

연구노트

시금치 유래 천연 아질산염 생산의 최적화 연구

김태경[†] · 서동호[†] · 성정민 · 구수경 · 전기홍 · 김영봉 · 최윤상*
한국식품연구원 식품가공기술연구센터

Study of optimization of natural nitrite source production from spinach

Tae-Kyung Kim[†], Dong-Ho Seo[†], Jung-Min Sung, Su-Kyung Ku, Ki-Hong Jeon,
Young-Boong Kim, and Yun-Sang Choi*

Food Processing Research Center, Korea Food Research Institute, Seongnam

Abstract This study investigated the screening and optimization of nitrite production from fermented spinach extract using different lactic acid bacteria, fermentation temperature, and time. Spinach extract was fermented using various lactic acid bacteria at 24, 30, and 36°C for 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, and 96 h in the presence of different carbohydrates (glucose, sucrose, fructose, and lactose). *Lactobacillus farciminis* (KCTC 3618) produced the highest amount of nitrite using fermented spinach extract at 30°C for 28 h compared to *Staphylococcus carnosus*, *L. coryniformis* (KCTC 3167), *L. fructosus* (KCTC 3544), *L. reuteri* (KCTC 3677), *L. amylophilus* (KCTC 3160), *L. hilgardii* (KCTC 3500), *L. delbrueckii* (KCTC 1058), *L. fermentum* (KCTC 3112), *L. plantarum* (KCTC 3104), and *L. brevis* (KCTC 3498). Comparison of the yield at different fermentation temperatures showed that the highest amount of nitrite was produced using fermented spinach extract at 30°C. Similarly, maximum nitrite yield was observed after 36 h fermentation in the presence of sucrose. Therefore, maximum nitrite production was observed upon *L. farciminis*-mediated fermentation of spinach extract at 30°C for 36 h in the presence of sucrose.

Keywords: nitrate, nitrite, reduction, spinach, lactic acid bacteria

서 론

합성아질산염은 식육가공품의 육색 발현, 풍미생성, 산화방지 작용, *Clostridium botulinum*의 성장 및 독소 생성을 억제하는데 있어 필수적인 첨가제이다(1). 또한 혈관을 팽창시켜 협심증 등의 혈관관련 증세를 완화시키며, 병원성 균과 장내 유해균의 성장을 억제시키는 등 건강에 유익한 면도 존재하고 있다. 그러나 베이컨, 햄 등의 식육가공품을 고온에서 가열시 합성아질산염과 아민이 반응하여 발암성 물질인 나이트로소아민(nitrosamine)을 형성한다. 또한 아질산염의 남용은 혈액속의 헤모글로빈을 산화시켜 메트헤모글로빈증 등 각종 중독현상 등의 부작용을 일으킨다. 이러한 합성아질산염의 장단점은 1970년대부터 현재까지 논쟁되어 오고 있으며, 현재는 세계적으로 여러 국가에서 사용에 규제를 하고 있는 실정이다(1,2).

현대의 소비자들은 식품소비에 있어 건강지향적인 측면을 중시함에 따라 발암 위험성이 있는 합성아질산염 첨가 식육가공품에 대한 선호도가 감소하고 있다. 이로 인해 합성아질산염을 대

체할 수 있는 천연물질을 첨가한 식육가공품에 대한 선호도가 증가하고 있으며, 선진국에서는 합성아질산염의 대체를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 합성아질산염의 첨가량을 낮추기 위하여 채소나 과일로부터 추출한 천연물질을 활용하여 항산화, 항암 등의 효과를 기대하고 있다. 또한 식품의 질산염을 천연아질산염으로 환원시켜 식품첨가제로 활용하는 연구도 진행 중이다(2). 현재 상업적으로 미생물을 활용한 발효셀러리가 활발히 이용되고 있으나 알레르기 반응 등을 일으켜 몇몇 소비자에게 그 사용에 제한을 받고 있어 셀러리를 대체할 천연아질산염의 연구가 필요한 실정이다.

