

Biological Activity and Biochemical Properties of Silkworm (*Bombyx mori* L.) Powder Fermented with *Bacillus subtilis* and *Aspergillus kawachii*Jae-Young Cha¹, Yong-Soon Kim², Hee-Young Ahn³, Min-Jung Kang⁴, Su-Jin Heo³ and Young-Su Cho^{4*}¹Technical Research Institute, Daesun Distilling Co., Ltd., Busan 619-934, Korea²Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea³Department of Medical Biosciences, Graduate School, Dong-A University, Busan 604-174, Korea⁴Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-174, Korea

Received October 6, 2010 / Accepted December 13, 2010

Biological activities (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, fibrinolytic activity and reducing power) and biochemical properties (protein content and electrophoretic protein patterns) were examined in solid state fermentation with *Bacillus subtilis* and *Aspergillus kawachii* using silkworm powder (SP) as substrate. The highest protein contents and free radical scavenging activities were seen in the SP fermented for 12 days with *B. subtilis* and *A. kawachii*, and these were in a time-dependent manner. The highest reducing power was seen in the SP fermented for 6 days with *B. subtilis* and for 12 days with *A. kawachii*, respectively. The highest fibrinolytic activities were seen in silkworm fermented for 6 days with *B. subtilis* and *A. kawachii*, but this activity was higher in the *A. kawachii* fermented SP than that of *B. subtilis*. When total protein patterns were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), the proteins of the SP fermented with *B. subtilis* for 3 days were completely degraded, while the protein degradation in the SP fermented with *A. kawachii* occurred after 12 days and this degradation increased proportionally to culture time. As a result, the SP fermented with both *B. subtilis* and *A. kawachii* showed higher fibrinolytic activities after 6 days of fermentation and antioxidative activity after 12 days, indicating that physiological activities of the fermented SP using these strains were highly improved compared to the unfermented SP, and that this compound could be a candidate material as a dietary supplement of healthy functional foods.

Key words : Fermented-silkworm powder, antioxidation, *B. subtilis*, *A. kawachii*, fibrinolytic activity

서 론

최근 새로운 생물자원으로 곤충의 중요성이 인식되면서 신소재로서 다양한 분야에서 활용되고 있다. 특히 누에 (*Bombyx mori* L.), 누에 번데기, 누에 분변, 실크 유래 단백질은 필수 아미노산, 생리활성 펩타이드, 1-deoxynojirimycin, pigments와 같은 성분이나 물질을 함유하고 있어 혈당개선, 혈압개선, 간 기능 개선, 혈액 순환 촉진 및 미백 기능 등의 생리적 활성 작용 때문에 건강기능식품 소재로 주목 받게 되었다[5,6,11,15,16].

특히 고단백 식품 소재를 *Bacillus* 속과 같은 단백질 분해력이 뛰어난 미생물로 발효시킬 경우 균 생육이 촉진되는 동시에 균주가 생산하여 분비 되는 효소의 작용으로 미분해성 물질들의 분해가 촉진되어 가용성 추출물의 함량이 증가 하고, 분비되는 효소의 작용에 의해 단백질이 유리아미노산, oligopeptide, 저 분자 단백질로 전환 되는 등 다양한 생리활성 물질

이 생성되어 원료 소재에 비해 기능성이 향상된 식품재료로 인식 되어 지고 있다[3]. 단백질 분해력이 뛰어난 미생물이나 식용연화 효과가 있는 과즙 액으로 발효시킨 발효 누에분말은 단백질 농도가 증가하고, 항산화 작용, 혈전용해작용, 티로시나제 활성 저해 등의 생리활성작용이 발효 전 누에분말 보다 증가한다는 사실을 밝힌 바 있다[3,4,16].

따라서 본 실험에서는 누에 분말 발효에 사용된 균주들 중에서 생리활성작용이 우수한 *B. subtilis*와 *A. kawachii* 균주를 이용하여 누에분말 고체 발효 기간에 따른 발효물로부터 단백질 농도 변화, 구성 아미노산 조성 변화, 단백질 패턴 변화, 항산화 활성 및 혈전용해 활성을 측정하여 최적 발효 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 누에분말 발효 조건

실험 재료인 누에 분말은 열풍 건조 시킨 것으로 순천영농법인(순천, 전남)에서 직접 구입하여 실험재료로 사용하였다. 열풍 건조 누에 분말의 발효를 위하여 *Bacillus subtilis* (KACC

***Corresponding author**

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

E-mail : choys@dau.ac.kr

91157) 및 *Aspergillus kawachii* (KCCM 32819) 균주를 한국미생물보존센터로부터 분양 받아 사용하였다. 열풍 건조 누에 분말 각 50 g씩을 500 ml 비이커에 넣고 중량 대비 1.5배의 증류수를 가하여 분말에 모두 흡수 시킨 후 121°C에서 15분간 멸균한 후, 실온이 되었을 때 전배양 시킨 *B. subtilis* 배양액을 누에 분말에 1% (v/w) 수준으로 잘 섞은 다음 37°C에서 12일간 발효시켰다. 또한 전배양 한 *A. kawachii* 균사체도 누에 분말에 5% (v/w) 수준으로 섞은 다음 37°C에서 12일간 발효시켰다. 이때 발효과정 중에 건조를 막기 위하여 멸균된 증류수를 일정량을 뿌려주면서 발효를 진행시켰다. 두 균주를 사용하여 최장 12일까지 발효시키면서 3일 간격으로 시료를 각각 취하여 완전히 건조시킨 후 분석에 사용하였다.

