

유산균으로 제조한 속성 흰점박이꽃무지 염장소스의 특성

최주영*, 조현솔*, 박정철**, 홍선미*
*환동해산업연구원 기술개발부 소재산업화팀
**농업회사법인 주식회사 동의보궁
e-mail:hongsunmee@mire.re.kr

Production of *Protaetia brevitarsis*'s Salt-Sauce using LAB and the Qualitative Evaluation

Ju Young Choi*, Hyun Sol Jo*, Jung Chul Park**, Sun Mee Hong*
*Dep. Research and Development, Inst. MIRE,
**Agricultural Company Corporation, DongUiBoGum, Korea

요약

본 연구는 식용곤충의 하나인 흰점박이꽃무지 (*Protaetia brevitarsis*, Pb)를 천일염과 정제염을 이용하여 염장한 후 유산균 접종에 의해 속성발효하여 제품의 성분분석과 그 특성을 분석하였다. 흰점박이꽃무지는 유산균 무침가군과 점가군에서 미생물과 효소의 작용에 의해 3-6개월간 발효하였다. 유산균에 의해 발효 숙성되는 흰점박이꽃무지의 글루탐산이 글루탐산 모노나트륨(monosodium glutamate, MSG)와 가바(γ -aminobutyric acid, GABA)로 전환되었다. 흰점박이꽃무지 염장 소스는 유리아미노산 함량도 무치리군보다 높아지며 맛, 향 등도 우수하였다. 우리는 일반성분, 염도, 당도, 중금속, 지방산과 그 숙성 기간 동안 유산균과 기타 미생물의 분포를 16s RNA 로 확인하여 3-6개월의 적정 숙성 기간을 확인하였다. 또한 세포독성 없고 중금속 저감효과가 확인되었으며 항산화기능과 증성지방 저감의 효과가 있었다. 이 결과는 식용곤충을 이용한 첫 염장 소스로 기타 다른 식용곤충에 응용하여 다양한 식품으로의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

1. 서론

곤충은 단백질 함량이 높을 뿐만 아니라 필수아미노산의 조성도 우수한 양질의 단백질 공급원으로, 육류와 어류를 대체할 미래 식품으로 떠오르고 있으며, 이러한 곤충의 영양적 우수성은 최근 대중에게도 인식되고 있다(1). 또한 곤충에 함유된 지방은 육류에 비해 불포화지방산 함량이 상당히 높고, 곤충 표피의 키틴질로부터 유래되는 식이성섬유, 칼슘이나 철과 같은 무기질함량과 비타민에 이르기까지 곤충의 영양기능 가치가 높다. 한편, 흰점박이꽃무지는 고단백, 고영양 식품 원료로서, 주요 아미노산 성분 중 글루탐산이 풍부한 것으로 알려져 있다. 글루탐산을 매개로 발효 식품가공 공정을 거치면 GABA(γ -aminobutyric acid) 함량이 증가 된다. GABA는 식품에 미량 존재하고 제품의 형태가 모두 불용성 형태로 제품 개발에 한계점을 나타낸다. 이러한 문제의 해결을 위하여, 유산균을 이용하여 기질 중에 첨가 된 모노소듐글루타메이트(MonoSodium Glutamate, MSG)를 탈탄산효소를 이용하여 GABA로 전환시킨 후 배양액 중 축적되어 있는 GABA만을 회수 농축한 제품이 개발된 바 있다(2).

본 연구에서는 유산균을 이용하여 흰점박이꽃무지의 속성 발효에 대한 공정을 확립하는 한편 그에 관련한 성분, 특성 및 가바함량에 대한 분석을 실시하였다. 식용곤충 염장 소스

개발을 통해 다양한 식용곤충 시장을 확대하고 연구 자료로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

흰점박이꽃무지 3령(중령) 유충을 35일간 키우고 3일동안 절식시켜 흰점박이꽃무지 유충의 내장을 깨끗하게 하였다. 상기 얻어진 유충을 60℃에서 48시간동안 열풍건조하여 살충 및 건조하고, 식품용 분쇄기를 사용해 분말로 제조하였다. 구체적으로, 식품 분쇄기 사용에 의한 열 발생을 방지하기 위해 1분간 분쇄 후 3분간 휴지하는 분쇄 사이클을 5회 반복하여, 흰점박이꽃무지 유충의 분말(Pb)을 제조하였다.

2.2 균주

가바를 함유하는 발효물 제조를 위해, 항균활성과 효소활성 등의 기능을 가지는 유산균 균주인 락토바실러스 플란티움(*L. plantarum*, Lp) 및 웨이셀라 파라메센테로이드(*W. paramesenteroides*, Wp)를 각각 해양심층수와 발효 톱밥에서 분리 및 동정하여 이용하였다.

