

식용 번데기의 저장 중 Biogenic Amine 함량 변화와 품질지표 개발

조태용* · 한규홍¹ · 강병선² · 김선봉³

식품의약품안전청 위해기준팀, ¹식품의약품안전청 식중독예방관리팀,
²영동대학교 와인발효식품학과, ³부경대학교 식품공학과

Changes of Biogenic Amine Level during Storage and Development of New Quality Index on Silkworm Pupa

Tae-Yong Cho*, Gyu-Hong Han¹, Byung-Sun Kang², and Seon-Bong Kim³

Food & Risk Standardization Team, KFDA

¹Foodborne Disease Protection Team, KFDA

²Department of Food Fermentation, Young-Dong University

³Department of Food Science and Technology, Pukyong National University

(Received September 5, 2007/Accepted December 7, 2007)

ABSTRACT – A study on the evolution of acid value, peroxide value and biogenic amines in silkworm pupa during 7 days at different temperature of storage (-18, 25 and 35°C) was performed. Seven biogenic amines (putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine, spermine and 2-phenylethylamine) were determined. Acid value in Silkworm pupa increased both during normal temperature (25°C) and room temperature (35°C) and the biogenic amine (histamine, tyramine) content generally increased in 25°C and 35°C with storage time. Significant differences were found ($P < 0.05$) in the levels of tyramine and histamine among Silkworm pupa. The relationship of storage time and acid value of Silkworm pupa were resolved a simple linear equation, and histamine and tyramine could be predicted using this equation. Quality indices related to the contents of the major biogenic amines were calculated and they correlated well with physicochemical characteristics qualities such as acid value.

Key words: Silkworm pupa, biogenic amine, quality index, acid value

서 론

번데기(silkworm pupa, *Bombyx mori* L.)는 실크산업의 부산물로 국외에서는 주로 동물의 사료와 비료로 쓰여 왔으나, 우리나라에서는 소형 가관대를 중심으로 증가한 번데기를 식용으로 판매되어 섭취하고 있다. 이러한 번데기에는 단백질이 많이 함유되어 있고¹⁾, 본초강목, 동의보감 등에서 천연 자양 강장 식품으로 품과 여원 것을 다스린다고 한다는 내용을 살펴볼 때 번데기는 예로부터 섭취된 식품인 것을 알 수 있다²⁾. 하지만 현재 번데기의 경우 국외에서는 섭취하지 않는 혐오식품으로 알려져 있고, 대부분의 생산되는 번데기가 우리나라로 수입되는 것을 보면

우리나라는 식용 번데기의 다소비 국가인 것이다. 때문에 우리나라 식품공전에서는 규격외 기타가공품으로 번데기를 분류하여, 산가 5.0 이하, 과산화물가 60 이하로 규격을 관리하고 있다. 이는 식용 번데기의 경우 단백질 49.9% 및 지방 33.4%를 함유하고 있으며 특히, 지방에는 불포화 지방산을 많이 함유하고 있어³⁾, 산패에 의한 변질이 쉽기 때문에 산패의 품질지표를 나타내는 산가와 과산화물가를 규격 관리하고 있는 것이다. 하지만 번데기는 원료 자체가 지니고 있는 다량의 유리 지방산으로 인하여 산가가 높아질 수 있기 때문에⁴⁾, 새로운 품질지표의 개발이 필요하다.

Biogenic amine은 단백질 식품을 함유한 식품이 미생물에 의해 부패되거나 발효되는 과정에서 유리 아미노산의 탈탄산반응으로 생성되는 물질⁵⁾이며, 최근 식품 변패 정도의 척도로 사용되고 있다⁶⁾. 즉, 치즈의 신선함의 척도⁷⁾, 생선 및 수산물의 신선도⁸⁾ 및 기타 단백질 식품에서 위생지표로 사용된다. 이는 단백질의 분해로 인한 변패가

*Correspondence to: Tae-Yong Cho, Food & Risk Standardization Team Korea Food and Drug Administration, 194 Tongil-ro, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea
Tel: 82-2-352-4797, Fax: 82-2-352-4606
E-mail: okcho@kfda.go.kr

biogenic amine의 함량을 증가시키고, 식품의 품질과 상관 관계를 가진다는 것을 의미하며 번데기의 경우에도 단백질의 함량이 높고 여러 아미노산을 함유하고 있기에 새로운 품질지표로서 biogenic amine을 검토할 여지가 있다.

