

화분에서의 조단백질 및 환원당 추출시 단백질 분해효소가 미치는 영향

최수정 · 정윤화[†]

단국대학교 식품영양학과

Effect of Proteases on the Extraction of Crude Protein and Reducing Sugar in Pollen

Su-Jeong Choi and Yoonhwa Jeong[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

Abstract

This study was conducted to increase crude protein and reducing sugar contents in pollen extracts by proteases. Four commercial neutral proteases (Alcalase 2.4L, Protamex, Flavozyme and Protease A) and two alkaline proteases (Protease S and Protease P) were used to prepare acorn and Darae pollen extracts. Contents of moisture, ash, crude protein and crude fat of acorn pollen were 5.2%, 2.7%, 6.2% and 22.3%, respectively, while those of Darae pollen were 5.4%, 2.8%, 1.8% and 27.8%, respectively. Contents of crude protein and reducing sugar in pollen extracts were increased by proteases. Alcalase 2.4L was the most effective in increasing protein contents while Protease A in increasing reducing sugar contents. It is suggested the use of proteases is one of the potential methods for increasing the contents of crude protein and reducing sugar in preparation of pollen extracts.

Key words: pollen, protease, extracts, protein, reducing sugar

서 론

최근 생활수준의 향상과 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 건강식품에 대한 관심 역시 높아지고 있으며 그 중의 하나가 화분이다. 화분(pollen)은 영양, 생리적 기능이 뛰어난 물질로 일반적으로 벌 등의 곤충들에 의해 매개 수집되는 충매 화분과 바람에 의해 매개되는 풍매 화분으로 나누어지며, 충매 화분은 벌의 타액이나 꿀 등과 혼합되어 덩어리 형태의 화분하(pollen load) 상태로 수집되며, 화분하 하나는 보통 수십 내지 수백만 개의 화분 입자들로 구성되어 있고, 풍매 화분은 충매화분과 달리 화분 이외의 다른 성분과 혼합되지 않고 개개의 화분 입자상태로 수집된다(1). 화분하는 꿀벌이 화밀을 수집하면서 모아온 화분(pollen)입자에 화밀과 꿀벌의 타액 등이 혼합된 꽃가루 덩어리로서 꿀벌의 먹이로 저장 이용되며, 단백질, 유리당, 무기질, 지방산, 아미노산, 비타민 등의 영양 성분을 함유하고 있으며, 이들 성분 조성은 밀원 식물의 종류, 생육 환경, 혼합 정도 등에 따라서 함유량이 달라진다고 알려져 있다(2). 화분에 대한 연구로서는 화분립 형태에 관한 연구(3,4), 화분 내 효소에 대한 연구(5), 화분 일반성분에 관한 연구(6-10) 등이 보고되었다. 무기질에 관한 연구(11-14)에서 Elser와 Ganzuller(11)는 무기질 중

칼륨의 함량이 높음을 보고하였고, 비타민에 관한 연구(15, 16)에서 Sagromsky(15)는 지용성 비타민의 함량이 낮은 반면에 비타민 B군의 함량은 많다고 보고하였다.

국내의 화분 연구현황은 화분의 기원 식물에 관한 조사(17), 봉밀과 화분의 순도 시험 및 성분 조사(18-20), 콜레스테롤 대사에 미치는 영향(21), 간 독성(21-26)과 신장 장애(27) 등의 영양 생리학적인 연구들이 주류를 이루고 있으며, 화분의 물 및 n-헥산 추출물에 대한 성분 분석에 관한 연구(1)도 보고되었다. 화분이 알레르기원으로 작용할 때 가장 중요한 역할을 하는 부분인 외피는 튼튼하고 두꺼운 층으로 되어 있어서 화분 내 영양소가 밖으로 나오지 않게 된다. 또 외피는 강산이나 위산에 대해 저항성이 강하여 분해되지 않고, 아무리 환경 조건이 나빠지더라도 쉽게 파괴되지 않아 인체의 소화기관에서도 쉽게 파괴되거나 분해되지 않는다(28,29). 그러므로 화분의 영양성분을 인체 내에서 효율적으로 이용되기 위해서는 화분의 외피를 파괴하여 영양성분을 추출하는 것이 매우 중요하다. Peng 등(30)의 벌 창자에서 화분의 세포질이 어떻게 유출되는지를 관찰한 연구, Kim(31)의 벌 유충의 창자 효소를 이용하여 화분 세포벽의 발아 공을 분해시킨 뒤 내부의 유용 성분을 유출시킨 연구, Kim과 Son(32)의 화분을 Planetary Mill을 사용하여 껍질을 파