발효 누에분말의 pH 및 단백질 농도 측정

발효 누에분말을 각각 증류수에 1% 농도로 첨가하여 교반 후 pH meter (Methrohm 691, Swiss)로 직접 pH를 측정하였다. 발효 누에분말의 단백질 농도는 Lowry 방법[18]으로 540 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하고, bovine serum albumin을 표준시약으로 사용하여 단백질 양을 측정하였다.

발효 누에분말의 구성 아미노산 측정

구성 아미노산 분석은 12일째 발효 누에분말 시료 0.2 g에 15 ml performic acid와 6 N HCl 15 ml를 가하여, 110°C dry oven에서 24시간 이상 산 가수분해 시켰다. 분해 된 시료를 55°C 수조에서 감압농축 한 후 pH 2.2 citrate dilution buffer로 25 ml를 맞춘 후 0.2 µm membrane filter로 여과시킨 다음, 시료 일정량을 사용하여 아미노산 자동분석기(Biochrom 30, Amersham Biosciences Ltd., Cambridge, UK)로 구성 아미노산을 분석하였다.

발효 누에분말의 Native-PAGE에 의한 단백질 패턴 비교

발효 누에분말의 단백질 패턴은 Davis 방법[7]에 따라 분석하였으며, slab-type native-PAGE의 gel 농도는 7.5%를 사용하였다. 즉 분리 gel은 7.316% acrylamide, 0.814% bis-acrylamide, 376 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8), 0.03% TEMED 및 0.07% 과산화암모늄을 혼합하여 1 mm 두께로 만들어 사용하였다. 분리 gel 위에는 농축 gel을 2.7% acrylamide, 0.625% bis-acrylamide, 61.4 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8)를 만들어 40% sucrose-buffer용액에 혼합한 시료를 농축 gel내에 성형된 well에 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 전기영동 시켰다. 전기영동이 완료된 gel은 7% 초산 용액에 용해한 1% coomassie brilliant blue R-250으로 염색 후 7% 초산 용액으로 충분히 탈색시켜 건조 및 사진 촬영을 하였다.

발효 누에분말의 SDS-PAGE에 의한 단백질 패턴비교

발효 누에분말의 단백질 패턴 분석은 Weber 및 Osborn방법[29]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 하였다.

발효 누에분말의 혈전용해 효소 활성 측정

발효 누에분말의 혈전용해 효소 활성은 fibrin plate 법[1]을 변형하여 lysed zone으로 측정하였다. 혈전용해 활성 측정에 사용된 fibrin, fibrinogen, thrombin은 Sigma Co. (St. Louis MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Fibrin plate는 0.06% fibrinogen을 0.2 M borate buffer (pH 7.5)에 용해시킨 후 petri dish에 10 ml씩 분주하고 thrombin (5,000 unit) 40 unit을 균일하게 섞이도록 가하면서 균일한 두께의 fibrin clot를 형성시킨 후 실온에서 30분간 방치한 후 사용하였다. 시료를 증류수에 1% 농도로 용출시킨 후 여과(Whatman filter paper 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.

발효 누에분말의 DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

발효 누에분말의 항산화 활성은 Blois의 방법에 따라 측정하였다[2]. 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 0.1% (1 mg/ml) 시료 용액 1 ml를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 대조구인 시판 항산화제 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

발효 누에분말의 Fe 환원력 측정

발효 누에의 Fe-환원력 측정은 Zhu 등의 방법[31]에 따라 측정하였다. 발효 누에 0.1% 물추출물 0.75 ml를 취하고, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 1.25 ml 및 1% (w/v) potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] 1.25 ml을 혼합하여 50°C에서 20분간 진탕반응 시켰다. 이 반응액에 10% trichloroacetic acid (w/v)를 1.25 ml 가하여 acidified 시키고, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 시켰다. 상층액 2.5 ml를 취하고 distilled water 2.5 ml 및 0.5% ferric chloride (FeCl₃) 0.5 ml를 혼합한 후 실온에서 10분간 반응 시켜 Spectrophotometer (HITACHI U-2900, Tokyo, Japan)의 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 환원력 비교를 위하여 시판 항산화제로 많이 사용되고 있는 ascorbic acid, BHT를 각각 시료와 동일 농도로 만들어 동일한 방법에 의해 흡광도를 측정하였다. 환원력은 시료 반응액에서 흡광도가 증가된 만큼 강한 환원력을 나타내어 준다.

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean±SE)로 표시하였다[8].