따라서 본 연구에서는 온도에 따른 저장기간중 식용 번데기에서 산가의 경시변화와 biogenic amine의 함량과의 상관관계를 살펴봄으로써 식용 번데기의 품질지표로서 biogenic amine을 검토하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Biogenic amine의 표준품putrescine(PUT) dihydrochloride (98%), cadaverine(CAD)(95%), histamine(HIS) dihydrochloride (99%), tyramine(TYR) hydrochloride(99%) 및 유도체시약 dansyl chloride는 모두 Sigma사(Steinhein, Germany)에서 구입한 것을 사용하였다. 이동상인 acetonitrile은 HPLC급을 사용하였으며 에테르 등 시약은 모두 특급을 사용하였다. 번데기는 2006년 11월 중국에서 수입된 것을 바로 사용하였으며, polyethylene 비닐백에 넣어 -18°C, 25°C 및 35°C에서 7일간 저장하였다.

산가

번데기에서 추출한 유지 시료 2-3 g을 정확히 100 mL 들이 삼각 플라스크에 넣고 diethyl ether-ethanol 혼합용액 20-40 mL를 가하여 녹인 다음 1% phenolphthalein 용액 2-3방울을 가하고 0.1N KOH·ethanol 용액으로 적정하였다. 용액이 미홍색으로 30초간 계속될 때를 종말점으로 하였다.

과산화물가

번데기에서 추출한 유지시료 0.5-1.0 g을 정확히 200 mL 삼각플라스크에 넣은 다음 chloroform 10 mL를 가하여 녹이고, 빙초산 15 mL를 가하여 혼합하였다. 여기에 KI 포화용액 1 mL를 가한 다음 마개를 하고 1분간 심하게 흔들 다음 15분간 어두운 곳에 방치한 후 물 75 mL를 가하고 전분용액을 지시약으로 하여 0.01 N Na₂S₂O₃용액으로 적정하였다.

Biogenic amine의 정량

시료추출 및 유도체화 - BAs의 분석은 일본 식품위생시험법¹⁰⁾의 불휘발성부패아민 분석법을 변형하여 사용하였다. 시료 약 2-5 g을 취하여 산성용액(0.1 N 염산 또는 0.4 M 인산 또는 5% 삼염화초산) 20 mL를 가한 후 균질화하고, 이것을 원심분리(3,000 rpm, 4°C, 15 min)한 후 상층액을 취하고 잔사에 다시 산성용액 20 mL를 가하여 위의 조작을 반복하여 얻은 상층액을 합쳐 산성용액 50 mL

로 한 것을 추출용액으로 하였다.

Dansyl chloride를 이용한 유도체화는 혼합 표준용액 및 추출용액 각각 1 mL을 마개 달린 시험관에 취한 다음 내부표준용액(I.S.)(100 mg/L) 100 µL를 가한 후 포화 탄산나트륨 용액 0.5 mL와 1% dansyl chloride 아세톤용액 1 mL를 가하여 혼합한 후 마개를 하여 45°C에서 1시간 유도체화하였다. 유도체화 후 10% proline 용액 0.5 mL를 가하여 과잉의dansyl chloride를 제거하였다. 시험관에 에테르 5 mL를 가하여 3분간 진탕하고 상층액을 취하여 질소농축한 뒤 아세토니트릴 1 mL를 가하여 0.45 µm로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

기기분석 조건 - Diode array 검출기 및 형광검출기가 부착된 HPLC(Shiseido SI-2, Shiseido Co. Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였고 분리칼럼으로는 Shiseido UG-120(4.6 mm × 250 mm, 5 µm particle size)를 사용하였다. 유속은 1 mL/min, 칼럼온도는 40°C를 유지시켰다. Dansyl chloride 유도체의 이동상 조건은 55% 아세토니트릴을 최초 10분간 유지 후 15분까지 65%, 20분까지 80%로 하여 5분간 유지 후, 30분까지 90%로 하여 5분간 유지시켰다. 검출과장은 UV 254 nm 및 형광Ex 325 nm, Em 525 nm로하였다(Fig. 1).