2.3 흰점박이꽃무지 소스 속성제조

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 제조에 있어, 유산균 발효를 위한 최적의 염장 조건을 확립하기 위해, 소금의 종류와 농도 및 유산균 발효 시간을 달리하여 실험을 수행하였다(3). 흰점박이꽃무지 염장물을 제조하기 위하여, 먼저 소금의 종류로는 천일염과 정제염의 두 가지를 준비하였다. 흰점박이꽃무지 유충과 상기 각 소금의 혼합비는, 유충 14kg에 소금 6kg, 또는 유충 12kg에 소금 8kg를 혼합하여 소금 함량 30%(w/w) 또는 소금 함량 40%(w/w)로 준비하였다.

2.4 흰점박이꽃무지 소스내의 미생물 분석

미생물 및 유산균 균주는 16S rRNA의 염기서열 분석을 이용하여 동정되었다. 균주를 동정하기 위해, 우선 mini genomic DNA extraction kit(Promega)를 이용하여 각 균주의 유전체 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 상기 분리된 유전체 DNA를 주형으로, 하기의 27F 및 1492R 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler(Japan)으로 상기 균주 2종의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭하였다.

2.5 흰점박이꽃무지 소스내의 가바분석

제조된 흰점박이꽃무지 열수추출물과 상기 열수추출물에서 발효시간을 달리한 유산균 발효물 내 가바 존부를 확인하기 위해 얇은막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) 분석을 수행하였다.

2.6 흰점박이꽃무지 소스내의 성분분석

pH와 염도는 흰점박이꽃무지 염장 발효물 및 대조군 액젓을 1/10으로 물에 희석한 다음, pH meter(Pettler Tolendo, USA) 및 염도측정기 (PTAGO salt meter, USA)를 이용하여 측정하였다. 당도는 희석 과정 없이 원액 그대로를 당도계(ATAGO Refractometer, USA)로 측정하였다.

2.7 흰점박이꽃무지 소스내의 항산화능 분석

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 항산화 효과를 확인하기 위해 발효 숙성 기간을 달리 하여 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)를 이용하여 자유라디칼 소거 활성 분석을 수행하였다.

2.8 세포독성 실험

흰점박이꽃무지 염장 발효물의 유산균 첨가 전 염장 숙성 기간에 따른 인간 비만세포에 대한 세포주 독성 실험을 수행하였다. 상기 인간 비만 세포는 3T3-L1(ATCC CRL-3242) 세포주를 이용하였으며, 독성 시험은 Cell counting kit-8

(CCK-8, Dojindo)을 이용하여 측정하였다.

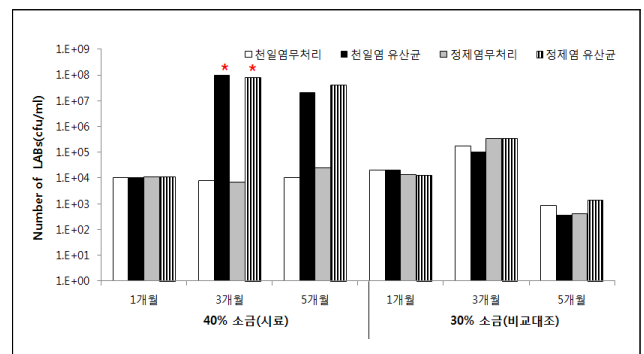
2.8 중성지방 저감 효과 분석

세포 배양 플레이트 내에 세포가 90% 이상 차게 되면 PBS(Phosphate buffered saline)으로 2회 세척하고 Trypsin-EDTA(wellGENE, Korea)를 처리한 후 원심분리하여 세포를 수집해 5X10⁵ cells/well의 밀도로 6-well plate의 각 웰에 세포를 분주하였다. 각 Well에는 실시예 7-2와 동일한 배양 배지가 첨가되었으며, 다시 6-well plate에서 세포가 90% 정도 각 웰에 차게 되면 48시간 방치하였다. 그런 후에 세포의 분화 유도를 위해서, DMEM에 10%(v/v) FBS와 23mg/ml IBMS(sigma USA), 5mg/ml insulin(Sigma, USA), 1Mm dexamethasone(Sigma, USA)이 첨가된 배지를 처리하여 세포 분화를 48시간 동안 유도한 후에, 2일마다 10%(v/v) FBS DMEM 배지에 5mg/ml 인슐린(insulin)이 첨가된 배지로 교체하였다. 양성 대조군으로는 5mg/ml 인슐린을 포함하는 10%(v/v) FBS DMEM 배지를 첨가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 유산균 생균수를 고려한 제조 조건 분석