[†]Corresponding author. E-mail: yjeong@dku.edu
Phone: 82-2-709-2472. Fax: 82-2-796-2472

쇄한 연구 등 화분 세포질을 추출하는 많은 연구가 수행되어져 왔다.

본 연구에서는 효율적인 화분 영양 성분의 추출을 위하여 단백질 분해효소를 이용하여 화분 추출물을 제조하고 화분 추출물의 조단백질과 환원당 함량이 증가하는 지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

화분은 2003년에 경남 밀양에서 채취된 도토리 화분(acorn pollen)과 강원도 홍천에서 채취된 다래 화분(Darae pollen)을 시중에서 구입하여 -70°C 에 냉동 보관하면서 분석시료로 사용하였다. 화분하 형태의 화분을 분쇄기로 분쇄한 후 60 mesh 표준망체로 통과시켜 분말화하여 사용하였다.

중성 단백질 분해효소 4종(Alcalase 2.4L, Protamex, Flavozyme, Protease A)은 Novo사(Denmark)에서, 알칼리 분해효소 2종(Protease S, Protease P)은 Amano사(Japan)에서 구입하여 사용하였다.

일반성분 분석

시료의 일반성분은 AOAC(33)법에 의하여 정량하였고, 수분함량은 105°C 상압가열건조법, 회분은 550°C 에서 직접 회화법으로, 조지방 함량은 soxhlet 추출법으로 측정하였다. 조단백질은 semi-micro Kjeldahl 법으로 측정하였으며, 질소 환산계수는 6.25를 사용하였다. 탄수화물의 함량은 100에서 수분, 회분, 조지방, 조단백질 함량을 뺀 값으로 나타내었다.

단백질 분해효소 활성 측정

단백질 분해효소 활성은 Jensen(34)의 방법에 의해 측정되었다. 기질(1% hammersten casein, pH 7.0) 3 mL를 37°C 의 항온에서 예열한 후 효소액 0.1 mL를 넣어 10분간 반응시킨 후에 5% TCA(trichloroacetic acid)용액으로 반응을 정지시켰고, $1,160\times\text{g}$ 에서 15분간 원심 분리하여 상층액 1 mL를 취하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성단위는 효소가 1분당 흡광도 0.001을 증가시키는 계수로 정의하였다.

화분 추출물제조

화분 추출물의 제조방법은 Fig. 1과 같다. 화분 10 g에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0 또는 8.0) 90 mL를 넣은 후 실온에서 30분간 교반시킨 후 각 효소의 최적 pH를 0.5 N NaOH로 조정하여, 최적 온도와 pH 조건에서 효소를 0.2 unit(U)와 0.5 unit(U)의 양으로 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. 대조군은 10%로 희석한 효소를 100°C 에서 20분간 가열하여 불활성시킨 후 사용하였다. 반응이 끝나면 90°C 에서 20분간 가열하여 효소 반응을 정지시킨 후 가수 분해물을 4°C , $1,160\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리한 후 Whatman No.1 여과지로 감압 여과하여 여액을 -70°C 에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

