

발효 누에 숙잠 혈림프의 항산화 및 항티로시나제 활성

문지영 · 조유영* · 권해용 · 이광길 · 여주홍 · 이희삼
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

Antioxidant and antityrosinase activity of fermented silkworm hemolymph

Ji-Young Mun, You-Young Jo*, HaeYong Kweon, Kwang-Gill Lee, Joo-Hong Yeo and Heui-Sam Lee
Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

(Received October 03, 2014, Accepted November 14, 2014)

ABSTRACT

In this study, functionality of products of silkworm hemolymph fermented by *Bacillus species* was studied such as cell viability, antioxidant effect, and inhibitory effect on tyrosinase activities. A matured silkworm hemolymph was degraded by fermentation with *Bacillus subtilis* 10854 and *Bacillus amyloliquefaciens* M27. Especially, proteins of matured silkworm hemolymph were degraded to 3,000 Da by fermentation with *B. amyloliquefaciens* M27. Cell viability for MTT assay was higher than PBS in hemolymph and fermented hemolymph. A DPPH free radical scavenging activity of fermented hemolymph was as higher as Vitamin C and dependent on sample concentrations. Thus, these results suggest that degraded hemolymph fermented by *B. amyloliquefaciens* M27 may have antioxidant properties as a material for cosmetics.

Key word : Silkworm, Hemolymph, Fermentation, Bacillus

서 론

우리나라에 해외기술이 도입되고 화장품 연구개발이 본격적으로 이루어지기 시작한 1960년대 이후 국내 화장품 시장 및 연구수준은 비약적인 발전을 이루었다. 2013년 국내 화장품 시장 규모는 17조 6,000억으로 특히 국산화장품의 시장 점유율이 60%에 이르는 것으로 조사되었으며, 이는 국내에서 생산되는 원료로 다양한 과학기술을 이용하여 생산한 화장품의 경쟁력이 높아지고 있다는 것을 의미한다. 최근에는 미백, 보습, 자외선 차단, 주름개선과 같은 화장품의 트렌드를 반영하기 위하여, 천연물의 기능을 활용하는 화장품 연구개발이 활발하게 이루어지고 있다. 흑마늘은 일반 마늘에 비해 생리활성물질의 증가로 새로운 기능성 소재로 각광받고 있으며 흑마늘의 티로시나아제(tyrosinase)와 엘라스타아제(elasetase) 활성 억제능과 자외선으로 인한 멜라닌 내 과산화물의 억제 효과에 대해 보고되어 있다(Jung et al. 2010, Lee et al. 2010). 오미자씨 오일은 높은 안정성과 DPPH 라디칼 소거능 및

콜라겐 합성능력이 뛰어나 기능성 화장품 소재로의 가능성이 보고된 바 있다(Yang 2012). 또한, 이러한 천연물을 단순추출 및 사용하는 것 뿐만 아니라 미생물 발효에 의해 생성된 생리활성물질의 기능을 평가하는 연구도 보고되고 있다. 균주로는 유산균(락토바실러스, *Lactobacillus*)과 효모(사카로미세스속, *Saccharomyces*), 고초균(바실러스속, *Bacillus*)을 주로 사용하고 있으며, Shim et al.(2012)에 따르면 유산균으로 발효한 더덕 발효추출물이 pH 및 점도 변화에 안정하고 경피 수분증발량을 억제하여 보습성을 높인다고 보고하였다. 마디풀 속과에 속하는 호장근(*Polygonum cuspidata* SIEB. et ZUCC.)을 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)으로 발효시켜 SOD(Superoxide dismutase), catalase 항산화 효소활성을 측정하여 호장근 발효추출물은 농도 의존적으로 항산화 효소 활성이 증가하였다고 보고되었다(Lim et al. 2010). 바실러스속 세균은 자연계에 널리 존재하는 그람 양성균의 간균으로 호기성 또는 통성 혐기성 조건에서 생육하는 것으로 알려져 있고 주로 전분과 단백질 분해효소를 생성하는 것으로 연구되

