

## 누에 배설물에서 Ethanol 추출한 녹색색소의 일반적 성질

김 용 환

경기대학교 식품생물공학과

### Characteristics of Greenish Pigments from Silkwarm Excrement by Ethanol Extraction

Yong-Hwan Kim

Dept. of Foods and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

#### Abstract

A study of characteristics of greenish pigments from silkwarm excrement by ethanol extraction.

Through visible absorption scanning, it showed two absorption peaks at 415 and 657nm, and it was shown to be greenish color. In the presence of light, the stability of pigments rapidly degraded, but in the presence of Al-foil, green and blue cover were very stable. It was shown to be stabilized at the temperature of 70°C until 20days and presence of metal ions, such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>.

The pigments was shown to be stabilized in 5% acetic acid solution, but in the presence of lactic acid, citric acid and tartaric acid solution were unstable.

On the result of TLC analysis, pigments were shown to be composed of eight color fractions, and main color fractions were F-1, F-2 and F-3. In F-1, F-2 fractions were revealed green color and F-3 fraction were revealed yellow color.

Key words : silkwarm excrement, greenish pigments.

#### 서 론

색택을 유지하는 과정에서 천연상태를 최대한 유지하여 주는 것이 최선의 방법이었으나 여러 가지 처리 과정에서 일부 번색 또는 퇴색되어 품질저하 현상이 발생하고 있다. 이를 보완하기 위하여 안정성이 높은 합성색소가 일부 사용되어지고 있으나, 안전성에 대한 문제가 제기되어 안정성에서 다소 뒤지기는 하지만 천연색소의 사용이 요구되고 있는 실정이다.

녹색색소는 주로 치자로부터 추출하여 사용되고 있는 상태이며, 보다 경제적인 면을 고려하여 다른 자원에서부터 색소 생산을 위한 연구의 필요성이 제기되고 있다. 이를 위하여 미생물을 이용한 녹색색소의 생산 및 이용에 관한 연구<sup>1~4)</sup>와 식물의 chlorophyll 색소에 대한 연구<sup>5~14)</sup> 등 다수가 있으나 대부분이 색소의 화학적 특성에 관한 연구로서, 실제 색소 사용 중

의 안정성 측면에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 보다 경제적인 천연의 녹색 색소자원의 개발과, 안정성 검토에 대한 필요성이 제기되고 있는 실정므로 누에배설물을 색소자원으로 이용한다면 보다 경제성이 높을 것이다.

누에는 뽕잎을 섭식하는 과정에서 다른 성분들을 소화, 흡수하여 성장하지만, 일반적으로 대부분의 chlorophyll계 색소성분은 소화, 흡수되지 않고 배설되는 것으로 알려져 있다. 이러한 누에배설물은 옛부터 일부에서 한방 위장약으로 사용되고 있어 안전성 문제가 해결되어진 것으로 판단할 수 있으나, 이들은 대부분 비료 또는 폐기물로 처리되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 자원의 재활용 차원과 경제성을 고려할 경우, 뽕잎에서 색소를 추출하여 사용하기 보다, 뽕잎은 잠사산업에 사용하고 폐자원인 누에배설물을 이용하는 것이 바람직할 것으로 판단하고 누에배설

물을 새로운 천연의 녹색색소 자원으로 활용하고자 녹색색소를 추출하여 몇 가지 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 처리

누에 배설물은 1994년 7월 중국에서 천일건조된 상태로 가져와 분말화하였고,  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 열수에 침지하여 10분간 교반 후 냉수로 급냉하여 충분히 세척하였다. 이를 다시 10배량의 30% ethanol로 10분간씩 3회 교반 세척 후, 음건하여 사용전 까지  $-18^\circ\text{C}$ 의 냉동실에 보관하였다.

### 2. 색소의 추출 및 색소용액 조제

시료를 95% ethanol로  $20^\circ\text{C}$ 의 압소 조건 하에서 48시간 교반 추출하고,  $40^\circ\text{C}$ 에서 감압 건조시킨 후  $-70^\circ\text{C}$ 의 deep freezer에 사용할 때 까지 보관하였으며 사용 직전 95% ethanol로 재용해시켜 일정 농도로 조절한 후 색소용액으로 하였다.

