

Biological Activity and Chemical Characteristics of Fermented Silkworm Powder by Mold

Jae-Young Cha, Yong-Soon Kim¹, Pil-Don Kang¹, Hee-Young Ahn², Kyung-Eun Eom² and Young-Su Cho^{2*}

Technical Research Institute, Daesun Distilling Co., Ltd. Busan 619-951, Korea

¹Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707, Korea

²Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Received December 15, 2009 / Accepted December 21, 2009

Five mold strains - *Mucor racemosus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachi*, and *Monascus purpureus* - were used for the fermentation of both freeze-dried and air-dried silkworm powders. The concentrations of proteins and minerals, electrophoretical protein patterns, fatty acid composition and the activities of fibrinolytic and antioxidation with freeze-dried silkworm (FDSW) or air-dried silkworm powders (ADSW) fermented by the five molds were investigated. The concentrations of major minerals in fermented FDSW and ADSW powders were K by 72.0-76.3 and 77.1-78.9 ppm, Mg by 29.6-49.7 and 44.3-58.7 ppm, Ca by 1.9-14.9 and 9.8-21.6 ppm and Zn by 0.64-0.70 and 4.17-4.52 ppm, respectively. Major fatty acids in fermented FDSW and ADSW powders were linolenic acid, oleic acid, and palmitic acid. There were slightly varietal differences in electrophoretical protein patterns when total protein patterns of fermented FDSW and ADSW powders were analyzed by native- and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). DPPH radical scavenging activity was slightly stronger in fermented ADSW powders than that in fermented FDSW. Fibrinolytic activity was only detected in the FDSW fermented by *Aspergillus kawachi* and *Monascus purpureus*. These results may provide the basic data to understand the biological activities and chemical characteristics of silkworm fermented by mold, which can be used for the development of functional foods.

Key words : Fermented-silkworm powder, mold strains, antioxidant activity, fibrinolytic activity, functional foods

서 론

최근 들어 유산균, 효모, 바실러스, 곰팡이 등의 유익한 미생물을 이용한 발효기술 진보로 다당체, 올리고당, 사포닌, 아미노산, 펩타이드, 피틴산 등의 발효산물을 얻거나 또는 상호간의 시너지 작용에 의해 생리활성효능이 상승되는 것으로 알려져 왔다[8,9,42]. 탄수화물과 단백질은 주로 분해하는 미생물 중의 하나로 곰팡이 균주가 분비하는 효소에 의하여 생성되는 당류, 아미노산류, 유기산류 등의 맛 성분은 제품의 품질에 결정적인 영향을 줄뿐만 아니라 bioconversion에 의하여 다당체, 올리고당, 아미노산류, 펩타이드류, 유기산류, 폴리페놀류 등의 유효 성분의 생성 및 증가에 의해서는 다양한 생리활성 작용을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다[27,28]. 이들 곰팡이류에는 *A. oryzae*, *A. kawachi*, *A. niger*, *Rhizopus tritici*, *Monascus purpureus* 등이 있다. 특히 *A. kawachi*는 구연산과 내산성 당화 효소를 생산하는 균주로 알려져 있어 주류 제조에 많이 이용되고 있으며, *Monascus purpureus* 균주는 홍국색소를 생산하므로 식품첨가물로 이용되기도 하고, monacolin K, mevino-

lin, lovastatin, γ -aminobutyric acid (GABA), acetylcholine 과 같은 생리활성물질을 만들어 콜레스테롤 생합성 효소 (HMG-CoA reductase) 활성 억제, angiotensin converting enzyme (ACE)저해에 의한 혈압상승 억제, 지질개선작용, 혈전 용해 작용 및 항산화 활성과 같은 유효성 검증에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있다[4,9,13,29,33,35-37].

최근 새로운 생물자원으로 곤충산업의 중요성이 조명되면서 누에 유충을 이용한 생리활성 작용과 그 물질을 분리하는 연구가 다수 수행되고 있다[19,34,38]. 누에(*Bombyx mori* L.)는 주로 단백질과 지방을 많이 함유하고 있으며, 누에 번데기에도 이들 성분을 비교적 많이 함유하고 있어 고단백질 식품소재로 인식되고 있다[10]. 이들 성분 중에는 필수 아미노산과 고도불포화 지방산이 많이 함유되어 있어 간 기능 개선이나 혈액순환 관련 건강식품 소재로 활용되고 있다[19,39,45]. 누에 실크 유래의 sericin 단백질도 serine, aspartic acid 및 glycine 으로 주로 구성되어 있어 알코올성 간독성에 대해 간 보호 효과와 항산화 효과가 높은 것으로 보고되었다[22]. 또한 단백질 함량이 높은 누에 분말을 단백질 분해력이 뛰어난 *Bacillus* 속 미생물로 발효시켜 얻은 발효누에에서 항산화 작용, 혈전 용해 작용, 티로시나제 활성 저해 등의 생리활성작용이 발효 전 누에 분말보다 증가하는 것으로 보고한 바 있다[8]. 한편,

*Corresponding author

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

E-mail : choys@dau.ac.kr

클로로필을 다량 함유한 누에 분변도 알코올성 간독성에 대한 보호 효과가 있는 것으로 보고되었다[25]. 따라서 본 실험에서도 누에분말의 이화학적 변화에 의한 생리활성작용을 기대하기 위하여 탄수화물과 단백질 분해능이 있는 몇 종류의 유용 곰팡이 균주를 이용하여 동결 및 열풍건조 누에분말을 발효시켜 균종간의 변화를 비교 검토하고 건강기능식품 소재로 활용하기 위한 기초 자료를 얻는 목적으로 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