결과 및 고찰

발효 누에분말의 단백질 농도 및 아미노산 조성

Park 등[25]과 류 등[26]의 실험에서 고단백 식품소재로 각 광받고 있는 누에분말을 단백질 분해력이 뛰어난 *Bacillus* 및 *Aspergillus* 속 미생물로 발효시켜 얻은 발효 누에분말에서 단백질 함량 증가, 항산화 작용, 혈전 용해 작용, 티로시나제 활성 저해와 같은 생리활성작용이 발효 전 누에분말보다 증가하는 경향을 보였으며, 또한 SDS-PAGE 상의 단백질 분해 패턴 분석에서도 66-97 kDa 정도 크기의 단백질이 분해되어 밴드상의 차이를 보이고 있어 단백질 분해 효소의 작용에 의해 아미노산과 펩타이드 조성에 영향을 미쳐 생리활성 작용에 차이를 나타내 보인 것으로 보고된 바 있다[25,26]. 따라서 본 실험에

서는 이들 균주에 의한 발효누에의 경시적인 패턴을 알아보기 위하여 최고 12일째까지 고체발효를 실시하였다. 그 결과 비발효 누에분말의 단백질 농도는 48.6±0.28%를 나타내었으나, 발효 누에분말의 경우 단백질 함량이 증가한 것으로 나타났다 (Table 1). 즉 *Bacillus* 균주에 의한 발효 누에분말의 단백질 농도는 발효 경과 시간과 더불어 지속적으로 높아지는 경향을 보였는데, 발효 12일째 55.6%로 최대 함량을 보였다. *Bacillus* 속 b01 균주를 이용한 청국장에서의 protease 효소 활성은 발효 9일까지 완전한 증가를 보였다는 실험 결과도 보고된 바 있다[9]. 또한 *Aspergillus* 균주에 의한 발효 누에분말의 단백질 농도는 발효 9일째까지 큰 변화가 없다가 12일째 52.3%로 최대 함량을 보였으나, *Bacillus* 균주에 의한 발효 누에분말의 단백질 농도보다는 낮은 값을 나타내었다.

Bacillus 속 JH-209 균주 유래 단백질 분해 효소로 누에 번데기에 함유되어 있는 불용성 단백질을 가용성 단백질로 추출하기 위한 실험에서 pH 5.0에서 최저값을 보이다가 pH가 높아짐에 따라 단백질 추출량이 약간씩 증가하는 경향을 보였다고 하였다[16]. 본 실험에서도 *Bacillus* 균주에 의한 발효에서 경시적으로 pH 값이 차츰 증가하면서 단백질 분해 효소의 작용이 활발하게 이루어져 단백질 함량이 증가한 것으로 보여진다 (Table 1). 또한 *Aspergillus* 균주에 의한 발효에서는 9일째까지 pH 값에서 큰 변화가 없다가 12일째 증가하면서 동시에 단백질 농도도 증가한 것으로 나타나 누에 번데기 단백질의 농도 변화와 유사한 것으로 나타났다.

발효 누에분말의 Native-PAGE 및 SDS-PAGE에 의한 단백질 패턴 비교

누에분말 단백질을 native-PAGE로 전기영동 하여 비교분석 한 결과 비발효 누에 단백질들은 gel 상단부의 66-97 kDa 크기 위치에 단백질들이 분포하는 것에 비해 *B. subtilis* 발효 누에분말에서는 발효 3일째부터 대부분 분해되어 저분자화됨으로서 단백질들의 분포가 잘 보이지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 그러나 *A. kawachii* 균주에 의한 발효 누에분말 단백질 밴드는 발효 시간이 경과하면서 밴드의 농도가 차츰 연해지는

Table 1. The pH and protein content in silkworm powder fermented by *B. subtilis* and *A. kawachii* according to the fermentation time

Sample	Time (day)	pH	Protein content (%)	
Silkworm powder (SP)	0	7.11±0.20	48.60±0.28	
	3	7.27±0.10	51.40±0.38	
	<i>Bacillus subtilis</i>	6	7.43±0.10	52.51±0.12
		9	7.53±0.10	53.53±0.18
		12	7.97±0.00	55.60±0.08
<i>Aspergillus kawachii</i>	3	6.55±0.10	49.60±0.26	
	6	6.56±0.10	49.60±0.28	
	9	6.74±0.10	50.10±0.36	
	12	7.26±1.10	52.32±0.38	

