

## Bioactive and Chemical Properties by Silkworm (*Bombyx mori* L.) Powder Degradation with Kiwifruit, Papaya, Pineapple and Pear Juice

Jae-Young Cha, Yong-Soon Kim<sup>1</sup>, Hee-Young Ahn<sup>2</sup>, Kyung-Eun Eom<sup>2</sup>, Su-Jin Heo<sup>2</sup> and Young-Su Cho<sup>3\*</sup>

Technical Research Institute, Daesun Distilling Co, Ltd Busan, 619-934, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Department of Medical Biosciences, Graduate School, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Received October 6, 2010 / Accepted November 2, 2010

Bioactive and chemical properties of silkworm powder (SP) degradation by fruit extract containing the proteolytic enzymes of kiwifruit, papaya, pineapple and pear were investigated. Silkworm powder was incubated with extracts from each fruit at 60°C for 24 hr. Protein content was slightly higher in the SP treated with fruit extract than that in the control SP. Major minerals were K, Ca, Mg, and Zn. Major fatty acids were linolenic acid, oleic acid, and palmitic acid. When total protein patterns were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), silkworm protein was strongly degraded by the treatment of fruit extract from pineapple, papaya, and pear, but little silkworm degradation was observed in kiwifruit extract treatment. Fibrinolytic activity was only detected in the SP by the fruit extract treatments from papaya and pear. DPPH radical scavenging activity was slightly stronger in the SP treated with fruit extract than that in silkworm powder. However, all these samples exhibited a relatively low activity compared with the butylated hydroxytoluene (BHT). These results may provide the basic data for understanding the biological activities and chemical characteristics of SP treated with fruit extract for development of functional foods

**Key words** : Silkworm powder, fruit proteolytic enzymes, antioxidant activity, fibrinolytic activity, functional foods

### 서 론

최근 새로운 생물자원으로서의 누에(*Bombyx mori* L.)는 단백질과 지방 함유량이 높아 고단백질 식품소재로 인식되고 있을 뿐만 아니라[8,20], 필수 아미노산과 n-3 계열의 고도불포화 지방산 함유량이 높아 간 기능 개선이나 혈액순환 관련 건강식품 소재로 활용 가능성이 제시되고 있다[26,28]. 단백질 분해력이 높은 균주를 이용하여 발효시킨 발효 누에분말에 항산화작용, 항혈전작용, 타이로시나제 활성 억제작용이 있는 것으로 보고됨에 따라 향후 건강기능식품 소재로 사용될 가치가 충분히 있는 것으로 기대된다[6,7]. 한편 단백질 분해력은 미생물 유래의 단백질 분해효소 뿐만 아니라 키위, 배, 파인에플, 파파야, 무화과 등의 과즙 중에도 식육연화 작용을 나타내는 단백질 분해 효소 작용이 있어 식품의 품질개선과 더불어 소화제와 같은 제약산업, 피혁산업, 세제산업 및 사료첨가제 등 다양한 분야에서 사용되어지고 있다[4,9,18,24]. 이들 과일 중에는 actinidin, ficin, bromelain, papain과 같은 단백질 분해 효소의 단리에 의한 식육연화 작용과 단백질 분해의 최적 조

건 확립 등 다양한 연구가 진행되고 있다.

국내 자생곤충으로부터 추출한 304종에서 방아깨비, 왕잠자리, 비단노린재 등 극히 일부인 10종에서만 항트롬빈 활성이 관찰되었으며[25], 항산화 활성은 방아깨비, 가시길쭉바구미, 알락수염노린재, 송장벌레과 유충 4종에서만 관찰되어[25] 곤충 중에 항혈전 및 항산화 활성을 나타내는 종류가 많지 않은 점을 감안할 때 누에가 미생물 발효나 효소 처리에 의해 생리활성작용이 확인되어 건강기능식품 소재로 사용될 가능성이 시사된 바 있다.

따라서 과일에 존재하는 단백질 분해효소가 함유된 과즙액을 고단백 식품소재인 누에분말에 활용 한다면 식품첨가물로서의 안전성과 필수 아미노산과 지방산에 의한 영양가 및 향미성분에 의한 기호성 증진과 함께 항산화 작용, 항혈전 작용 등의 생리활성 작용도 기대된다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 과즙액 조제

실험 재료인 누에분말은 순천영농법인(순천, 전남)에서 직접 구입하여 사용하였다. 공시재료로 사용한 키위(*Actinidia chinensis*), 파파야(*Carica papaya* L.), 파인애플(*Ananas comosus*

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : choys@dau.ac.kr

L.), 배(*Pyrus serotina* L.)는 부산지역 대형마트에서 구입하여 상온에서 4 일간 후숙 시킨 후 사용하였다. 과일에 존재하는 단백질을 분해효소를 이용하기 위하여 가식부만 균질화 시키고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액만 회수하여 누에분말의 단백질 분해에 사용하였다. 회수한 과즙 착즙액을 10% (v/w) 수준으로 누에분말에 골고루 섞은 다음 60°C에서 24시간 반응 시켰다. 이때 반응 온도는 카제인을 기질로 한 단백질 분해에서 배, 무화과, 파인애플, 파파야 과즙 유래의 단백질 조효소제 활성이 60°C 온도에서 최대 활성을 나타낸 결과를 고려하였으며[4], 반응시간은 actomyosin 분해에서 12시간 이후부터 고분자 단백질의 분해산물이 저분자 단백질로 분해되기 시작하는 시간을 고려하여 결정하였다[18].