발효 재료 및 사용 균주

2009년 4월 동결 및 열풍건조 누에분말을 순천영농법인(순천, 전남)에서 구입하였으며, 외관상 동결건조 누에분말은 약간의 푸른빛을 나타내었고, 열풍건조 누에분말은 약간의 옅은 갈색을 나타내어 건조방법에 따른 유관상의 차이가 있었다. 누에 분말의 발효는 5종의 곰팡이 *Mucor racemosus forma racemosus* KCCM 12352, *Rhizopus oryzae* KCCM 11273, *Aspergillus oryzae* KCCM 11372, *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, 및 *Monascus purpureus* KCCM 12002 균주를 한국미생물보존센터로부터 분양받아 사용하였다.

누에분말의 발효 조건

동결 및 열풍건조 누에분말을 발효시키기 위하여 곰팡이를 각각 전배양 시켜 얻은 균사체 배양액을 누에분말에 5% (v/w) 수준으로 섞은 다음 30°C에서 12일간 발효 시켰다[8]. 이때 발효과정 중에 건조를 막기 위하여 멸균된 증류수를 일정한 동량씩을 뿌려주면서 발효를 진행시켰다.

발효 누에 분말의 산도 측정

산도측정은 각 곰팡이 균주로 발효시킨 동결 및 열풍건조 발효 누에분말을 증류수에 1% (w/v) 수준으로 추출한 후 시료액 10 ml를 취하고 증류수 50 ml를 가한 후 잘 흔들어 1% phenolphthalein 용액 4~5 방울 떨어뜨리고 0.1 N NaOH로 적정 한 후 그 소모량을 측정하여 총 산도로 환산하였다. 추출물의 총 산도는 acetic acid 값인 0.0006을 계산식에 적용하였다.

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

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

Mineral 함량 측정

각 곰팡이 균주로 발효시킨 동결 및 열풍건조 발효 누에분말의 미네랄 함량은 AOAC분석 방법[1]에 준하여 측정하였다. 즉, 이들 시료 분말 1 g씩을 각 550°C 회화로에서 3시간 회화시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해 시켜 수용상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건조물에 3 N HCl를 가하여 Whatman No. 4 여과지로 1차 여과하고 0.2 µm 필터로 여과시켜 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석한 후 원자흡광

분광광도계(Analyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

지방산 조성 분석

각 곰팡이 균주로 발효시킨 동결 및 열풍건조 발효 누에분말의 지방산 분석은 Garces 및 Mancha 방법[14]으로 행하였다. 즉, 각 발효누에 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, Kyoto, 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.

Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE)에 의한 단백질 패턴비교

각 곰팡이 균주로 발효시킨 동결 및 열풍건조 발효 누에분말의 단백질패턴은 Davis 방법[11]에 따라 slab-type polyacrylamide gel을 사용하였다. Native-PAGE의 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)을 만들어 5× sample buffer (312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8), 50% glycerol, 0.05% bromophenol blue] 용액에 혼합한 시료를 농축 gel 내에 성형된 홈에 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, 저온(4°C)에서 2시간 통전시켰다. 영동이 완료된 gel은 7% 초산액에 용해한 후 1% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 7% 초산액으로 충분히 탈색시켜 건조 및 사진촬영을 하였다.

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의한 단백질 패턴비교

각 곰팡이 균주로 발효시킨 동결 및 열풍건조 발효 누에분

말의 단백질패턴은 Weber 및 Osborn 방법[43]에 준하였다. SDS-polyacrylamide gel의 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, 0.5M 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 하였다.

혈전용해 효소 활성 측정

각 곰팡이 균주로 발효시킨 동결 및 열풍건조 발효 누에분말의 혈전용해 효소 활성은 fibrin plate 법[3]을 변형하여 lysed zone으로 측정하였다. Fibrin plate는 0.06% fibrinogen (Sigma, 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, 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 μ l씩 점적하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 생성된 투명환 부위의 직경을 측정하였다. 직경은 서로 수직인 두 개의 지름을 측정하여 투명환의 면적을 구하였다.

DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

각 곰팡이 균주로 발효시킨 동결 및 열풍건조 발효 누에분말의 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(0.5%)의 시료용액 1 ml를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 대조구인 시판 항산화 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(%)