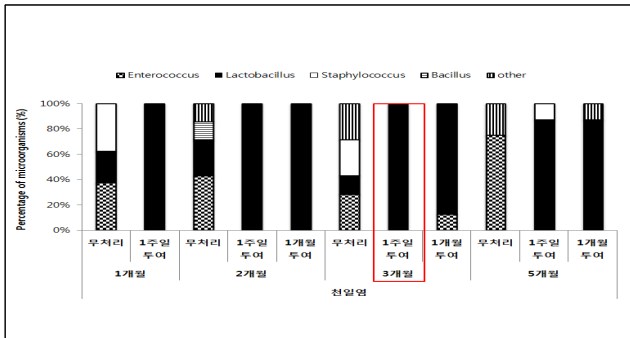
흰점박이꽃무지 염장물을 제조하기 위하여, 먼저 소금의 종류로는 천일염과 정제염의 두 가지를 준비하였다. 흰점박이꽃무지 유충과 상기 각 소금의 혼합비는, 유충 14kg에 소금 6kg, 또는 유충 12kg에 소금 8kg를 혼합하여 소금 함량 30%(w/w) 또는 소금 함량 40%(w/w)로 준비하였다. 유산균 첨가 후 발효는 25 내지 30℃온도로 유지하여 수행하였다. 발효기간으로서 유산균 첨가일로부터 1개월, 3개월 및 5개월 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 유산균 발효 조건을 확인하였으며, 측정 결과를 그림 1에 나타냈다.



[그림 1] 흰점박이꽃무지의 염장물 제조를 위한 염장 조건과, 유산균 배양 기간에 따른 유산균 수 (cfu/ml)

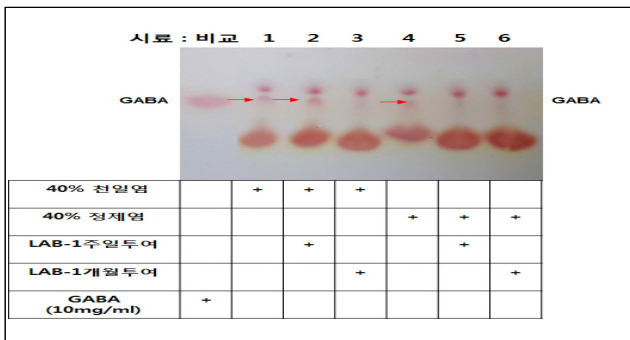
3.2 유산균 배양 조절에 따른 염장물의 미생물 분포
천일염을 사용한 염장 발효물의 유산균 투입 시기 및 발효숙성 기간에 따른 미생물 종 및 분포를 나타내었

으며, 정제염을 사용한 경우의 결과를 나타낸 것이다 (그림 2). 미생물 분포는 전체 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 전체 16S rRNA의 시퀀싱 리드 대비 해당 균종으로 밝혀진 시퀀싱 리드의 비율(%)로 표시되었다.



[그림 2] 천일염을 이용한 염장 발효물 제조 조건에 따른 염장 발효물 내 미생물의 분포

3.3 유산균 배양 조적에 따른 염장물의 가바생산
 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 가바 함량을 실시예 2-3과 동일한 방법으로 TLC 분석을 통해 확인하였다. 대조군으로는 GABA 1%(w/v) 용액을 이용하였다. 구체적인 시료의 제조는 조건은 그림 3에 나타낸다. 유산균을 첨가하지 않은 염장물에서도 GABA의 함량이 확인되었으나, 1주일간 염장숙성 후 유산균을 첨가하여 발효 숙성을 거친 시료에서 GABA를 나타내는 Band가 더 진하게 나타나, 가바의 함량이 증가하였음을 정성적으로 확인하였다.