시금치는 국내 전통소재로써 일반 재배 작물 중에서도 항산화 능력이 높다고 알려져 있다. 국내에서 재배되는 시금치는 약 3,000 ppm의 질산염을 함유하고 있어 셀러리와 유사한 양의 질산염을 함유하고 있다(3). 또한 비타민 A의 전구체인 카로틴(carotene)과 아스코브산(ascorbic acid)를 다량으로 함유하고 있어 식육가공품의 천연아질산염으로 첨가 시 항산화 효과가 뛰어날 것으로 판단된다.

따라서 본 연구는 식육가공품에 첨가되는 천연아질산염에 대한 기초자료를 제공하고자, 다양한 표준 젖산균주를 활용하여 발효 시금치 추출물의 질산염을 아질산염으로 환원시켜 천연아질산염의 생산량의 최적화 조건을 확인하였다.

재료 및 방법

시금치 추출액 및 발효 시금치 추출액 준비

분말 형식의 시금치를 시중의 A 시장에서 구입 후, 10% (w/

[†]The author contributed equally to this work.

*Corresponding author: Yun-Sang Choi, Food Processing Research Center, Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea
Tel: +82-31-780-9387
Fax: +82-31-780-9076
E-mail: kcys0517@kfri.re.kr
Received February 8, 2017; revised March 3, 2017;
accepted March 6, 2017

v)의 농도로 멸균수에 희석하여 멸균된 Whatman No. 1 (Whatman™, Maidstone, UK)을 통해 여과한 시금치 추출액을 사용하였다. 발효 미생물 균주로는 현재 산업적으로 활용되고 있는 *Staphylococcus carnosus*를 대조구로 선정하였으며(4), 처리구로는 *Lactobacillus* 표준균주들을 활용하여 실험을 진행하였다. *Lactobacillus coryniformis* (KCTC 3167), *L. farciminis* (KCTC 3618), *L. fructosus* (KCTC 3544), *L. reuteri* (KCTC 3677), *L. amylophilus* (KCTC 3160), *L. hilgardii* (KCTC 3500), *L. delbrueckii* (KCTC 1058), *L. fermentum* (KCTC 3112), *L. plantarum* (KCTC 3104), *L. brevis* (KCTC 3498)를 각각 28시간 동안 30°C에서 동일한 조건으로 lactobacillus MRS broth (de Man Rogosa Sharpe-Broth, Difco, Detroit, MI, USA)에 1×10^8 CFU/mL가 되도록 배양하였다. 10% 시금치 추출액에 0.1% 발효 미생물 균주를 첨가하여 24시간 발효 후 아질산염의 생산량을 측정하였다. 아질산염의 측정은 AOAC 방법을 수정하여 사용하였다(5). 시금치 발효액 1 mL을 취하여 2% 아세트산용액 5 mL 및 Griess시약(Griess reagent, Sigma-Aldrich Co. LLC., Saint Louis, MO, USA) 0.4 mL을 첨가하여 혼합 후 15분 암실에서 반응 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 아질산염의 양을 측정하였다.

발효온도에 따른 시금치 발효액 아질산염 생산량

아질산염의 생산량이 가장 많은 *L. farciminis* (KCTC 3618)을 접종시킨 시금치 추출물을 24시간 동안 온도별로 발효하여 아질산염의 생산량을 비교 평가하였다. 10% 시금치 추출액에 미생물을 첨가한 후 24, 30, 36°C에서 동일한 조건으로 발효하여 아질산염의 생산량을 측정하였다(5).

발효시간에 따른 시금치 발효액 아질산염 생산량

아질산염의 생산량이 가장 많은 온도에서 발효시간 별 아질산염의 생산량을 비교 평가하였다. 10% 시금치 추출액에 *L. farciminis* (KCTC 3618)을 첨가한 후 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96시간에서 동일한 조건으로 발효하여 아질산염의 생산량을 측정하였다(5).