통계분석

온도별로 번데기의 산가와 biogenic amine의 tyramine와 histamine을 지표로하여 품질변화의 지표를 결정하고자 하였다. 즉, 서로 다른 온도에서 저장하여 측정된 산가와 tyramine 및 histamine을 Statistica(Statesoft Inc., Tulsa)에 입력하고, 단순 선형 회귀법(simple linear regression)과 다중 선형 회귀법(multiple linear regression)을 사용하여 상관관계를 비교하였다.

결과 및 고찰

저장기간에 따른 산가, 과산화물가의 변화

일반적으로 원료 번데기는 냉동저장으로 시중에 유통되는데, 이를 식품공전에서 규정하는 냉동(-18°C), 상온(25°C) 및 실온(35°C)에서 7일간 저장하면서 산가와 과산화물가의 경시변화를 살펴보았다(Fig. 1, 2). 식용 번데기를 냉동 저장하였을 때, 산가와 과산화물가 모두 저장 7일 동안 변화를 보이지 않았으나, 상온과 실온에서 저장하였을 때에는 저장 1일 이후부터 급격하게 증가하였다. 특히 산가의 경우 상온에서 2일 이상 저장한 경우 식용 번데기 규격치인 5.0 이상 초과하는 것으로 나타났고(Fig. 1), 실온에서 저장한 경우 2일 이전에 기준규격을 넘는 것으로 보아 냉동 저장하지 않을 경우 쉽게 산패되는 것을 알 수 있었다. 과산화물가의 경우 산화초기단계의 산패도를 관찰하는 지표로서, 지방질성분의 초기 산화과정 중에

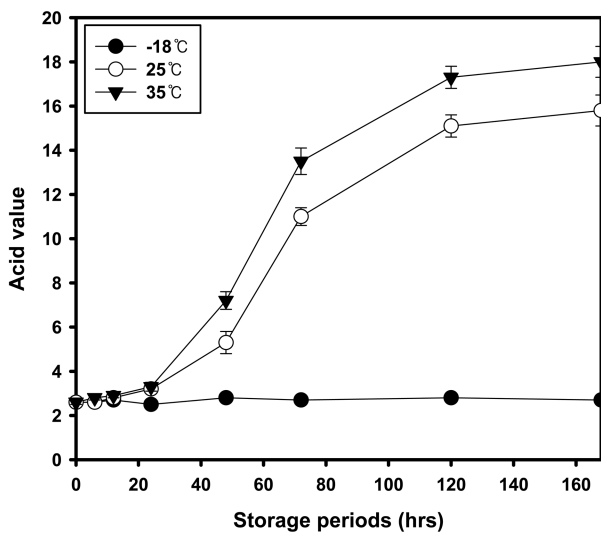


Fig. 1. Changes of acid value of Silkworm pupa during storage at -18, 25 and 35°C.

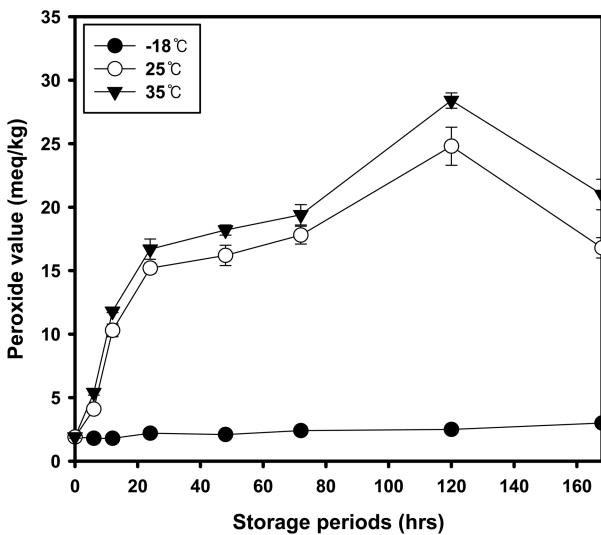


Fig. 2. Changes of peroxide value of Silkworm pupa during storage at -18, 25 and 35°C.

형성되는 1차 산화생성물인 과산화물의 함량으로 나타난다. 원료 번데기의 과산화물가는 초기 1.9 meq/kg에서 저장 1일째 될 때 상온과 실온에서 15.216.7 meq/kg으로 급격하게 증가하였고, 저장 5일 이후부터는 감소하는 경향을 보여주었다(Fig. 2). 그러나 식용 번데기 과산화물가의 경우 기준규격을 넘은 산가에 비하여 저장 7일 모두 기준치인 60을 넘지 않는 결과를 보였다.