#### 과즙액 처리 누에 분말 용액의 pH 및 산도 측정

각 과즙액으로 반응시킨 누에분말을 증류수에 1% (w/v) 농도로 첨가하여 교반한 후 pH meter (Methrohm 691, Swiss)로 직접 pH를 측정하였다. 산도 측정은 시료액 10 ml를 취하고 증류수 50 ml를 가한 후 잘 흔들어 1% phenolphthalein 용액 4-5 방울 떨어뜨리고 0.1 N NaOH로 적정한 후 그 소모량을 측정하여 총 산도로 환산하였다. 추출물의 총 산도는 acetic acid 값인 0.0006을 계산식에 적용하였다.

Total acidity (acetic acid, %, W/V)

$$= \frac{[(\text{titrated } 0.1 \text{ N NaOH ml} \times 0.0006) / \text{sample ml}] \times 100}{}$$

#### 과즙액 처리 누에 분말의 단백질 농도 측정

각 과즙액으로 반응시킨 누에분말의 단백질 농도는 Lowry 방법[22]으로 540 nm에서 분광광도계로 bovine serum albumin을 표준품으로 흡광도를 측정하였다.

#### 과즙액 처리 누에 분말의 Mineral 함량 측정

각 과즙액 처리 누에 분말의 미네랄 함량은 AOAC 분석 방법[1]으로 시료 분말 1 g을 각 550°C 회화로에서 3시간 회화시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산 분해 시켜 수욕조상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl를 가하여 Whatman No. 4 여과지로 1차 여과하고 0.2µm 필터로 여과시켜 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석한 후 원자흡광분광광도계(AAnalyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 과즙액 처리 누에 분말의 지방산 조성 분석

과즙액 처리 누에 분말의 지방산 분석은 Garces 및 Mancha 방법[13]으로 누에 분말 1 g에 15 ml chloroform 및 7.5 ml methanol 혼합액(2:1)을 넣고 37°C에서 30분간 가온 추출한 후 chloroform 및 methanol 혼합액(2:1)으로 25 ml로 맞추어 여과 시켰다. 여과한 용액에 4.5 ml의 증류수를 가하여 혼합시킨 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 버리고

chloroform 층을 질소가스 하에서 농축하여 5 ml의 석유에테르로 다시 용해하였다. 추출된 지질 용액에 methanol:HCl (5:1, v/v%) 용액을 가하여 65°C에서 3시간 methylation 한 후 hexane으로 지방산 methylester를 추출하였다. 지방산 분석은 Omega-Wax capillary column (30 m × 0.25 µm, Supelco, USA)을 사용하여 Gas chromatography (GC-17A, Shimadzu, Koyto, Japan)로 분석하였다. 캐리어 가스는 헬륨을 사용하였고, injection 온도는 250°C, oven 온도는 180°C 및 detection 온도는 260°C로 하였다. 지방산 분석 결과는 각 지방산 표준물질과 동일한 retention time에 검출된 것으로 하였으며, 이때 검출된 총 지방산의 면적에 대한 각 지방산의 면적 비율(%)로 나타내었다.

#### 과즙액 처리 누에 분말의 Native-PAGE에 의한 단백질 패턴 비교

각 과즙액 처리 누에 분말의 단백질 패턴은 Davis 방법[11]에 따라 slab-type Native-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)의 gel 농도는 7.5%를 사용하였다. 즉 분리 gel은 30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide, 1.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.8), 0.05% TEMED 및 10% 과산화암모늄을 혼합하여 1 mm 두께로 만들어 사용하였다. 분리 gel 위에는 5% 농축 gel [30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide, 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)]를 만들어 5× sample buffer (312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8), 50% glycerol, 0.05% bromophenol blue] 용액에 혼합한 시료를 농축 gel내에 형성된 wall에 일정량씩 주입하였다. 전기영동은 Tris-glycine 완충액(25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.8) 하에서 1.5 mA/gel (cm)의 정전류를 통하여 행하고, 4°C 저온에서 2시간 통전시켰다. 전기영동이 완료된 gel은 7% 초산 액에 용해한 1% coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 7% 초산 액으로 충분히 탈색시켜 건조 및 사진촬영을 하였다.

#### 과즙액 처리 누에 분말의 SDS-PAGE에 의한 단백질 패턴 비교

각 과즙액 처리 누에 분말의 단백질 패턴 분석은 Weber 및 Osborn 방법[27]에 준하였는데, SDS-PAGE의 조성은 10% acrylamide, 1.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.8), 0.4% SDS (Sodium dodecyl sulfate), 10% 과산화암모늄 및 0.05% TEMED로 만들어 사용하였다. 농축 gel의 조성은 5% acrylamide, 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8), 0.4% SDS, 0.05% TEMED 였다. 시료단백질의 SDS 처리는 최종농도 2% SDS, 14.4 mM β-mercaptoethanol, 60 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8), 25% glycerol 및 0.1% BPB 혼합액에서 100°C로 5분간 열처리 하였다. 전기영동은 Tris-glycine 완충액(25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3) 하에서 130-150 mA/gel (cm)의 정전류를 통하여 1시간 30분간 하였다. 전기영동 후 gel은 고정액

(Methanol:Acetic acid:Water=10:10:80)에 1% coomassie brilliant blue R-250을 첨가하고 10시간 염색한 후 탈색액 (Methanol:Acetic acid:Water=10:10:80)으로 충분히 탈색시켜 건조 및 사진촬영을 행하였다.