### 3. 광선의 영향

색소에 미치는 광선의 영향과 포장재의 광선차단에 대한 효과를 알아보기 위하여 시료용액을  $20^\circ\text{C}$ 의 자연채광(서남향)조건에서 Al-foil 포장조건과 4종의 유색 셀로판(녹색, 청색, 적색, 황색)포장조건 및 자연광 노출조건 하에서 20일간 보관하면서 일정 간격으로 UV/Vis spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 415nm에서 그들의 잔존 흡광도를 측정하였다.

### 4. 온도 및 금속의 영향

색소에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 시료용액을  $4^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  및  $70^\circ\text{C}$ 의 압소조건으로, 금속이온의 영향을 알아보기 위하여  $20^\circ\text{C}$ 의 압소조건에서 시료용액에  $1.0 \times 10^{-2}\text{M}$ 의 금속이온용액을 각각 1.0%의 농도가 되도록 첨가하여 각각 20일간 보관하면서 일정 간격으로 그들의 흡광도 변화를 측정하였다.

### 5. 유기산의 영향

유기산이 색소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료용액에 일정 농도의 4종의 유기산(acetic acid, lactic acid, citric acid, tartaric acid)을 가하여 각각의 농도가 0~5.0%가 되도록 조절하고  $20^\circ\text{C}$ 의 압소에서 4시간 방치 후 color and color differ-

ence meter(color techno system JC-801, Japan)로 측정하여 Hunter의 색계인 L, a, b값으로 나타내었으며 이때 표준백색판의 L, a, b값은 각각 99.98, 3.14 및 10.90이었다. 또한 UV/Vis spectrophotometer를 사용하여 유기산 첨가 후 4시간 및 8시간 경과 후 800~350nm까지의 absorption spectra의 변화를 측정하였다.

### 6. Thin layer chromatography

추출된 색소의 조성을 알아보기 위하여  $100^\circ\text{C}$ 의 drying oven에서 24시간 활성화 시킨 두께 0.25mm의 glass plate(Silicagel 60 F<sub>254</sub>, precoated, Merck art No. 5715)에 색소를 linespot하고 기존의 방법<sup>6,7)</sup>에 따라 light petroleum ether/acetone/diethylamine (10:4:1)을 전개용매로하여 분리하였다. 이때 분리된 각 분획들은 그들의 발현색과 Rf 값을 조사하였고, 가시광선 흡수특성을 알아보기 위하여 95% ethanol로 재추출하여 UV/Vis spectrophotometer를 사용하여 800~350nm까지의 absorption spectra를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 광선의 영향

시료에 미치는 광선의 영향은 Fig. 1에서와 같이 Al-foil에 의해서 광선이 차단된 경우에는 20일까지도 98% 이상의 흡광도 값을 나타내어 대단히 높은 안정성을 나타내었으며 유색 셀로판 포장의 경우에도 녹색포장은 20일까지 90% 정도의 안정성을, 청색포장은 9일까지 80% 이상의 안정성을 나타내었으나, 반면에 적색포장은 4일까지만 80%의 안정성을 나타내었으며 황색포장은 2일까지만 80%의 안정성을 나타내었다. 한편 자연광 노출의 경우 1일까지만 70% 정도의 안정성을 나타내었고, 그후 급격한 안정성의 감소를 보인 것으로 나타났다. 이에 따라 본 색소는 Al-foil, 녹색 및 청색 셀로판 포장의 안정화 효과가 높게 나타났으므로 이들 색상을 가진 포장재를 사용하면 안정성 측면에서 상당한 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

### 2. 온도의 영향

온도가 색소에 미치는 영향은 Fig. 2에서와 같이  $4^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ 의 경우 모두 20일까지 95%이상의 높은 안정성을 나타내었으며  $70^\circ\text{C}$ 의 경우도 20일까지 90% 정도의 안정성을 나타내어 온도에 대한 안정