탄소원에 따른 시금치 발효액 아질산염 생산량

아질산염의 생산량이 가장 많은 발효 온도와 시간을 조건으로 탄소원을 종류별로 각각 2% (w/v)의 농도로 첨가하여 아질산염의 생산량을 비교 평가 하였다. 10% 시금치 추출액에 미생물과 포도당, 설탕, 과당, 유당을 첨가하여 발효하여 아질산염의 생산량을 측정하였다(5).

통계분석

통계분석은 SAS program (Statistics Analytical System, version 9.12, SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA)의 GLM (General Linear Model) procedure를 통하여 분석하였고, 처리구간의 평균간 비교는 Duncan의 다중검정을 통하여 유의성 검정($p < 0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

유산균 종에 따른 시금치 발효액 아질산염 생산량

유산균 종에 따른 시금치 발효액의 아질산염 생산량은 Fig. 1에 나타내었다. *Staphylococcus carnosus*는 일반적인 식육의 염지 과정 중에 사용되는 스타터 배양(starter culture)에 포함되는 미생물로서 질산염을 아질산염으로 환원시키는 질산염 환원 미생물

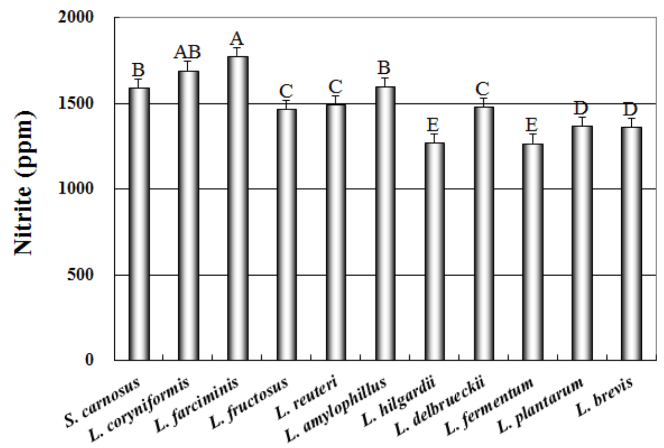


Fig. 1. Nitrite production in fermented spinach extract by lactic acid bacteria. ^{A-E}The different letters within nitrite are significantly different ($p < 0.05$).

이다(6,7). Hammes 등(7)의 연구에 따르면, *Lactobacilli*는 *Staphylococcus*종 보다 아질산염으로의 환원 속도가 느려 발효육의 색과 풍미생산에 결함이 있다고 보고하였다. 그러나 *Lactobacilli*는 항균성 등의 효과가 있는 프로바이오틱 균으로써 제조과정 중에 미생물의 오염을 막을 수 있다. *S. carnosus*와 *Lactobacillus* spp. 등으로 발효하였을 때, *L. farciminis* (KCTC 3618)가 *S. carnosus* 보다 질산염의 환원률이 높아 아질산염을 가장 많이 생산하였다($p < 0.05$). *L. farciminis*는 특히 *Lactobacilli* 중에서도 프로바이오틱 균으로써 효율이 높아 병원균에 대한 항균성이 높다고 알려져 있다(7). 그러므로 *L. farciminis* (KCTC 3618)가 육가공품의 제조 과정 중 미생물의 오염방지와 아질산염에 의한 육의 풍미와 색의 발현에 적절할 것으로 사료된다.