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

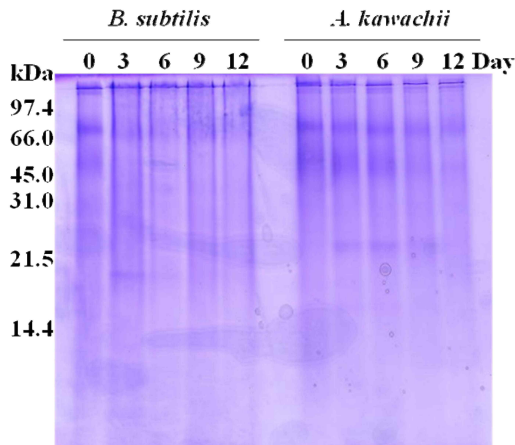


Fig. 1. Electrophoretic patterns in silkworm powder fermented by *B. subtilis* and *A. kawachii* according to the fermentation time using native-polyacrylamide gel electrophoresis. 0: Silkworm powder, 3: Silkworm powder fermented for 3 days by *B. subtilis* or *A. kawachii*, 6: Silkworm powder fermented for 6 days by *B. subtilis* or *A. kawachii*, 9: Silkworm powder fermented for 9 days by *B. subtilis* or *A. kawachii*, 12: Silkworm powder fermented for 12 days by *B. subtilis* or *A. kawachii*. The molecular weight markers: phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), and α -lactoalbumin (14.4 kDa).

경향을 보이고 있어 두 균주 간에 큰 차이를 보였다. Kang 등[12]은 누에 장면과 단명 품종의 유충 체액 단백질(Major hemolymph protein)을 native-PAGE로 비교한 결과 5령 초기에 많은 종류의 밴드가 관찰되었고, 5령 일수가 증가할수록 새로운 단백질의 출현뿐만 아니라 전체적인 단백질 농도의 증대가 뚜렷하다고 하였다.

발효 누에분말 단백질을 SDS-PAGE상의 전기영동 패턴을 비교분석 한 결과(Fig. 2), 발효 시작전 66-97 kDa 크기의 누에분말 단백질 밴드가 뚜렷이 있는 것에 비해 *B. subtilis* 균주에 의한 발효 누에분말의 단백질에서는 발효 3일째부터 전혀 없는 것으로 보아 단백질 분해 효소에 의해 대부분 분해된 것으로 보여진다. 그러나 *A. kawachii* 균주에 의한 발효 누에분말의 66-97 kDa 크기의 단백질 밴드는 발효 시간이 경과하면서 차츰 없어지면서 최종 12일째에는 대부분이 분해가 일어난 것으로 나타나 분해에 상당한 시간이 필요한 것으로 생각되어진다. 따라서 누에 단백질로부터 아미노산이나 펩타이드와 같은 생리활성 물질을 산업적으로 얻기 위해서는 *A. kawachii* 균주에 의한 발효보다는 *B. subtilis* 균주에 의한 발효가 더 경제적일 것으로 사료되어진다.

누에 발효 분말의 구성 아미노산 함량

구성 아미노산의 총 함량은 비발효 누에분말의 354,610 ppm에 비해 *B. subtilis* 발효 누에분말 661,692 ppm 및 *A.*

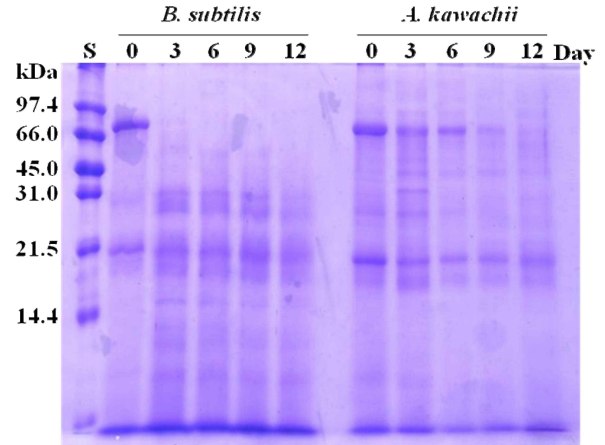


Fig. 2. Electrophoretic patterns in silkworm powder fermented by *B. subtilis* and *A. kawachii* according to the fermentation time using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. S: Standard proteins, 0: Silkworm powder, 3: Silkworm powder fermented for 3 days by *B. subtilis* or *A. kawachii*, 6: Silkworm powder fermented for 6 days by *B. subtilis* or *A. kawachii*, 9: Silkworm powder fermented for 9 days by *B. subtilis* or *A. kawachii*, 12: Silkworm powder fermented for 12 days by *B. subtilis* or *A. kawachii*. The molecular weight markers: phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), and α -lactoalbumin (14.4 kDa).

kawachii 발효 누에분말 679,708 ppm으로 상당히 많은 양이 검출되었다(Table 2). 비발효 누에분말의 구성 아미노산 농도는 glycine (48,519 ppm), alanine (46,349 ppm), glutamic acid (42,402 ppm), aspartic acid (32,498 ppm) 및 serine (29,882 ppm) 순으로 분석 되어졌다[3]. 그러나 본 실험에서 이들 두 균주에 의한 발효 누에분말의 구성 아미노산 중에서 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid로 63.25-63.51%를 차지하여 발효전과 다른 양상을 보였다. *B. subtilis* 발효 누에분말의 구성 아미노산 조성은 glutamic acid 418,536, aspartic acid 32,335, serine 30,190, tyrosine 21,848, leucine 21,145 ppm 순으로 나타났다. *A. kawachii* 발효 누에분말의 구성 아미노산 조성은 glutamic acid 431,660, aspartic acid 32,135, serine 29,195, lysine 24,270, histidine 23,857 ppm 순으로 나타나 두 균주에 의한 발효 누에분말의 구성 아미노산 조성에서도 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 특히 비발효 누에분말의 glutamic acid, proline, histidine은 두 균주의 발효에 의해 현저히 증가한 반면, glycine, alanine, valine은 현저히 감소한 것으로 나타났다. 지금까지 알코올성 간 독성 관련 연구에서 glycine, glutamic acid, arginine, serine, aspartic acid와 같은 단일 아미노산 처리에 의해서도 개선효과가 보고 되었다[17,30]. 한편, 숙취해소에 널리 사용되고 있는 콩나물의 구성 아미노산 조성에서도 aspartic acid, glutamic acid, arginine이 많이 함유되어