*Corresponding author. E-mail: yyjo@korea.kr

어 있다(Fergus 1977, Reddy et al. 2003). 고초균이라고도 불리는 *Bacillus subtilis*는 콩류나 청국장의 발효연구에 많이 이용되고 있고 *Bacillus amyloliquefaciens*는 1943년에 일본 과학자에 의해 토양에서 발견분리되었으며 주로 액 화형 아밀라아제를 분비하는 것으로 알려져 있다(Welker et al. 1967). 여러 연구에서 검은콩 추출물을 *Bacillus subtilis* BCRC 14715로 발효시켰을 때 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 자유라디칼 소거활성이 증가하였다고 보고 되었다(Wu et al. 2009, Juan et al. 2010).

이전 연구에서 우리는 누에 내분비기관인 실샘을 이용하여 트윈케이크 등의 화장품을 개발하고 보습 및 탄력, 항산화 효과가 우수함을 확인하였다(Chon et al. 2012). 또한 누에 숙잠 혈림프로부터 멜라닌 생성 억제 효과를 보고한 바 있다(Mun et al. 2013). 본 연구에서는 누에 숙잠의 화장품으로서의 기능성과 피부 침투력을 증가시키고자 바실러스를 이용하여 누에 숙잠 혈림프를 발효시키고 그 기능을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 누에 숙잠 혈림프 분말 제조

누에 숙잠을 동결건조한 후 실샘과 중장을 제거하고 나머지 누에조직을 분쇄하였다. 분쇄된 누에 중량의 20배 부피의 증류수를 넣고 잘 섞은 뒤, 혈림프의 산화방지를 위하여 60°C에서 30분간 열처리 하였다. 열처리 후 20°C, 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 분무건조기(Mini spray dryer B-191, BUCHI)를 이용하여 분말을 제조하였다.

2. 누에 숙잠 혈림프 발효

누에 숙잠 혈림프를 2종의 바실러스균(*Bacillus subtilis* 10854, *Bacillus amyloliquefaciens* M27)을 이용하여 발효하였다. 균주는 Nutrient agar 배지에서 배양된 1개의 콜로니를 Nutrient Broth 배지 100 ml에 접종한 후 37°C에서 16시간 동안 배양하여 사용하였다. 먼저 누에 혈림프 분말을 1% 농도로 500 ml의 증류수에 녹인 뒤 주사기필터(0.2 µm syringe filter, Sartorius)를 사용하여 여과멸균 하였다. 여과멸균된 혈림프 용액에 미리 배양된 2종의 균주 배양액을 각각 10 ml 씩 접종하여 37°C에서 4주 동안 발효시켰다.

3. 누에 혈림프 발효액의 분자량 측정

발효가 완료된 누에 숙잠 혈림프 발효액은 균체를 제거하기 위하여 원심분리한 후 주사기 필터(0.2 µm syringe filter, Sartorius)로 여과하여 분자량 측정용 시료로 사용하

였다. 이들 발효액의 분자량을 측정하기 위하여 NuPAGE Bis-Tris Mini gel(novex, USA)을 이용하여 제조사에서 제공한 매뉴얼에 따라 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 완료된 젤은 Coomassie Blue R-250으로 염색하였다.

4. 세포독성

멜라닌세포(Melanocyte B16F1)을 이용하여 누에 숙잠 혈림프 발효액의 세포독성을 평가하였다. 세포배양을 위한 배지는 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum, GIBCO, USA)와 100 U 스트렙토마이신과 100 µg/ml penicillin (GIBCO, USA)이 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose, WelGENE, Korea)를 사용하였다. 96well plate에 세포 (10,000 cells/well)를 접종하고 24시간 배양한 후에 누에 숙잠 혈림프 액과 누에 숙잠 혈림프 발효액을 농도별로 첨가하고 이들의 세포 생존력을 MTT법을 이용하여 측정하였다(Mosmann, 1983).

5. 항산화 효과 측정

누에 숙잠 혈림프와 혈림프 발효액의 항산화 활성은 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼 소거 활성 측정으로 확인하였다. 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 160 µl를 시료 40 µl와 혼합하여 30°C 암소에 30분간 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 40 µg/ml의 비타민 C(Vitamin C)를 사용하였다.

