

## Comparison of Antioxidant Activity According to Silkworm Cultivars

Jong Woo Park<sup>\*†</sup>, Chang Hoon Lee<sup>†</sup>, Chan Young Jeong, Sang Kuk Kang, Wan-Taek Ju, Seong-Wan Kim, Nam-Suk Kim, Hae Yong Kweon and Kee Young Kim

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, RDA, Jeollabuk-do 55365, Korea

Received October 9, 2021 / Revised October 26, 2021 / Accepted October 26, 2021

Although varieties of silkworms, which have recently attracted attention as a health functional food, are being produced, studies on the differences in the functionality of different silkworm varieties are insufficient. Therefore, in this study, the antioxidant activities of different silkworm breeds bred in domestic farms were analyzed, and the potential for their cultivation as specialized varieties with excellent antioxidant function was investigated. To compare antioxidant activity, four varieties of silkworms, white Bakokjam, Golden silk, Yeonokjam, and Hanseongjam, were bred; water and ethanol extracts of these silkworms were prepared on the 3rd and 5th days of the 5th instar larval stage. The highest extraction yield was seen for the water extract from the Golden silk variety on the 3rd day of the 5th instar; the highest total phenolic compound and flavonoid contents were observed for the water extract ( $86.11 \pm 4.04 \mu\text{g}/\text{mg GE}$ ) and 70% (v/v) ethanol extract ( $46.70 \pm 2.81 \mu\text{g}/\text{mg QE}$ ). Bakokjam and Yeonokjam exhibited DPPH radical scavenging activity of up to 78% and showed the highest nitrite scavenging activity (85%) at pH 1.2. The maximum SOD-like activity of Yeonokjam was about 47%. Furthermore,  $48 \mu\text{g}/\text{ml}$  of the Yeonokjam extract showed a reducing power of 0.7 abs, which was the best among the four varieties. Considering these results, the Yeonokjam (on the 3rd day of the 5th instar) had antioxidant activity and represents a silkworm cultivar that would be suitable for cultivation as a health food.

**Key words** : Antioxidant activity, cultivars, silkworm, Yeonokjam

### 서 론

경제발전과 식생활의 서구화로 인하여 육류 및 당류의 소비는 지속적인 증가 추세이며, 이와 같은 식습관의 변화가 대사성 질환 및 성인병의 원인으로 지목됨에 따라 최근 소비자들은 노화와 관련된 질병 예방 및 식습관 개선에 많은 관심을 갖게 되었다[15]. 생체 내 산화 반응 중 생성되는 활성 산소(reactive oxygen species; ROS)가 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소에 의하여 성공적으로 제거되지 못하여, 단백질 및 DNA의 손상, 지질의 산화와 같은 산화적 스트레스를 유발하여 대사성 질환 및 성인병이 발생 된다고 알려지면서 항산화 물질의 개발이 활발히 진행되고 있다[6]. 하지만 합성 항산화제에서는 다양한 부작용들이 발견되면서, 천연물 유래의 항산화제가 주목받고 있다[7]. 대표적인 항산화 활성을 지니는 식품으로는 안토시아닌, 플라보노이드 등의 페놀성 화합물을 풍부하게 함유한 복분자, 블

루베리, 아로니아와 같은 베리류가 대표적이나[8], 최근에는 곡물 및 채소류와 더불어 곤충 유래의 2차 대사산물 또한 항산화 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다[7, 10].

곤충산업의 발달과 더불어 곤충의 식품 원료 등록이 활발하게 추진됨과 동시에 곤충의 기능성에 관한 관심 또한 높아지고 있다. 대표적인 식용 곤충으로는 누에, 갈색거저리, 흰점박이꽃무지 유충 등이 있으며, 누에의 경우 아주 오래전부터 번데기 형태로 섭취가 이루어져 왔다[16]. 이처럼 산업 곤충으로서 누에는 오랜 기간 섬유 생산 및 식용으로 사용되어왔으며, 나비목의 표본 곤충으로서 생태 및 유전학적 연구가 지속해서 이루어져 왔다[11]. 하지만 근래에 들어 인공섬유의 생산 및 이용이 증가함에 따라 천연실크의 수요가 감소하며 섬유산업으로서 잠업은 점차 쇠퇴하고 있는 실정이다. 하지만 최근 다양한 연구 결과에서 알츠하이머 예방, 혈당 강하 및 콜레스테롤 저하 등의 다양한 기능성을 나타낸다는 결과들이 도출됨에 따라 건강 기능성 식품의 원료로서 주목받고 있다[1, 9, 23]. 하지만 이와 같은 누에를 고부가가치 상품으로 개발하고 지속적인 소비 유도를 통한 기능성 양잠의 활성화를 위해서는 다양한 기능성을 과학적으로 입증하고 최근 소비트렌드에 맞는 상품의 개발이 필요한 실정이다.

대표적인 단식성 곤충인 누에는 깨끗한 뽕잎만을 섭취하며, 5단계의 유충기를 거쳐 성충에 이르게 된다[17]. 주로 식용으로 이용되는 누에는 중장 내에 뽕잎이 다량 포함되어있는 5령 3일째 또는 중장 내에 뽕잎이 모두 배출되고 실샘이 최대로

<sup>†</sup> Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-62-238-2913, Fax : +82-63-238-3833