[그림 3] 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 가바 함량을 TLC로 분석

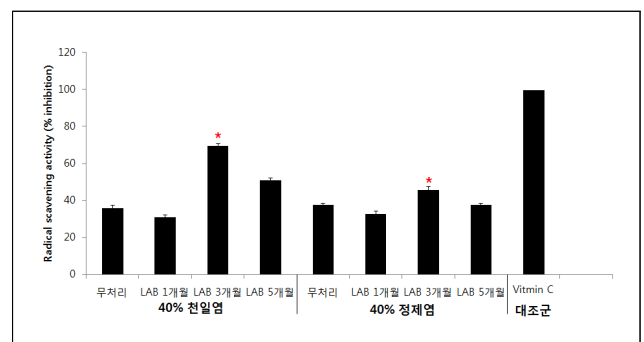
3.4 흰점박이꽃무지 염장발효물의 성분분석

천일염으로 염장한 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 부처리균의 열량은 24.56 (g/100g), 수분 76.22 (g/100g), 조단백질 10.1 (g/100g), 조탄수화물 4.86 (g/100g), 조지방 0.12 (g/100g)이고 초기 젖산균 투여의 경우는 열량은 18.27 (g/100g), 수분 77.47 (g/100g), 조단백질 12.6 (g/100g), 조탄수화물 2.97 (g/100g), 조지방 0.15 (g/100g)이었다. 정제염으로 염장한 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 부처리균의 열량은 9.77 (g/100g), 수분 81.75 (g/100g), 조단백질 8.96 (g/100g), 조탄수화물 1.35 (g/100g), 조지방 0.09

(g/100g)이고 초기 젖산균 투여의 경우는 열량은 13.48 (g/100g), 수분 78.18 (g/100g), 조단백질 11.4 (g/100g), 조탄수화물 2.05 (g/100g), 조지방 0.08 (g/100g)로 나타났다. 총질소의 경우 천일염과 정제염의 경우 무처리의 경우가 각각 0.16 %, 0.15 %로 었으나, 젖산균을 투여한 그룹에서는 모두 0.2 %, 0.18%로 다소 높게 나타났다. 타르색소는 모두 불검출이고 보존료의 경우 안식향산이 천일염과 정제염에서 모두 0.01 g/kg이고 파라옥시안식향산, 소브산, 프로피온산은 검출되지 않았다. 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 pH는 유산균이 첨가되지 않은 시료는 pH6.9이고, 유산균이 첨가된 경우에 염장 숙성 기간이 1주일인 시료에서는 pH 5.93, 염장 숙성 기간이 1개월인 시료에서는 pH 6.03으로 나타났다. 당도는 유산균 미첨가 시료에서 31.5 brix이나, 유산균을 첨가한 시료에서는 염장숙성 기간 1주일 및, 1개월일 때 각각 32.2 및 32.3brix로 나타났다. 염도는 유산균 미처리군이 29.9%로 높았으나, 유산균을 투여한 그룹에서는 모두 27.2%로 다소 감소하였다.

3.5 흰점박이꽃무지 소스의 항산화기능

천일염을 사용한 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 경우, 염장하고 발효 숙성을 수행하지 않은 천일염 대조군에 비해, 발효 숙성 기간이 1개월인 때에는 DPPH 억제율이 30.9%로 일시적으로 낮아졌으나, 발효 숙성 기간이 3개월인 때에는 DPPH 억제율이 69.4%로 증가하였고, 발효 숙성 기간이 5개월이 되자 DPPH 억제율이 다시 51%로 감소하였다. 따라서 흰점박이꽃무지 열수추출물의 유산균 발효물을 첨가한 후 3개월간 숙성시킨 염장 발효물이 가장 높은 항산화 효능이 있는 것으로 조사되었다(그림 4).

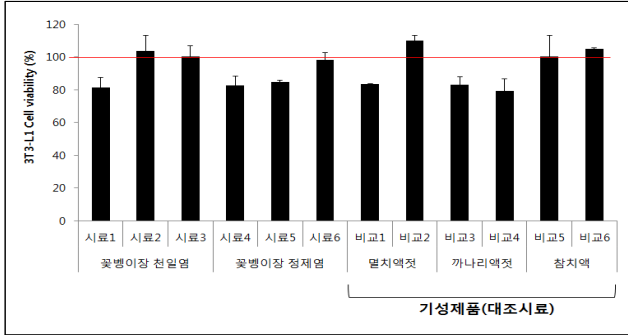


[그림 4] 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)를 이용하여 자유라디칼 소거 활성 분석

3.6 흰점박이꽃무지 소스의 세포주 독성실험

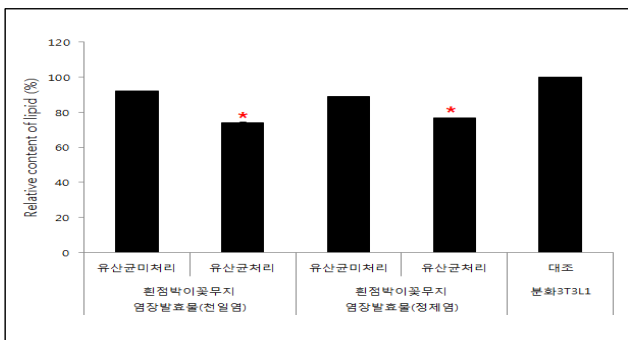
유산균을 첨가하지 않은 천일염 흰점박이꽃무지 염장물을 제외하고는 유산균을 첨가하여 발효숙성을 수행한 시료 모두에서 세포수가 대조군 대비 100% 정도로 유지되거나 소폭으로

