

누에번데기 유래 불포화지방산을 이용한 기능성 효과 시험

강필돈 · 김진원 · 정이연 · 김기영 · 강석우 · 김미자 · 류강선
농업과학기술원 농업생물부

Study on the Unsaturated Fatty Acids in the Pupae of Silkworm, *Bombyx mori*

Pil-Don Kang, Jin-Won Kim, I-Yeon Jung, Kee-Young Kim, Seok-Woo Kang, Mi-Ja Kim and Kang-Sun Ryu

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

Purification method of unsaturated fatty acid from silkworm pupa has been set up. Over 70% of total fatty acid was unsaturated form. Unsaturated fatty acid from silkworm pupa improved hyperlipemia in the induced hyperlipemial mice, increased the production of collagen, inhibited the activity of collagenase, and cured the dryness-induced skin very quickly.

Key words : Gas chromatogram, Unsaturated fatty acid, Silkworm pupa

서 론

북극에 가까운 지역에 사는 캐나다 원주민의 낮은 심장 질환 발병율을 근거로 역학조사를 한 결과, 등푸른 생선에 풍부하게 존재하는 불포화지방산이 혈소판 응집 억제를 통해 심장질환예방에 효과적인 것으로 밝혀졌다는 것은 이미 낯선 얘기는 아니다. 그 이후의 불포화지방산, 그 중에서도 ω -3(오메가 3) 불포화지방산에 대한 연구는 전 세계적으로 유행하여 심장질환예방효과 외에도 피부세포의 방어기능을 증대시켜 일종의 보호막과 같은 역할을 한다는 것도 밝혀졌다. 이러한 불포화지방산의 효과에 기인하여 많은 식·의약품 및 화장품이 개발되어 고가임에도 불구하고 세계적으로 큰 수요를 일으키고 있다(최 등, 1994; Van *et al.*, 1991; Marchis *et al.*, 2002; Yuichi *et al.*, 2001).

누에의 번데기에 많은 기름성분이 있는 것은 주지의 사실이지만, 그 기름성분을 조사한 결과 불포화지방산의 함량이 전체 지방산 중 70%가 넘는다는 예비실험 결과에 기초하여, 본 연구에서는 누에번데기에서 불포화지방산을 분리 정제하는 방법을 완성하여 분리된 누에번데기 유래 불포화지방산을 이용하여 고지혈증 유발동물에 대한 콜레스테롤 저하 효과시험, 주름개선 효과 시험, 피부보습 효과 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 누에 번데기의 불포화 지방산의 분리 정제 및 정성·정량 분석

건조누에번데기 10 kg을 파쇄한 후 에틸 아세테이트 1 L를 첨가하여 40°C에서 1시간 동안 추출하고 이어서 10분 동안 초음파 추출한 후, 추출물을 20 μ m 여과지를 이용하여 여과하였다. 이 과정을 3회 반복한 후, 추출액의 1/2 부피의 10% NaOH, NaCl, 포화된 NaCl 용액으로 2회에 걸쳐 수용성 불순물을 제거하고, 10%(w/v) MgSO₄ 용액으로 물을 제거하였다. 물이 제거된 추출액을 10 μ m 여과지로 여과하고 40°C에서 감압 농축하여 유기용매를 제거하고, 남은 기름에 5배 부피의 CH₂Cl₂과 20배 부피의 hexane 및 활성탄을 첨가하여 불순물을 제거한 후, 다시 감압 농축하여 유기용매를 완전히 제거하여 정제된 불포화지방산을 최종적으로 얻을 수 있었다. 정제된 불포화지방산은 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

2. 누에번데기 유래 불포화 지방산을 이용한 기능성효과 시험

가. 누에번데기 불포화지방산의 고지혈증 유발동물에 대한 콜레스테롤 저하 효과시험
실험용 흰쥐를 콜레스테롤 식이(콜레스테롤 1% 첨가)

*Corresponding author. E-mail: kangpd@rda.go.kr

섭취에 의하여 고지혈증을 유발시킨 후, 누에번데기 유래 불포화지방산을 40, 200, 1000 mg/kg 수준으로 4주간 매일 경구 투여하였다. 2주 간격으로 2회에 걸쳐 채혈 후 Triglyceride(TG), Total cholesterol(CHO), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol 함량을 측정하고, 동맥경화지수(atherogenic index, AI)를 산출하였다. 최종일에 간조직 중 Cholesterol 및 Triglyceride를 측정하였다.

