J. Fd Hyg. Safety 20(3), 123-127 (2005)

한국 전통약주에서 제조 및 음용 과정 중 발생하는 곤충의 혼입 경로에 대한 판정

김승진 · 이정훈 · 최영환 · 김계원†
(주)국순당 부설 연구소

Determination for Inflow Routes of Insects Caused by Manufacturing and Drinking Process in Korean Rice-wine

Seung-jin Kim, Jeoung-hoon Lee, Young-hwan Choi, and Gye-won Kim†
Research Laboratories, Kooksoondang Brewery Co. Ltd.
(Received March 2, 2005; Accepted August 27, 2005)

ABSTRACT – To determine the possibility of inflow routes for insect in Korean rice-wine, we investigated catalase (CAT) activity and oxygen bubble formation through stereoscopic microscope in pasteurized insects (bee, fly, fruit fly) treated with H_2O_2. The pasteurization condition was 30 and 60 min heating at 65 and 70°C. Bubble was not shown under the CAT level of 50 μmoles/min/ml. CAT activity level was more sensitive compared with oxygen bubble formation, but the CAT activity had correlation with oxygen bubble formation method. We also tested bubble formation at room temperature, 65 and 70°C for 30 days. The bubble formation was slowly decreased in all insects at room temperature during experiment, but it was rapidly decreased at 65 and 70°C. The fruit fly was not shown bubble formation at 65 and 70°C. These results suggest that bubble formation method was a new simple method for inflow routes of insects caused by manufacturing and drinking process in pasteurized Korean rice-wine.

Key words: Korean rice-wine, Insect, Catalase, Bubble formation, Inflow routes, Pasteurization

최근 식품 안전 및 위생에 대한 관심이 고조되면서 식음료의 제조과정 또는 취식 및 음용 과정 중에 파리, 초파리, 벌 등 곤충의 혼입에 의한 소비자 불만이 증가하고 있다. 하지만 식음료 제조업체에서는 곤충의 혼입경로에 대해 명확히 판정을 할 수 있는 방법이 전무한 실정이다. 특히 곡물을 사용하여 발효시킨 전통약주의 경우에는 발효 산물인 당, 유기산, 향 등 곤충을 유인 할 수 있는 많은 요소들을 갖고 있기 때문에 음용 중 곤충이 혼입되어 소비자가 불만을 제기하는 경우가 많이 있다.

일본의 경우 젤리, 우유, 과자 등의 식품에 혼입된 곤충의 혼입 경로 판단에 Catalase (CAT) 활성검사를 통하여 열 가열에 의한 효소 활성 변화 여부에 따라 곤충의 유입경로를 판정한 사례가 있다[1].

Catalase (CAT)는 동물, 식물, 곤충, 미생물 등 cytochrome system을 포함하고 있는 거의 모든 호기성 세포에 존재하는 항산화 효소이다. 이 효소는 분자 당 4개의 ferrihemoprotein 그룹으로 구성되어 있고 약 240 kDa의 분자량을 갖고 있으며, CAT는 $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$의 과산화수소 분해반응을 촉매한다[2]. 이러한 과산화수소 분해반응을 갖는CAT의 특성에 의하여 식품 중의 과산화수소 제거와 산업체에서 사용하고 남은 과산화수소의 처리 등에 사용되고 있다[3].

따라서, 본 논문에서는 CAT가 열에 의해 불활성화 되는 특성을 이용함으로써 열처리에 의하여 장기 보전성을 확보한 한국 전통약주에 혼입된 곤충이 제조과정 또는 음용 단계에서 혼입된 것 인지를 판정하기 위하여 살균조건(pasteurization)에 따른 곤충(벌, 파리, 초파리)의 CAT 활성을 측정 하였고, CAT 활성 측정법과 산소 기포형성 변화 측정법의 감도를 비교하여 전통약주에서 곤충의 혼입경로를 간편하게 측정할 수 있는 방법을 제시하였다.

재료 및 방법

살균 조건

벌, 파리, 초파리를 온도를 65°C 또는 70°C로 맞춰 놓은 10가지 한약재가 첨가된 전통약주((주)국순당 제품)에 넣고

†Author to whom correspondence should be addressed.