$$= \{1 - (\text{Abs}/\text{Abs}_0)\} \times 100$$

Abs: Absorbance of control treatment at 528 nm

Abs: Absorbance of sample treatment at 528 nm

결과 및 고찰

누에분말의 발효

새로운 생물자원 소재로서 곤충 관련 산업이 주목받고 있는 가운데[34,38], 누에의 천연 단백질인 silk fibroin과 누에 실크 유래의 sericin 단백질의 생리활성작용으로 알코올성 간 독성 개선효과와 항산화 효과가 보고 되었다[10,22]. Sericin 단백질의 구성아미노산은 serine 31%, aspartic acid 17.8% 및 glycine 19.1%로 구성되어 있으며[22], serine, glycine, aspartic acid, alanine 및 arginine과 같은 아미노산은 알코올성 간 독성 개선 효과가 있는 것으로 보고되어 누에와 그 부산물에도 간 보호 효과에 관련된 아미노산이 많이 함유되어 있을 것으로 사료된다[26,44]. 이전의 실험에서 고단백 식품소재로 각광받고 있는 누에 단백질을 분해 또는 발효시켜 새로운 생리활성작용을 기대하려는 시도로 *B. subtilis* 균주[31,32]와 유산균인 *L. hilgardii* 균주[2]로 발효시킨 결과 항산화 활성 증가, 혈전 용해 활성 증가 및 티로시나제 활성 억제 등 생리활성작용이 발효에 의해 증가하는 것으로 나타났다[8]. 숙취 해소의 소재로 많이 사용되고 있는 콩나물에도 단백질 함량이 많고 arginine, aspartic acid, glutamic acid와 같은 아미노산을 많이 함유하고 있어 간 보호 효과가 있다고 하였다[26]. 아미노산을 대상으로 알코올 분해에 관련된 alcohol dehydrogenase와 acetaldehyde dehydrogenase 효소 활성을 *in vitro* 실험계에서 측정할 결과 arginine 처리에서 활성이 증가되는 것으로 나타나 알코올성 간독성 개선 효과가 있다는 것을 뒷받침해 주었다[6]. 본 실험에서도 탄수화물과 단백질 분해능이 있는 곰팡이 균종을 선택하여 열풍 및 동결건조 누에분말을 발효시켜 얻은 발효누에 분말에서 이화학적 변화와 생리활성작용의 변화를 관찰할 수 있었다.

발효누에의 산도 변화

곰팡이 균주로 발효시킨 열풍 및 동결건조 발효누에 분말 1% 추출 수용액의 산도 측정에서는 *A. kawachii* 균주에 의해 발효된 동결 및 열풍건조 발효누에에서 산도가 가장 높은 것으로 나타났다(Table 1). *A. kawachii* 균주는 구연산을 많이 생산할 뿐만 아니라 내산성 당화 효소를 생산하는 것으로 알려져 발효 시 pH를 산성으로 유지시켜 발효를 안전하게 한다고 하여 발효누에의 산도를 높이는 이유도 이에 관련성이 높은 것으로 보여 진다[28].

Mineral 함량

각 곰팡이 균주 발효에 의한 동결 및 열풍건조 발효누에 분말의 미네랄 함량은 칼륨이 각각 72~76.3 및 77.1~78.9 ppm으로 가장 많았다(Table 2). 다음으로 마그네슘 각각 29.6~49.7 및 44.3~58.7 ppm으로 많았으며, 칼슘은 각각 1.9~14.9 및 9.8~21.6 ppm이 함유되어 있었다. 특히 아연의 경우

Table 1. The total acidity of fermented freeze-drying silkworm (FDSW) and air-drying silkworm (ADSW) powders by molds

| Sample | Total acidity (%) |
|--|-------------------|
| FDSW+ <i>Mucor racemosus</i> (Mr) | 2.55 |
| FDSW+ <i>Rhizopus oryzae</i> (Ro) | 1.97 |
| FDSW+ <i>Aspergillus oryzae</i> (Ao) | 2.26 |
| FDSW+ <i>Aspergillus kawachii</i> (Ak) | 2.89 |
| FDSW+ <i>Monascus purpureus</i> (Mp) | 2.20 |
| ADSW+ <i>Mucor racemosus</i> (Mr) | 2.10 |
| ADSW+ <i>Rhizopus oryzae</i> (Ro) | 2.06 |
| ADSW+ <i>Aspergillus oryzae</i> (Ao) | 2.40 |
| ADSW+ <i>Aspergillus kawachii</i> (Ak) | 3.00 |
| ADSW+ <i>Monascus purpureus</i> (Mp) | 1.95 |

Table 2. Mineral concentrations of fermented freeze-drying silkworm (FDSW) and air-drying silkworm (ADSW) powders (ppm)

| Ingredients | Na | Zn | Mg | Mn | Ca | Fe | K |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|
| FDSW+Mr | 0.06 | 0.70 | 30.9 | 0.38 | 14.9 | 0.82 | 74.8 |
| FDSW+Ro | 0.06 | 0.67 | 29.6 | 0.36 | 7.8 | 0.68 | 73.3 |
| FDSW+Ao | 0.07 | 0.71 | 30.2 | 0.36 | 3.2 | 0.63 | 74.2 |
| FDSW+Ak | 0.04 | 0.64 | 49.7 | 0.36 | 1.9 | 0.61 | 76.3 |
| FDSW+Mp | 0.06 | 0.65 | 30.1 | 0.35 | 4.2 | 0.57 | 72.0 |
| ADSW+Mr | 0.06 | 4.52 | 48.3 | 0.63 | 9.8 | 1.92 | 78.4 |
| ADSW+Ro | 0.07 | 4.45 | 50.0 | 0.65 | 12.8 | 1.67 | 78.5 |
| ADSW+Ao | 0.06 | 4.41 | 58.7 | 0.66 | 16.5 | 1.81 | 78.9 |
| ADSW+Ak | 0.07 | 4.17 | 44.3 | 0.62 | 19.8 | 1.77 | 77.1 |
| ADSW+Mp | 0.07 | 4.42 | 53.7 | 0.65 | 21.6 | 1.66 | 79.7 |

Abbreviations are the same in table 1.