식용 번데기의 biogenic amine 함량

식용 번데기에서의 biogenic amine(BA) 함량은 Table 1과 같다. 식용 번데기에서 검출된 BA는 putrescine(PUT), cadaverine(CAD), histamine(HIS), tyramine(TYR), spermidine (SPD), spermine(SPM) 및 2-phenylethylamine(PHE) 등 7

Table 1. Contents of biogenic amines in tested Silkworm pupa product

Biogenic amines	Contents (mg/kg)
Putrescine	243.0±5.4 ²⁾
Cadaverine	2.9±0.3
Histamine	2.6±0.2
Tyramine	15.2±0.9
Spermidine	61.6±2.8
Spermine	6.1±1.0
2-phenylethylamine	N.D. ¹⁾ ±0.1

¹⁾N.D. : Not detected.

²⁾Means±S.D.

종류가 검출되었고, 이중 PUT이 243.0±5.4 mg/kg으로 가장 높게 나타났다. 이러한 PUT은 아질산(nitrite)과 반응할 경우 heterocyclic carcinogen nitosamine인 nitrosopyrrolidine와 nitrosopiperidine를 생성⁹⁾할 수 있기 때문에, 식용번데기는 아질산이 포함된 식품과 함께 섭취해서는 안될 것이다. 이외 CAD, HIS, SPM, PHE 등은 10 mg/kg 이하의 함유량을 보여주었고, 혈관수축 및 혈압상승을 유발¹¹⁾하는 것으로 알려진 TYR의 경우 15.2±0.9 mg/kg로 나타났다.

저장기간에 따른 biogenic amine 함량 변화

식용 번데기의 기준 규격인 산가 및 과산화물가 외에 품질 지표를 살펴보기 위하여 상온(25°C)에서 7일 동안 저장하면서 BA를 측정하면서 지표로 활용 가능성을 살펴보았다(Fig. 3). Halsz 등¹²⁾에 의하면 BA 중 HIS, TYR, PUT, CAD, SPM과 SPD는 자체적으로 가지고 있는 독성 뿐만 아니라 식품의 부패 및 신선함의 척도로 사용할 수 있다고 하였는데, 본 연구결과에서도 TYR과 HIS의 경우 저장기간이 증가할수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다. TYR

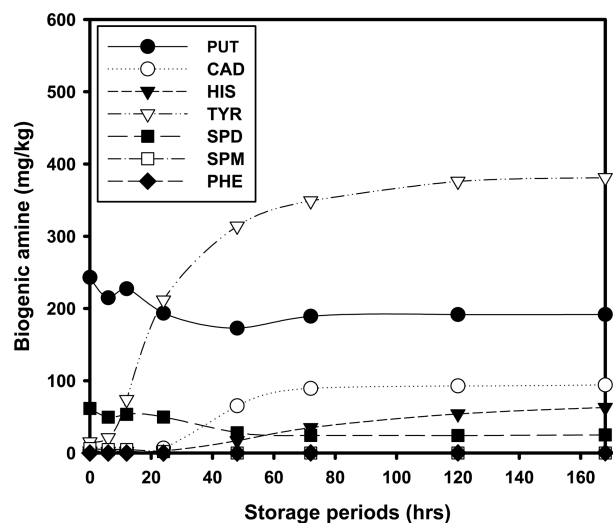


Fig. 3. Changes of biogenic amine of Silkworm pupa during storage at 25°C.