* 동맥경화지수(atherogenic index, AI):
(Total cholesterol-HDL-cholesterol) / (HDL-cholesterol)

나. 주름개선 효과 시험

(1) 콜라겐 생성에 미치는 불포화지방산의 효과

Human normal fibroblast 세포를 배양하고, 세포배지를 수집한 후 그 배지 100 µl를 37°C에서 2시간동안 배양하고 PBS 400 µl로 3회 세척하였다. Antibody-POD conjugate solution 100 µL를 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 배양하고 다시 PBS 400 µl로 3회 세척하였다. 기질용액(TMBZ) 100 µl 첨가 후, 상온에서 15분간 배양하고 1N H₂SO₄ 100 µl를 첨가한 후 450 nm에서 ELISA reader로 detection 하였다.

(2) 콜라게네이즈 저해시험

Human normal fibroblast 세포를 배양하고 샘플(0.01%, 0.05%, 0.1%)과 TNF-α(MMP-1을 활성화 시키는 인자)를 가하여 24시간 동안 배양하였다. 세포배지를 수집하여 그 중 100 µl를 2-8°C에서 밤새 배양하고 Wash buffer를 이용하여 4번 씻은 후 APMA 50 µl, assay buffer, detection reagent(detection enzyme + substrate)를 각각 50 µl씩 첨가하고 37°C에서 90분간 배양하고, ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

(3) 엘라스테이즈 활성 억제능 시험

50 µl의 10 nM elastase(0.25 µg/ml), 시료, 0.2 M Tris-Cl (pH8.0) buffer를 섞고(총2.5 mL), 25°C에서 10분간 배양하였다. 125 mM SANA 20 µl를 첨가한 후 A410 nm에서 2-3분간 absorbance를 측정하였다.

다. 피부보습 효과 시험

실험용 쥐에 2% SDS 처리에 의해 피부건조증을 유발한 후, 누에유래 불포화지방산 50, 100, 200 µL를 1일 2회 처리한 후 피부보습도를 측정하였다.

결과 및 고찰

누에유래 불포화지방산의 가스 크로마토그램은 그림 1과 같다. 그 결과, 지방산의 70% 이상이 불포화지방산이

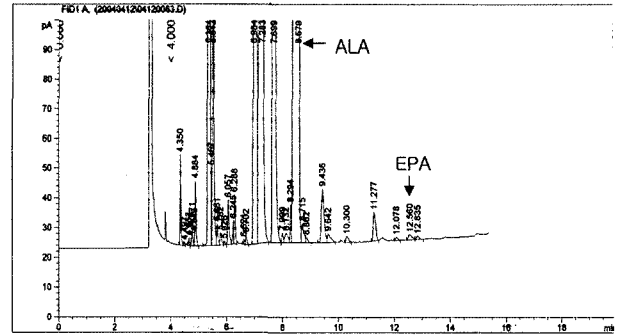


Fig. 1. Gas chromatogram of the fatty acid of silkworm larvae. ALA : α-Linolenic acid, EPA : Eicosapentaenoic acid.

Table 1. Fatty acid content of silkworm pupa

fatty acid kinds	content (%)
α-linolenic acid (ω-3 fatty acid)	25.6
linoleic acid	4.8
oleic acid	40.3
stearin acid (saturate fatty acid)	29.3

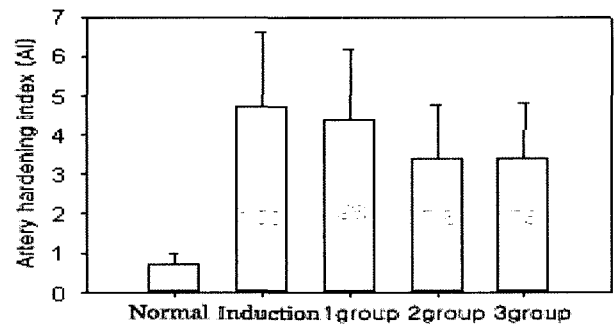


Fig. 2. Effect of the silkworm-pupa originated unsaturated fatty acid on hyperlipemia.