동결건조 발효누에 0.64~0.70 ppm에 비해서 열풍건조 발효 누에의 경우 4.17~4.52 ppm으로 건조방법에 따라 함량 차이가 달라지는 것으로 나타났다. 이는 열풍 및 동결건조 누에분

말의 아연 함량이 각각 0.76 및 4.50 ppm으로 함유되어 있어 발효에 의한 영향이 아니라 원래 누에분말에 함유된 아연 농도를 반영하고 있다[8].

지방산 조성

곰팡이 균주에 의해 발효된 열풍 및 동결건조 발효누에 분말의 지방산 조성을 분석한 결과 n-3 계열의 linolenic acid (C18:3)와 일가불포화지방산(MUFA) oleic acid (C18:1)가 가장 많은 비율을 차지하였다(Table 3). 특히 n-3 계열의 linolenic acid 지방산이 많은 비율을 차지하고 있어 혈관계질환에 유익할 것으로 사료되어 진다[7,17].

단백질 농도

열풍 및 동결건조 누에분말의 단백질 농도는 비슷한 것으로 나타났으나(Fig. 1), 곰팡이 균주에 의해 발효된 발효누에 분말 중의 단백질 농도는 차이를 보여 발효에 의해 영향을 받는 것으로 보여 진다. 즉 동결건조 분말의 경우 *Mucor racemosus*에 의한 발효누에에서만 단백질 농도가 증가한 것으로 나타났으나, 열풍건조 누에분말의 경우 5종 균주 모두에서 발효에 의해 단백질 농도가 증가한 것으로 나타났다. 특히 *Rhizopus oryzae*에 의해 발효된 열풍건조 발효누에 분말에서 단백질 함량이 가장 높았다. *Mucor racemosus*에 의한 발효누에의 경우 동결 및 열풍건조 누에분말 모두에서 단백질 함량이 증가한 것으로 나타났다. 누에분말의 단백질 함량은 55~65% 정도로 함유된 고단백 식품이며, 누에 번데기에도 단백질 함량이 23% 정도로 함유되어 있어 오늘날 단백질 식품소재뿐만 아니라 단백질 분해를 통한 아미노산과 펩타이드 소재로서의 활용가치도 높은 것으로 여겨진다[8,39,45].

Native-PAGE에 의한 단백질 영동 패턴비교

동결 및 열풍건조 누에와 그 발효누에 분말의 단백질을

Table 3. Fatty acid compositions of fermented freeze-drying silkworm (FDSW) and air-drying silkworm (ADSW) powders (% for area of total fatty acids)

| Fatty acid | Palmitic acid (16:0) | Palmitoleic acid (16:1) | Stearic acid (18:0) | Oleic acid (18:1, n=9) | Linoleic acid (18:2, n=6) | Linolenic acid (18:3, n=3) | Arachidinic acid (20:0) | Behenic acid (22:0) | Others |
|------------|----------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------|--------|
| FDSW+Mr | 19.6 | 0.3 | 10.9 | 29.6 | 7.7 | 32.4 | 0.3 | 0.1 | trace |
| FDSW+Ro | 23.4 | 0.2 | 11.3 | 28.4 | 7.0 | 26.6 | trace | 0.1 | 2.9 |
| FDSW+Ao | 21.0 | 0.2 | 11.1 | 30.5 | 12.8 | 31.0 | 0.1 | 0.0 | trace |
| FDSW+Ak | 19.1 | 0.2 | 10.1 | 30.4 | 14.2 | 26.8 | 0.1 | 0.1 | trace |
| FDSW+Mp | 19.2 | 0.1 | 10.1 | 29.8 | 14.6 | 27.5 | 0.4 | 0.4 | trace |
| ADSW+Mr | 17.4 | 0.2 | 11.5 | 28.9 | 6.3 | 33.0 | 0.2 | 0.2 | 2.4 |
| ADSW+Ro | 18.2 | 0.2 | 10.5 | 29.4 | 6.7 | 34.9 | 0.2 | 0.2 | trace |
| ADSW+Ao | 21.1 | 0.2 | 13.3 | 30.0 | 6.4 | 28.7 | 0.3 | 0.3 | trace |
| ADSW+Ak | 17.9 | trace | 11.6 | 30.2 | 13.4 | 27.6 | 0.2 | 0.2 | trace |
| ADSW+Mp | 19.5 | 0.2 | 10.8 | 28.6 | 7.2 | 34.6 | 0.1 | 0.1 | trace |

Abbreviations are the same in table 1.

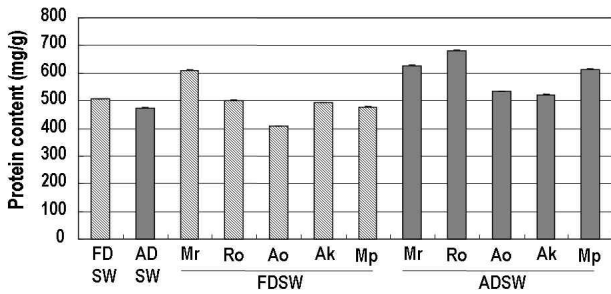


Fig. 1. Protein concentrations of fermented freeze-drying silkworm (FDSW) and air-drying silkworm (ADSW) powders. Abbreviations are the same in table 1.