감소하여, 세포가 증식됨을 확인할 수 있었다. 시판 액젓 시료에서는 멸치액젓(CJ) 및 참치액은 대조군(DMEM배지)대비 세포수가 유지되거나 소폭 증식하였으나 멸치액젓(청정원)과 까나리액젓 시료에서는 세포 수가 감소하는 것으로 확인되었다(그림5). 따라서, 본 발명의 흰점박이꽃무지 염장 발효물은 3T3L1세포주에 대해 독성이 낮고 안전함을 확인하였다.



[그림 5] 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 독성 실험

3.7 흰점박이꽃무지 염장발효물의 중성지방 저감효과 천일염과 정제염을 사용한 경우에 모두 유산균 발효를 수행하지 않은 시료의 지방축적률은 89.2% 및 92.2%이며, 유산균을 첨가하여 발효 숙성을 진행한 시료는 지방축적률이 74.1 및 76.7%로 크게 감소하였다. 따라서 본 발명에 따른 흰점박이꽃무지 염장 발효물은 비만세포 내에서 지방 축적을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(그림6).



[그림 6] 흰점박이꽃무지 염장 발효물의 독성 실험

3.8 흰점박이꽃무지 염장발효물의 중금속 저감효과 흰점박이꽃무지의 염장물 또는 염장 발효물은, 카드뮴 함량은 0.0013 및 0.0021 mg/kg으로, 대조군에 비해 약 62배 내지 102배 감소하였으며, 식품공전의 중금속 기준값을 충족하였다.

수은은 모든 시료 염장물 또는 염장발효물에서 검출되지 않았으며, 비소의 경우 0.0091 및 0.0145 mg/kg로 검출되어 대조군에 비해 약 690배 내지 1,100배 감소하였으며, 식품공전의 기준보다 현저히 낮은 비소 수치를 보였다.

크롬은 모든 시료 염장물 또는 염장발효물에서 1.14 ug/100g

및 1.97 ug/100g으로 나타나, 대조군에 비해 2배 내지 20배 이상 감소하였다(표1).

따라서 본 발명에 따른 흰점박이꽃무지의 염장물 또는 염장 발효물은 소금 및 유산균에 의한 숙성 과정을 거치며 유해 중금속 성분의 식품 내 함량이 현저히 감소하여, 식품으로서 적합하고 인체 안전성이 우수함을 확인하였다.

[표 1] 흰점박이꽃무지 염장물이 중금속 함량

단위	3개월 숙성 꽃뱅이장	천일염		정제염		대조군 (흰점박이꽃무지)
		시료1 (무첨가)	시료2 (초기유산균 투여)	시료3 (무처리)	시료4 (초기유산균 투여)	
크롬(ug/100g)		1.14	1.97	1.18	1.83	27.28
중금속	카드뮴(mg/kg)	0.0015	0.0016	0.0013	0.0021	0.1326
	비소(mg/kg)	0.0113	0.0115	0.0091	0.0145	10.0129
	수은(mg/kg)	불검출	불검출	불검출	불검출	0.0236

본 연구는 흰점박이꽃무지의 염장 발효물을 포함하는 식품 또는 기능성 식품 및 흰점박이꽃무지의 염장 발효물을 제조하는 방법을 제공한다. 염장 발효물의 제조 방법은 염장 후 유산균을 첨가하는 단계를 포함하며, 연구에서 제조된 식품 조성물은 가바(GABA)를 포함하고, 체내 지방 축적을 저해하며, 중금속 함량이 낮아 식품으로서 안전성을 가져 다른 식품군중에도 유효할 것으로 생각된다.

사사

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농생명기술개발사업(118034-2)과 미래형혁신식품기술개발사업(119027-3)지원을 받아 연구되었습니다.

참고문헌

- [1] 전정우, “사염화탄소에 의해 유발된 흰쥐의 간독서에 미치는 흰점박이꽃무지 추출물의 간보호 효과”, 한국잡사학잡지, 제 50권 2호, pp. 93-100, 2012년.
- [2] 엄인선, “시판 까나리(Ammodytes personatus) 액젓의 biogenic amines 함량”, 한국수산과학회지, 48(6) pp. 883-887, 2015년
- [3] 정연경, “소금 종류가 멸치액젓의 품질에 미치는 영향”, JFMSE, 29(1) pp. 325-331, 2017년