E-mail : jwpark0824@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성장한 5령 7일째 누에를 분말 형태로 가공한다[9, 11, 23]. 일반적인 누에 유충은 수분 10.6%, 조단백질 54.8%, 조지방 9.4%, 조섬유 7.2%로 성분의 대부분을 단백질이 차지하고 있어 고단백 식품으로도 가치가 매우 높다[2, 9]. 국내 농가에서 주로 사육 및 생산하는 누에 품종은 백옥잠, 골든실크, 연녹잠 및 한생잠 등이 있으며, 이중 골든실크는 최근 치매 예방 효과가 우수한 것으로 알려지면서 많은 소비자들이 찾고 있다[9]. 이처럼 누에의 품종별 기능성의 차이에 대한 보고는 많이 있는 반면, 품종에 따른 항산화 효과의 차이에 관한 보고는 전무한 실정이므로 본 연구를 통해 항산화 기능성에 특화된 누에 품종을 선발하고 육성할 기초 자료를 제공할 필요가 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 국내 농가에서 주로 사육되는 4가지 품종의 누에를 생산하여 유충 성장 시기 및 추출 용매를 달리하여 추출물을 제작하고, 각 추출물의 항산화 효과를 비교하여 특화 품종 선발을 위한 기초자료를 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 누에는 휴면계통 보급 품종인 백옥잠(잠 123X124), 골든실크(잠 311X312), 연녹잠(잠315X316) 및 한생잠(잠153X154)을 이용하였으며, 누에 사육은 농촌진흥청 농업 생물부의 표준 사육기준(온도, 24~27°C, 습도, 70~90%)에 준하여 신선한 뽕잎을 급여하고 25°C, 16L8D의 조건에서 사육하였다. 사육된 각 누에는 5령 3일째와 5령 7일째에 각각 수거하여 -70°C에서 동결 후, 동결건조기(EYELA, Japan)를 이용하여 중량 변화가 발생하지 않을 때까지 건조하여 이용하였다. 누에 추출물은 동결건조 된 누에를 분쇄기(Hanil, Korea)을 이용하여 분쇄하고, 각 시료에 증류수, 30% (v/v) 에탄올 및 70% (v/v) 에탄올을 각각 1:5 (v/v)의 비율로 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 2회 진탕 추출한 후 10,000x g로 4°C에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻어 Speed vac (Labogen, Korea)을 이용하여 농축 및 건조한 후 추출에 이용된 용매를 이용하여 18 mg/ml의 농도로 용해하여 누에 추출물 시료를 제조 후 실험에 이용하였다.

### 총 페놀성 화합물 함량 측정

누에 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis [5]법을 이용하여 페놀성 화합물이 phosphomolybic acid와 반응하여 발생되는 현상을 이용하였다. 증류수 580 µl에 누에 추출물 시료(18 mg/ml) 20 µl, 2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 100 µl, Folin-Denis 용액(Sigma, USA) 50 µl을 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후 분광광도계(Hidex, Finland)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀성 화합물의 함량은 gallic acid (Sigma, USA)를 이용한 표준 검량곡선으로부터 환산하여 누

에 추출물 건량 1 mg 당 µg gallic acid equivalents (GAE), 즉 µg GAE/mg으로 나타내었다.

### 플라보노이드 함량 측정

누에 추출물의 플라보노이드 함량은 Zhishen 등[24]의 방법에 따라 측정하였다. 누에 추출물 시료 50 µl에 증류수 450 µl를 넣어 희석하고 5% (w/v) NaNO<sub>2</sub> (Sigma) 50 µl를 넣어 실온에서 5분간 반응시킨 후 10% (w/v) AlCl<sub>3</sub> (Sigma) 50 µl를 넣고 6분간 다시 방치하였다. 이후 1 M NaOH (Duksan, Korea) 400 µl를 첨가하여 잘 혼합한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin (Sigma)을 이용하여 검량곡선을 작성한 후, 플라보노이드 함량을 구하여 누에 추출물 건량 1 mg 당 µg quercetin equivalents (QE), 즉 µg QE/mg으로 나타내었다.

### DPPH radical 소거능 측정

누에 추출물의 라디칼 소거능은 Blois [3]의 방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)와 항산화 물질이 반응하여 보라색이 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 측정하였다. 누에 추출물 시료를 30% (v/v) 에탄올을 이용하여 농도별로 희석한 후, 원심분리기(Tomy, Japan)를 이용하여 10,000x g에서 10분간 원심분리하고 상등액만을 이용하여 분석하였다. 누에 추출물 희석액 20 µl에 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충액 180 µl, 0.2 mM DPPH용액(Sigma) 100 µl을 넣고 혼합한 후, 빛이 없는 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 비교하여 백분율(%)로 나타내고, 농도별 검량곡선에 대비하여 IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration)을 산출하였다.

### SOD 유사활성 측정

Marklund와 Marklund [20]의 방법을 변형하여 pyrogallol로부터 생성되는 활성 산소로부터 과산화수소로의 전환 반응의 속도를 측정하여 superoxide dismutase (SOD) 유사활성으로 나타내었다. 96 well ELISA plate에 30% (v/v) 에탄올을 이용하여 3.6 mg/ml의 농도로 희석한 누에 추출물 희석액 20 µl를 10 mM EDTA가 첨가된 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 완충액 160 µl 및 7.2 mM pyrogallol (Sigma) 20 µl를 혼합한 후, 분광광도계를 이용하여 26°C에서 10초 간격으로 20분간 420 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. SOD 유사활성은 누에 추출물 첨가구와 무첨가구의 흡광도 증가 속도의 차이를 백분율로 나타내었다.

### 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Kato 등[13]의 방법을 변형하여 측정하였다. 30% (v/v) 에탄올을 이용하여 농도별로 희석한 누에

추출물 희석액 25 µl와 1 mM NaNO<sub>2</sub> (Sigma) 용액 15 µl를 넣고 0.1 N HCl (pH 1.2)과 0.2 M citric acid (pH 3.0 and 6.0)를 각각 80 µl씩 첨가하여 반응액의 pH를 1.2, 3.0 및 6.0으로 보정한 후, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액에 3% (v/v) acetic acid를 100 µl 첨가하고, Griess reagent (A:B=1:1, A: 1% (v/v) sulfanilic acid in 30% (v/v) acetic acid, B: 1% (v/v) naphthylamine in 30% (w/v) acetic acid)를 30 µl 첨가하여 실온에서 15분간 반응시켰다. 반응액은 10,000x g에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 200 µl를 채취하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 비교하여 백분율로 나타내었다.

**Reducing power 측정**

누에 추출물의 환원력 측정은 Oyaizu M [21]의 방법을 이용하여 측정하였다. 30% (v/v) 에탄올을 이용하여 농도별로 희석한 누에 추출물 희석액 20 µl에 증류수 255 µl와 200 mM sodium phosphate (pH 6.6) 완충액 500 µl 및 1% (w/v) potassium hexacyanoferrate (III) (Sigma) 50 µl를 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후, 10% (w/v) trichloroacetic acid (Sigma) 125 µl를 첨가하였다. 반응액을 10,000x g에서 10분간 원심분리하고 상등액 250 µl를 채취하여 0.1% (w/v) FeCl<sub>3</sub> (Sigma) 50 µl와 혼합한 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하여 absorbance unit (abs)로 나타내었다.