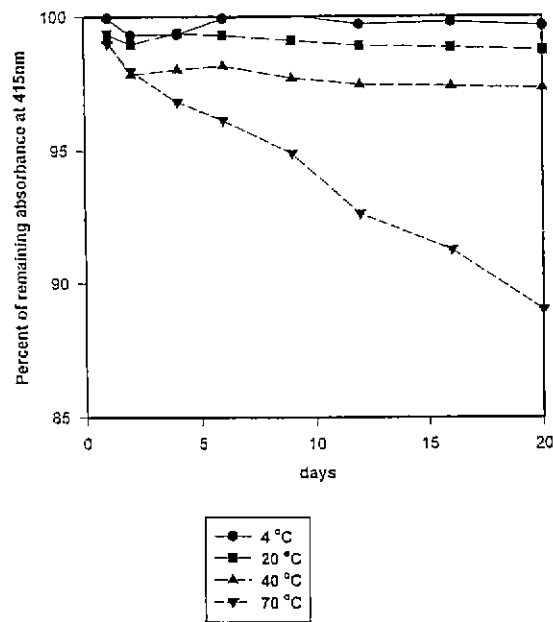
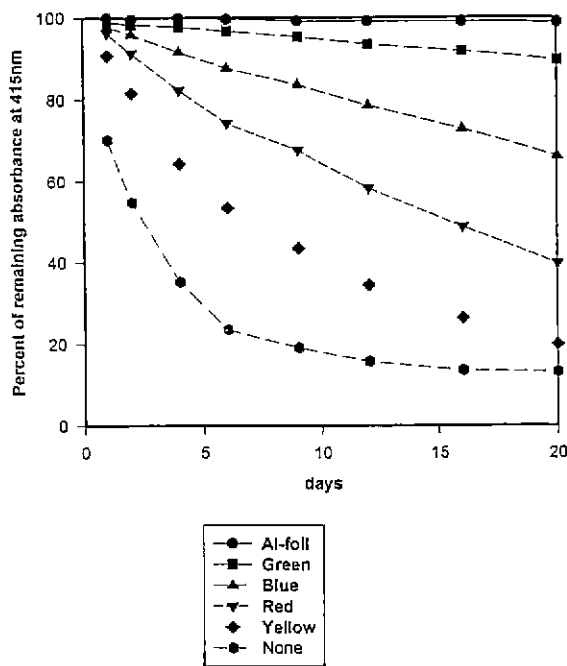


Fig. 1. Effect of light on the stability of greenish pigments at 20°C.

Fig. 2. Effect of temperature on the stability of greenish pigments in the dark.

성은 높은 것으로 판단된다. 이는 미생물로부터 추출한 녹색색소의 열 안정성이 70°C에서 1일 경과 후부터 급격히 저하되었다는 보고<sup>4)</sup>와 비교하여 볼 때 열에 대한 안정성이 높은 것으로서, 시료 처리과정에서 70±5°C의 열수 세척시 색소 안정화에 영향을 줄 성분들이나 열 안정성이 낮은 성분들이 사전에 제거되었거나 가열처리에 의하여 갈변에 관여하는 효소들의 실활에 의한 것으로 판단되며, 일반적으로 식물의 chlorophyll계 색소가 blanching에 의하여 선명한 녹색을 유지한다고 알려진 것과 동일한 경향이라 하겠다. 이에 따라 열수 세척 후 추출한 본 색소는 가열

처리가 수반되는 경우에도 이용이 가능할 것으로 판단된다.

3. 금속이온의 영향

8종의 금속이온의 영향을 검토한 결과 Table 1에 서와 같이 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>의 경우 20일까지도 95% 이상의 안정성을 나타내었으며 chlorophyll의 안정성에 기여한다는 것으로 알려진 Mg<sup>2+</sup>과 Zn<sup>2+</sup>의 경우 대조구보다 안정성 측면에서 보다 우수한 것으로 나타났다. 한편 Cu<sup>2+</sup>의 경우 첨가 4일까지는 70% 이상의 안정성을 보였으며 Fe<sup>3+</sup> 및 Al<sup>3+</sup>의 경우 첨

Table 1. Effect of metal ions(1.0×10<sup>-2</sup>M) on the stability of greenish pigments during storage in the dark at 20°C

Metal	Days									
	0	1	2	4	6	9	12	16	20	
None	100.0	99.54	99.34	98.91	98.47	98.14	97.76	97.38	97.02	
NaCl		100.46	101.86	102.27	101.78	100.63	99.56	98.99	98.13	
KCl		100.08	100.52	100.11	99.92	99.73	99.34	98.80	98.20	
MgCl <sub>2</sub>		100.36	101.26	101.61	101.80	101.61	101.66	101.56	101.42	
CaCl <sub>2</sub>		102.02	101.15	100.96	100.63	100.43	100.16	99.45	98.67	
ZnCl <sub>2</sub>		102.16	102.74	103.69	103.96	105.09	105.61	106.51	106.58	
CuCl <sub>2</sub>		78.13	74.98	71.24	69.10	68.01	66.42	64.55	62.53	
FeCl <sub>3</sub>		58.31	56.38	54.44	53.34	52.66	51.65	50.59	49.75	
AlCl <sub>3</sub>		57.75	52.78	48.98	45.62	43.29	42.62	42.62	41.31	

