하고자 한다.

발효과정 중인 살라미 외피를 실체현미경을 이용하여 관찰하면서 곰팡이를 분리하였다. 먼저 살라미 외피 전체에 골고루 퍼져 있고 실체현미경상으로 흰색 또는 녹색의 분생포자머리(Conidial head)를 이루는 *Aspergillus*속 균주를 (Fig. 1B) 핀셋으로 집어 MEA배지[Malt extract agar 50 g (Oxoid CM0059), distilled water 1L]와 DG18배지[Dichloran-glycerol agar base 31.5 g (Oxoid CM0729), glycerol 220 g, chloramphenicol 0.1 g, distilled water 1 L]배지에

Kor. J. Mycol. 2014 March, 42(1): 74-78
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.1.74
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: funguy@korea.kr; kychung@mail.sangji.ac.kr

Received March 16, 2014

Revised March 16, 2014

Accepted March 17, 2014

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Fig. 1. Fungi on salami. A, Salami casing; B-D, Conidial head of *Aspergillus* (B), *Penicillium* (C) and *Cladosporium* (D) on salami casing by stereomicroscope. Scale bars, 100 μ m.

streaking하였다. 또한 살라미 외피에 띄엄띄엄 흰색의 덩어리를 형성하는 *Penicillium*속 균류(Fig. 1C), 그리고 드물게 살라미 외피에 검은색 반점을 형성하는 *Cladosporium*속 균류(Fig. 1D)를 역시 MEA와 DG18배지에 streaking하였다. 이들을 배양한 후에 해당 균주는 MEA 또는 PDA 평판 배지로 옮기고 이들을 다시 단포자 분리한 후에 *Aspergillus* 균주는 KACC 47683, *Penicillium* 균주는 KACC 47682, *Cladosporium* 균주는 KACC 47684로 번호를 부여하고 사면배지에 배양한 후에 4°C에 보존하면서 동정 실험에 사용하였다.

살라미 외피로부터 분리된 3균주의 곰팡이는 분자적 방법과 형태적인 방법을 이용하여 동정을 수행하였다. 분자적 동정을 위하여 DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 이를 PCR 주형으로 사용하였다. *Aspergillus*(KACC 47683)와 *Penicillium* (KACC 47682)은 ITS영역(프라이머 ITS1, ITS4)[3]과 β -tubulin 유전자(프라이머 Bt2a, Bt2b)[4]를, *Cladosporium* (KACC 47684)은 ITS와 actin (ACT) 유전자(프라이머 512F, 783R)[5]의 염기서열을 해독하여 종 동정에 이용하였다. 해독된 염기서열은 NCBI에 blast 검색을 통하여 상동성이 높은 종을 선발하였으며 문헌조사를 통하여 이 종을 포함한 근연종의 염기서열을 확보하였다. *Asper-*

gillus section *Aspergillus* (완전세대 *Eurotium*)에 속하는 KACC 47683의 β -tubulin 유전자 염기서열(NCBI GenBank Accession no., KJ528497)은 Kim 등(2014) 논문[6]의 모든 *Eurotium* 종의 β -tubulin 염기서열과 함께, *Penicillium* subgenus *Penicillium* section *viridicatus*에 속하는 KACC 47682의 β -tubulin 유전자 염기서열(NCBI GenBank Accession no., KJ528496)은 Samson 등(2004) 논문[7]의 section의 모든 종의 β -tubulin 염기서열과 함께[7], *Cladosporium sphaerospermum* complex에 속하는 KACC 47684의 rDNA ITS와 ACT유전자 결합 염기서열[NCBI GenBank Accession no., KJ528498 (ITS), KJ528495 (ACT)]은 Bensch 등(2012) 논문[8]의 *Cladosporium sphaerospermum* complex의 모든 종의 rDNA ITS와 ACT 염기서열과 함께 유연관계도를 작성하였다. 유연관계도 작성은 MEGA version [5.2.2] 프로그램을 이용하였으며 다중 정렬은 ClustalW, 거리계산은 Tamura-Nei 상수 모델, 계통수(Phylogenetic tree)는 Neighbor-Joining (NJ)방법을 이용하였다[9]. 계통도 작성 결과, KACC 47683 균주는 *Aspergillus cibarius* 표준균주인 KACC 46346 균주와 하나의 그룹을 형성하였고 인접한 다른 종과는 먼 유연관계를 나타냈다(Fig. 2A). KACC 47682 균주는 *Penicillium echinulatum* 표준균주인 CBS 317.48 균주와 하나의 그룹을 형성하였고 인접한 *P.*