6. 티로시나아제 활성 억제효과 측정

멜라닌 생성 초기 단계에 관여하는 티로시나아제의 활성을 억제하는 미백 효과가 있는지 알아보기 위해 티로시나아제 활성 억제력을 측정하였다. 티로시나아제 활성 측정은 Choi et al.(1998)의 방법을 변형하여, 96well plate에 시료 40 µl를 넣고 8.3 mM L-DOPA(3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine D9628-5G, Sigma-Aldrich Co.) 120 µl과 125 U(unit) 머쉬룸티로시나아제(tyrosinase from mushroom T3824, Sigma-Aldrich Co.) 40 µl를 혼합하였다. 37°C에서 30분 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 도파퀴논(dopaquinone)의 양을 계산하였다. 또한, 세포 내의 티로시나아제 활성을 측정하기 위하여, 24 well plate에 멜라닌 생성 세포(Melanocyte B16F1)를 100,000 cells/well을 분주하고 하루 정도 배양하였다. 배지를 걷어 내고 시료를 배지에 섞어 처리한 후 37°C, CO₂ 배양기에서 추가로 24시간 배양하였다. Trypsin-EDTA로 세포를 수집한 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층을 제거하고 침전물을 단백질 추출액(Protein extraction solution NP-40)에 풀어준 뒤 10분간 얼음에 방치하였다가 14,000 rpm

에서 10분간 다시 원심분리하였다. 펠렛을 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 용해시킨 뒤 37°C에서 15분 반응시킨 뒤 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 분자량 측정

2종의 바실러스균(*Bacillus subtilis* 10854, *Bacillus amyloliquefaciens* M27)을 이용하여 누에 숙잠 혈림프를 4주 동안 발효시킨 다음 전기영동하여 혈림프 발효액의 분자량을 측정하였다(그림 1). 누에 숙잠 혈림프는 70 kDa 부근에서 특징적인 명확한 단백질 밴드가 나타난 반면, 혈림프 발효액은 70 kDa의 단백질이 저분자량의 단백질로 전환됨을 확인하였다. 특히 *Bacillus amyloliquefaciens* M27를 이용하여 발효시킨 경우 분자량이 감소되는 현상이 *Bacillus subtilis* 10854에 비해 매우 뚜렷하게 보였다. *Bacillus amyloliquefaciens* M27로 발효 후 저분자화에 걸리는 시간을 측정하기 위하여 1주 단위로 발효를 진행하고 이의 분자량을 확인하였다(그림 2). 그 결과, *Bacillus amyloliquefaciens* M27를 이용한 발효액은 1주 발효 시에도 70 kDa의 단백질이 40 kDa이하의 단백질로 분자량이 저하됨을 확인할 수 있었다. 발효에 의한 분자량 저하는

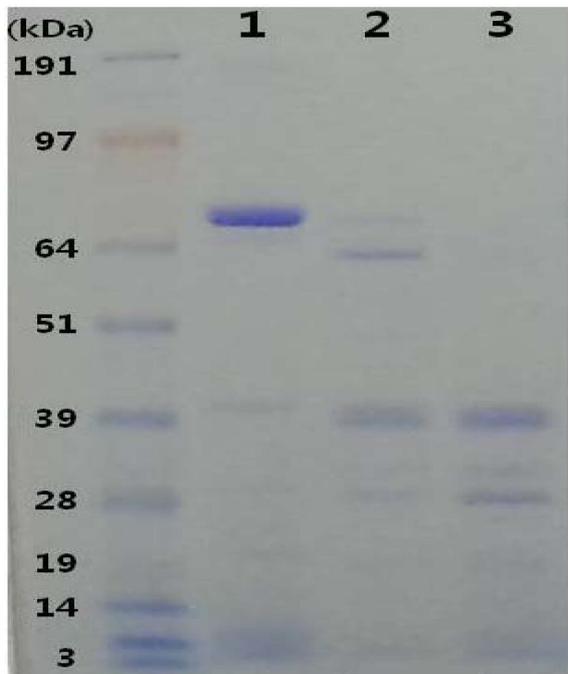


Fig. 1. SDS-PAGE of fermented silkworm hemolymph 1 : 1% hemolymph (HL), 2 : 1% HL + *B. subtilis* 10854, 3 : 1% HL + *B. amyloliquefaciens* M27.