발효온도에 따른 시금치 발효액 아질산염 생산량

발효온도에 따른 시금치 발효액 아질산염 생산량은 Fig. 2(a)에 나타내었다. 30°C에서 24시간 발효했을 시 가장 높은 양의 아질산염을 생산하였으며, 24, 36°C 순으로 아질산염의 생산량이 많았다($p < 0.05$). Casaburi 등(4)은 질산염 환원균이 질산염을 아질산염으로 환원시키기 위해서는 15°C 이상의 온도여야 하며, 최대 아질산염을 생성하기 위해서는 30°C 이상의 온도여야 한다고 보고하였다. Krause 등(8)에 따르면 *Staphylococcus carnosus*를 이용하여 채소즙 분말(vegetable juice powder)을 24°C에서 발효를 하였을 시 38°C에서 발효를 하였을 때 보다 많은 양의 아질산염을 생산하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

발효시간에 따른 시금치 발효액 아질산염 생산량

발효온도에 따른 시금치 발효액은 30°C에서 가장 많은 양의 아질산염을 생산하였다. 이를 바탕으로 발효시간에 따른 시금치 발효액의 아질산염 생산량은 Fig. 2(b)와 같다. 동일한 조건에서 발효를 하여 시간별로 아질산염의 생산량을 측정하였을 경우 36시간에서 가장 많은 양의 아질산염을 생산하였다($p < 0.05$). 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 미생물의 대사 활동, 발효액의 pH 감소, 항산화 물질에 의해 아질산염이 소거된 것으로 사료된다(2). Krause 등(8)의 연구에서도 아질산염의 생산량이 최고로 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내어 본 실험과 유사한 결과를 발표하였다.

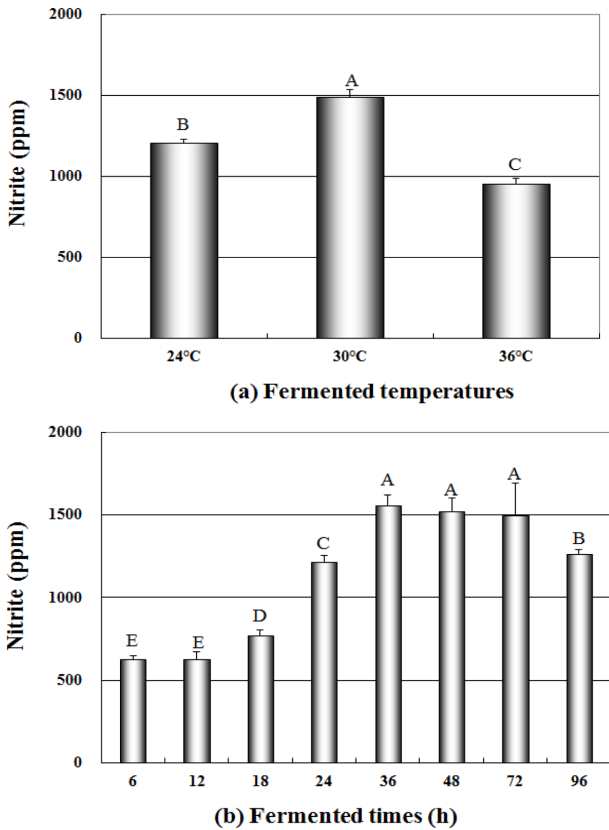


Fig. 2. Nitrite production in fermented spinach extract by temperature (a) and time (b). ^{A-E}The different letters within nitrite are significantly different ($p < 0.05$).