**통계분석**

모든 분석결과는 3회 반복 실험한 결과로부터 평균값과 표준편차로 나타내었으며 통계분석은 IBM SPSS Statistics (23, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를 통해서 시료 간 유의적 차이 (p<0.05)를 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**누에 품종에 따른 추출물 수득률**

백옥잠, 골든실크, 연녹잠, 한생잠 등 4개 품종의 품종 누에에 대한 추출 용매에 따른 추출 수율을 비교하고 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 품종 구분 없이 5령 3일째 누에에서 가장 높은 추출 수율을 나타낸 용매는 물로서 약 3%의 수득률을 나타냈으며, 30% (v/v) 및 70% (v/v) 에탄올을 이용한 추출에서 각각 2%와 1.3%의 수득률을 나타냈다. 또한, 물을 이용한 추출에서는 5령 3일째와 7일째 누에의 추출 수율에 차이가 크지 않았으나, 30% (v/v) 및 70% (v/v) 에탄올 추출에서는 5령 3일째 누에의 추출 수율이 더 높게 나타났다. 이는 에탄올 추출에서 5령 3일째 누에의 중장 내에 존재하는 다량의 뽕잎의 성분이 에탄올에 의하여 용출되어 나왔기 때문으로 판단된다[17]. 가장 높은 추출 수율을 나타낸 골든실크 누에의 물 추출 수율이 30 mg/ml이었으며, 백옥잠, 연녹잠 및 한생잠은 28 mg/ml의 수준으로 확인되었다. 하지만 물 추출을 제외한 추출에서는 품종 간 추출 수율의 차이는 발견되지 않았으며, 이는 골든실크 누에가 수용성 성분을 더 많이 포함하고 있기 때문으로 판단된다[9].

**누에 추출물의 페놀화합물 및 플라보노이드 함량**

페놀화합물은 식물체의 대표적인 2차 대사산물로서 단백질 또는 기타 거대 분자와 결합하는 특성이 있어 항산화 및 항균 효과에 관여하는 것으로 알려져 있으며 생리활성을 평가하는 지표로 사용된다[22]. 누에 품종 및 용매 조건에 따른 누에 추출물의 총 페놀화합물의 농도는 Table 2에 나타내었다. 추출에 이용된 용매와 상관없이 총 페놀화합물의 함량은 백옥잠(85.51 ±3.15 µg GAE/mg)과 연녹잠(86.11±4.04 µg GAE/mg)에서 높게 나타났으며, 추출용매 간의 비교에서는 30% (v/v) 에탄올을 이용한 추출(76.5 µg GAE/mg)에서 가장 높은 평균 농도를 나타냈다. 5령 3일째와 7일째 사이의 비교에서는 물과 70% (v/v) 에탄올 추출물에서 3일째 누에가 페놀화합물의 함량이 더 높은 것으로 확인되었으나, 30% (v/v) 에탄올 추출물에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

플라보노이드는 식물체에서 주로 합성되는 페놀화합물로서 생리활성을 나타내는 대표적인 물질이다. 누에 추출물의

Table 1. Differences in the amounts of extracts obtained by silkworm cultivar (mg/g)<sup>1)</sup>

	Extraction solvent					
	H <sub>2</sub> O		30% (v/v) ethanol		70% (v/v) ethanol	
	3 days <sup>2)</sup>	7 days	3 days	7 days	3 days	7 days
Bakokjam	28.8±0.3 <sup>b3)</sup>	27.9±0.3 <sup>b</sup>	18.8±0.2 <sup>d</sup>	14.0±0.5 <sup>e</sup>	13.3±0.1 <sup>ef</sup>	7.70±0.1 <sup>g</sup>
Golden silk	30.5±0.4 <sup>a</sup>	31.0±0.2 <sup>a</sup>	19.4±0.6 <sup>d</sup>	13.8±0.1 <sup>ef</sup>	12.2±0.3 <sup>f</sup>	6.90±0.2 <sup>g</sup>
Yeonokjam	28.8±0.8 <sup>b</sup>	28.1±0.5 <sup>b</sup>	19.7±0.4 <sup>d</sup>	13.9±0.5 <sup>ef</sup>	13.4±0.4 <sup>ef</sup>	8.30±0.4 <sup>g</sup>
Hanseongjam	28.8±0.8 <sup>bc</sup>	28.1±0.5 <sup>c</sup>	19.7±0.4 <sup>d</sup>	13.9±0.5 <sup>ef</sup>	13.4±0.4 <sup>ef</sup>	8.30±0.4 <sup>g</sup>

<sup>1)</sup>Total extract weight was expressed as mg/g of silkworm powder

<sup>2)</sup>Number of days of growth of the fifth instar silkworm

<sup>3)</sup>The values represent mean ± SD for triplicate experiments. Means with same letters within a table are not significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 2. The contents of total phenolic compounds in each silkworm extracts (µg GAE<sup>1)</sup>/mg)

	Extraction solvent					
	H <sub>2</sub> O		30% (v/v) ethanol		70% (v/v) ethanol	
	3 days <sup>2)</sup>	7 days	3 days	7 days	3 days	7 days
Bakokjam	83.57±3.82 <sup>a</sup>	68.84±4.85 <sup>g</sup>	85.51±3.15 <sup>a</sup>	76.64±3.64 <sup>bcd</sup>	45.41±1.63 <sup>j</sup>	25.17±1.04 <sup>m</sup>
Golden silk	73.10±2.88 <sup>def</sup>	58.76±2.78 <sup>h</sup>	78.05±1.53 <sup>bc</sup>	73.84±6.25 <sup>de</sup>	40.30±1.20 <sup>i</sup>	23.13±1.32 <sup>m</sup>
Yeonokjam	86.11±4.04 <sup>a</sup>	74.86±2.89 <sup>cde</sup>	79.70±2.08 <sup>b</sup>	79.96±1.52 <sup>b</sup>	48.13±6.29 <sup>i</sup>	25.85±1.07 <sup>j</sup>
Hanseongjam	71.58±2.63 <sup>efg</sup>	69.65±4.94 <sup>fg</sup>	73.00±3.35 <sup>def</sup>	69.25±10.11 <sup>fg</sup>	36.11±2.22 <sup>k</sup>	22.16±0.93 <sup>m</sup>

<sup>1)</sup>Total flavonoid content was expressed µg/ml of gallic acid equivalent.