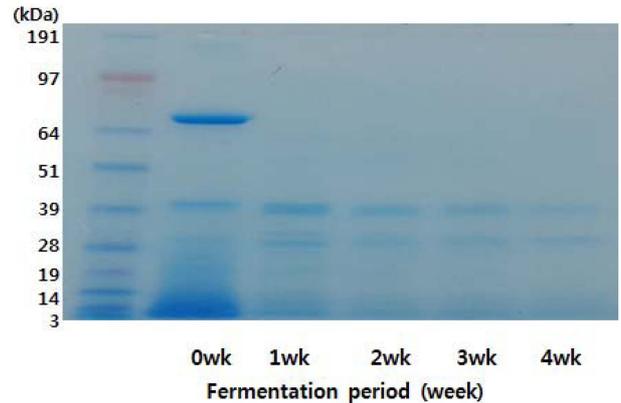


Fig. 2. SDS-PAGE of silkworm hemolymph fermented by *B. amyloliquefaciens* M27.

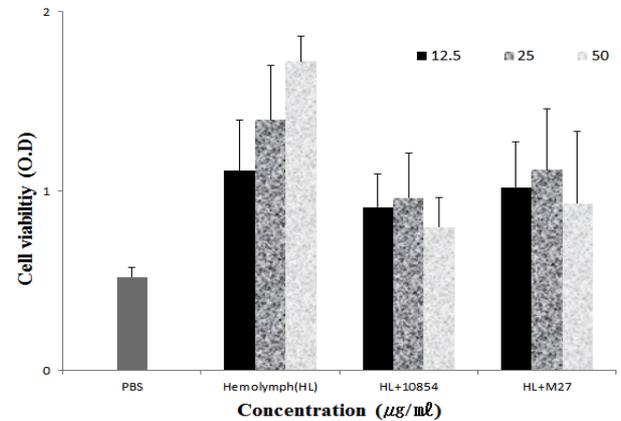


Fig. 3. Cell viability of hemolymph fermented by *B. subtilis* 10854 and *B. amyloliquefaciens* M27.

Weng et al.(2010)이 대두단백질을 *Bacillus subtilis*로 발효시킨 연구에서 발효시간 경과에 따른 낫토(natto)의 단백질 변화를 측정한 결과 24시간 이후 분자량이 저하되기 시작해 48시간 발효시켰을 때 20 kDa 이상의 단백질 밴드가 사라졌다고 보고 한 바 있다. 본 연구에서의 70 kDa의 단백질의 분자량 저하는 발효에 의한 분자량 저하라는 측면에서 동일한 결과를 나타낸 것으로 보여지며, 화장품의 피부 침투 효과를 증진시키는데도 큰 의미가 있다.

2. 세포 독성

누에 숙잠 혈림프와 혈림프 발효액의 농도별 세포독성 평가 결과를 그림 3에 나타내었다. 대조군에 비해 혈림프와 혈림프 발효액 모두 세포 생존율이 증가하였지만, 발효 처리에 대한 유의차는 없었다. 다만 *Bacillus amyloliquefaciens*를 이용한 혈림프 발효액이 *Bacillus subtilis*를 이용한 혈림프 발효액보다 세포 생존율이 더 높았다. 이는 누에 혈림프가 세포사멸(apoptosis) 억제능이 있고(Zhang et al. 2011,