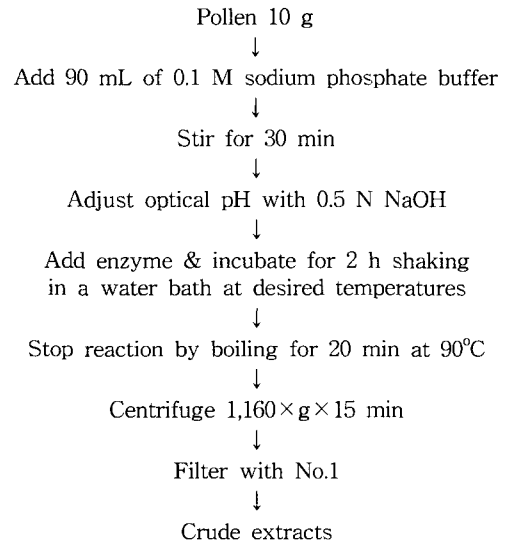


Fig 1. Flow chart for the preparation of pollen extracts.

화분 추출물의 조단백질 및 환원당 분석

화분 추출물의 조단백질 함량은 AOAC(34)법에 의하여 semi-micro Kjeldahl 법으로, 환원당 함량은 Somogyi 법(35)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

일반성분 조성

도토리 화분하와 다래 화분하의 일반 성분분석 결과는 Table 1과 같다. 화분의 기원이 식물체에에도 불구하고 조단백질 함량이 22.0~27.8%로 상당히 높았으며 Lee 등 (1)의 도토리 화분 성분 분석 결과보다 수분함량은 다소 낮았고, 조단백질과 회분은 비슷한 수준이었으며, 조지방은 다소 높았다. 다래 화분의 경우 Kim과 Son(32)의 연구보다 수분함량과 조지방량은 다소 낮았고, 회분은 비슷한 수준이었으며, 조단백질함량은 더 높았다. 화분하의 일반성분 함량이 차이를 보이는 것은 수분 함량의 차이에 의한 각 성분들의 상대적인 변화와 밀원 식물의 종류, 생육환경, 혼합 정도 및 양봉 방식 등이 다르기 때문이라고 여겨진다(2).

Table 1. General composition of pollens (%)

	Acorn	Darae
Moisture	5.2 ¹⁾	5.4
Ash	2.7 (2.8) ²⁾	2.8 (2.9)
Crude protein	22.3 (23.6)	27.8 (29.4)
Crude fat	6.2 (6.5)	1.8 (1.9)
Carbohydrate ³⁾	63.6 (67.1)	62.2 (65.8)

¹⁾Mean value of two determinations.

²⁾(): Dry basis

³⁾Carbohydrate content was calculated subtracting moisture, ash, crude protein, and crude fat contents from total weight (100).

단백질 분해 효소의 비활성

실험에 사용된 효소의 비활성(specific activity U/mg)은 Table 2와 같다. 비활성(U/mg)은 Protease S가 가장 높았으며 중성 단백질 분해효소에서는 Flavozyme>Alcalase 2.4L >Protamex>Protease A 순이었고 알칼리성 단백질 분해효소에서는 Protease S>Protease P 순이었다.

화분 추출물의 조단백질 함량

단백질 분해 효소에 의한 화분 추출물의 조단백질 함량은 Table 3 및 Table 4와 같다. 효소처리한 도토리화분 추출물의 조단백질 함량은 대조군보다 높았으며, 효소량의 증가에 따라 조단백질 함량도 증가하였다. 특히, Alcalase 2.4L를 0.2 U과 0.5 U 첨가 시 도토리 화분 추출물의 조단백질 함량

Table 2. Characteristics of commercial proteases used¹⁾

Name	Opt. temp. (°C)	Opt. pH	Specific activity (U/mg)	Manufacturer
Neutral protease				
Alcalase 2.4L	60	7.0	0.75 ²⁾	Novo (Denmark)
Protamex	60	7.0	0.73	Novo (Denmark)
Flavozyme	50	7.0	2.54	Novo (Denmark)
Protease A	50	7.0	0.10	Amano (Japan)
Alkaline protease				
Protease S	70	8.0	3.05	Amano (Japan)
Protease P	45	8.0	0.08	Amano (Japan)

¹⁾Enzyme activity was assayed after 10 min of reaction at optimal temperatures and pHs using casein as a substrate.
²⁾Mean value of two determinations.