<sup>2)</sup>Number of days of growth of the fifth instar silkworm

<sup>3)</sup>The values represent mean ± SD for triplicate experiments. Means with same letters within a table are not significantly different at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test.

플라보노이드를 측정 한 결과는 Table 3에 나타났다. 준비된 추출물의 플라보노이드를 함량을 5령 3일째 연녹잠 70% (v/v) 에탄올 추출물에서 46.70±2.81 µg QE/mg으로 가장 높게 나타났으며, 5령 7일째 골든실크 물 추출물에서 5.27±0.87 µg QE/mg으로 가장 낮게 나타났다. 플라보노이드 함량의 경우 에탄올을 이용한 추출에서 높게 나타났으며, 5령 7일째보다 3일째 누에에서 더 높게 나타났다. 이처럼 페놀화합물 및 플라보노이드 함량이 5령 3일째에 더 높게 나타나는 것은, Kim 등[17]이 밝힌 바와 같이 3일 때 누에 중장 내부에 존재하는 뽕잎으로부터 식물 유래의 플라보노이드가 다량 용출되어 나왔지만 7일째 누에의 중장에는 뽕잎이 없어 플라보노이드의 용출이 없었기 때문으로 판단된다.

**DPPH radical 소거능**

라디칼은 생체 구성성분의 산화 유도를 통해 노화 및 질병을 유발한다고 알려져 있으며, 이에 대한 제거 활성은 화학적으로 유도된 DPPH 라디칼에 대한 전자공여 작용에 의한 탈색 반응을 통해 분석할 수 있다[4]. 누에 품종별 추출물의 전자공여능을 분석한 결과를 Table 4에 나타났다. DPPH radical 소거능은 70% (v/v) 에탄올 추출물보다 30% (v/v) 에탄올과 물을 이용한 추출물에서 더 높게 나타났으며, 48 µg/ml의 농도의 추출물을 이용한 분석에서는 누에 품종 사이의 차이를

확인할 수 없었으나, 9 µg/ml 농도의 추출물의 DPPH radical 소거능은 연녹잠에서 가장 높게 나타났다. 품종별 DPPH radical 소거능의 차이를 분석하기 위하여 산출된 IC<sub>50</sub>값은 30% (v/v) 에탄올 추출물에서 5령 3일째 백옥잠이 10.24±0.83 µg/ml로 가장 낮게 나타났으며, 그 다음은 연녹잠으로 11.94±1.93 µg/ml이었다. 그뿐만 아니라, 5령 7일째 누에의 추출조건을 기준으로 비교 했을 때, 대부분 조건에서 백옥잠과 연녹잠의 DPPH radical 소거능이 우수한 것으로 확인되었다.

**SOD 유사 활성 측정**

SOD는 체내의 활성 산소를 과산화수소로 전환하여 peroxidase에 의해 제거될 수 있도록 하는 효소로서 항산화 활성을 분석하는 주요 지표로 사용되며[20], 누에 품종별 추출물의 SOD 유사 활성 분석 결과는 Fig. 1과 같다. 양성대조군으로 사용된 비타민 C와 각 실험군의 SOD 유사 활성은 농도가 증가할수록 농도 의존적인 증가 양상을 나타내었고, 누에 추출물의 경우 5령 3일째 연녹잠 30% (v/v) 에탄올 추출물에서 약 47%의 SOD 유사 활성을 나타내어 가장 높게 나타났으며, 이는 비타민 C 40 µg/ml의 농도에서 나타내는 SOD 유사 활성은 45%와 유사한 수준으로 나타났다. 하지만 다른 추출조건에서는 누에 품종간 SOD 유사 활성에 큰 차이가 나타나지 않았다. 이와 같이 5령 3일째 연녹잠의 에탄올 추출물의 SOD 유사

Table 3. The contents of flavonoid compounds in each silkworm extract (µg QE<sup>1)</sup>/mg)

	Extraction solvent					
	H <sub>2</sub> O		30% (v/v) ethanol		70% (v/v) ethanol	
	3 days <sup>2)</sup>	7 days	3 days	7 days	3 days	7 days
Bakokjam	17.35±4.08 <sup>hi</sup>	11.08±0.76 <sup>n</sup>	39.07±2.48 <sup>c</sup>	14.81±0.85 <sup>jk</sup>	43.37±1.28 <sup>b</sup>	16.52±1.32 <sup>hij</sup>
Golden silk	18.28±5.27 <sup>h</sup>	5.27±0.87 <sup>o</sup>	36.83±1.07 <sup>d</sup>	10.41±0.66 <sup>n</sup>	36.20±0.88 <sup>d</sup>	13.74±0.66 <sup>klm</sup>
Yeonokjam	21.96±2.52 <sup>g</sup>	12.44±1.08 <sup>lmn</sup>	41.91±0.67 <sup>b</sup>	15.77±0.70 <sup>ijk</sup>	46.70±2.81 <sup>a</sup>	17.41±1.06 <sup>hi</sup>
Hanseongjam	16.76±0.99 <sup>hij</sup>	11.99±3.13 <sup>mn</sup>	29.43±1.18 <sup>f</sup>	11.97±0.52 <sup>mn</sup>	32.81±4.88 <sup>e</sup>	14.55±0.58 <sup>kl</sup>

<sup>1)</sup>Total flavonoid content was expressed µg/ml of quercetin equivalent.