Table 2. Compositional amino acids in silkworm powder fermented by *B. subtilis* and *A. kawachii* for 12 days fermentation (ppm)

Amino acids	Sample		
	Silkworm [3]	<i>B. subtilis</i>	<i>A. kawachii</i>
L-Aspartic acid	32,498±125	32,335±150	32,135±135
L-Threonine	15,930±75	16,341±50	15,108±80
L-Serine	29,882±105	30,190±95	29,195±120
L-Glutamic acid	42,402±200	418,536±230	431,660±210
L-Proline	9,359±40	13,831±55	13,629±60
L-Glycine	48,519±250	8,270±50	9,256±55
L-Alanine	46,349±210	7,818±35	8,021±30
L-Valine	17,027±80	3,059±20	3,493±25
L-Isoleucine	13,103±50	14,256±60	13,822±65
L-Leucine	18,820±80	21,145±90	20,369±85
L-Tyrosine	20,114±95	21,848±90	23,557±90
L-Phenylalanine	13,769±50	14,926±45	15,349±60
L-Histidine	9,373±40	20,708±90	23,857±90
L-Lysine	19,613±90	20,526±95	24,270±90
L-Arginine	17,553±80	17,905±80	15,987±65
Total	354,610±105	661,692±82	679,708±84

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

있어 역시 간 보호 효과가 높았다고 하였다[17]. 한편 sericin 단백질의 구성 아미노산 조성에서도 serine 31%, aspartic acid 17.8% 및 glycine이 19.1%를 차지하고 있었으며, 또한 알코올성 간 독성 개선효과가 보고된 바 있다[13]. 따라서 간 보호 효과가 있는 glutamic acid, serine 및 aspartic acid와 같은 아미노산을 많이 함유하고 있어 간 기능개선 건강보조식품 소재로서의 활용가치가 기대 된다.

발효 누에분말의 혈전용해 활성

혈관에 혈전이 만들어지게 되면 혈액순환을 방해하여 고혈압, 동맥경화, 뇌졸중, 협심증 등을 일으키는데, 이 때 혈전용해 효소가 활성화되면 혈전 생성이 억제되어 각종 순환기계 질병을 예방하는데 효과가 있다고 알려져 있다[23]. 자연계에 존재하는 *B. subtilis*, *Fusarium pallidorosserum*, *Katsuwonus pelamis*, *Streptococcus aureus* 미생물 유래나 청국장, 된장, 멸치젓갈, natto (nattokinase) 및 shiokara (katauwokinase)와 같은 전통 발효 식품 유래의 혈전 용해 효소의 활성을 위한 소재로 많이 연구개발 되었으며, 주로 serine protease로 분류되고 있다[23,28]. 또한 국내 자생곤충 76종으로부터 304종의 추출물 중에서 방아깨비, 왕잠자리, 비단노린재 등 10종에서 우수한 항혈전 활성이 있다고 할 정도로 극히 일부의 곤충에서만 관찰되는 것으로 보고하였다[26]. 냉동건조 누에분말의 70% 메탄올 추출물에서도 혈전용해 활성이 약하게 나타났으나 반면 열풍 건조 누에분말 추출물에서는 활성이 전혀 나타나지 않아 누에 유충의 건조 방법에 따라 달라지는 것으로 보고 하였다 [3]. 이전의 실험에서 열풍 건조 누에분말에 *B. subtilis* 균주를

1% 접종하여 2일간 발효시킨 발효 누에분말에서 혈전용해 활성이 2.2 unit 였으나, *A. kawachii* 균주 5% 접종으로 12일간 발효한 발효 누에분말에서는 3.4 unit로 약간 높은 혈전용해 능이 관찰되었다[4]. 본 실험에서도 열풍 건조 누에분말에 *B. subtilis* 균주를 1% 접종하여 경시적인 혈전용해 능을 조사한 결과 3일째 2.79 unit였으며, *A. kawachii* 균주 5% 접종으로 12일간 발효한 발효 누에분말에서는 5.83 unit로 이전의 발효 누에분말 결과와 비슷한 결과가 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 두 균주로 발효시킨 발효누에분말의 혈전용해 활성은 6일째 최대 활성을 나타내다가 이후부터 감소하는 경향을 보였다. Soybean grit를 이용한 *B. subtilis* HA 균주 발효에서 5일째 가장 높은 혈전용해 효소 활성이 나타나 발효 기간에 따라 효소 활성에 영향을 미치는 것이 다르게 보고되었다[14]. 따라서 *A. kawachii* 균주로 발효시킨 발효 누에분말의 항혈전 작용은 발효 6일째 15.02 unit로 최대 활성을 보여 발효 누에분말의 혈전용해 효소 활성을 갖는 발효산물을 얻기 위해서는 5-6일 정도의 발효가 적절한 기간으로 생각된다.