Fig. 2. Taxonomic position of fungal strains isolated from salami casing. Phylogenetic trees of *Aspergillus* (A) and *Penicillium* (B) were based on DNA sequence of partial β -tubulin gene and phylogenetic tree of *Cladosporium* (C) was based on combined data of the rDNA-ITS and partial actin gene sequences. In *Cladosporium* tree (Fig. 2C), there are two NCBI accession numbers on every fungal strains, the former is accession no. of rDNA ITS and the latter is that of ACT gene. CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. KACC: Korean Agricultural Culture Collection, Suwon, Republic of Korea; NRRL: ARS Culture Collection, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA. EXF: Culture Collection of Extremophilic Fungi, Biotechnical Faculty, Ljubljana, Slovenia. The "T" after the collection number indicates the type strain of the species.

solitum, *P. discolor*와는 차이를 보였다(Fig. 2B). KACC 47684 균주는 *Cladosporium sphaerospermum* 표준 균주인

CBS 193.54, *C. sphaerospermum* CBS 109.14, EXF-738와 100% bootstrap 값으로 하나의 그룹을 형성하였고 *C.*

sphaerospermum complex의 다른 종과는 먼 유연관계를 나타내었다(Fig. 2C).

형태적 동정을 위하여 25°C 조건 하에 MEA배지와 DG 18배지에서 이들의 성장특성을 관찰하였고, 광학현미경 (Zeiss, Germany)을 이용하여 분생포자경(Conidiophore)과 분생포자(Conidium), 자낭구(Cleistothecium), 자낭포자(Ascospore) 등의 미세구조를 관찰하였다.

KACC 47683은 노란색의 풍부한 자낭구를 형성하고 4.5~5.5 μm 의 자낭포자를 형성하였으며 3.5~6.0 μm 의 크기의 돌기가 있는 타원형 분생포자를 형성하여 *A. cibarius*의 전형적인 특징을 나타냈다(Fig. 3). KACC 47682는 *P. echinulatum*의 특징인 돌기가 있는 분생포자경의 자루(Stipe), 3~4 μm 크기의 구형의 거친 분생포자를 관찰할 수 있었다(Fig. 3). KACC 47684는 *C. sphaerospermum*의 특징인 2~

Fig. 3. Description of fungal species from salami casing. *Aspergillus cibarius* KACC 47683 (A. Colonies on DG18, B. Cleistothecia by stereomicroscope, C. Conidial head, D. Cleistothecium, E. Conidia, F. Ascospore); *Penicillium echinulatum* KACC 47682 (G. Colonies on MEA, H. Conidial heads by stereomicroscope, I. Conidiophores, J. Conidia), *Cladosporium sphaerospermum* KACC 47684 (K. Colonies on MEA, L. Conidial heads by stereomicroscope, M. Conidiophores, N. Conidia). Scale bars, C, D, I, M: 20 μm , E, F, J, N: 5 μm .

3개로 분지된 분생포자경, 3~4 μm 크기의 구형인 작은 분생포자와 8~12 μm 크기의 작은 돌기가 있는 타원형의 큰 분생포자를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

이상의 분자적 특징과 형태적 특징을 종합하여 KACC 47683 균주는 *Aspergillus cibarius* S.B. Hong & R.A. Samson으로, KACC 47682 균주는 *Penicillium echinulatum* Raper & Thom ex Fassat.로 그리고 KACC 47684 균주는 *Cladosporium sphaerospermum* Penz.로 최종 동정되었다.