<sup>2)</sup>Number of days of growth of the fifth instar silkworm

<sup>3)</sup>The values represent mean ± SD for triplicate experiments. Means with same letters within a table are not significantly different at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 4. DPPH radical scavenging activities of silkworm extracts according to cultivars

Solvent	5 <sup>th</sup> instar days	Cultivar	DPPH radical scavenging activity (%)			IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (µg/ml)
			48 µg/ml	12 µg/ml	9 µg/ml	
H <sub>2</sub> O	3	Bakokjam	77.01±1.24 <sup>abc1)</sup>	48.82±13.69 <sup>bcd</sup>	27.11±7.32 <sup>efg</sup>	14.06±1.86 <sup>h</sup>
		Golden silk	76.43±0.24 <sup>abcd</sup>	48.47±7.10 <sup>bcd</sup>	30.57±5.23 <sup>def</sup>	16.60±1.19 <sup>g</sup>
		Yeonokjam	76.58±0.49 <sup>abcd</sup>	40.67±6.03 <sup>def</sup>	36.2±5.61 <sup>bcd</sup>	16.18±1.68 <sup>g</sup>
		Hanseongjam	77.44±0.89 <sup>ab</sup>	35.83±3.70 <sup>efg</sup>	29.84±2.82 <sup>def</sup>	20.42±2.40 <sup>e</sup>
	7	Bakokjam	78.01±1.29 <sup>ab</sup>	35.77±14.40 <sup>efg</sup>	23.73±7.42 <sup>fgh</sup>	20.84±3.25 <sup>e</sup>
		Golden silk	77.87±0.65 <sup>ab</sup>	39.34±5.98 <sup>def</sup>	26.17±5.67 <sup>efg</sup>	25.51±3.33 <sup>d</sup>
		Yeonokjam	78.01±0.43 <sup>ab</sup>	35.25±7.81 <sup>efg</sup>	32.76±7.56 <sup>cde</sup>	19.30±1.81 <sup>ef</sup>
		Hanseongjam	78.3±0.24 <sup>a</sup>	38.53±4.95 <sup>def</sup>	28.52±7.22 <sup>efg</sup>	21.27±2.13 <sup>e</sup>
30% (v/v) ethanol	3	Bakokjam	77.87±2.03 <sup>ab</sup>	64.87±13.23 <sup>a</sup>	44.19±3.72 <sup>a</sup>	10.24±0.83 <sup>i</sup>
		Golden silk	75.86±0.43 <sup>abcd</sup>	55.09±14.00 <sup>abc</sup>	39.33±4.74 <sup>abc</sup>	11.71±1.99 <sup>hi</sup>
		Yeonokjam	75.71±0.24 <sup>abcd</sup>	48.36±2.98 <sup>bcd</sup>	41.1±5.82 <sup>ab</sup>	11.94±1.93 <sup>hi</sup>
		Hanseongjam	77.01±0.65 <sup>abc</sup>	49.49±6.27 <sup>bc</sup>	36.08±6.88 <sup>bcd</sup>	15.75±0.75 <sup>gh</sup>
	7	Bakokjam	77.44±0.99 <sup>ab</sup>	58.46±16.93 <sup>ab</sup>	37.43±1.27 <sup>abc</sup>	10.99±2.21 <sup>hi</sup>
		Golden silk	77.58±0.00 <sup>ab</sup>	53.33±14.31 <sup>bc</sup>	39.13±7.98 <sup>abc</sup>	12.94±1.97 <sup>hi</sup>
		Yeonokjam	77.44±0.49 <sup>ab</sup>	48.71±4.38 <sup>bcd</sup>	41.52±5.77 <sup>ab</sup>	11.79±2.34 <sup>hi</sup>
		Hanseongjam	78.01±1.29 <sup>ab</sup>	44.87±5.66 <sup>cde</sup>	38.85±6.51 <sup>abc</sup>	14.49±1.48 <sup>h</sup>
70% (v/v) ethanol	3	Bakokjam	74.56±0.74 <sup>cd</sup>	32.86±15.69 <sup>fgh</sup>	22.19±5.48 <sup>gh</sup>	31.88±2.91 <sup>c</sup>
		Golden silk	75.43±1.14 <sup>bcd</sup>	22.24±4.56 <sup>hij</sup>	18.63±3.87 <sup>hij</sup>	33.15±1.32 <sup>c</sup>
		Yeonokjam	74.71±0.65 <sup>cd</sup>	25.94±3.86 <sup>ghi</sup>	22.57±3.62 <sup>gh</sup>	28.06±1.26 <sup>d</sup>
		Hanseongjam	74.28±2.37 <sup>d</sup>	22.00±3.88 <sup>hij</sup>	15.24±3.22 <sup>j</sup>	36.12±1.19 <sup>b</sup>
	7	Bakokjam	58.33±3.17 <sup>e</sup>	12.63±6.00 <sup>kl</sup>	7.73±3.12 <sup>k</sup>	45.88±3.11 <sup>a</sup>
		Golden silk	46.12±2.28 <sup>g</sup>	6.50±3.32 <sup>l</sup>	3.92±3.97 <sup>k</sup>	-
		Yeonokjam	49.85±2.86 <sup>f</sup>	9.70±4.86 <sup>kl</sup>	9.5±2.85 <sup>jk</sup>	-
		Hanseongjam	46.83±0.24 <sup>g</sup>	15.85±1.42 <sup>ijk</sup>	8.52±3.73 <sup>k</sup>	-

<sup>1)</sup>The values represent mean ± SD for triplicate experiments. Means with same letters within a column are not significantly different at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test.

<sup>2)</sup>Half maximal inhibitory concentration was calculated using silkworm extract 48, 24, 18, 12, 9, and 6 µg/ml.