과즙액 처리 누에 분말의 혈전용해 효소 활성 측정

각 과즙액 처리 누에 분말의 혈전용해 효소 활성은 fibrin plate 법[2]을 변형하여 lysed zone으로 측정하였다. Fibrin plate는 0.06% fibrinogen (Sigma chem.,Co., St. Louis MO, USA)을 0.2 M borate buffer (pH 7.5)에 용해시킨 후 petri dish에 10 ml씩 분주하고 thrombin (5,000 unit, Sigma,chem.,Co St. Louis MO USA) 40 unit를 균일하게 섞이도록 가하면서 균일한 두께의 fibrin clot를 형성시킨 후 실온에서 30분간 방치한 후 사용하였다. 시료를 증류수에 1% 농도로 용출시킨 후 여과(Whatman No. 2)하여 fibrin plate 상에 50 µl씩 점적하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 생성된 투명한 부위의 직경을 측정하였다. 직경은 서로 수직인 두 개의 지름을 측정하여 투명대의 면적을 구하여 unit/ml로 표시하였다.

과즙액 처리 누에 분말의 DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

과즙액 처리 누에 분말의 항산화 활성은 Blois의 방법에 따라 측정하였다[5]. 즉 DPPH (α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl) 용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 여과지(Whatman filter paper NO. 2)로 여과시켜 만들었다. DPPH 용액 5 ml에 일정 농도(0.1% 및 0.5%)의 시료용액 1 ml을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 대조구인 시판항산화 BHT는 0.05%로 첨가하여 상기와 동일한 방법으로 흡광도 감소를 측정하였다. DPPH free radical scavenging activity는 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율(%)로 표시하였다.

DPPH free radical scavenging activity (%)

$$= \{1 - (\text{Abs}/\text{Abc})\} \times 100$$

Abc: Absorbance of control treatment at 528 nm

Abs: Absorbance of sample treatment at 528 nm

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과값은 one-way ANOVA 검정에 의한 평균값과 표준편차(mean±S.D.)로 표시 하였다. 실험군들 사이의 유의성은 유의한 차이가 있는 경우  $p < 0.05$  수준에서 Duncans multiple range test로 시료들 사이의 유의성을 검정하였다[8].

결과 및 고찰

pH 및 산도 변화

누에분말 및 과즙액 처리 누에 분말의 pH 범위는 6.77-7.52였으며, 키위가 6.77로 낮았고 파파야가 7.52로 높았다(Table 1). 산도는 키위 및 파인애플에서 각각 0.46% 및 0.50%로 대조구의 누에분말 0.34% 보다 높았다. 누에 번데기 단백질을 pH 5-9 사이에서 단백질 분해효소로 처리하였을 경우 무처리 대조구에 비해 단백질 추출량이 증가한 것은 효소 작용에 의해 일어난 현상으로 보고되었으며[20], 국산 파인애플 유래의 단백질 분해 효소 bromelain의 효소 최적 pH가 6.0 이었으며, 안정범위는 6-7 사이라 하였다[10]. 따라서 과즙액 처리 누에 분말의 pH가 중성 부근으로 과일 유래 단백질 분해 효소의 작용 pH와 유사하여 누에분말 단백질의 분해가 잘 일어난 결과로 보여 진다.

단백질 농도

대조구로 사용한 누에분말의 단백질 농도는 48.48%로 과즙액 처리 누에분말의 경우 배 61.70%, 파파야 58.68%, 키위 52.82%, 파인애플 53.46%로 모두 단백질 농도가 증가한 것으로 나타났다(Table 1). 누에 번데기 단백질도 단백질 분해 효소 처리에 의해 단백질 추출량이 증가하였고, 미생물 유래 단백질 분해효소 처리가 불용성 단백질의 추출에 효과적이었다는 보고도 있다[20,21]. 이전의 실험에서 곰팡이 균주에 의해 발효된 발효누에 분말 중의 단백질 농도는 균주에 따라서 차이가 있었으며, 특히 *Rhizopus oryzae*에 의한 발효누에 분말에서 단백질 함량이 가장 많이 증가한 것으로 나타났다[7]. 또한 단백질 분해력이 높은 *Bacillus* 속 균주에 의한 발효 누에분말에서도 단백질 농도가 증가한 것으로 나타났다[6]. 오늘날 누에는

Table 1. The pH, total acidity and protein content in silkworm powder by extract treatment of kiwifruit, papaya, pineapple and pear

Sample	pH	Total acidity (%)	Protein content (%)
Silkworm powder (SP)	7.24±0.02 <sup>b</sup>	0.34±0.02 <sup>b</sup>	48.38±0.32 <sup>d</sup>
Kiwifruit+SP	6.77±0.01 <sup>b</sup>	0.46±0.01 <sup>a</sup>	52.68±0.48 <sup>c</sup>
Papaya+SP	7.51±0.00 <sup>a</sup>	0.38±0.01 <sup>b</sup>	58.55±0.79 <sup>b</sup>
Pineapple+SP	6.98±0.01 <sup>c</sup>	0.50±0.01 <sup>a</sup>	53.35±0.69 <sup>c</sup>
Pear+SP	7.24±0.01 <sup>b</sup>	0.34±0.01 <sup>b</sup>	61.56±0.55 <sup>a</sup>

Values are mean±S.D. of three samples.