*A. cibarius*는 국내의 메주에서 2013년에 처음으로 보고된 종이다[10]. 이 종은 또한 유럽의 빵, 검은콩(Black bean), 살라미 등에서도 분리가 되었는데 수분활성도가 낮은 곳에서 잘 자란다는 것 이외에는 아직 특성이 잘 밝혀져 있지 않다. 우리나라 대표적인 전통음식인 된장과 간장의 주요 재료인 메주에서 처음 분리된 곰팡이가 서양의 대표 발효 식품 중의 하나인 살라미의 국내 생산에서 발견되는 것은 아주 흥미로운 일이다. *P. echinulatum*은 북극, 한대, 온대 지방 등의 낮은 온도에서 잘 자라며 또한 낮은 pH, 수분활성도에 내성을 가진다. 토양, 목재 및 목재 부산물에서 분리되며 식품으로는 버터, 마가린 등 지방식품, 냉장치즈, 건조 육류 등에서 흔히 분리된다[11]. *C. sphaerospermum*은 세계적으로 분포하며 실내공기, 곡류, 과일 등에서 분리된다. 낮은 수분활성도에서도 잘 자란다[11].

이상과 같이 우리나라에서 제조하는 살라미 외피에 발생하는 주요 곰팡이의 동정과 해당 곰팡이 종의 일반적인 특징을 기술하였다. 하지만 실제 이 곰팡이들이 살라미에 어떤 영향을 미치는지에 대하여는 추가의 실험이 필요하겠다. 본 실험에서 분리된 곰팡이는 농업미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC; <http://www.gene-bank.go.kr>)에 장기보존 되었으며, 살라미 제조에서의 역할 등의 추가적인 연구에 활용될 수 있을 것이다.

적 요

각종 육류를 세균, 곰팡이 등의 다양한 미생물로 발효시켜 만든 살라미는 서양인들에게는 치즈만큼이나 널리 애용되는 식품이다. 국내의 살라미 소비는 수입에 의존하였었는데, 최근에 국내산 육류를 이용하여 살라미를 제조하고자 하는 시도가 진행되고 있다. 살라미 제조 시의 곰팡이는 살라미 껍질에 주로 발생하여 내부의 육류가 세균에 의하여 안정되게 발효될 수 있도록 돕고, 살라미의 풍미에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서 제조 중에 있는 살라미의 껍질을 실체현미경으로 관찰하고 주요곰팡이를 직접 분리하였으며, 형태적, 분자적 방법에 의하여 동정하였다. 이들은 *Aspergillus cibarius* S.B. Hong & R.A. Samson, *Penicillium echinulatum* Raper & Thom ex Fassat.,

Cladosporium sphaerospermum Penz.으로 동정되었는데, *A. cibarius*는 살라미 껍질에 흰색 또는 옅은 녹색으로 자라며 전체에 넓게 분포하였다. *P. echinulatum*은 살라미 껍질에 띄엄띄엄 발생하였으며 흰색의 덩어리를 형성하였다. *C. sphaerospermum*은 살라미 껍질에 드물게 발생하였으며 검은 반점을 형성하였다. 이들의 살라미 제조에서의 역할 및 살라미 제조에의 활용에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 과제(No. PJ00866601)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Web site of Wikipedia [Internet], [Cited 3 march 2014]. Available from <http://en.wikipedia.org/wiki/Salami>.
2. Web site of Korea Pork Producers Association [Internet], [Cited 24 July 2011]. Available from <http://www.koreapork.or.kr/sub2.html>.
3. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California; 1990.
4. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol 1995;61: 1323-1330.
5. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 1999;91:553-556.
6. Kim DH, Kim SH, Kwon SW, Lee JK, Hong SB. *Aspergillus cumulatus* sp. nov., from rice straw and air for Meju fermentation. J Microbiol Biotechnol 2014;24:334-336.
7. Samson RA, Seifert KA, Kuijpers AFA, Houbraken J, Frisvad JC. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. Stud Mycol 2004; 49:175-200.
8. Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW. The genus *Cladosporium*. Stud Mycol 2012;72:1-401.
9. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. Mol Biol Evol 2011;28:2731-2739.
10. Hong SB, Lee M, Kim DH, Meijer M, Majoor E, Kuyk PA, Samson RA. *Aspergillus cibarius* sp. nov., from traditional Meju in Korea. J Microbiol 2012;49:669-674.
11. Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. CBS laboratory manual series 2. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; 2010.