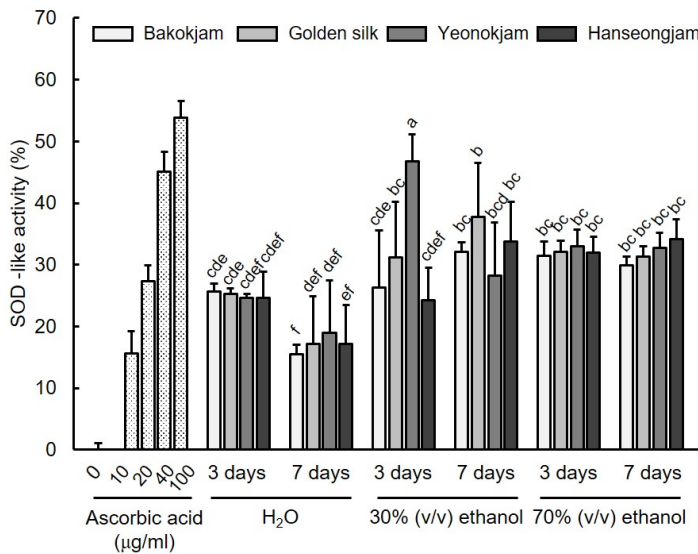


Fig. 1. SOD-like activities of silkworm extracts according to cultivars. In this assay, 72 µg/ml of silkworm extracts were submitted to analysis and ascorbic acid was used as a positive control. The values represent the mean ± SD of triplicate experiments. Means with same letters above a bar are not significantly different at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test.

활성이 가장 높게 나타난 것은 플라보노이드 함량(Table 1)과 유사한 양상으로 Lee 등[18]의 연구에 따르면 페놀화합물 및 플라보노이드 함량이 증가함에 따라 SOD 유사활성이 증가한

다는 연구와 일치하는 것으로 누에 추출물의 SOD 유사활성의 변화 또한 플라보노이드의 변화에 기인하는 것으로 판단된다.

**아질산염 소거능 측정**

체내에서 아질산염은 헤모글로빈과 결합하고 있는 철을 산화시켜 메트헤모글로빈을 형성하거나, amine과 결합하여 발암물질인 nitrosamine을 형성함으로써 인체에 영향을 끼치기 때문에 이에 대한 제거 능력은 항산화 활성을 측정하는 지표로 이용된다[13]. 누에 품종별 추출물의 아질산염 소거능을 분

석하고 Fig. 2에 나타냈다. 각 실험군의 pH를 달리하여 실험한 결과, 일반적으로 낮은 pH에서 높은 활성을 나타내었으며, 5령 3일째 누에를 기준으로 물 추출물의 경우 pH 1.2에서 백옥잠과 연녹잠이 85%가량으로 가장 높게 나타났고, pH 3.0에서는 백옥잠이 25%, 연녹잠이 20%의 아질산염 소거 활성을 가졌으며, pH 6.0에서는 백옥잠과 연녹잠 모두 약 15%의 소거 활

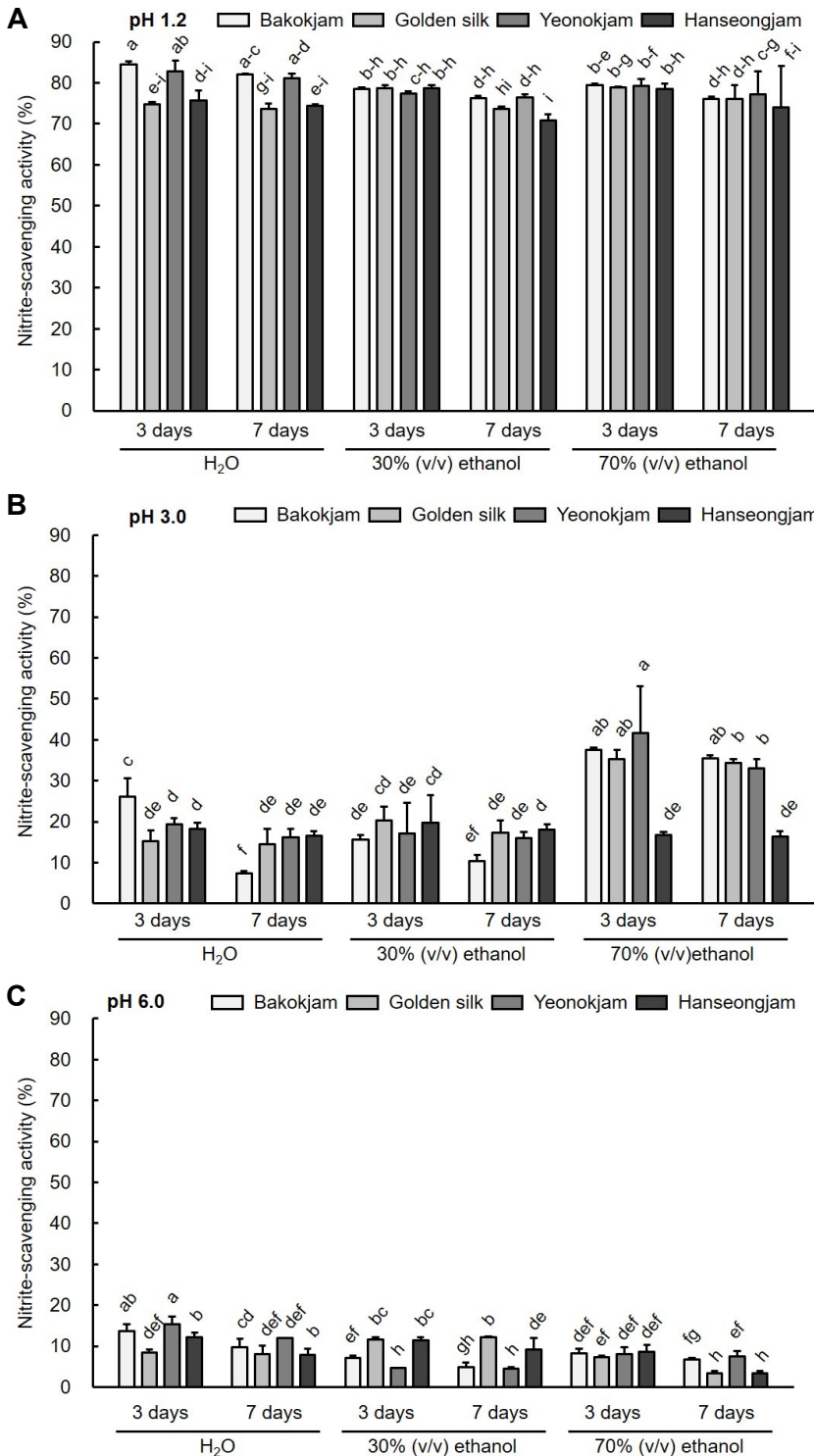


Fig. 2. Nitrite-scavenging activities of silkworm extracts according to cultivars. In this assay, 90 µg/ml of silkworm extracts were submitted to analysis. The values represent the mean ± SD of triplicate experiments. Means with same letters above a bar are not significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