10-60 분간 살균하였다. 단기 활성측정의 경우에는 30 또는 60분 살균 후, 효소활성을 측정하였고, 장기 활성측정의 경우에는 10분 살균 후, 30일간 상온에서 보관하면서 효소 활성의 변화를 확인하였다.

CAT 활성 측정

CAT 활성은 catalase activity assay kit(Sigma, Saint Louis, USA)을 이용하여 kit 내에 있는 사용 매뉴얼에 따라 측정하였다. 간단히 서술하면, 곤충을 enzyme dilution buffer(0.1% Triton X-100이 함유된 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0) 1000 μl(벌, 파리) 또는 100 μl(초파리)에 넣고 분쇄한 후, 4°C에서 3000 g으로 3분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 그 상등액을 다시 4°C에서 12,000 g으로 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소원으로 사용하였다[4]. 표준 곡선을 구하기 위하여, 1× assay buffer 250-1000 μl와 10 mM H_2O_2 0-750 μl를 혼합하여 최종 0.0125-0.075 μM의 H_2O_2 용액을 만든 후, 10 μl의 H_2O_2 용액에 Color reagent 1000 μl을 혼합하여 15분간 반응하였다. 이 반응액을 520 nm에서 흡광도의 변화를 측정하고 표준곡선을 그렸다. 효소측정을 위한 반응액은 효소원 10 μl, 200 mM H_2O_2 25 μl, 1× assay buffer를 혼합하여 3분간 반응시킨 후, stop solution 900 μl을 혼합하여 반응을 정지시켰다. 이 혼합액 10 μl에 color reagent 1000 μl을 혼합하여 15분간 반응시킨 후, 520 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 우선 표준곡선을 통하여 각 흡광도에서 H_2O_2의 mmoles를 구한 후, 다음의 식으로 효소의 활성을 계산하였다.

$$\text{Activity } (\mu\text{moles/min/ml}) = \{(\text{Dmmoles } (H_2O_2) \times d \times 100) / (V \times t)\}$$

$$\Delta\mu\text{moles}(H_2O_2) = \mu\text{moles of } H_2O_2(\text{Blank}) - \mu\text{moles of } H_2O_2(\text{Sample})$$

d: dilution of original sample for Catalase Reaction
t: Catalase Reaction duration(minutes)
V: sample volume in Catalase Reaction(0.00× ml)
100: dilution of aliquot from Catalase Reaction in Colorimetric Reaction(10 μl from 1 μl)

산소 기포형성 변화 측정법

CAT 측정과 동일한 방법으로 살균과정을 진행한 하였다. 곤충의 복부를 절개하고 3% H_2O_2 1 μl을 일정량씩 적가하면서, 실체현미경(×10 또는 ×20, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

결과 및 고찰

살균조건에 따른 Catalase 활성 변화와 산소 기포형성 변화 측정법의 비교

본 연구에서는 벌, 파리 및 초파리를 선정하여 전통약주에서 살균 온도와 시간에 따른 각 곤충들의 CAT 활성 변화를 확인하고, 실체현미경을 이용한 관찰방법과의 상관관계를 확인하기 위하여 65, 70°C에서 30, 60분 살균 후, 벌, 파리, 초파리의 CAT 활성과 산소 기포 형성을 비교하였다. 3종의