\* Percent of remaining absorbance at 415nm

가 1일후 부터 50%까지의 급격한 안정성 저하를 나타내었다. 이는 금속이온에 의해 안정성이 저하되었다는 미생물 색소에 대한 보고<sup>4)</sup>와 비교할 때 Fe<sup>3+</sup>와 Al<sup>3+</sup>을 제외하고는 상반되는 결과로서 계속적인 검토가 필요할 것으로 판단된다.

4. 유기산의 영향

색소용액에 미치는 유기산의 종류 및 농도에 따른 Hunter value를 측정된 결과 Table 2에서와 같이 유기산 첨가에 따른 L값의 변화는 그다지 크지 않았다. a, b값의 경우 acetic acid의 농도증가에 따라 a, b값 모두 미미하게 감소 및 증가하는 경향을 나타내었으며 시각적으로도 녹색을 그대로 유지하고 있었다. 그러나 lactic acid의 경우 1.0% 이상의 농도에서, citric acid의 경우 0.75% 이상의 농도에서, tartaric acid의 경우 0.5% 이상의 농도에서 a값이 급격하게 저하되었으며 b값도 유사한 경향으로 감소하여 심각한 손상을 입은 것을 알 수 있었다. 시각적으로도 유기산의 농도가 증가함에 따라 녹색이 다수 소

실되고 황색으로부터 황갈색에 이르기까지 변화되었다.

한편 유기산의 종류 및 농도에 따른 absorption spectra를 비교하여 본 결과 흡수극대가 415nm와 657nm인 2개의 peak로 확인된 본 색소는 Table 3에서와 같이 대조구와 비교하여 볼 때 acetic acid의 경우 5%까지의 농도증가에 따라서는 경과시간에 관계없이 미미하게 이동되었다. 하지만 lactic acid를 첨가하여 4시간 경과 후에는 2.0% 이상의 농도에서 415nm로부터 404nm로 11nm 천색이동(淺色移動) 되었으며, 657nm에서 663nm로 6nm 심색이동(深색移動) 되었고, 8시간 경과 후에는 0.7% 이상의 농도에서 각각 11nm 천색이동, 6nm 심색이동 되었다. Citric acid는 4시간 경과 후 1.0% 이상에서 8nm 천색이동, 6nm 심색이동 되었고, 8시간 경과 후 0.5%이상에서 10nm 천색이동, 7nm 심색이동 되었다. Tartaric acid는 4시간 경과 후 0.75%이상에서 8nm 천색이동, 6nm 심색이동 되었고, 8시간 경과 후 0.5%이상에서 12nm 천색이동, 8nm 심색이동 되

Table 2. Hunter's color values of greenish pigments at various organic acids and concentrate conditions

Acid Conc. (%)	Acetic acid			Lactic acid			Citric acid			Tartaric acid		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
0	83.78	-34.49	92.22									
0.25	78.14	-28.31	86.36	77.16	-22.65	84.64	77.56	-21.75	84.17	77.52	-20.83	83.56
0.5	78.72	-27.22	86.38	78.29	-21.68	84.70	78.04	-20.23	83.40	77.58	-18.73	82.05
0.75	78.80	-26.29	86.50	78.89	-20.66	84.29	78.43	-18.85	82.87	78.36	-17.15	81.48
1.0	79.09	-25.73	86.80	79.18	-19.98	83.72	78.66	-16.96	81.91	78.73	-15.97	80.90
2.0	80.76	-24.69	86.91	80.53	-17.13	82.46	79.01	-14.52	81.51	78.98	-13.30	79.33
3.0	81.56	-24.99	87.23	81.65	-15.85	82.78	79.67	-13.73	81.46	79.93	-12.56	78.10
4.0	82.87	-25.23	87.96	82.39	-15.15	82.66	80.34	-13.38	81.51	80.49	-12.17	76.78
5.0	83.29	-25.32	88.01	83.30	-14.94	83.13	80.78	-13.27	81.00	80.71	-11.74	74.91

Table 3. Visible absorption spectra at various organic acids, concentrate and standing time conditions in the dark at 20°C