발효 누에분말의 DPPH free radical에 의한 전자공여활성

식품에 함유되어 있는 polyphenol계 물질은 hydroxy기를 하나 이상 함유하고 있는 환구조와 methyl기 또는 비극성 탄화수소 사슬 구조와 같은 비극성기를 가진 분자구조적 특징을 가진 수소공여 항산화 물질로 알려져 있으며, 이를 측정하는 대표적인 방법이 DPPH free radical scavenging 항산화 활성 측정법이다[2]. DPPH는 유리기(free radical)에서 특유의 색을

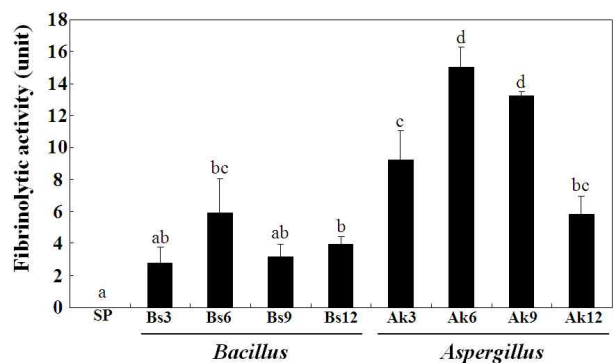


Fig. 3. Fibrinolytic activities in silkworm fermented by *B. subtilis* and *A. kawachii* according to the fermentation time. SP: Unfermented silkworm powder, Bs3: Silkworm powder fermented for 3 days by *B. subtilis*, Bs6: Silkworm powder fermented for 6 days by *B. subtilis*, Bs9: Silkworm powder fermented for 9 days by *B. subtilis*, Bs12: Silkworm powder fermented for 12 days by *B. subtilis*, Ak3: Silkworm powder fermented for 3 days by *A. kawachii*, Ak6: Silkworm powder fermented for 6 days by *A. kawachii*, Ak9: Silkworm powder fermented for 9 days by *A. kawachii*, Ak12: Silkworm powder fermented for 12 days by *A. kawachii*. Values are mean±S.E. of three samples. a,b,c,d different letters are significantly different ($p < 0.05$).

나타내다가 전자나 수소원자에 의해 전자가 쌍을 이루게 되면 비라디칼 형성으로 특유의 색이 사라지는 색도상의 차이를 측정하는 원리를 이용한 가장 일반적인 항산화 활성 측정 방법으로 실제 천연물의 항산화 활성과도 매우 연관성이 높은 것으로 잘 알려져 있다[22,27].

항산화 활성은 비발효 누에분말 물추출물(1 mg/ml)에서 42.12%를 나타내었고, 대조구로 사용한 시판 항산화제 BHT 1 mg/ml 농도에서는 95.96%의 높은 활성을 보였다(Fig. 4). *B. subtilis* 발효 누에분말 물추출물(1 mg/ml)의 항산화 활성은 발효 기간이 길어지면서 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다. 발효 전 42.12%에서 발효 9일째 75.90% 이상의 활성을 보이는 이후 완만하게 증가하는 경향이였다. *A. kawachii* 발효 누에 분말 물추출물의 항산화 활성은 발효 9일째까지 큰 변화를 보이지 않다가 발효 12일째 73.99%의 높은 활성을 보였다(Fig. 4). 우리나라 고유의 전통식품인 된장, 일본 Okara koji, 인도네시아 tempeh에서 발효과정 중에 단백질 분해가 일어나 이 때 생성되는 대사산물인 펩타이드나 아미노산 등의 화합물에 의해 항산화 활성이 증가하였다는 보고가 있다[20,21,27]. Marcuse는 cysteine을 제외한 대부분의 아미노산에서 항산화 활성이 있었다고 보고하였다[19]. 발효 전 누에분말 물추출물에 비해 발효 누에분말의 물추출물에서 항산화 활성이 증가한 것은 발효 과정 중에 생성되는 대사산물에 의한 효과로 사료된다. 한편, 국내 자생곤충 76종의 304종 추출물 중 DPPH 소거능으로 항산화 활성을 측정된 결과 방아깨비, 가시길쭉바구미, 알락수염노린재, 송장벌레과 유충 4종에서만 항산화 활성이 있었다고 하였다[25]. 이처럼 극히 일부 곤충에서만 항산화 활성이 있는 것에 비해 누에 자체에 항산화 활성이 있으면서 미생물 발효에 의해 더욱더 활성이 증가함으로써 누에의 생리