<sup>a,b,c,d</sup>different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

고단백질 식품소재뿐만 아니라 미생물에 의한 발효로 미생물이 분비하는 효소에 의한 단백질 분해를 통해 아미노산과 펩타이드 소재로서의 활용가치도 높은 것으로 여겨진다 [6,26,28]. 따라서 누에분말의 단백질은 *Rhizopus*, *Bacillus*, *Aspergillus*와 같은 미생물 유래 단백질 분해효소 뿐만 아니라 배와 같은 과일 유래 단백질 분해효소 처리에 의해서도 단백질 함량이 증가함으로써 향 후 기능성식품 개발시 안전성 및 기호성 측면에서의 활용 가능성에 대해서도 고려해볼 만 하다. 누에 번데기 단백질의 추출을 위한 *Bacillus* 균주 유래의 단백질 분해효소 처리 온도가 20°C에서 80°C로 높아짐에 따라 단백질 농도가 증가하는 경향을 보였으나, 40-50°C가 최적 활성 온도였다고 하였다[20]. 카제인을 기질로 한 과일 유래 단백질 분해효소의 최대 활성은 배, 무화과, 파인애플, 파파야는 60°C였으나, 키위는 이보다 낮은 40°C에서 최대 활성을 나타내었다[3]. 이처럼 4종류의 과일 중에서 단백질 농도가 키위 과즙액 처리에서 가장 낮은 것은 대부분의 과일 유래 단백질 분해효소의 최적 활성 온도가 60°C 부근인데 비해 이보다 낮은 40°C에서 최적 활성을 나타낸 것과 무관하지 않는 것으로 보여 진다. 식육연화 작용이 있다고 알려진 4종류의 과즙액 처리에 의한 누에분말 단백질 농도는 배>파파야>파인애플>키위 순으로 높았으나, 카제인을 기질로 한 실험에서는 파인애플>키위>파파야>배 순으로 본 실험 결과와는 상당히 상반된 결과를 나타내었다[3]. 이러한 결과는 기질로 사용한 단백질 종류의 차이에서 효소의 작용부위가 다르기 때문으로 생각되어 진다.

#### Mineral 함량

대조구로 사용한 누에 분말의 미네랄 함량 중 칼륨이 328 ppm으로 가장 많았고, 과즙액 처리 누에 분말에서는 모두 이보다 많았으며, 파인애플에서 418 ppm으로 가장 많이 함유되어 있었다(Table 2). 다음으로 많이 함유된 마그네슘과 칼슘은 대조구 누에 분말에 비해 과즙액 처리 누에 분말에서 모두 감소한 것으로 나타났다.

#### 지방산 조성

누에 분말의 지방산 조성에서 n-3 계열의 linolenic acid (C<sub>18:3</sub>)와 일가불포화지방산(MUFA) oleic acid (C<sub>18:1</sub>)가 가장 많은 비율을 차지하였다(Table 3). 과즙액 처리 누에 분말에서는 대조구인 과즙액 미처리 누에 분말보다 palmitic acid (C<sub>16:0</sub>)는 약간씩 감소하고, linolenic acid (C<sub>18:3</sub>)는 오히려 약간씩 증가한 것으로 나타났다. 특히 n-3 계열의 linolenic acid 지방산이 가장 많은 비율을 차지하고 있어 혈관계질환에 유익할 것으로 사료되어 진다[14].

#### Native-PAGE에 의한 단백질 영동 패턴비교

대조구로 사용한 누에 분말 단백질과 키위 및 파인애플 과즙액 처리 누에 분말 단백질은 native-PAGE상에서 비슷한 밴드 패턴이 관찰되었으나, 배와 파파야 과즙액 처리에 의해서는 약간 다른 밴드상의 패턴을 보였다(Fig. 1). 누에 장면과 단명 품종의 유충 체액 단백질(Major hemolymph protein)을 native-PAGE로 비교한 결과 5주령 초기에 많은 종류의 밴드

Table 2. Mineral contents in silkworm powder by extract treatment of kiwifruit, papaya, pineapple and pear (ppm)

Sample	K	Mg	Ca	Na	Zn	Fe	Mn
Silkworm powder(SP)	326.0±1.1 <sup>d</sup>	44.1±0.66 <sup>a</sup>	73.4±0.42 <sup>a</sup>	0.73±0.01 <sup>a</sup>	4.50±0.06 <sup>c</sup>	1.65±0.00 <sup>a</sup>	0.60±0.01 <sup>d</sup>
Kiwifruit+SP	374.7±5.8 <sup>c</sup>	27.1±0.09 <sup>b</sup>	20.7±0.15 <sup>c</sup>	12.8±0.10 <sup>a</sup>	4.42±0.01 <sup>c</sup>	1.57±0.01 <sup>c</sup>	0.67±0.00 <sup>c</sup>
Papaya+SP	400.3±2.4 <sup>b</sup>	31.1±0.15 <sup>b</sup>	22.7±0.16 <sup>b</sup>	1.46±0.00 <sup>c</sup>	4.95±0.01 <sup>a</sup>	1.59±0.00 <sup>b</sup>	0.79±0.01 <sup>a</sup>
Pineapple+SP	418.0±4.4 <sup>a</sup>	28.9±0.22 <sup>c</sup>	18.7±0.12 <sup>d</sup>	1.62±0.01 <sup>b</sup>	4.63±0.01 <sup>b</sup>	1.37±0.02 <sup>d</sup>	0.76±0.00 <sup>a</sup>
Pear+SP	381.0±6.8 <sup>c</sup>	31.3±0.07 <sup>b</sup>	20.9±0.10 <sup>c</sup>	1.10±0.00 <sup>d</sup>	4.90±0.02 <sup>a</sup>	1.54±0.02 <sup>c</sup>	0.74±0.00 <sup>b</sup>

Values are mean±S.D. of three samples.