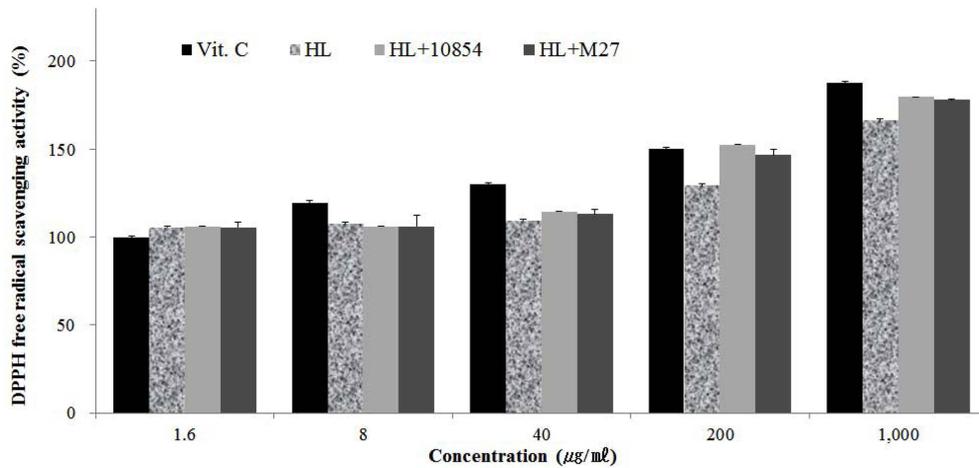


Fig. 4. DPPH free radical scavenging activity of hemolymph and fermented hemolymph HL: hemolymph, HL + 10854: HL + *B. subtilis* 10854, HL + M27: HL + *B. amyloliquefaciens* M27.

Rhee et al. 2013), 곤충세포를 포함한 세포 배양을 위한 배지의 첨가물로 사용될 수 있다는 점을 근거로 하여 누에 숙잠 혈림프의 세포 생존율이 높게 나타난 것으로 생각된다.

3. 항산화 효과

누에 숙잠 혈림프와 혈림프 발효액의 DPPH 자유라디칼 소거활성을 조사하였다. 혈림프와 혈림프 발효액 모두 DPPH 자유라디칼 소거활성을 보였으며, 혈림프 보다 혈림프를 발효하였을 때 더욱 항산화 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 4). *Bacillus subtilis* 10854 균주에 의한 혈림프 발효액의 항산화 활성이 실험군 중 가장 우수하였으나, 실험군 간 유의차는 없었다. 또한 200 µg/ml의 고농도에서 혈림프 발효액은 양성대조군인 비타민 C(vitamin C)에 비해 항산화 효과가 뛰어나지는 않았지만 거의 유사한 활성 정도를 나타내었다. 혈림프 발효액의 분자량 저하 효과가 뚜렷하였던 *Bacillus amyloliquefaciens* M27균주를 이용하여 4주간 발효시키며 발효기간별 DPPH 자유라디칼 소거 활성을 측정하였다(그림 5). 실험 결과, 1주 발효시켰을 때에는 발효 전과 유의적인 차이를 보이지 않았으나 2주 이상 발효시켰을 때 약 5% 이상 자유라디칼 소거 활성 능력이 증가함을 나타내었다. 단백질의 분자량과 항산화 효과의 관계는 여러 논문에서 보고된 바 있는데, 고분자의 단백질을 저분자로 가수분해 시키면 항산화력을 보이는 아미노산의 증가를 유도해 DPPH 자유라디칼 소거활성이 증가하는 것으로 보인다고 보고되었다(Yang et al. 2011). 돼지의 혈장단백질 가수분해물이 분해되지 않은 혈장단백질보다 더 강한 라디칼 소거능과 구리 결합력을 보인다고 보고된 논문(Yang et al. 2011)을

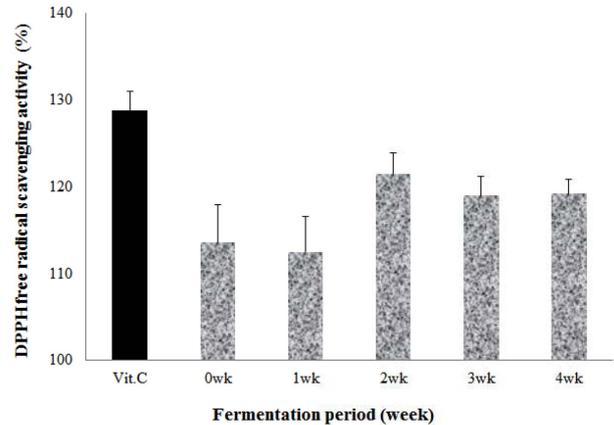


Fig. 5. DPPH free radical scavenging activity of fermented hemolymph (*B. amyloliquefaciens* M27) by periods.