Native-PAGE로 비교분석 한 결과 동결건조 발효누에 분말에서 많은 종류의 밴드가 관찰되었다(Fig. 2). 누에 장면과 단명 품종의 유충 채액 단백질(Major hemolymph protein)을 native-PAGE로 비교한 결과 5령 초기에 많은 종류의 밴드가 관찰되었고, 5령에서 일수가 증가할수록 새로운 단백질의 출현 뿐만 아니라 전체적인 단백질 함량도 증가되었다고 하였다 [21]. 동결건조 발효누에와 열풍건조 발효누에 모두 각 균주에 의한 단백질 밴드상의 패턴에서도 큰 차이는 관찰되지 않았지만 약간씩 변화가 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

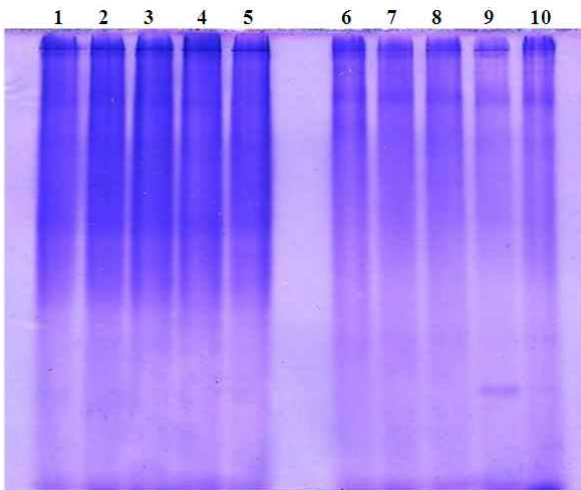


Fig. 2. Electrophoretic patterns of fermented freeze-drying silkworm (FDSW) and air-drying silkworm (ADSW) powders using native-polyacrylamide gel electrophoresis.

1. FDSW fermented by *Mucor racemosus forma racemosus* KCCM 12352, 2. FDSW fermented by *Rhizopus oryzae* KCCM 11273, 3. FDSW fermented by *Aspergillus oryzae* KCCM 11273, 4. FDSW fermented by *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, 5. FDSW fermented by *Monascus purpureus* KCCM 12002, 6. ADSW fermented by *Mucor racemosus forma racemosus* KCCM 12352, 7. ADSW fermented by *Rhizopus oryzae* KCCM 11273, 8. ADSW fermented by *Aspergillus oryzae* KCCM 11273, 9. ADSW fermented by *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, 10. ADSW fermented by *Monascus purpureus* KCCM 12002.

SDS-PAGE에 의한 단백질 영동 패턴비교

누에분말 단백질의 SDS-PAGE상의 전기영동 패턴을 분석한 결과 동결건조 누에 분말에서 97~66 kDa 중간 정도 크기의 단백질 밴드가 있는 것에 비해서 5종의 곰팡이 균주에 의해 발효된 발효누에에서는 거의 관찰되지 않는 점으로 보아 발효 과정 중에 단백질 분해가 일어나는 것으로 보여 진다(Fig. 3). 그러나 열풍건조 누에의 단백질 패턴은 발효에 의해서는 큰 차이는 관찰되지 않았지만 97~66 kDa 중간 정도 크기의 단백질 밴드가 각 균주 마다 약간씩 밴드의 농도가 다른 것으로 나타났다. 동결건조 누에분말의 경우 열풍건조 누에분말보다 건조 과정에서 단백질의 변성이 적게 일어날 가능성에 비추어 보면 단백질 분해력이 상대적으로 약하지만 곰팡이 균주에 의해서도 어느 정도는 누에 단백질의 분해가 일어난 것으로 보여 진다. 전보에서 특히 단백질 분해능이 우수한 *B. subtilis* 발효에 의해서는 분자량이 작은 단백질 패턴이 관찰되어 누에 단백질의 분해가 상당히 이루어졌기 때문이다[8].

혈전용해 활성

열풍 및 동결건조 누에 분말을 물 추출하여 혈전용해 활성을 측정한 결과에서는 동결 및 열풍건조 누에 분말 모두 혈전용해 활성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 4). 그러나 열풍건조 누에 분말을 곰팡이 균주로 발효시킨 결과 *A. kawachii*에서 혈전용해 활성이 3.40 Unit/ml으로 가장 높게 나왔으며,

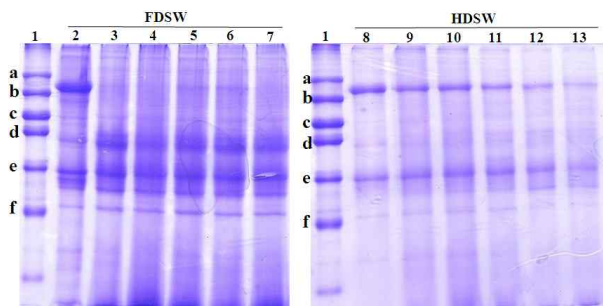


Fig. 3. Electrophoretic patterns of fermented freeze-drying silkworm (FDSW) and air-drying silkworm (ADSW) powders using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. ST: standard proteins, a: molecular weight 97.4 kDa, b: 66.0 kDa, c: 45.0 kDa, d: 31.0 kDa, e: 21.5 kDa, f: 14.4 kDa. 1. Standard, 2. FDSW, 3. FDSW fermented by *Mucor racemosus forma racemosus* KCCM 12352, 4. FDSW fermented by *Rhizopus oryzae* KCCM 11273, 5. FDSW fermented by *Aspergillus oryzae* KCCM 11273, 6. FDSW fermented by *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, 7. FDSW fermented by *Monascus purpureus* KCCM 12002, 8. ADSW, 9. ADSW fermented by *Mucor racemosus forma racemosus* KCCM 12352, 10. ADSW fermented by *Rhizopus oryzae* KCCM 11273, 11. ADSW fermented by *Aspergillus oryzae* KCCM 11273, 12. ADSW fermented by *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, 13. ADSW fermented by *Monascus purpureus* KCCM 12002.