<sup>a,b,c,d</sup> different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

Table 3. Fatty acid compositions in silkworm powder by extract treatment of kiwifruit, papaya, pineapple and pear (% for area of total fatty acids)

Sample	Palmitic acid (16:0)	Palmitoleic acid (16:1)	Stearic acid (18:0)	Oleic acid (18:1)	Linoleic acid (18:2)	Linolenic acid (18:3)	Arachidinic acid (20:0)	Behenic acid (22:0)
Silkworm powder (SP)	18.1±0.1 <sup>a</sup>	0.36±0.01 <sup>a</sup>	8.1±0.12 <sup>a</sup>	23.3±0.1 <sup>a</sup>	5.7±0.1 <sup>a</sup>	34.9±0.2 <sup>a</sup>	0.44±0.1 <sup>a</sup>	0.00±0.1 <sup>a</sup>
Kiwifruit+SP	16.2±0.2 <sup>a</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>	8.2±0.06 <sup>a</sup>	26.5±0.3 <sup>b</sup>	7.4±0.1 <sup>b</sup>	40.4±0.3 <sup>b</sup>	0.30±0.1 <sup>a</sup>	0.13±0.1 <sup>b</sup>
Papaya+SP	16.4±0.2 <sup>a</sup>	0.32±0.03 <sup>a</sup>	8.8±0.23 <sup>b</sup>	29.3±0.3 <sup>c</sup>	6.5±0.2 <sup>c</sup>	38.1±0.3 <sup>c</sup>	0.90±0.1 <sup>b</sup>	0.13±0.1 <sup>b</sup>
Pineapple+SP	16.3±0.9 <sup>a</sup>	0.38±0.04 <sup>a</sup>	8.3±0.03 <sup>a</sup>	27.8±0.4 <sup>d</sup>	7.1±0.1 <sup>b</sup>	40.1±0.2 <sup>b</sup>	0.30±0.1 <sup>a</sup>	0.13±0.1 <sup>b</sup>
Pear+SP	17.3±0.9 <sup>a</sup>	0.31±0.02 <sup>a</sup>	8.9±0.20 <sup>b</sup>	27.2±0.2 <sup>b</sup>	6.8±0.1 <sup>c</sup>	39.4±0.2 <sup>d</sup>	0.31±0.1 <sup>a</sup>	0.10±0.1 <sup>b</sup>

Values are mean±S.D. of three samples.

<sup>a,b,c,d</sup> different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

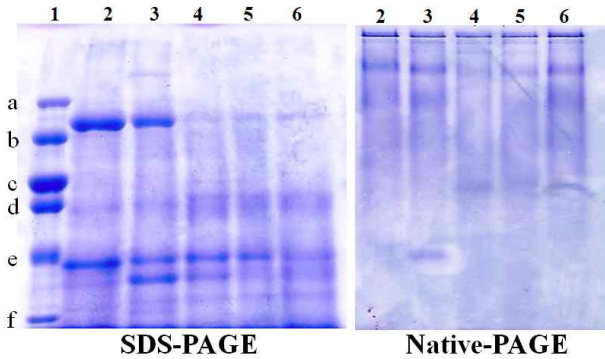


Fig. 1. Electrophoretic patterns in silkworm powder by extract treatment of kiwifruit, pear, papaya and pineapple using SDS- and native-polyacrylamide gel electrophoresis. Standard proteins, a: molecular weight 97.4 kDa, b: 66.0 kDa, c: 45.0 kDa, d: 31.0 kDa, e: 21.5 kDa, f: 14.4 kDa. 1: Standard, 2: Silkworm powder (SP), 3: Kiwifruit + SP, 4: Pear + SP, 5: Papaya + SP, 6: Pineapple + SP

가 관찰되었고, 5주령에서 일수가 증가할수록 새로운 단백질의 출현뿐만 아니라 전체적인 단백질 함량도 증가되었다고 하였다[17].

SDS-PAGE에 의한 단백질 영동 패턴비교

곰팡이 균주로 발효시킨 발효 누에분말의 단백질을 SDS-PAGE 전기영동으로 밴드상의 패턴을 분석한 결과 비발효 누에 분말 단백질에 비해 66-97 kDa 크기의 단백질 밴드가 거의 관찰되지 않는 것으로 보아 발효 과정 중에 단백질 분해가 대부분 일어난 것으로 관찰되어졌다[7]. 또한 단백질 분해능이 우수한 *B. subtilis* 발효에 의해서도 분자량이 작은 단백질 패턴이 관찰되어 누에 단백질이 대부분 발효에 의해 분해가 상당히 이루어진 것으로 관찰되었다[6]. 본 실험에서는 66-97 kDa 크기의 누에단백질 밴드가 배, 파파야, 파인애플 과즙액 처리에 의해서는 대부분 분해가 일어난 것으로 관찰되었으나, 키위 과즙액 처리에 의해서는 대조구 누에 단백질 패턴과 큰 차이를 보이지 않아 과일 종류에 따라 단백질 분해정도가 다른 것으로 판단된다(Fig. 1).