Normal: normal group, Induction: hyperlipidemia induction group, 1 group: unsaturate fatty acid 40 mg/kg injection group, 2 group: unsaturate fatty acid 200 mg/kg injection group, 3 group: unsaturate fatty acid 1,000 mg/kg injection group.

있고 전체 지방산의 25%가 ω-3 불포화지방산으로 알려진 α-Linolenic acid였다(표 1). 번데기의 경과일수는 함량비와 큰 관계가 없었다.

누에번데기 유래 불포화지방산의 고지혈증 및 콜레스테롤 개선효과를 살펴본 결과, 고지혈증 유발쥐에 불포화지방산을 40, 200, 1000 mg/kg 투여한 결과, 2주 후 투여량 의존적으로 동맥경화지수(30%) 및 총콜레스테롤 함량(15-20%)을 감소시켰다(그림 2, 3).

누에번데기 불포화지방산 유래 주름개선 효과를 보기 위하여 콜라겐 생합성, 콜라게네이즈 활성 억제 시험, 엘라스테이즈 활성 억제 시험을 한 결과, 누에번데기 유래 불포화지방산은 콜라겐 생합성을 0.01%와 0.05%에서 농

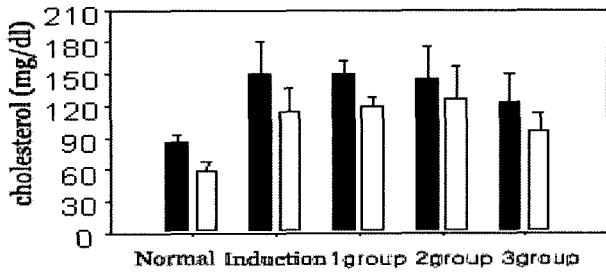


Fig. 3. Decreasing effect of the silkworm-pupa originated unsaturated fatty acid on cholesterol content.

Normal : normal group, Induction : hyperlipidemia induction group, 1 group : unsaturate fatty acid 40 mg/kg injection group, 2 group : unsaturate fatty acid 200 mg/kg injection group, 3 group : unsaturate fatty acid 1,000 mg/kg injection group, ■ : Cholesterol quantity after two weeks, □ : Cholesterol quantity after four weeks.

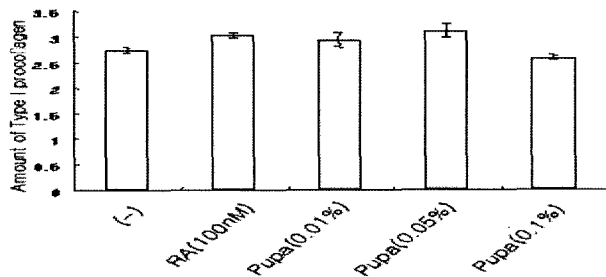


Fig. 4. Effect of the silkworm-originated unsaturated fatty acid on collagen generation.

RA : ratinolic acid (positive control, 110.6%), unsaturate fatty acid 0.01% (107.1%), unsaturate fatty acid 0.05% (113.4%), unsaturate fatty acid 0.1% (94.1%).

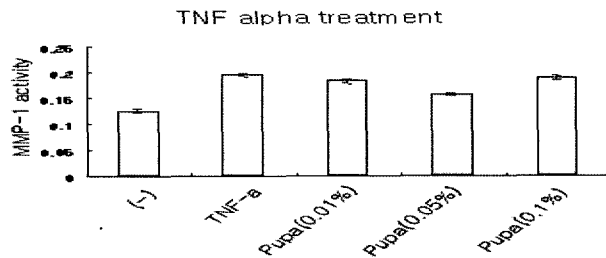


Fig. 5. Effect of the silkworm-pupa originated unsaturated fatty acid on collagenase vitality TNF-α (control, 100%), TNF-α / Pupa (0.01%) (93.6%), TNF-α / Pupa (0.05%) (80.3%), TNF-α / Pupa (0.1%) (96.4%).

도 의존적으로 증가시키는 것을 볼 수 있었고(각각 100% 대비 107%, 113.4%) ($p < 0.01$) (그림 4), 0.01%와 0.05%의 경우 유의성 있게 농도의존적인 콜라게네이즈 활성 억제 현상을 나타내었다(각각 100% 대비 93.6%, 80.3%) ($p < 0.01$) (그림 5). 그러나 누에번데기 유래 불포화지방산은 엘라스테이즈는 억제하지 않았다(그림 6).