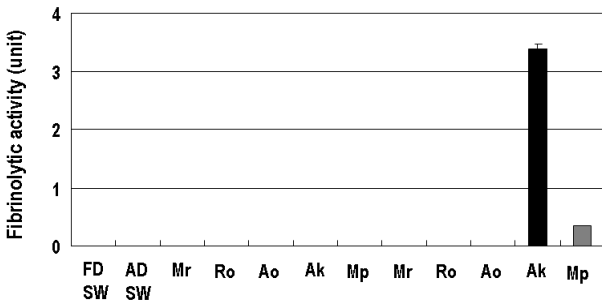


Fig. 4. Fibrinolytic activities of water extract from fermented freeze-drying silkworm (FDSW) and air-drying silkworm (ADSW) powders. Abbreviations are the same in table 1.

Monascus purpureus 균주 발효에 의해서는 0.34 Unit/ml로 약한 혈전용해 활성이 나왔다. 그러나 전보에서 *B. subtilis* 균주에 의해서는 동결건조 발효누에 및 열풍건조 발효누에분말 모두 혈전용해 활성이 높았으며, 발효시 균주의 접종 농도에 따라서도 활성이 다른 것으로 보아 균주에 의한 영향이 큰 것으로 사료되어 진다[8].

자연계에 존재하고 있는 *Bacillus subtilis*, *Fusarium pallidiroserum*, *Katsuwonus pelamis*, *Streptococcus aureus* 균주들을 이용한 청국장, 된장, 멸치젓갈, natto (nattokinase) 및 절임식품인 shiokara (katauwoxinase)와 같은 발효식품에서 혈전용해 활성이 있는 것으로 보고되고 있다[23,40]. 한편 국내에 자생하고 있는 곤충 76종으로부터 304종의 추출물을 만들어 혈전용해 활성을 조사한 결과 방아깨비, 왕잠자리, 비단노린재 등 10종에서 항트롬빈 활성이 관찰되어 극히 일부의 곤충에서만 혈전용해 활성이 있는 것으로 보고 되었다[38]. 홍국균인 *Monascus purpureus* KFR1 1134 균주로부터 UV조사에 의해 홍국색소 생산량이 높은 *Monascus* sp. MK2-2 돌연변이 균주를 분리해 내고, 이 균주를 이용하여 천연 홍국 색소의 최대 생산을 위한 최적배지 조건과 홍국색소 추출물의 항혈전 활성을 조사한 결과 5, 10, 20, 40 mg/ml 농도에서 각각 345%, 360%, 383%, 542%의 높은 항혈전 활성을 나타내었으며, 동시에 양성대조구로 사용된 아스피린 40 mg/ml 농도에서는 540%의 활성을 나타내어 홍국색소 추출물과 비슷한 효능을 나타내었다고 하였다[18]. 따라서 *A. kawachi* 및 *Monascus purpureus* 균주를 이용한 발효누에에서의 혈전용해 활성을 활용하여 향후 혈전생성 혈관계질환의 위험성을 낮출 수 있는 소재로 활용될 가능성이 높아 보인다.

DPPH free radical에 의한 전자공여활성

동결 및 열풍건조 누에분말 수용성 추출물의 항산화 활성을 DPPH법으로 측정된 결과 열풍건조 분말에서 약간 높았다(Fig. 5). 항산화 활성이 동결건조 누에분말 보다는 열풍건조 누에분말에서 더 높게 나올 수 있는 것은 건조과정 중에

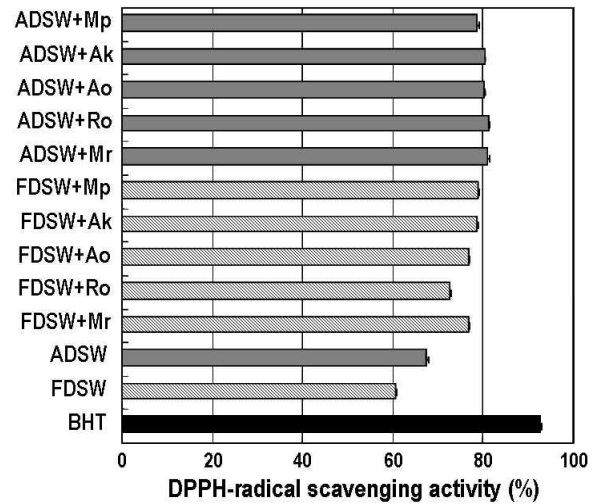


Fig. 5. DPPH free radical scavenging activities of fermented freeze-drying silkworm (FDSW) and air-drying silkworm (ADSW) powders. Abbreviations are the same in table 1.