Acid Conc. (%)	Acetic acid		Lactic acid		Citric acid		Tartaric acid	
	4 hr	8 hr	4 hr	8 hr	4 hr	8 hr	4 hr	8 hr
0	415, 657							
0.25	415, 659	415, 658	415, 658	414, 660	415, 659	413, 661	414, 659	410, 662
0.5	415, 658	415, 658	415, 659	412, 662	413, 660	405, 664	412, 661	403, 665
0.75	415, 658	415, 658	414, 660	404, 663	412, 661	403, 665	407, 663	402, 665
1.0	415, 658	415, 658	413, 660	404, 664	407, 663	402, 665	404, 664	402, 666
2.0	415, 658	415, 659	404, 663	402, 666	402, 665	402, 666	402, 665	402, 666
3.0	415, 658	414, 660	403, 665	402, 666	402, 666	402, 666	402, 665	402, 666
4.0	415, 658	413, 660	402, 665	402, 665	402, 666	403, 665	402, 665	402, 666
5.0	414, 658	412, 661	402, 665	402, 666	402, 666	403, 665	402, 665	402, 665

**Table 4. Color, Rf value and spectral characteristics of the isolated pigments by TLC**

Fraction no.	Color	Rf value*	Absorption wavelength (nm)**
95% EtOH extract	Green		415, 657
F-1	Bluish green	0.96	415, 527, 570, 611, 656
F-2	Green	0.88	373, 428, 534, 584, 635, 663
F-3	Yellow	0.81	442, 472, 652
F-4	Pale green	0.71	373, 429, 458, 660
F-5	Greenish yellow	0.53	422, 648
F-6	Yellow	0.44	413, 436, 464, 653
F-7	Bluish green	0.09	412, 654
F-8	Greyish green	0.04	412, 440, 579, 634

\* TLC developing solvent : light petroleum ether / acetone / diethylamine (10:4:1)

\*\* Absorption spectra of collected pigments in 95% ethanol

었다. 이로 인하여 acetic acid의 경우는 시각적으로 색조의 변화를 감지하지 못할 정도로 녹색을 유지하고 있었으나, lactic acid는 0.75% 이상의 농도에서, citric acid와 tartaric acid는 0.5% 이상의 농도에서 시각적으로 황색으로부터 황갈색으로의 급격한 색조변화를 나타내었다.

유기산과의 접촉시간이 증가함에 따라 더욱 낮은 안정성을 나타내었으므로 acetic acid를 제외한 다른 유기산과의 일정 농도 이상 장기접촉은 피해야 할 것으로 판단되며, 이는 olive의 염장발효 저장시 생성되는 젖산에 의하여 pheophytin과 pheophorbide로 변화된다는 보고<sup>7)</sup>와 식물의 chlorophyll계 색소가 산성조건에서 갈색의 pheophytin을 형성하는 것과 동일한 경향이라 하겠다.

##### 5. TLC 및 absorption spectra

색소의 조성상태와 광화학적 특성을 알아보기 위하여 TLC와 visible absorption scanning을 실시한 결과는 Table 4와 같다. 95% ethanol로 추출한 색소는 흡수극대가 415 및 657nm인 2개의 peak로 확인되었으며 TLC에 의하여 분리된 색소는 8개의 분획을 나타내었다. 가지적으로는 녹색계열을 나타내는 Rf값 0.96, 0.88, 0.71, 0.53, 0.09 및 0.04인 6개의 분획과, 황색계열을 나타내는 Rf값 0.81 및 0.44인 2개의 분획으로 나타났다. 이들을 95% ethanol로 재추출하여 흡광도를 측정한 결과 F-1, F-2 및 F-3가 높은 흡광도 값을 나타내어 이들 분획들이 색소의 주성분을 이루고 있는 것을 알 수 있었다.

이들 중 F-1은 청녹색을 나타내며 415, 527, 570, 611 및 656nm에서, F-2는 녹색을 나타내며 373, 428, 534, 584, 635 및 663nm에서, F-3은 황색을 나타내며 442, 472 및 652nm에서 흡수극대를 나타내

었다. Olive로부터 acetone 추출한 색소에 관한 연구<sup>6,7)</sup>와 비교할 때 F-2는 chlorophyll a로, F-3는  $\beta$ -carotene으로 추측되며 F-3을 제거하면 보다 선명한 녹색색소의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

이상의 결과로 미루어 누에 배설물로부터 ethanol 추출한 녹색색소는 보다 경제적인 새로운 색소자원으로서의 이용성이 높을 것으로 기대된다.