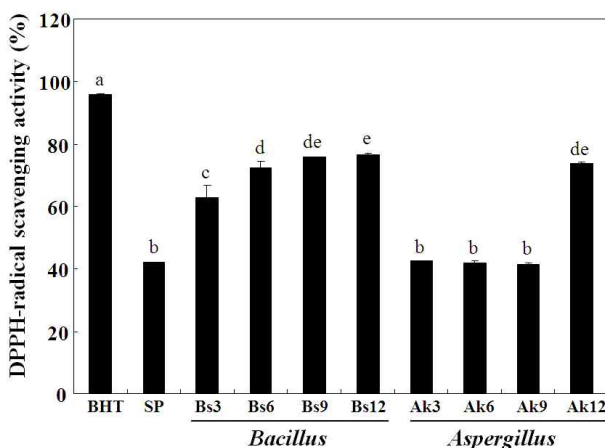


Fig. 4. DPPH free radical scavenging activity in silkworm powder fermented by *B. subtilis* and *A. kawachii* according to the fermentation time. BHT: Butylated hydroxyl toluene. Other abbreviations are the same in Fig. 3. Values are mean±S.E. of three samples. ^{a,b,c,d,e} different letters are significantly different ($p < 0.05$)

활성 작용을 이용한 건강기능식품 개발의 기초자료로 활용될 가치가 있어 보인다.

발효 누에분말의 환원력 효과

Fe 환원력(reducing power) 활성 정도는 수소 원자를 제공하는 유리 라디칼의 연쇄 반응으로 금속 이온을 환원시키는 정도를 흡광도 값으로 나타내는 것으로, 환원력의 효과는 반응 물질의 흡광도 수치가 높을수록 항산화 활성이 높다는 것이다[10]. Fe-환원력은 대조구로 사용한 시판 항산화제인 BHT 및 ascorbic acid 0.1%의 농도에서 1.29 및 1.21의 흡광도를 나타내었다(Fig. 5). 비발효 누에 물추출물(1 mg/ml)의 환원력은 0.41로 대조구로 사용한 시판 항산화제 BHT 또는 ascorbic acid 흡광도 보다 3배 정도 낮은 값을 보였다(Fig. 5). 그러나 *B. subtilis* 발효 누에분말 물추출물(1 mg/ml)에서는 발효 6일째 0.56으로 증가하다가 차츰 낮아지는 경향을 보였으며, *A. kawachii* 발효 누에분말 물추출물(1 mg/ml)에서는 발효 9일째까지 큰 변화를 보이지 않다가 발효 12일째 0.47로 가장 높은 활성을 보였다. 더덕의 경우 열수 추출물(1 mg/ml)에서 환원력으로 측정된 흡광도는 0.34인데 비해 발효 더덕의 경우 0.65으로 발효에 의해 활성이 증가된 것으로 나타나 본 실험 결과와는 일치하는 것으로 나타났다[24].

이상의 실험에서 *B. subtilis* 발효 누에분말에서 환원력과 혈전 분해 활성은 발효 6일째에 항산화 활성과 단백질 농도는 발효 12일째에 가장 높았고, SDS-PAGE상의 전기영동 분석에서는 발효 초기인 3일째 66-97 kDa 크기의 단백질이 대부분 분해가 일어났었다. *A. kawachii* 발효 누에분말의 환원력, 항산화 활성 및 단백질 농도는 발효 12일째에 가장 높았고, SDS-PAGE상의 전기영동 분석에서 66-97 kDa 크기의 단백질은 발효 3일째부터 차츰 분해되기 시작하여 12일째 분해가

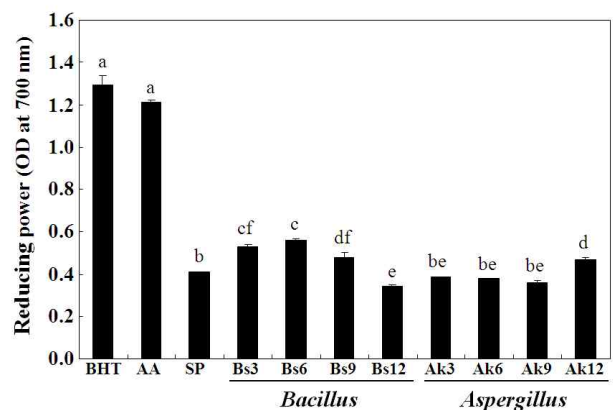


Fig. 5. Reducing power in silkworm powder fermented by *B. subtilis* and *A. kawachii* according to the fermentation time. BHT: Butylated hydroxyl toluene, AA: Ascorbic acid. Other abbreviations are the same in Fig. 3. Values are mean±S.E. of three samples. ^{a,b,c,d,f} different letters are significantly different ($p < 0.05$)