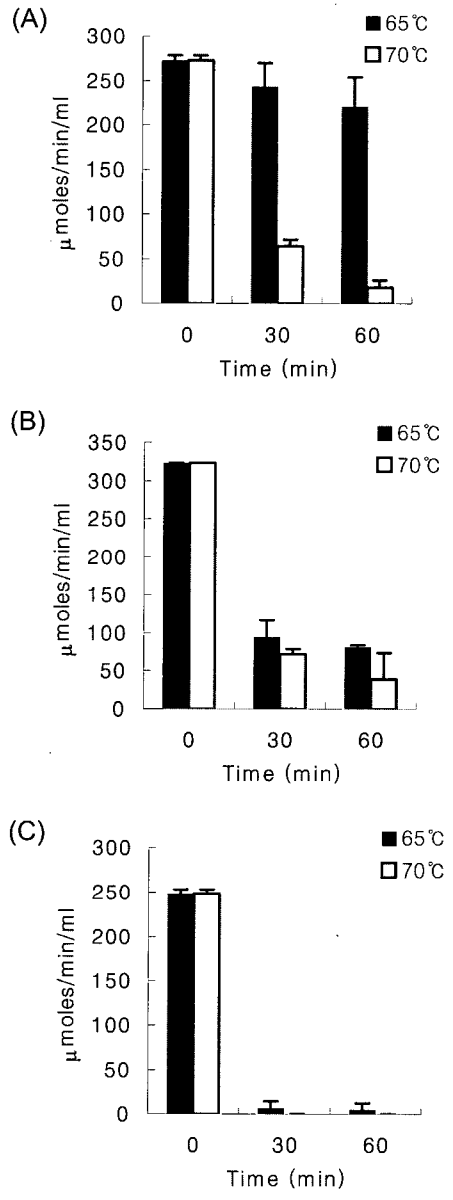

Fig. 1. The catalase activity of insects treated with heating in alcohol beverage. (A) Bee, (B) Fly, (C) Fruit fly. ■: 65°C, □: 70°C.

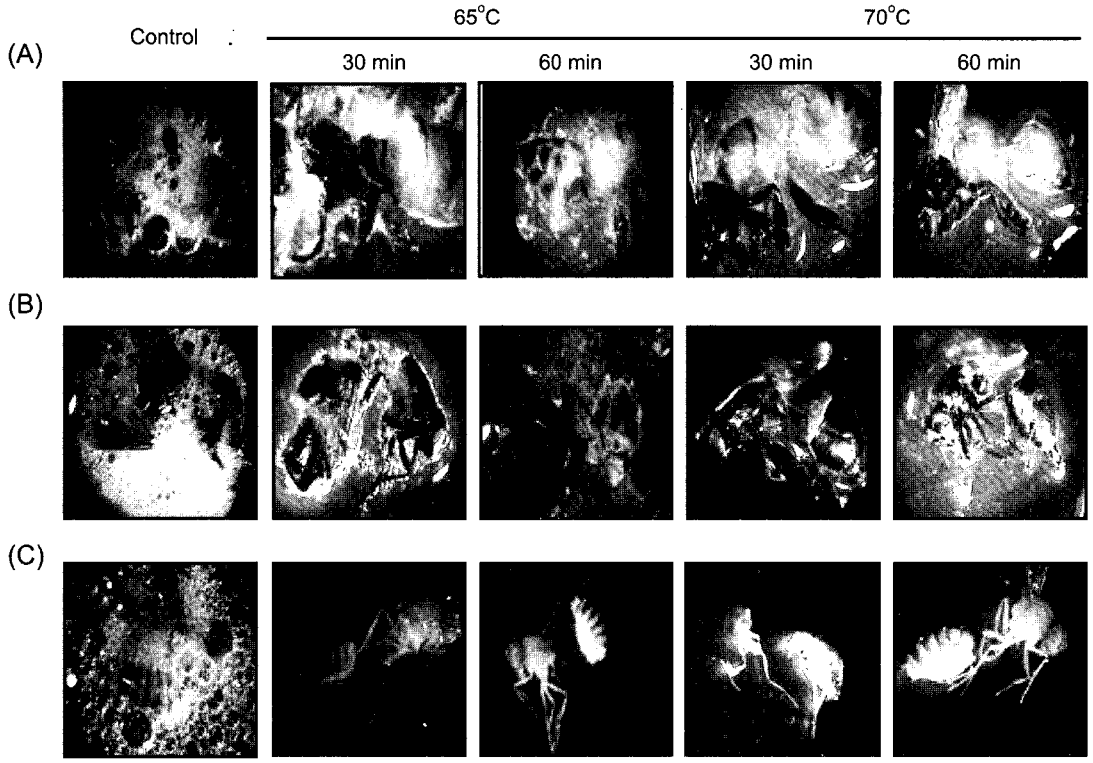

Fig. 2. The bubble formation of insects treated with 3% H_2O_2 (× 10 or 20).