근거로 하여 동식물 유래 단백질 모두에서 단백질의 분자량 및 분자량을 저하시키는 과정에서 생성되는 아미노산의 구성과 항산화력이 밀접한 관련이 있음이 제기되어 왔다. 본 연구의 결과도 이와 다르지 않았다. 2주 동안 발효시킨 혈림프 단백질이 1주 동안 발효시킨 것보다 분자량이 더 저하되었고 항산화력을 나타내는 아미노산 및 생리활성 물질이 생성되어 DPPH 자유라디칼 소거 활성이 증가한 것으로 생각된다.

4. 티로시나아제 활성 억제 효과

티로시나아제는 피부가 자외선 등에 노출되면서 티로신에서 멜라닌 생성에 강하게 작용하는 효소로 티로신을 도파, 도파퀴논으로 전환하는 것으로 알려져 있으며, 티로시나아제 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제할 수 있으며 이로 인해 기미, 주근깨, 노인성 홍반 등의 유발

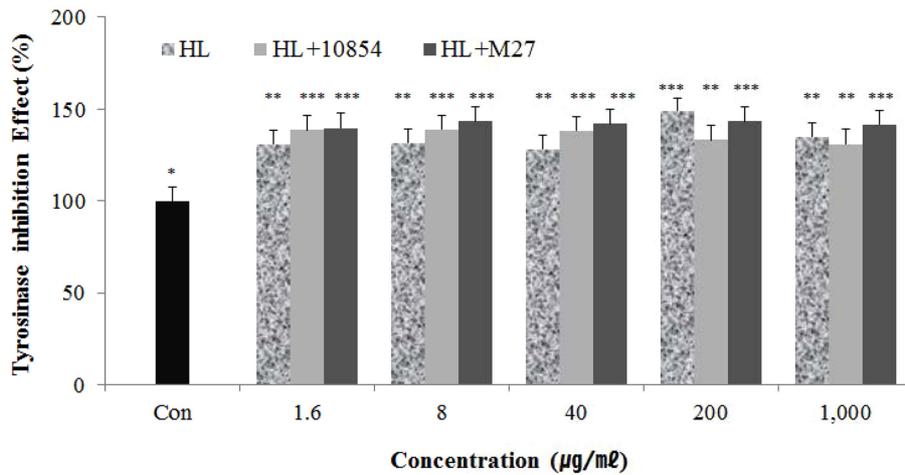


Fig. 6. Tyrosinase activity of hemolymph and fermented hemolymph, Con: not treated, HL: hemolymph, HL + 10854: HL + *B. subtilis* 10854, HL + M27: HL + *B. amyloliquefaciens* M27.

을 막을 수 있는 것으로 알려져 있다(Jeon et al. 2012). 따라서 티로시나아제 활성 억제 능력은 화장품의 미백효과를 확인하기 위한 필수적인 항목이다. 본 연구에서는 누에 숙잠 혈림프와 누에 숙잠 혈림프를 *Bacillus amyloliquefaciens* M27와 *Bacillus subtilis* 10854 균주를 이용하여 얻은 발효액을 대상으로 티로시나아제 활성 억제 효과를 검증하였다(그림. 6). 대조군에 비해 혈림프와 혈림프 발효액 처리군의 모든 농도에서 티로시나아제의 억제효과가 나타났으며, 특히 *Bacillus amyloliquefaciens* M27 배양액의 경우 티로시나아제 억제에 대한 미백효과가 더 좋았다.

적 요

본 연구는 누에 숙잠 혈림프를 발효를 통하여 화장품으로서의 기능성과 피부 침투력을 증진시키고자 수행되었다. 누에 숙잠 혈림프를 대량 정제하여 이를 이용하여 2종의 *Bacillus*균을 이용하여 4주간 발효하였으며, 이들 발효산물의 분자량 및 세포 독성, 항산화, 티로시나아제 활성 억제 효과를 확인하였다.