Table 3. Crude protein contents of Acorn pollen extracts prepared by proteases

Protease	Reaction ¹⁾			Crude protein contents (%)			Increase rate (%)
	pH	Temp. (°C)	Control (No enzyme)	Enz. unit	Enzyme denatured	Enzyme native	
Neutral protease							
Alcalase 2.4L	7.0	60	8.1 ²⁾	0.2	8.1	11.0	35.8
				0.5	8.3	12.1	45.8
Protamex	7.0	60	8.7	0.2	8.7	10.3	18.4
				0.5	8.5	11.2	31.8
Flavozyme	7.0	50	8.6	0.2	8.8	9.5	8.0
				0.5	8.8	9.8	11.4
Protease A	7.0	50	8.5	0.2	9.3	11.7	25.8
				0.5	10.7	14.7	37.4
Alkaline protease							
Protease S	8.0	70	10.5	0.2	11.1	11.4	2.7
				0.5	11.3	11.5	3.5
Protease P	8.0	45	9.5	0.2	10.6	13.0	22.6
				0.5	12.2	15.5	27.0

¹⁾0.1 M sodium phosphate buffer was used.

²⁾Mean value of two determinations.

Table 4. Crude protein contents of Darae pollen extracts prepared by proteases.

Protease	Reaction ¹⁾			Crude protein contents (%)			Increase rate (%)
	pH	Temp. (°C)	Control (No enzyme)	Enz. unit	Enzyme denatured	Enzyme native	
Neutral protease							
Alcalase 2.4L	7.0	60	6.4 ²⁾	0.2	6.4	10.8	68.8
				0.5	6.6	13.3	101.5
Protamex	7.0	60	6.5	0.2	6.5	9.9	52.3
				0.5	6.5	10.6	63.1
Flavozyme	7.0	50	6.2	0.2	6.3	6.4	1.6
				0.5	6.5	6.7	3.1
Protease A	7.0	50	6.3	0.2	7.2	12.1	68.1
				0.5	8.5	14.4	69.4
Alkaline protease							
Protease S	8.0	70	6.7	0.2	6.7	6.8	1.5
				0.5	6.7	6.8	1.5
Protease P	8.0	45	6.5	0.2	7.6	11.1	46.1
				0.5	8.6	14.2	65.1

¹⁾0.1 M sodium phosphate buffer was used.

²⁾Mean value of two determinations.

은 대조군보다 각각 35.8%, 45.8% 증가하였으며, Alcalase 2.4L>Protease A>Protamex>Protease P>Flavozyme>Protease S 순으로 조단백질 함량이 증가하였다.

다래 화분 추출물의 조단백질 함량은 Protease S를 제외한 모든 효소첨가군에서 대조군보다 높았으며, 효소 첨가량이 증가함에 따라 조단백질 함량도 증가하였다. 특히 Alcalase 2.4L을 0.2 U와 0.5 U 첨가 시 다래 화분 추출물의 조단백질 함량은 대조군보다 각각 68.8%, 101.5%로 증가되었고, Alcalase 2.4L>Protease A>Protamex>Protease P>Protease S>Flavozyme 순으로 조단백질 함량이 증가하였다. Lee 등(1)이 보고한 잡화분, 도토리 화분, 송화분의 물 추출물 조단백질 함량 13.2, 13.8, 4.0%와 비교하면 도토리 화분

의 추출물은 8.1~8.6%로 Lee 등(1)의 결과보다 더 낮았지만, 효소처리에 의하여 9.1~15.5%로 증가하였고, 다래 화분의 경우에도 6.2~6.7%에서 효소 처리에 의하여 6.4~14.2% 증가하였다. 단백질 분해 효소에 의해 추출물의 조단백질 함량이 증가한 이유는 Peng 등(30)의 연구에서 꿀벌 창자 내에서 화분의 세포질이 외피의 발아구를 통해 유출된 것과 같이 이 발아구를 통해 단백질 분해 효소가 들어가 영양 성분이 분해 용출되어 조단백질 함량이 증가되는 것으로 사료된다.