곤충을 선정한 이유는 Tokyo 도립위생연구소에서 음료 및 주스 등에 혼입된 곤충조사에서 가장 많은 부분을 파리가 차지하고 있고[1], 이와 별도로 전통약주에 함유된 각종 향기성분과 발효 생성물 등에 의해 유인되며 주변에서 흔히 서식하고 있는 벌과 초파리를 추가로 선정하였다.

살균온도와 시간에 따른 이들 곤충의 형태학적 변화는 관찰되지 않았으며, CAT 활성의 경우 각 곤충에 따라서 살균온도와 시간에 따라서 효소 활성의 변화에 큰 차이를 보였다. 벌의 경우 65°C에서 각 살균시간의 변화에 따라서 CAT 활성 변화가 거의 없었지만, 70°C에서는 급격하게 CAT 활성이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1-A). 파리의 경우에는 65°C에서 시간에 따라 급격하게 CAT의 활성이 감소하였으며, 70°C에서도 역시 동일한 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 1-B). 초파리의 경우에는 모든 살균 조건에서 CAT의 활성이 거의 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1-C). 이러한 결과는 CAT가 65-70°C에서 30분 가열 시 불활성화 된다는 것과 유사한 결과이며, 살균온도 68°C에서도 70°C와 동일한 CAT 활성 감소를 관찰하였다(결과제시 않음). 이렇게 곤충간에 서로 다른 결과를 보이는 것은 곤충의 표면을 구성하고 있는 외피에 따라 열에 견디는 정도에 차이를 보이는 것으로 판단된다.

실체현미경을 이용하여 동일한 살균 조건에서 곤충들의 산소 기포 생성 정도를 관찰하였고(Fig. 2), 관찰 결과를 토대로 대조군의 기포생성 정도를 최대로 하여 그 상대적 기포 형성 감소를 기포 형성 index로 나타내었다(Table 1). Fig. 1의 CAT 활성 변화와 비교하여 약 50 mmoles/min/ml 이하의 CAT 활성에서는 산소 기포가 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 실체현미경을 이용한 기포 형성 측정법이 CAT 활성 측정법에 비하여 측정 감도는 낮지만, 최근 문제가 발생하고 있는 전통약주의 곤충 혼입에

Table 1. Bubble formation index of insects in pasteurized beverage.

Sample	Pasteurized Temperature	Pasteurized Time (min)		
		0	30	60
Bee	65 °C	+++++	+++	++
	70 °C	+++++	–	–
Fly	65 °C	+++++	+++	+
	70 °C	+++++	+	–
Fruit fly	65 °C	+++++	–	–
	70 °C	+++++	–	–

+: Increased bubble formation
–: None detection

Table 2. Bubble formation index of insects for long time storage in pasteurized beverage.

Sample	Pasteurized Temperature	Storage Day					
		1	5	7	10	20	30
Bee	R.T.	+++++	+++++	+++	+++	+++	+++
	65 °C	+++	++	++	++	++	++
	70 °C	++	+	+	++	+	-
Fly	R.T.	+++++	++++	++++	++++	++++	+++
	65 °C	++++	+++	+++	++	++	++
	70 °C	++	+	+	-	-	-
Fruit fly	R.T.	+++++	++++	+++	+++	++	++
	65 °C	-	-	-	-	-	-
	70 °C	-	-	-	-	-	-

+: Increased bubble formation
-: None detection
R.T.: Room temperature

관한 경로를 판정할 수 있는 간편한 실험 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

유통 중 CAT 변화

주류에 발견되는 곤충의 혼입 경로 판정과 관련하여 일본의 경우 와인에서 검은 바퀴의 성충이 발견된 사례가 있는데 CAT 반응 결과 생개체와 같은 강한 양성반응을 보임에 따라 구입 이후의 혼입으로 판정하고 있다. 또한 살균 처리된 맥주와 비살균 처리된 맥주에서의 곤충 혼입 경로 판정에 대하여 효소의 활성변화를 연구하여 발표한 사례가 있다. 여기서 살균 처리된 맥주의 경우 곤충의 Catalase 반응을 실시하고, 비살균 처리된 맥주의 경우에는 혼입된 곤충의 Cholinesterase와 Acetyl cholinesterase의 활성 증감변화를 측정함으로써 혼입 경로를 판정할 수 있다고 보고 하였다[5]. 하지만 한국 전통약주의 경우 곤충 혼입 경로에 대한 판정 사례나 보고는 전무한 실정이다.