키위 단백질 분해 효소에 의한 근단백질 actomyosin 분해는 pH 5.3 조건에서 1시간 반응에 의해 분해가 일어나기 시작하였으나, pH 8.0 조건에서는 24시간 이후에서야 분해가 시작되는 것으로 관찰되어 산성조건에서 활성이 높게 나타났다.[18]. 카제인을 기질로 한 키위 단백질 분해 효소에 의해서는 pH 3.0에서 가장 강한 활성을 보인 반면, 배, 무화과, 파인애플, 파파야의 경우는 pH 7.0에서 최적 활성을 나타내어 과일 유래 단백질 분해 효소는 키위를 제외하고 모두 중성 또는 약알칼리에서 높은 활성을 나타내었거나[3], 키위 과즙에 의한 분해에서 낮은 pH값을 나타낸 것은 단백질 분해가 상대적으로 적게 일어난 결과 단백질 농도가 낮은 것 과도 관련성이

있어 보인다.

한편 파인애플에서 추출한 단백질 분해 효소인 bromelain의 actomyosin에 대한 분해 정도는 pH 5.3 및 8.0에서 모두 강하게 일어났으며, 또 다른 연구에서도 pH 6-7 사이에서 파인애플 추출물이 강한 단백질 분해활성을 보였고, bromelain의 최적 pH가 6 정도라고도 하였다[10]. 배 및 파파야의 단백질 분해 효소에 의한 actomyosin 단백질 분해에서도 pH 5.3과 pH 7.0 반응에서 유사한 패턴을 보여 키위와는 다른 양상을 나타내었다[18]. 따라서 누에분말 단백질의 과일 유래 단백질 분해 효소에 의한 반응은 산성조건에서 높은 활성을 나타내는 키위를 제외한 다른 과일에서는 66-97 kDa 중간 정도 크기의 단백질 밴드가 대부분 나타나지 않는 것으로 보아 단백질 분해가 일어난 것을 시사한다.

DPPH free radical에 의한 전자공여활성

천연물의 항산화 활성 측정과 매우 연관성이 높은 DPPH free radical scavenging 활성을 측정[5,16]한 0.5% 누에 분말의 항산화 활성이 63%로 국내 자생 곤충 중에서도 상당히 높은 것으로 보고한바 있다[6,7,25]. 이러한 누에 분말을 *B. subtilis* 및 *A. kawachii* 균주로 발효시킨 결과 그 활성이 더욱 증가되는 것으로 보고한 바 도 있다[6,7]. 그러나 본 실험에서 대조구로 사용한 누에분말 0.5% 수용성 추출물의 항산화 활성이 과즙액으로 처리한 누에 분말의 수용성 추출물보다 높은 것으로 관찰되었으나, 이보다 낮은 0.1% 농도의 시료 추출물에서는 오히려 대조구보다 과즙액으로 처리한 누에 분말에서 약간씩 항산화 활성이 증가된 것으로 관찰되었다(Table 4). 특히 0.1% 및 0.5% 두 농도 처리에서 모두 키위 단백질 분해 효소 처리에 의해 다른 과일보다 약간씩 높은 활성을 나타내었다. 키위는 과육 중에 단백질 가수분해 효소 actinidain을 함유하고 있어 소화를 촉진시켜주며, 비타민 C가 풍부하고, 특히 칼륨과 같은 미네랄 성분이 높아 고혈압 예방 효능이 있는 과일로 알려져 있다[15]. 또한 국내산 골든 키위의 열수 추출물에 DPPH free radical scavenging 활성이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였는데, 1.5, 3, 6.2, 12.5 mg/ml 농도에서 각각 14, 27, 45,

Table 4. The DPPH free radical scavenging activity in silkworm powder by extract treatment of kiwifruit, papaya, pineapple and pear

Sample	0.5%	0.1%
BHT	92.85±0.17 <sup>a</sup>	89.09±0.14 <sup>a</sup>
Silkworm powder (SP)	62.52±0.19 <sup>b</sup>	22.76±0.66 <sup>c</sup>
Kiwifruit+SP	61.73±0.34 <sup>b</sup>	33.25±0.07 <sup>b</sup>
Papaya+SP	54.32±0.28 <sup>d</sup>	23.30±0.14 <sup>c</sup>
Pineapple+SP	60.56±0.12 <sup>b</sup>	32.43±0.17 <sup>b</sup>
Pear+SP	56.12±0.43 <sup>c</sup>	29.00±0.23 <sup>b</sup>

Values are mean±S.D of three samples.

<sup>a,b,c,d</sup> different letters are significantly different ( $\mu < 0.05$ ).

70%의 활성을 나타내어 본 실험에서 사용된 0.1%(1 mg/ml) 및 0.5%(5 mg/ml)에서 각각 33% 및 62%로 약간씩 높아 과일 유래 단백질 분해효소 작용에 의한 시너지 효과에 기인하는 것으로 생각되어진다.