환원당 함량

단백질 분해효소에 의한 화분 추출물의 환원당 함량은 Table 5 및 Table 6과 같다. 도토리 화분 추출물의 환원당

Table 5. Reducing sugar contents of Acorn pollen extracts prepared by proteases

Protease	Reaction ¹⁾		Reducing sugar contents (%)				Increase rate (%)
	pH	Temp. (°C)	Control (No enzyme)	Enz. unit	Enzyme denatured	Enzyme native	
Neutral protease							
Alcalase 2.4L	7.0	60	21.3 ²⁾	0.2	22.2	23.6	6.3
				0.5	22.2	25.1	13.1
Protamex	7.0	60	22.9	0.2	22.6	23.7	4.9
				0.5	22.7	24.9	9.7
Flavozyme	7.0	50	22.6	0.2	22.9	23.0	0.4
				0.5	22.9	23.1	0.9
Protease A	7.0	50	22.1	0.2	22.8	25.4	11.4
				0.5	22.8	27.0	18.4
Alkaline protease							
Protease S	8.0	70	23.6	0.2	23.9	25.2	5.4
				0.5	24.4	25.8	5.7
Protease P	8.0	45	23.8	0.2	23.7	26.4	11.4
				0.5	23.9	27.3	14.2

¹⁾0.1 M sodium phosphate buffer was used.

²⁾Mean value of two determinations.

Table 6. Reducing sugar contents of Darae pollen extracts prepared by proteases

Protease	Reaction ¹⁾		Reducing sugar contents (%)				Increase rate (%)
	pH	Temp. (°C)	Control (No enzyme)	Enz. unit	Enzyme denatured	Enzyme native	
Neutral protease							
Alcalase 2.4L	7.0	60	20.8 ²⁾	0.2	20.3	21.8	7.4
				0.5	20.4	22.7	11.3
Protamex	7.0	60	20.9	0.2	20.3	21.3	4.9
				0.5	20.5	21.7	5.9
Flavozyme	7.0	50	20.6	0.2	20.7	20.9	1.0
				0.5	20.7	21.3	2.9
Protease A	7.0	50	20.4	0.2	21.3	23.9	12.2
				0.5	21.2	24.2	14.2
Alkaline protease							
Protease S	8.0	70	22.9	0.2	22.9	23.1	0.9
				0.5	23.0	23.4	1.7
Protease P	8.0	45	22.7	0.2	22.4	24.0	7.1
				0.5	22.3	25.2	13.0

¹⁾0.1 M sodium phosphate buffer was used.

²⁾Mean value of two determinations.

함량은 Flavozyme 외의 모든 효소첨가군이 대조군보다 효소 첨가군이 높았으며, 효소 첨가량이 증가함에 따라 환원당 함량이 증가했다. 특히 Protease A의 경우 효소 0.2 U과 0.5 U 첨가시 도토리 화분 추출물의 환원당 함량은 대조군보다 각각 11.4%, 18.4% 증가하였으며, Protease A>Protease P >Alcalase 2.4L>Protamex>Protease S>Flavozyme 순으로 환원당 함량이 증가하였다. 다래 화분 추출물의 환원당 함량은 대조군보다 효소 첨가군이 증가하였고, Flavozyme 과 Protease S를 첨가 시 효소 첨가군과 대조군의 환원당 함량은 비슷했으나, 다른 효소들의 경우는 효소 첨가량에 따라 대조군보다 환원당 함량이 증가했다. 특히 Protease A의 경우 0.2 U과 0.5 U 첨가 시 다래 화분 추출물의 환원당 함량은 대조군보다 각각 12.2%, 14.2% 증가하였으며, Protease A>Protease P>Alcalase 2.4L>Protamex>Protease S>Flavozyme 순으로 환원당 함량이 증가하였다.