따라서 약주의 제조 또는 음용 중 발생하는 곤충혼입 경로를 판정하기 위하여 65, 70°C에서 10분간 살균한 후, 30일간 상온에 보관하면서 기포형성의 변화를 관찰하였다(Table 1). 상온에서 혼입된 곤충들의 경우 기포형성이 곤충 혼입 후 30일까지 약간 감소하긴 하지만 실체현미경을 통하여 충분히 관찰이 가능한 수준으로 강하게 기포가 형성되는 것을 확인하였다. 파리와 벌의 경우에는 살균 후, 65°C에서는 기포형성이 서서히 감소하여 30일 보관 시 기포생성이 감소하였고, 70°C에서는 급격하게 활성이 감소하여 30일 보관 시에는 전혀 기포가 관찰되지 않았다. 또한, 초파리의 경우에는 모든 살균조건에서 전혀 기포 발생이 되지 않는 것을 확인하였다.

이러한 결과는 열을 이용하여 살균을 하는 한국전통약주에서 고객불만으로 나타나고 있는 곤충의 제품 중 혼입이 제조과정 또는 음용 과정 중에 혼입된 것인지를 판정할 수 있는 간편한 실험법으로 기포형성 변화 측정법을 활용할 수 있으며, 이를 통해 제조일 또는 소비자의 불만 발생일로부터 경과 시간에 따른 곤충 혼입 과정의 판단이 가능할 것으로 생각된다.

국문요약

열을 이용해 살균 처리를 하는 한국전통약주에서 고객불만으로 제기되고 있는 곤충의 혼입경로판정 실험법을 제시하기 위하여 Catalase (CAT) 활성을 이용한 실험법의 적용 가능성을 확인하였다. 본 실험에서는 살균 온도와 시간에 따른 CAT 활성 변화와 실체현미경을 이용한 기포형성 변화를 index로 나타내어, 50 mmoles/min/ml이하의 CAT활성에서는 기포가 형성되지 않는 것을 확인하였고, CAT 활성 측정법이 민감도는 높지만 기포형성 변화 측정법이 간편하게 곤충의 혼입 경로를 판정할 수 있으며 그 둘 사이에 상관관계가 있다는 것을 확인하였다. 또한 이를 이용하여 살균 후 30일간의 기포형성 변화를 관찰한 결과 상온 처리 시료에서는 모든 곤충에서 기포생성 정도의 감소가 천천히 일어나는 반면에 파리와 벌은 열처리 조건 하에서는 기포생성 정도가 급격히 감소 하였다. 특히, 초파

리의 경우에는 열처리 조건 하에서는 전혀 기포가 발생하지 않았다. 이러한 결과는 기포형성 변화 측정법이 한국전통약주의 제조 및 음용 과정 중 혼입되는 곤충의 혼입 경로 판정방법으로 사용되어 제조일 또는 소비자의 불만 발생일로부터 경과 시간에 따라 곤충의 혼입 판정이 가능한 것을 확인하였다.

참고문헌

1. 신광순: 이물과 식품안전. 한국식품안전협회, 서울, pp.71-100 (2004)
2. Deisseroth, A., and Dounce, A.L.: Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.*, **50**, 319-375 (1970))
3. 장문석, 허경혜, 김석원, 박일현, 유장렬, 곽상수: 다양한 식물배양세포주에서 Catalase 활성과 다른 항산화효소 활성의 비교, 식물조직배양학회지, **23**, 157-160 (1996
4. Kwong, L.K., Mockett, R.J., Bayne, A.C, Orr, W.C., and Sohal R.S.: Decreased mitochondrial hydrogen peroxide release in transgenic Drosophila melanogaster expressing intramitochondrial catalase. *Arch Biochem. Biophys.*, **383**, 303-308 (2000)
5. Nakagiri, H., Ishida, I., Yoshimura, N., Sakuma, S., Kowaka, M.: Analytical methods to determine whether insects detected in draught beer entered during packaging or in the market. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0361-0470, (1996)