국내 자생곤충 76종의 304종 추출물 중에서 항산화 활성은 방아깨비, 가시길쭉바구미, 알락수염노린재, 송장벌레과 유충 4종에서만 국한되어 있었기 때문에[25] 곤충 중에 항산화 활성을 나타내는 종류는 많지 않은 점을 감안할 때 과일의 단백질 분해효소를 함유한 과즙액으로 처리한 누에 분말의 항산화 활성은 생리활성작용을 가지는 건강기능식품 소재로 활용될 가능성을 시사하는 것으로 사료되어 진다.

#### 혈전용해 활성

국내 자생곤충으로부터 304종의 추출물을 만들어 항혈전 활성을 조사한 결과 방아깨비, 왕잠자리, 비단노린재 등 극히 일부인 10종에서만 항트롬빈 활성이 관찰되는 것으로 보고되었다[25]. 자연계에 존재하는 *Bacillus subtilis*, *Fusarium pallidorostrum*, *Katsuwonus pelamis*, *Streptococcus aureus* 미생물 유래나 청국장, 된장, 멸치젓갈, natto (nattokinase) 및 절임식품인 shiokara (katauwokinase)와 같은 발효식품 유래의 혈전용해제 개발이 많이 이루어져 왔다[19,23]. 이처럼 발효식품의 주요 미생물인 *Bacillus* 속 균주들은 단백질 분해능뿐만 아니라 혈전용해 효소 활성도 높아 혈관계 질환 관련 건강기능식품 소재로 많이 활용되고 있는 가운데 *B. subtilis* 및 *A. kawachii* 균주의 발효 누에분말 추출물에서도 혈전 용해 활성이 있었으나, 누에분말 그 자체의 추출물에서는 활성이 없는 것으로 나타나 이들 균주의 발효에 의해 활성이 부여된 것으로 보여진다[6,7]. 본 실험에서 혈전용해 활성은 배와 파파야 단백질 분해 효소 처리에 의해 각각 11.64 및 8.46 unit/ml로 비교적 높았으나, 키위와 파인애플 반응액에서는 항혈전 활성이 전혀 없는 것으로 나타나 누에분말의 단백질을 분해시키는 정도도 과일 종류에 따라서 영향을 받는 것으로 사료되어진다(Table 5).

이상의 실험 결과로부터 과즙액을 처리 함으로서 몇몇 과즙 처리에 의한 누에분말은 건강기능성식품 소재로서 충분한 가치가 있는 것으로 판단되어진다.

Table 5. Fibrinolytic activities in silkworm powder by extract treatment of kiwifruit, papaya, pineapple and pear

Sample	Unit/ml
Silkworm powder (SP)	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Kiwifruit+SP	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Papaya+SP	8.46±0.03 <sup>b</sup>
Pineapple+SP	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Pear+SP	11.64±0.20 <sup>a</sup>

Values are mean±S.D of three samples.

<sup>a,b,c</sup> different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

#### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 '2010년도 어젠다 식의약소재 연구비 지원사업에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

#### References

1. AOAC. 1997. Official methods of analysis. 17th eds., Association of official analytical chemists. Washington, D.C., USA.
2. Astrup, T. and S. Mullertz. 1991. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys.* **40**, 346-351.
3. Bai, Y. H. and J. H. Roh. 2000. The properties of proteolytic enzymes in fruits (pear, kiwifruit, fig, pineapple and papaya). *Korean J. Soc. Food Sci.* **16**, 363-366.
4. Bai, Y. H. and J. H. Roh. 2000. Application of proteolytic enzymes in fruits for meat tenderization. *Korean J. Soc. Food Sci.* **16**, 367-371.
5. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
6. Cha, J. Y., Y. S. Kim, H. Y. Ahn, K. E. Eom, B. K. Park, and Y. S. Cho. 2009. Biological activity of fermented silkworm powder. *J. Life Sci.* **19**, 1468-1477.
7. Cha, J. Y., Y. S. Kim, P. D. Kang, H. Y. Ahn, K. E. Eom, and Y. S. Cho. 2010. Biological activity and chemical characteristics of fermented silkworm powder by mold. *J. Life Sci.* **20**, 237-244.
8. Cho, C. H., W. S. Cha, and J. S. Kim. 1989. Effect of temperature, time and pH on the extraction of protein in a chrysalis of silkworm. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **4**, 65-68.
9. Choe, I. S. and Y. J. Park. 1996. A study on the utilization as meat tenderizer from Korean pear protease. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **16**, 89-93.
10. Choi, C., G. M. Son, Y. J. Cho, S. S. Chun, S. I. Lim, and Y. R. Seok. 1992. Purification and characteristics of bromelain from Korean pineapple. *J. Korean Agric. Chem Soc.* **35**, 23-29.
11. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. In gel electrophoresis. by J. E. Fredrich. *Ann. New York Acad. Sci.* 121-404.
12. Elkahalifa, E. A. and N. G. Marriott. 1990. Comparison of the effects of *Achromobacter iophagus* and splenic pulp on collagen of restructured beef. *J. Muscle Foods* **1**, 115-128.
13. Garces, R. and M. Mancha. 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* **211**, 139-143.
14. Ikeda, I., J. Y. Cha, T. Yanagita, N. Nakatani, K. Oogamil, K. Imaizumi, and K. Yazawa. 1998. Effects of dietary  $\alpha$ -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and  $\beta$ -oxidation in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 675-680.
15. Jeong, C. H., W. J. Lee, S. H. Bae, and S. G. Choi. 2007. Chemical components and antioxidative activity of Korean