대부분 이루어졌다. 따라서 미생물을 이용한 발효 누에에서 특성의 생리활성 작용을 기대하기 위해서는 사용하는 균종에 따라 발효 시간이 달라져야 한다는 것을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 09년도 어젠다 식의약소재 연구비 지원 사업(과제번호: 200901FHT010101534)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Astrup, T. and S. Mullertz. 1991. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* **40**, 346-351.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
- 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.
- 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.
- 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.
- Cho, Y. S., Y. S. Park, J. Y. Lee, K. D. Kang, K. Y. Hwang, and S. I. Seong. 2008. Hypoglycemic effect of culture broth of *Bacillus subtilis* S10 producing 1-Deoxyojirimycin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1401-1407.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. pp. 121-404, In Fredrich, J. E. (ed.), *Gel electrophoresis. Ann. New York Acad. Sci.*
- Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
- In, J. P., S. K. Lee, B. K. Ahn, I. M. Chung, and C. H. Jang. 2002. Flavor improvement of cheongkukjang by addition of *Yucca (Yucca shidigera)* extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 57-64.
- Jayaprakasha, G. K., R. P. Singh, and K. K. Sakariah. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem* **73**, 285-290.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kim, J. E. and S. B. Lee. 2009. Production of bioactive components and anti-oxidative activity of soybean grit fermented with *Bacillus subtilis* HA according to fermentation time. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**, 179-185.
- 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.
- 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.
- 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 deterrent in rat liver. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 802-808.
- 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.
- Marcuse, R. 1962. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. *J. Am. Oil Chem.* **39**, 97-103.
- Matsuo, M. 1997. *In vitro* antioxidant activity of Okara koji, a fermented Okara, by *Aspergillus oryzae*. *Biocheol. Biochem Bioch.* **61**, 1968-1972.
- Matsuo, M. N. Nakamura, Y. Shidoji, and T. Osawa. 1997. Antioxidative mechanism and apoptosis induction by 3-hydroxy anthranilic acid, an antioxidant in Indonesian food, tempeh, in the hyamn hepatoma derived cell line, HuH-7. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **43**, 249-259.
- Nieva, M. M., A. R. Sampietro, and M. A. Vattuone. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethopharmacol.* **71**, 109-114.
- 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.
- Park, S. J., S. W. Song, D. H. Seong, D. S. Park, S. S. Kim, J. Gou, J. H. Ahn, W. B. Yoon, and H. Y. Lee. 2009. Biological activities in the extract if fermented *Codonopsis lanceolata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 983-988.
- 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.
- 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.
- Shon, M. Y., J. Lee, J. H. Choi, and S. K. Park. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *cheongkukjang*. *J. Food Compos. Anal.* **20**,

- 113-118.
28. 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. *Experimentia* **43**, 1110-1111.
29. 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.
30. Yin, M., K. Ikejima, G. E. Arteel, V. Seabra, B. U. Bradford, H. Kono, and I. Rusyn, and R. G. Thurman. 1998. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1014-1019.
31. Zhu, Q. V., R. M. Hackman, X. X. Jodilensunsa, R. R. Holt, and C. L. Keen. 2002. Antioxidative activities of Oolong tea. *J. Agric. Food Chem* **50**, 6229-6934.

초록 : 유용식품 균주에 의한 발효 누에분말의 이화학적 특성과 생리활성

차재영¹ · 김용순² · 안희영³ · 강민정³ · 허수진³ · 조영수⁴*

(¹대선주조(주) 기술연구소, ²국립농업과학원 농업생물부, ³동아대학교 대학원 의생명과학과, ⁴동아대학교 생명공학과)

누에 분말을 이용하여 *B. subtilis* 및 *A. kawachii* 균주에 의한 고체 발효를 통해 얻어진 발효 누에분말의 발효 시간에 따른 이화학적 특성(단백질 함량 및 단백질 분해 패턴) 및 생리활성 효과(항산화 작용, 환원력 및 혈전용해 활성)를 평가하였다. 누에 단백질 함량과 항산화 활성은 *B. subtilis* 및 *A. kawachii* 두 균주 발효 모두 12일째에 가장 높았으며, 발효시간 증가와 함께 증가하는 경향을 보였다. 발효 누에분말의 환원력은 *B. subtilis* 균주 발효에 의해서는 6일째에 *A. kawachii* 균주 발효에 의해서는 12일째 가장 높은 것으로 나타나 균주간에 차이가 있었다. 혈전 분해 활성은 *B. subtilis* 및 *A. kawachii* 두 균주 발효 모두 6일째에 가장 높았으며, 이러한 효과는 *B. subtilis* 발효 누에분말보다는 *A. kawachii* 발효 누에분말에서 더 높았다. SDS-PAGE상의 단백질 패턴 분석에서는 66-97 kDa 크기의 단백질 밴드가 *B. subtilis* 발효에 의해서는 발효 초기인 3일째 대부분 분해가 일어났으나, *A. kawachii* 발효 누에분말에서는 발효 3일째부터 차츰 분해되기 시작하여 12일째 분해가 대부분 이루어졌다. 따라서 미생물을 이용한 발효 누에에서 특정의 생리활성 작용을 기대하기 위해서는 사용하는 균종에 따라 발효 기간이 달라져야 한다는 것을 시사하였다.