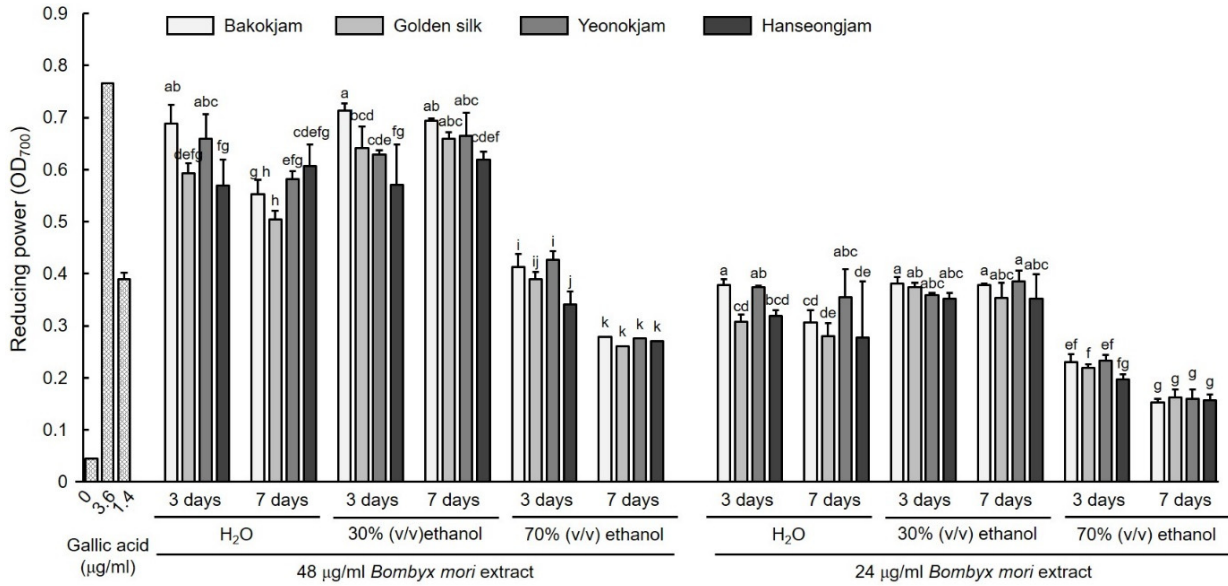


Fig. 3. Reducing powers of silkworm extracts according to cultivars. In this assay, 1.4 and 3.6 µg/ml of gallic acids were used as positive controls, and 24 or 48 µg/ml of silkworm extracts were submitted to analysis. The values represent the mean ± SD of triplicate experiments. Means with same letters above a bar are not significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

성을 나타냈다. 이와 같이 pH 변화에 따라 아질산염 소거 활성이 차이를 나타내는 원인에 대하여 Kang 등[12]은 아질산염과 amine류가 반응하여 nitrosamine을 형성하는 반응이 낮은 pH에서 활발히 일어나는 것이라고 밝히고 있다. 하지만 분석에 이용된 pH와 무관하게 대부분 추출조건에서 4개의 품종 중에 백옥잠 및 연녹잠의 아질산염 소거능이 높게 나타나 이 두 개의 품종의 항산화 활성이 더 뛰어난 것으로 판단된다.

**Reducing power**

환원력은 항산화 활성 중에 활성 산소종에 전하를 공여하는 능력으로서 ferric-ferricyanide (Fe<sub>3</sub><sup>+</sup>)를 ferrous (Fe<sub>2</sub><sup>+</sup>)로 환원시키는 능력을 측정하는 것으로 누에 추출물의 환원력 분석 결과는 Fig. 3과 같다. 누에 추출물의 농도를 달리하여 환원력을 분석한 결과, 농도 의존적으로 증가하였으며, 물과 30% (v/v) 에탄올 추출물에서 우수한 환원력을 나타내었다. 물을 이용한 누에 추출물 48 µg/ml 농도의 환원력은 0.7 abs의 수준으로 양성 대조구인 gallic acid (3.6 µg/ml)의 환원력인 0.77 abs보다 약간 낮은 활성을 나타내었다. 동일 조건에서 품종간 환원력을 비교한 결과, 백옥잠과 연녹잠이 높게 나타났으며, 5령 3일째와 7일째 사이에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 페놀화합물의 함량(Table 1)의 경향과 일치하는 결과로 아질산염 소거능과 함께 라디칼 소거능, SOD 유사활성 및 환원력 등이 폴리페놀 함량과 양의 상관관계가 존재한다는 Lee 등[19] 및 Kim 등[14]의 보고와 일치한다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 페놀화합물 및 플라보노이드 함유량이 많고, DPPH 라디칼 소거능, SOD 유사 활성, 아질산

염 소거능, 환원력 등의 항산화 활성 지표 분석에서 공통적으로 우수한 성적을 보인 연녹잠의 항산화 활성이 가장 우수하다고 판단된다. 그뿐만 아니라 항산화 효과라는 기능성 측면에서는 5령 3일째 누에의 이용이 5령 7일 누에보다 강점을 가지며, 30% (v/v) 에탄올을 이용할 때 더 많은 페놀화합물 및 플라보노이드의 추출이 가능한 만큼 추가적인 연구나 기능성 식품으로의 가공을 위한 추출에는 30% (v/v) 에탄올을 이용하는 것이 적합할 것으로 판단된다.

**감사의 글**

본 연구는 2021년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01502203) 및 국립농업과학원 전문연구원 지원사업에 의해 이루어진 것임.