요 약

국내산 증매 화분인 도토리 화분과 다래 화분에 단백질 분해효소를 이용하여 화분 추출물을 제조하고, 추출물의 조단백질 함량과 환원당 함량의 변화를 알아보았다. 도토리 화분의 일반성분 분석결과 수분 5.2%, 회분 2.7%, 조지방 6.2%, 조단백질 함량은 22.3%였고, 다래화분은 수분 5.4%, 회분 2.8%, 조지방 1.8%, 조단백질 함량은 27.8%였다. Casein을 기질로 사용하여 측정된 효소의 비활성(specific activity U/mg)은 Protease S>Flavozyme>Alcalase 2.4L>Protamex>Protease P>Protease A의 순이었다. 단백질 분해효소 처리에 의한 화분 추출물의 조단백질 함량은 효소 첨가군이 대조군보다 증가했고, Alcalase 2.4L을 0.2 U, 0.5 U 첨가 시에 도토리 화분 추출물은 대조군보다 각각 35.8%, 45.8%, 다래 화분 추출물은 각각 68.8%, 101.5% 증가하였다. 단백질 분해효소 처리에 의한 화분 추출물의 환원당 함량은 효소 첨가군이 대조군보다 증가했고, Protease A를 0.2 U, 0.5 U 첨가 시 도토리 화분 추출물은 대조군보다 각각 11.4%, 18.4%, 다래 화분 추출물은 대조군보다 각각 12.2%, 14.2% 증가하였다. 단백질 분해 효소 처리에 의해 화분 추출물의 조단백질과 환원당의 함량이 증가되었고, 단백질 분해 효소는 화분 추출물의 조단백질 및 환원당 함량을 높이는 방법 중의 하나로 이용될 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 단국대학교 대학연구비에 의해 수행되었습니다.