열에 의한 성분의 변화에 기인할 가능성이 시사되어 있다 [18,20]. 열처리를 하지 않은 백삼보다는 열처리 과정을 거친 홍삼의 DPPH radical scavenging activity와 폴리페놀 함량도 함께 증가하였는데, 이러한 증가하는 원인으로 열처리 과정 중에 생성되는 maillard 반응 생성물인 maltol이 시사되어 있다[18,20,24]. 버섯, 커피 및 과일도 열처리에 의해 maillard 반응 생성물이 증가하고 동시에 DPPH free radical scavenging 활성이 증가되었다고 하였다[30]. 한편 곰팡이로 발효시킨 열풍건조 발효누에 분말에서는 항산화 활성이 균주 종류에 관계없이 거의 비슷하게 나왔지만, 동결건조 분말을 발효시킨 발효누에 분말에서는 사용한 곰팡이 종류에 따라서 약간씩 항산화 활성이 다르게 나타났으나, 열풍 및 동결건조 발효누에 분말의 경우 발효 전에 비해 활성이 증가한 것으로 나타났다. 대조구로 사용한 시판 항산화제 BHT 처리구는 90% 이상의 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 발효 누에분말의 항산화 활성보다 높았다(Fig. 5). 국내 자생곤충 76종에 대한 추출물 304종 항산화 시험에서 방아깨비, 가시길쭉바구미, 알락수염노린재, 송장벌레과 유충 4종에서만 우수한 항산화 활성이 나타났고 하였다[14]. 이처럼 곤충 중에서도 항산화 활성을 나타내는 종류는 많지 않은 점을 감안하면 누에분말 또는 발효누에 분말의 항산화 활성은 생리활성작용을 나타내는 기초 자료로 활용될 가능성이 높은 것으로 시사되어 진다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 '10년도 어젠다 식의약소재 연구비 지원사업에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

1. AOAC. 1997. Official methods of analysis. 17th eds., Association of official analytical chemists. Washington, DC, USA.
2. Arena, M. E. and M. C. Manca de Nadra. 2005. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Res. Microbiol.* **156**, 858-864.
3. Astrup, T. and S. Mullertz. 1991. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
4. Bliznakov, E. G. 2000. More on the Chinese red-yeast-rice supplement and its cholesterol-lowering effect. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 152-154.
5. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
6. Cha, J. Y., H. Y. Jung, J. J. Jeong, H. J. Yang, Y. T. Kim, and Y. S. Lee. 2009. Effects of amino acids on the activities of alcohol metabolizing enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). *J. Life Sci.* **19**, 1321-1327.
7. Cha, J. Y., Y. Mameda, K. Oogami, K. Yamamoto, and T. Yanagita. 1998. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 508-513.
8. 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.
9. Cha, J. Y., J. C. Park, H. Y. Ahn, K. E. Eom, B. K. Park, B. S. Jun, and Y. S. Cho. 2009. Effect of *Monascus purpureus* fermented Korean red ginseng powder on the serum lipid levels and antioxidative activity in rats. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1153-1160.
10. 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.
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. Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
13. Endo, A. 1979. Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species. *J. Antibiot.* **32**, 852-854.
14. 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.
15. Gu, Y. A., S. Y. Jang, N. Y. Park, C. R. Mun, O. M. Kim, and J. Y. Jeong. 2006. Property changes of mung bean depending on hydrolysis conditions. *Korean J. Food Preserv.* **13**, 563-568.
16. Huang, C. F., T. C. Li, C. C. Lin, C. S. Liu, H. C. Shih, and M. M. Lai. 2007. Efficacy of *Monascus purpureus* Went rice on lowering lipid ratios in hypercholesterolemic patients. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **4**, 438-440.
17. Ikeda, I., J. Y. Cha, T. Yanagita, N. Nakatani, K. Oogami, K. Imaizumi, and K. Yazawa. 1998. Effects of dietary α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and β -oxidation in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 675-680.
18. Jeon, C. P., C. S. Kim, J. B. Lee, J. W. Shin, S. Y. Choi, C. S. Choi, O. S. Lee, and G. S. Kwon. 2007. Characteristics of *Monascus* natural pigments produced by *Monascus* sp. MK2-2. *J. Life Sci.* **17**, 137-142.
19. Kang, G. D., K. H. Lee, S. G. Do, C. S. Kim, J. G. Suh, Y. S. Oh, and J. H. Nham. 2001. Effect of silk fibroin on the protection of alcoholic hepatotoxicity in the liver of alcohol preference mouse. *Int. J. Indust. Entomol.* **2**, 15-18.
20. 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.
21. 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.
22. Kato, N., S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, and M. Nomura. 1998. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 145-147.
23. Kim, I. J., H. K. Kim, J. H. Jong, Y. K. Jeong, and C. H. Ryu. 2002. Study of functional *Chungkukjang* contain fibrinolytic enzyme. *J. Life Sci.* **12**, 357-362.
24. Kim, K. T., K. M. Yoo, J. W. Lee, S. H. Eom, I. K. Hwang, and C. Y. Lee. 2007. Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.* **111**, 443-450.
25. Kim, Y. S., K. Y. Kim, P. D. Kang, J. Y. Cha, J. S. Heo, and Y. S. Cho. 2008. Effect of silkworm (*Bombyx mori*) excrement powder on the alcoholic hepatotoxicity in rats. *J. Life Sci.* **18**, 1342-1347.
26. Lee, J. H., N. K. Kim, D. Y. Lee, and C. H. Lee. 1999. Protective effect of selected amino acids and food extracts on ethanol toxicity determent in rat liver. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 802-808.
27. Lee, S., W. G. Kim, E. Kim, I. J. Ryoo, H. K. Lee, J. N. Kim, S. H. Jung, and I. D. Yoo. 2005. Synthesis and melanin biosynthesis inhibitory activity of (+/-)-terrein produced by *Penicillium* sp. 20135. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 471-473.
28. Lee, T. S. and J. Y. Choi. 2005. Volatile flavor components in mash of *Takju* prepared by using *Aspergillus kawachii* nuruks. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 944-950.
29. Ma, J., Y. Li, Q. Ye, J. Li, Y. Hua, D. Ju, D. Zhang, R. Cooper, and M. Chang. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5220-5225.
30. Nicoli, M. C., M. Anese, L. Manzocco, and C. R. Lerici. 1997. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *Food Sci. Technol.* **30**, 292-297.
31. Ok, M., W. S. Seo, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2001. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. WRD-2 extracellular protease from soil. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 246-250.