Table 2. Experimental formulation for predicting acid value, tyramine and histamine during 7 days at 25°C, 35°C

	Dependent variable	Regression	r ²	F-value	Prob.
25°C	Y ₁ ¹⁾	0.0921X + 2.1191	0.9666	85.45	<0.0001
	Y ₂	1.5596X ₁ + 0.5501X ₂ + 1.9142	0.9887	176.28	0.0001
35°C	Y ₁	0.01074X + 2.4060	0.9601	70.76	0.0002
	Y ₂	12.6795X ₁ + 0.2165X ₂ + 2.2018	0.9800	98.18	0.0003

¹⁾Y₁: storage period, X, Y₂: acid value, X₁: tyramine, X₂: Histamine

과 HIS은 각각 아미노산인 tyrosine과 histidine에서 유래하는 물질인데, 저장기간 중 부패에 의하여 tyrosine과 histidine이 탈탄산반응에 의하여 TYR과 HIS의 생성을 증가시키는 것으로 사료된다. 특히 이러한 TYR과 HIS은 BA가 가지고 있는 대표적인 독성인 'Scombrototoxicosis, Tyramine toxicity'^{13,14)}를 가지고 있어 과량 섭취시 인체에

해를 일으킬 수 있기 때문에 세계적으로 권장규격으로 규제가 되고 있다^{5,12)}. 따라서 본 연구에서는 식용 번데기의 BA 중 HIS와 TYR을 대상으로 저장에 따른 변화를 살펴보고, 산가와 상관관계를 살펴봄으로써 식용 번데기의 새로운 품질지표로 활용가능성을 찾아보고자 하였다.

산가 및 biogenic amine 함량 변화의 상관관계

저장기간 동안 온도에 따른 식용 번데기의 산가를 측정하고, 측정된 산가에 의하여 번데기의 HIS, TYR의 변화를 예측하고자 산가, HIS, TYR을 독립변수(independent variable)로 설정하고 최적함수를 구하여 수립한 최적 함수 모델식과 상관계수 값(r²), F-value, probability를 Table 2에 나타내었다. 25°C와 35°C에서 저장한 번데기의 경우, 산가와와의 관계식이 simple linear식으로 표현되었으며, 산가에 따른 HIS과 TYR의 변화는 2차 simple linear관계식으로 제시되었다(Table 2). 각 저장 온도에서 예측되는 산가, HIS 및 TYR의 농도는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 저장기간이 길어질수록 모두 증가하는 것으로 나타났고, 예측된 관계식은 모두 0.95 이상의 유의차를 보여주어 모델식에 대한 타당성을 확인할 수 있었다. 따라서 식용 번데기에 있어 산가 이외에 BA인 HIS, TYR가 저장기간에 따라 유의적인 상관관계를 가짐으로써 새로운 품질지표로 사용이 가능할 것으로 사료되며, Table 2에서 제시한 바와 같이 HIS과 TYR과 산가의 상관관계가 밝혀짐으로써 앞으로의 기준규격 제정에 기초자료로 제공될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 식용 번데기를 냉동(-18°C), 상온(25°C) 및 실온(35°C)에 저장하면서, 식용 번데기의 기준규격인 산가와 과산화물가의 경시변화를 살펴보고, biogenic amine의 함량과의 상관관계를 살펴봄으로써 식용 번데기의 새로운 품질지표로 biogenic amine을 검토하였다. 번데기 원료에서는 7개의 biogenic amine이 검출되었으며, 그 중 putrescine이 243.0±5.4 mg/kg으로 가장 높게 나타났다. 저장기간에 따른 산가 및 과산화물가의 변화에 있어서는 냉동(-18°C)에서는 저장 7일 동안 변화를 보이지 않았고, 상온(25°C)에서는 2일, 실온(35°C)에서는 2일 이전에 번데기 산가의 기