문 헌

1. Lee BY, Choi HD, Hwang JB. 1997. Component analysis of

Korean pollens and pollen extracts. *Korean J Food Sci Technol* 29: 869-875.
 2. 최승윤. 1982. 양봉학. 서울대학교 출판부, 서울.
 3. Wodehouse RP. 1935. *Pollen grains off-setediton*. Harfner, New York.
 4. Erdtman G. 1952. *Pollen morprology and plant taxonomy*. Academic Press, New York.
 5. Blancjard GC, Gardner R. 1976. Characterization of some of the enzyme in Ragweed pollen. *Annals of Allergy* 36: 410-418.
 6. Vivino AE, Palmer LS. 1944. The chemical composition and nutritional value of pollen collected by bees. *Arch Biochem* 4: 129-136.
 7. Anderson RJ, Kulp WL. 1922. Analysis and composition of corn pollen. *J Biological Chemistry* 50: 433-435.
 8. Nelsen N, Grommer J, Lunden R. 1955. Investigations on chemical composition of pollen from same plant. *Acta Chem* 9: 1100-1106.
 9. Lunder R. 1954. *Literature on pollen chemistry*. Addison-Wesley, London. p 66, 201.
 10. Spector WS. 1956. *Handbook of biological data*. WB. Saunders, Philadelphia & London. p 87.
 11. Elser E, Ganzuller J. 1930. Die chemishe zusammensetzung einiger blutenstaubartern. *Z Physical Chem* 194: 21-28.
 12. Togasawa Y, Katsumata T, Ota T. 1967. Biochemical studies on pollen (inorganic components and phosphorus compound of pollen). *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 41: 178-183.
 13. Ichikawa C. 1936. Biochemical studies of pollen. *J Agr Chem Soc Japan* 12: 1117-1125.
 14. Todd FE, Bretherick U. 1942. The composition of pollen. *J Econ Entormol* 35: 312-316.
 15. Sagromsky H. 1947. Uber einige bestimmungen des vitamin B gehaltes von pollen mit hilfe des phycomyces testes. *Biol Zentr* 66: 140-146.
 16. Togasawa Y, Katsumata T, Fukata M, Motoi T. 1967. Biochemical studies of pollen (vitamin of pollen). *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 41: 184-190.
 17. Suk KD, Kim MK. 1983. Gross chemical analysis for honey and pollen load. *Korean J Phamacogn* 14: 83-92.
 18. Kim JW, Shin SC, Kim BK. 1984. Studies on pollen preparations as a health food (I). *Korean J Phamacogn* 15: 147-149.
 19. Kim JH, Lee KH, Kim ES, Park SB. 1992. A study on components of pollen load. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 566-572.
 20. Suk KD, Kim MK. 1983. Identification of floral type for honey and pollen load. *Korean J Phamacogn* 14: 197-200.
 21. Chung YG, Yoon SH, Kwon JS, Bae MJ. 1984. Nutritional and biochemical studies on the pollen loads studies on lipd compositions of sunflower pollen load and effects of its pollen load on liver cholesterol metabolism in mouse. *J Korean Soc Food Nutr* 13: 169-174.
 22. Kwon CS, Yoon SH. 1986. Effect of pollen load on chloroform induced hepatic and renal damage in rats concerning pathohistological aspects. *J Korean Soc Food Nutr* 15: 229-234.
 23. Kwon CS, Cho SY, Park JM, Hub K. 1989. Nutritional biochemical study on the pollen load effect of azalea pollen on the hepatic microsomal aniline hydroxylase activity. *J Korean Soc Food Nutr* 18: 93-100.
 24. Kwon CS, Cho SY, Chung HJ, Park JM, Hub K. 1989. Nutritional biochemical study on the pollen load-effect of azalea pollen on the aniline induced hepatotoxicity. *J Korean Soc Food Nutr* 18: 239-246.
 25. Yoon SH, Kang JH, Kwon CS. 1989. Effects of azalea pollen

- on the carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *J Korean Soc Food Nutr* 18: 363-371.
26. Yoon SH, Park EJ. 1992. A Study for new hepatotropic agents natural resources- the effect of azalea pollen on aromatic toxicants induced hepatotoxicity. *J Korean Soc Food Nutr* 27: 341-347.
27. Kwon CS, Yoon SH. 1986. Nutritional and biochemical studies on the pollen load 3-the effect of pollen load on the chloroform-induced hepatic and renal damage in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 15: 235-242.
28. Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. 1986. *Pharmacognosy*. 8th ed. Lee and Febiger, Philadelphia. p 426-448.
29. Lindahl O. 1982. *Pollen*. Forlags AB, ed. Johanneshoc, Philadelphia. p 136.
30. Peng YS, Nedhat N, Masston JM. 1986. Release of alfalfa medicago sativa pollen cytoplasm in the gut of the honey bees. *Physiol Entomol* 79: 804-807.
31. Kim DS. 1989. Effect of larva gut enzyme on pollen. *Korean J Food Sci Technol* 21: 404-408.
32. Kim JG, Son JH. 1990. Progress of chemical composition on pulverization of pollen. *Korean J Apiculture* 5: 23-30.
33. AOAC. 1980. *Official methods of analysis*. 14th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC.
34. Jensen DE. 1972. Continuous production of extracellular protease by *Bacillus subtilis* in a two stage fermenter. *Biotechnol Bioeng* 14: 647-662.
35. Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195: 19-23.

(2004년 6월 30일 접수; 2004년 9월 6일 채택)