**The Conflict of Interest Statement**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**References**

- Ahn, H. Y., Cha, J. Y., Park, K. R., Kim, Y. R. and Cho, Y. S. 2013. Improvement effect of fermented silkworm (*Bombyx mori* L.) powder against orotic acid-induced fatty liver in rats. *J. Life Sci.* **23**, 789-795.
- Bae, S. M., Jo, Y. Y., Lee, K. G., Kim, H. B. and Kweon,



- H. Y. 2016. Antioxidant activity of silkworm powder treated with protease. *Int. J. Indust. Entomol.* **33**, 78-84.
3. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
  4. Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B. and Lee, J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem.* **99**, 381-387.
  5. Folin, O. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as a color reagent. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-249.
  6. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
  7. Jeong, S. J., Lee, J. H., Song, H. N., Seong, N. S., Lee, S. E. and Baeg, N. I. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 135-140.
  8. Jun, H. I., Kim, Y. A. and Kim, Y. S. 2014. Antioxidant activities of *Rubus coreanus* Miquel and *Morus alba* L. fruits. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 381-388.
  9. Ji, S. D., Kim, N. S., Kweon, H. Y., Choi, B. H., Kim, K. Y. and Koh, Y. H. 2016. Nutrition composition differences among steamed and freeze-dried mature silkworm larval powders made from 3 *Bombyx mori* varieties weaving different colored cocoons. *Int. J. Indust. Entomol.* **33**, 6-14.
  10. Kang, I. H., Cha J. H., Han, J. H., Lee, S. W., Kim, H. J., Kwon, S. H., Han, I. H., Hwang, B. S. and Whang, W. K. 2005. Isolation of anti-oxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* bunge leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**, 121-128.
  11. Kang, P. D., Lee, S. U., Jung, I. H., Shon, B. H., Kim, Y. S., Kim, K. Y., Kim, M. J., Hong, I. P., Lee, K. G. and Park, K. Y. 2007. Breeding of new silkworm variety golden silk, a yellow cocoon color for spring rearing season. *Kor. J. Seric. Sci.* **49**, 14-17.
  12. Kang, Y. H., Park, Y. K. and Lee, G. D. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**, 232-239.
  13. Kato, H., Lee, I. E., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1333-1338.
  14. Kim, E. Y., Baik, I. H., Kim, J. H., Kim, S. R. and Rhyu, M. R. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medical plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 333-338.
  15. Kim, J. M., Park, J. Y., Kim, K. W. and Yoon, K. Y. 2014. Nutritional composition and functionality of mixed cereals powder. *Kor. J. Food Preserv.* **21**, 388-395.
  16. Kim, T. K., Yong, H. I., Kim, Y. B., Kim, H. W. and Choi, Y. S. 2019. Edible insects as a protein source: a review of public perception, processing technology, and research trends. *Food Sci. Anim. Resour.* **39**, 521-540.
  17. Kim, Y. S., Kim, K. Y., Kang, P. D., Cha, J. Y., Heo, J. S., Park, B. K. and Cho, Y. S. 2008. Effect of silkworm (*Bombyx mori*) excrement powder on the alcoholic hepatotoxicity in rats. *J. Life Sci.* **101**, 342-347.
  18. Lee, K. S., Kim, G. H., Kim, H. H., Kim, E. S., Park, H. M. and Oh, M. J. 2009. Physiological functionalities of tea thermally processed from *Ilex dentata* root. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 496-501.
  19. Lee, Y. M., Bae, J. H., Jung, H. Y., Kim, J. H. and Park, D. S. 2011. Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plant. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **10**, 29-36.
  20. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
  21. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.* **44**, 307-315.
  22. Perron, N. R. and Brumaghim, J. L. 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* **53**, 75-100.
  23. Ryu, K. S., Lee, H. S., Chung, S. H. and Kang, P. D. 1997. An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative conditions of silkworm powder. *Kor. J. Seric. Sci.* **39**, 79-85.
  24. Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.



## 초록 : 품종에 따른 국내산 누에의 항산화 활성 비교

박종우\*<sup>†</sup> · 이창훈<sup>†</sup> · 정찬영 · 강상국 · 주완택 · 김성완 · 김남숙 · 권해용 · 김기영  
(국립농업과학원 농업생물부)

최근 건강 기능성 식품으로 주목받고 있는 누에는 다양한 품종이 생산되고 있지만, 품종에 따른 기능성의 차이에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내 농가에서 사육되고 있는 누에의 품종에 따른 항산화 활성을 분석하였고, 우수한 항산화 활성을 나타내는 특화 품종으로서의 육성 가능성을 살펴보고자 하였다. 항산화 활성의 비교를 위하여 백옥잠, 골든실크, 연녹잠 및 한생잠 등 4개 품종을 사육하고 5령 유충기 3일째 및 7일째 누에에 대하여 물 및 에탄올 추출물을 제작하였다. 그 결과, 물을 이용한 5령 3일째의 골든실크에서 가장 높은 추출 수율이 나타났으나 총 페놀화합물과 및 플라보노이드 함량은 각각 5령 3일째 연녹잠의 물 추출물(86.11±4.04 µg/mg of gallic acid equivalent) 및 70% (v/v) 에탄올 추출물(46.70±2.81 µg/mg quercetin equivalent)에서 가장 높게 나타났다. DPPH 라디칼 소거능 분석에서 백옥잠과 연녹잠이 최대 78%의 라디칼 소거능을 나타냈으며, 연녹잠의 IC<sub>50</sub> 값은 11.94±1.93 µg/ml이었다. 연녹잠의 최대 SOD 유사 활성은 약 47%로 백옥잠 보다 높았으며, 비타민 C 40 µg/ml 농도의 SOD 유사 활성 45%와 유사했다. 아질산염 소거능 분석에서 pH 1.2 조건에서 백옥잠과 연녹잠이 85%로 가장 높게 나타났으며, pH 3.0에서는 백옥잠이 25%, 연녹잠이 20%의 아질산염 소거 활성을 나타냈다. 또한 연녹잠 추출물 48 µg/ml 농도의 환원력은 0.7 abs 수준으로 gallic acid 3.6 µg/ml 농도의 환원력과 유사한 수준으로 4개 품종 중 가장 우수했다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 항산화 활성 지표 분석에서 공통적으로 우수한 성적을 보인 5령 3일째의 연녹잠이 항산화 활성이 우수한 품종으로 육성하기에 적합할 것으로 판단된다.