탄소원에 따른 시금치 발효액 아질산염 생산량

탄소원에 따른 시금치 발효액의 아질산염 생산량은 Fig. 3에 나타내었다. 탄소원을 첨가한 처리구 모두 첨가하지 않은 대조구 보다 많은 양의 아질산염을 생산하였다. 특히, 탄소원으로 설탕을 첨가한 처리구가 가장 많은 아질산염을 생성하였다($p < 0.05$). Acton 등(9)의 연구에 의하면, 설탕을 넣고 제조한 발효소시지가 포도당, 텍스트린, 젖산을 넣은 소시지와 비교하였을 때 가장 낮은 pH 수치를 나타내었다. 이는 탄소원으로 설탕의 첨가시 가장 많은 양의 젖산을 생산하여 발효과정 중에 다른 탄소원을 이용했을 경우 보다 높은 대사활동을 보인다고 하였다. 본 실험에서는 설탕이 포도당보다 높은 아질산염의 환원량을 보여 상업적으로 설탕을 첨가하여 발효하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 *Lactobacillus* 표준균주를 활용하여 시금치 발효액의 질산염을 아질산염으로 환원시켜 천연 아질산염 생산량의 최적화 조건을 확인하기 위하여 진행하였다. 유산균 종, 발효온도, 발효시간, 탄소원에 따른 아질산염 생산량에 대하여 평가하였다. 본 연구에서 사용한 *Lactobacillus* 표준균주에서는 *L. farciminis* (KCTC 3618)가 가장 많은 아질산염을 생산하였고, 발효온도 및 배양온도는 30°C에서 36시간이 가장 많은 양의 아질산염을 생산하였다. 설탕을 첨가하였을 때 다른 탄소원을 첨가하였을 경우

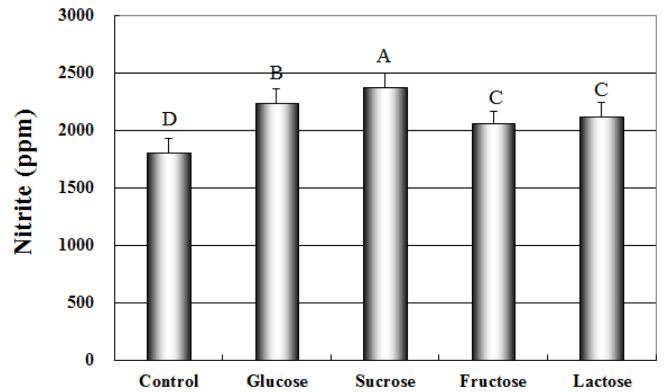


Fig. 3. Nitrite production in fermented spinach extract by adding carbohydrates. ^{A-D}The different letters within nitrite are significantly different ($p < 0.05$).

보다 많은 양의 아질산염을 생산하였다. 따라서 *L. farciminis*를 스타터 배양로 활용하여 시금치의 질산염을 아질산염으로 환원(30°C, 36 h)한다면 산업적으로 가장 효과적으로 천연 아질산염을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgments

이 논문은 2017년도 미래창조과학부 재원으로 한국식품연구원의 지원(E0133110-04)을 받아 수행된 연구성과입니다.

References

1. Lee KT, Kang JO, Kim CJ, Lee M, Lee SK, Lee JY, Lee JW, Cho SH, Joo ST, Chin KB, Choi SH. Studies on the regulation for use, metabolism, intake, and safety of sodium nitrite in meat products. *Korean J. Food Sci. An.* 25: 103-120 (2005)
2. Hung Y, Kok TM, Verbeke W. Consumer attitude and purchase intention towards processed meat products with natural compounds and a reduced level of nitrite. *Meat Sci.* 121: 119-126 (2016)
3. Kim TK, Kim YB, Jeon KH, Park JD, Sung JM, Choi HW, Hwang KE, Choi YS. Effect of fermented spinach as sources of pre-converted nitrite on color development of cured pork loin. *Korean J. Food Sci. An.* 37: 96-104 (2017)
4. Casaburi A, Blaiotta G, Mauriello G, Pepe O, Villani G. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Sci.* 71: 643-650 (2005)
5. AOAC. Official Method of Analysis Intl. 15th ed. Method 973.31. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (1990).
6. Hammes WP, Bantleon A, Min S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 87: 165-174 (1990)
7. Grimoud J, Durand H, Courtin C, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, Roques C. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe* 16: 493-500 (2010)
8. Krause BL, Sebranek JG, Rust RE, Mendonca A. Incubation of curing brines for the production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-added, ground, cooked and sliced ham. *Meat Sci.* 89: 507-513 (2011)
9. Acton JC, Dick RL, Norris EL. Utilization of various carbohydrates in fermented sausage. *Food Sci.* 42: 174-178 (1977)