## 요 약

누에 배설물에서 ethanol추출한 녹색색소의 몇가지 특성을 검토한 결과, 본 색소는 흡수극대가 415 nm와 657nm인 2개의 peak를 확인할 수 있었다. 광선의 존재 하에서는 안정하지 못했으나 Al-foil, 녹색 및 청색 셀로판 포장에 의해서는 우수한 안정성을 나타내어 이들 포장재의 광선 차단효과가 높은 것을 알 수 있었다. 70°C에서 20일까지도 안정성이 유지되었으며, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에 의해서도 안정성이 유지되었다. 5.0% 농도까지의 acetic acid에서도 안정성이 유지되었으나, lactic acid, citric acid, tartaric acid의 차례로 농도가 증가할수록 안정성에 커다란 저해를 받은 것으로 나타났다. 또한 TLC결과 8종의 색소성분으로 구성되어 있었으며 주 색소는 F-1, F-2 및 F-3의 3종으로 나타났다. 이들중 F-1과 F-2는 녹색을 나타내었으며 F-3는 황색을 나타내었다.

## 감사의 말

본 연구는 경기대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사 드립니다.

## 참고문헌

1. Hayashi, H., Nakano, N. and Morita, S. : Comparative studies of protein properties and bacteriochlorophyll contents of bacteriochlorophyll-protein complexes from spectrally different types of *Rhodospseudomonas palustris*, *J. Biochem.*, 92(6), 1805~1811 (1982).
2. Shimada, K., Hayashi, H. and Tasumi, M. : Bacteriochlorophyll-protein complexes of aerobic bacteria, *Erythrobacter longus* and *Erythrobacter* species OCh 114, *Arch. Microbiol.*, 143, 244~247 (1985).
3. Nishimura, Y., Mukasa, S., Iizuka, H. and Shimada, K. : Isolation and characterization of bacteriochlorophyll-protein complexes from an aerobic bacterium, *Pseudomonas radiosa*, *Arch. Microbiol.*, 152, 1~5 (1989).
4. 김용환, 이상섭 : Acetone 추출한 *Rhodospseudomonas viridis* 녹색색소에 대한 연구 : 식용색소로서의 일반적 성질, *한국식품과학회지*, 26(1), 93~97 (1994).
5. Hayakawa, K. I. and Timbers, G. E. : Influence of heat treatment on the quality of vegetables : changes of visual green color, *J. Food Sci.*, 42(3), 778~781(1977).
6. Minguez-Mosquera, M. I. and Garrido-Fernandez, J. : Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*), *J. Agric. Food Chem.*, 37(1), 1~7 (1989).
7. Minguez-Mosquera, M. I., Garrido-Fernandez, J. and Gandul-Rojas, B. : Pigment changes in olives during fermentation and brine storage, *J. Agric. Food Chem.*, 37(1), 8~11 (1989).
8. Schwartz, S. J. and Von Elbe, J. H. : Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables, *J. Food Sci.*, 48, 1303~1306 (1983).
9. Bidigare, R. R., Kennicutt-Ⅱ, M. C., Keeney-Kennicutt, W. L. and Macko, S. A. : Isolation and purification of chlorophyll a and b for the determination of stable carbon and nitrogen isotope compositions, *Anal. Chem.*, 63, 130~133 (1991).
10. Canjura, F. L. and Schwartz, S. J. : Separation of chlorophyll compounds and their polar derivatives by HPLC, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1102~1105, (1991).
11. Van Breemen, R. B., Canjura, F. L. and Schwartz, S. J. : Identification of chlorophyll derivatives by Mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1452~1456 (1991).
12. Schwartz, S. J. and Lorenzo, T. V. : Chlorophyll stability during continuous aseptic processing and storage, *J. Food Sci.*, 56(4), 1059~1062 (1991).
13. Khalyfa, A., Kermasha, S. and Alli, I. : Extraction, purification and characterization of chlorophylls from spinach leaves, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 215~220 (1992).
14. Pilar, C. M. and Antonia, M. M. : Pigment composition and color of frozen and canned kiwi fruit slices, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2141~2146 (1992).

---

(1998년 6월 8일 접수)