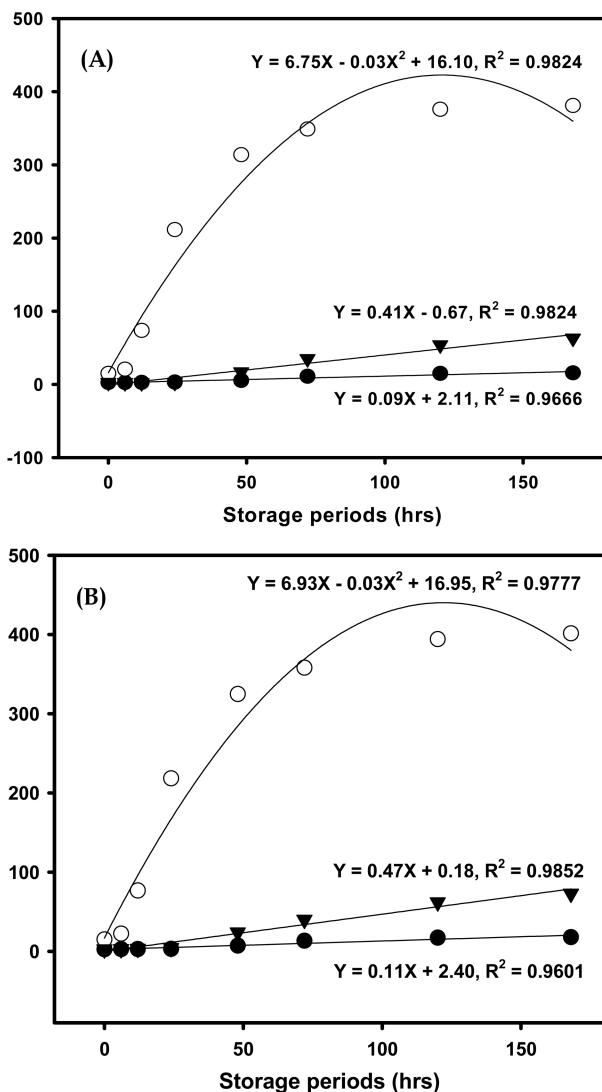


Fig. 4. Predict model and regression equation of acid value, histamine and tyramine on Silkworm pupa during storage at 25°C(A), 35°C(B). ● - ● acid value, ▼ - ▼ Histamine, ○ - ○ Tyramin.

준규격치인 5.0을 초과하였다. 또한, 상온(25°C)에서 저장하는 동안 biogenic amine는 histamine과 tyramine이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났고, 이를 바탕으로 산가와 histamine, tyramine의 상관관계를 살펴본 결과 저장기간과 산가는 simple linear식으로, 산가와 histamine, tyramine의 변화는 2차 simple linear관계식으로 제시되었다. 결과적으로 식용 번데기에 있어 산가 이외에 biogenic amine인 histamine과 tyramine이 유의적인 상관관계를 가짐으로써 새로운 품질지표로 사용이 가능하였다.

참고문헌

1. Park, G. S. and Park, J. R.: Functional properties of Silkworm Larvae protein concentrate, *Korean J. Food Sci. Tehcnol.*, **18**(3), 204-209 (1986).
2. Kwon, H. J., Lee, K. H., Kim, J. H., Chun, S. S., Cho, Y. J., Cha, W. S.: Effect of protease on the extraction and properties of the protein from silkworm pupa, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **49**(4), 304-308 (2006).
3. Kang, P. D., Kim, J. W., Jung, I. Y., Kim, K. Y., Kang, S. W., Kim, M. J., and Ryu, K. S.: Study on the unsaturated fatty acids in the pupae of Silkworm, *Bombyx mori* L. *Korean J. Seric. Sci.*, **48**(1), 21-24 (2006).
4. Nakasone, S.: Ito T. Fatty acid composition of the Silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol.*, **13**(8), 1237-1246 (1967).
5. Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. J. L., Huis in't Veld, J. H. J.: Occurrence and formation of biologically active amines in foods, *Int. J. Food Microbiol.*, **11**(1), 73-84 (1990).
6. Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Mendes, E., Oliveira, B. M., and Ferreira, M.: Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitao cheese, *Food Chem.*, **75**(3), 287-291 (2001).
7. Leuschner, R. G. K., Kurihara, R., and Hammes, W. P.: Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening, *Int. J. Food Microbiol.*, **44**(1), 15-20 (1998).
8. Karmas, E.: Biogenic amines as indicator of food freshness, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, **14**(3), 273-275 (1981).
9. Zhou, J. and Han, D.: Proximate, amino acid and mineral composition of pupa of the Silkworm *Antheraea pernyi* in China, *J. Food Comp. Anal.*, **19**(8), 850-853 (2006).
10. The Pharmaceutical Society of Japan. Methods of Analysis in Health Science. 2005. Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, Japan. pp. 180-182 (2005).
11. Joostern, H. M. L. G.: The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance, *Neth. Milk Dairy J.*, **42**, 25-42 (1988).
12. Halsz, A., Barth, A., Simon-Sarkadi, L., and Holzapfel, W.: Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, **5**, 42-48 (1994).
13. Tylor, S. L.: Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects, *Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 91-128 (1986).
14. Smith, T. A.: Amines in food, *Food Chem.*, **6**, 169-200 (1980).