32. 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.
33. Park, C. D., H. J. Jung, H. W. Lee, H. S. Kim, and T. S. Yu. 2005. Antioxidant activity of *Monascus* pigment of *Monascus purpureus* P-57 mutant. *Korean J. Microbiol.* **41**, 135-139.
34. 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.
35. Patrick, L. and M. Uzick. 2001. Cardiovascular disease: C-reactive protein and the inflammatory disease paradigm: HMG-CoA reductase inhibitors, alpha-tocopherol, red yeast rice, and olive oil polyphenols. A review of the literature. *Altern. Med. Rev.* **6**, 248-271.
36. Pyo, Y. H. and T. C. Lee. 2007. The potential antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Monascus*-fermented soybean extracts: evaluation of *Monascus*-fermented soybean extracts as multifunctional food additives. *J. Food Sci.* **72**, S218-223.
37. Rhyu, M. R. and E. Y. Kim. 2002. The relations between antihypertensive effect and γ -aminobutyric acid, mycelial weight and pigment of *Monascus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 737-740.
38. Ryu, H. Y., J. C. Heo, J. S. Hwang, S. W. Kang, C. Y. Yun, S. H. Lee, and H. Y. Sohn. 2008. Screening of thrombin inhibitor and its DPPH radical scavenging activity from wide insects. *J. Life Sci.* **18**, 363-368.
39. 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.
40. Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki. 1978. A novel fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable che in Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* **43**, 1110-1111.
41. Suzuki, Y., K. J. Choi, K. Uchida, S. R. Ko, H. J. Sohn, and J. D. Park. 2004. Arginyl-fructosyl-glucose and arginyl-fructose, compounds related to browning reaction in the model system of steaming and heat-drying processes for the preparation of red ginseng. *J. Ginseng Res.* **28**, 143-148.
42. Tsukahara, M., N. Shinzato, Y. Tamaki, T. Namihira, and T. Matsui. 2009. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **158**, 476-482.
43. 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.
44. Yin, M., K. Ikejima, G. E. Arteel, V. Seabra, B. U. Bradford, H. Kono, I. Rusyn, and R. G. Thurman. 1998. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1014-1019.
45. 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 : 유용곰팡이 균주에 의한 발효 누에분말의 이화학적 특성 및 생리활성

차재영 · 김용순¹ · 강필돈¹ · 안희영² · 엄경은² · 조영수^{2*}

(대전주조(주) 기술연구소, ¹국립농업과학원 농업생물부, ²동아대학교 생명공학과)

미생물 발효에 의한 누에분말의 생리활성 작용 및 물질을 개발하기 위한 기초 자료를 얻을 목적으로 *Mucor racemosus forma racemosus* KCCM 12352, *Rhizopus oryzae* KCCM 11273, *A. oryzae* KCCM 11372, *A. kawachii* KCCM 32819 및 *Monascus purpureus* KCCM 12002 5종의 곰팡이 균주를 본 실험에 사용하였으며, 이들에 의한 발효 누에분말의 미네랄 함량, 지방산 조성, 단백질 함량, 단백질 패턴, 항산화 활성 및 혈전용해 활성을 비교 검토하였다. 발효 동결 및 열풍건조 누에분말의 주요 미네랄 함량은 각각 칼륨 72.0~76.3 및 77.1~78.9 ppm, 마그네슘 29.6~49.7 및 44.3~58.7 ppm, 칼슘 1.9~14.9 및 9.8~21.6 ppm 및 아연 0.64~0.70 및 4.17~4.52 ppm이었으며, 주요 지방산 조성은 linolenic acid, oleic acid 및 palmitic acid 이었다. 발효 동결 및 열풍건조 누에 분말의 단백질을 Native-PAGE로 비교분석 한 결과 발효 동결누에 분말에서 많은 종류의 밴드가 관찰되었으며, SDS-PAGE상의 단백질 패턴 분석에서는 97~66 kDa 중간 정도 크기의 단백질 밴드가 발효에 의해 분해되어 거의 관찰되지 않았다. 발효 동결 및 열풍건조 발효누에 분말의 항산화 활성은 발효전보다 증가하였으나 균주 종류별로는 큰 차이가 없었고, 시판 항산화제 BHT 처리구의 90% 이상의 높은 항산화 활성보다는 낮았다. 혈전용해 활성은 동결 및 열풍건조 누에분말 모두 없었으나, 열풍건조 누에분말의 *A. kawachii* 및 *Monascus purpureus*에 의한 발효누에에서 혈전용해 활성이 나타났다. 이상의 실험결과에서 곰팡이 균주에 의한 누에분말의 생리활성 효과 및 이화학적 특성이 발효 전 누에 분말보다 강화됨으로써 건강기능식품의 소재로서의 이용 가능성이 높다고 할 수 있다.