- gold kiwifruit. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.* **36**, 859-865.
16. Kang, K. S., H. Y. Kim, J. S. Pyo, and T. Yokozawa. 2003. Increase in the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 750 - 754.
  17. Kang, P. D., H. J. Yoon, K. S. Ryu, B. H. Sohn, and H. D. Sohn. 1999. Electrophoretic patterns of hemolymph proteins of varieties with long and short life span in the silkworm *Bombyx mori* L. *Korean J. Seric. Sci.* **41**, 1-8.
  18. Kim, E. M., I. S. Choe and S. G. Hwang. 2003. Effects of singular manner or mixed type treatment of proteases isolated from pear, pineapple and kiwifruit on actomysin degradation. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **23**, 193-199.
  19. Kim, I. J., H. K. Kim, J. H. Jong, Y. K. Jeong and C. H. Ryu. 2002. Study of functional *Chungkukang* contain fibrinolytic enzyme. *Korean J. Life Sci.* **12**, 357-362.
  20. Kwon, H. J., K. H. Lee, J. H. Kim, S. S. Chun, Y. J. Cho, and W. S. Cha. 2006. Effect of protease on the extraction and properties of the protein from silkworm pupa. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 304-308.
  21. Lee, S. M. and Z. U. Kim. 1990. Extraction of proteins from soy milk residue using the enzymes from *Bacillus subtilis*. *Korean Agric. Chem Soc.* **33**, 282-286.
  22. Lowry, O. H., N. J. Rosebrogh, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-271.
  23. Ok, M. and Y. S. Cho. 2005. Screening of fibrinolytic enzyme producing from microorganism in Korean fermented soybean paste and optimum conditions of enzyme production. *Korean J. Food Preserv.* **12**, 643-649.
  24. Park, B. H., Y. O. Kim, H. J. Kee, Y. J. Cho, and H. K. Choi. 1999. The effect of fig conserve additive on the physicochemical characteristics of beef obtained from various breeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 511-519.
  25. Park, Y. J., J. C. Heo, S. M. An, E. Y. Yun, S. M. Han, J. S. Hwang, S. W. Kang, C. Y. Yun, and S. H. Lee. 2005. High throughput-compatible screening of antioxidative substances by insect extract library. *Korean J. Food Preserv.* **12**, 482-488.
  26. Seong, S. I., K. E. Park, M. Nagata, and N. Yoshitake. 1985. Effect of metamorphosis on the major hemolymph proteins of the silkworm. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2**, 91-104.
  27. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by sodium dodesyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
  28. Yun, E. Y., S. H. Kim, W. S. Kang, B. R. Jin, K. Y. Kim, H. R. Kim, M. S. Han, and S. K. Kang. 1997. Molecular cloning and expression of the novel attacin-like antibacterial protein gene isolated from the *Bombyx mori*. *Korean J. Appl. Entomol.* **36**, 331-340.

초록 : 키위, 파파야, 파인애플 및 배 과즙 처리에 의한 누에분말의 이화학적 특성과 생리활성

차재영 · 김용순<sup>1</sup> · 안희영<sup>2</sup> · 엄경은<sup>2</sup> · 허수진<sup>2</sup> · 조영수<sup>3\*</sup>

(대전주조(주) 기술연구소, <sup>1</sup>국립농업과학원 농업생물부, <sup>2</sup>동아대학교 대학원 의생명과학과, <sup>3</sup>생명공학과)

누에분말을 과일(키위, 파파야, 파인애플 및 배) 단백질 분해 효소로 반응시켜 생리활성작용 및 이화학적 특성을 조사하기 위하여 pH, 산도, 단백질 함량, 미네랄 함량, 지방산 조성, 단백질 패턴, 항산화 및 혈전용해 활성을 측정하였다. 누에분말은 각 과일 단백질 분해 효소로 60°C에서 24시간 반응시켰다. 단백질 농도는 과즙액 처리 누에분말에서 약간 높은 것으로 나타났다. 누에분말의 주요 미네랄은 칼륨, 마그네슘, 칼슘 및 아연이었으며, 주요 지방산 조성은 linolenic acid, oleic acid 및 palmitic acid 였다. SDS-PAGE상의 단백질 패턴 분석에서 66-97 kDa 정도 크기의 누에 단백질 밴드가 파인애플, 파파야 및 배 반응에 의해서는 대부분 분해가 일어났지만, 키위 반응에 의해서는 거의 분해가 일어나지 않은 것으로 관찰되었다. 혈전용해 활성은 파파야 및 배 반응에 의한 누에분말에서만 나타났다. 항산화 활성은 0.1% 처리 농도에서 과일 단백질 분해 효소 반응에 의한 누에분말에서 미반응 누에분말 보다 증가하였으나, 시판 항산화제 BHT 처리보다는 활성이 많이 낮았다. 따라서 과즙액 처리 누에분말의 경우 반응 전 누에분말 보다 생리활성작용 및 이화학적 특성이 강화됨으로써 건강기능식품 소재로서의 가치가 증가된 것으로 사료되어 진다.