누에번데기 유래 불포화지방산의 피부보습 개선효과를

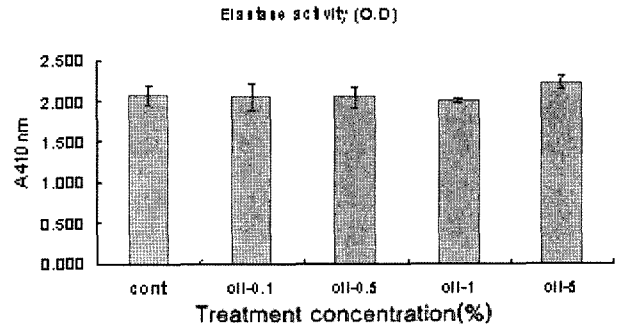


Fig. 6. Depression effect of the silkworm-pupa originated unsaturated fatty acid on elastase vitality.

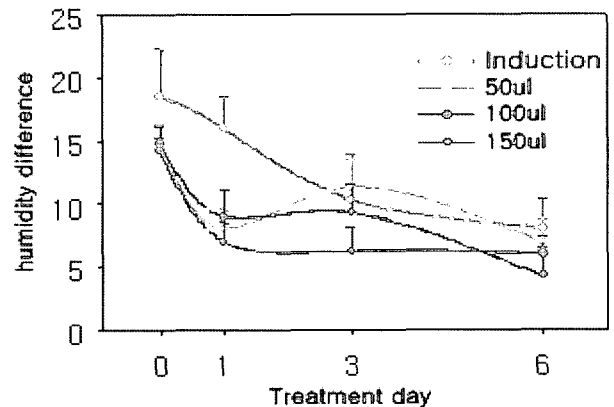


Fig. 7. Effect of the silkworm-pupa originated unsaturated fatty acid on xeroderma.

Induction group : xeroderma iduction group, 50-mL : 50 mL treatment group of unsaturate fatty acid (150%), 100 mL : 100 mL treatment group of unsaturate fatty acid (144%), 200 mL : 200 mL treatment group of unsaturate fatty acid (156%)

살펴본 결과, 처리량에 상관없이 처리 1일 만에 피부보습도가 각각 150%, 144%, 156% 유의하게 증가하여 ($p < 0.05$), 정상수준으로 피부건조증이 개선되었다(그림 7).

적 요

누에유래 불포화지방산의 분리법을 확립하여 특허출원 하였다(출원번호 : 2004-76364호). 분리 정제된 누에유래 불포화지방산의 비율은 70% 이상이었다. 누에유래 불포화지방산의 기능성을 시험해본 결과, 고지혈증 개선의 효과를 보였고, 피부단백질인 콜라겐 생성을 유의적으로 증가시키며, 콜라겐 분해효소 활성을 유의적으로 억제하였다. 또한, 피부건조증 개선에 빠르고 탁월한 효과가 있었다.

인용문헌

최운정, 김한수, 강정욱, 김성희, 서인숙, 정승용 (1994) 아미인유

와 해바라기 종자유의 혼합 급이가 식이 성 고지혈증 흰쥐의 혈청 지질 성분에 미치는 영향, 한국영양식량학회지. **23**: 23~30.

대한민국 특허청, 출원번호 10-2001-0021260. 출원일 2004년 9월 23일.

De Marchis, F., Ribatti, D., Giampietri, C., Lentini, A., Faraone, D., Scoccianti, M., Capogrossi, M. C. and Facchiano, A. (2002) Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties in vitro and in vivo through its alpha receptor. *Blood* 2002 Mar 15; **99**(6): 2045~2053.

한국보건공정서연구회간행, 건강기능성 식품의 기능성 시험 가이드

드(II) 고지혈조절 관련 표준시험법의 예시 445~449.

Van de Loosdrecht, A. A., Nennie, E., Ossenkoppele, G. J., Beelen, R. H. and Langenhuijsen, M. M. (1991) Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods*. **141**(1): 15~22.

Yuichi Tsukada, Keiji Miyazawa, and Naomi Kitamura (2001) High Intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor-induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J. Biol. Chem*. **276**: 40968~40976.