1. 누에 숙잠 혈림프 단백질의 분자량이 커서(70 kDa) 정제물의 용해도가 낮다는 문제가 제기되어 단백질의 저분자화를 위해 바실러스속 균주 2종(*B. subtilis* 10854, *B. amyloliquefaciens* M27)으로 4주간 발효시켰다. 그 결과, 혈림프 발효액의 단백질은 현저하게 분자량이 저하되었으며, 바실러스속 균주 중 *B. amyloliquefaciens* M27이 단백질 분해 능력이 더 뛰어난 것으로 나타났다.

2. 누에 숙잠 혈림프 정제물을 바실러스속 균주 2종(*B. subtilis* 10854, *B. amyloliquefaciens* M27)으로 발효하여 발효액의 세포독성을 멜라닌세포의 세포 생존율을 측정하여

확인한 결과, 발효액의 12.5 ~ 50 µg/mL 농도 범위에서 세포 독성이 나타나지 않았고 세포 생존율이 증가하는 결과를 보였다.

3. 누에 숙잠 혈림프, 혈림프 발효물의 DPPH 자유라디칼 소거 활성을 정한 결과, 농도 의존적으로 항산화력이 증가하였고 혈림프 발효액은 양성대조군인 비타민 C와 유사한 활성 정도를 나타내었다. 분자량 저하 효과가 더 우수했던 *Bacillus amyloliquefaciens* M27균주를 이용하여 4주간 발효시키며 발효기간별 DPPH 자유라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 2주 이상 발효시켰을 때 약 5% 이상 자유라디칼 소거 활성 능력이 증가함을 나타내었다.

4. 티로시나아제 활성 억제효과는 대조군에 비해 혈림프와 혈림프 발효액 처리군 모두에서 나타났으며, *amyloliquefaciens* M27를 이용한 발효액의 경우 미백효과가 더욱 뚜렷하였다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 기관고유과제(과제번호: PJ010006)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

- Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J Pharmacogn* **29**, 237~242.
- Chon JW, Kweon H, Jo YY, Park MK, Son YH, Lee HS (2012) A study on the development of functional cosmetics using silk-gland powder of silkworm. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **38**(2), 163~169.
- Fergus GP (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *bacillus*. *BACTERIOLOGICAL REVIEWS*, Sept. pp. 711~753,

- American Society for Microbiology, USA.
- Hong JH, Kim HY, Kim DI (2010) Skin UVB photo aging effect from extract of fermented *reynoutria elliptica*. J Korean Soc Food Sci Nutr **39**(3), 369~375.
- Jeon MJ, Kim MH, Jang HJ, Lee SW, Kim JH Kim HS, Lee SH (2012) Whitening effect of *Hizikia fusiformis* ethanol extract and its fractions. J Life Sci **22**, 889~896.
- Juan MY, Chou CC (2010) Enhancement of antioxidant activity, othalphenolicand flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC14715. Food Microbiol **27**, 586~591.
- Jung EY, Hong YH, Kim SH, Suh HJ (2010) Physiological effects of formulations added with black garlic extract on skin care: Oxidative stress, tyrosinase and elastase activities. J Korean Soc Food Sci Nutr **39**(5), 662~668.
- Lee HS, Kim SH (2010) Safety evaluation of black garlic extract for development of cosmeceutical ingredients. J Korean Soc Food Sci Nutr **39**(8), 1213~1219.
- Lim AK, Jung YJ, Kim KS, Kim YH, Kwak JH, Hong JH, Kim HY, Kim DI (2010) Skin UVB photo aging effect from extract of fermented *Reynoutria elliptica*. J Korean Soc Food Sci Nutr **39**(3), 369~375.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods **65**, 55~63.
- Mun JY, Lee HS, Lee KG, Kweon HY, Jo YY, Yeo JH (2013) Effects of matured silkworm hemolymph on suppressing melanin synthesis. J Seric Entomol Sci **51**(2), 207~210.
- Reddy NS, Nimmagadda A, Sambasiva R (2003) An overview of the microbial α -amylase family. Afr J Biotech **2**(12), 645~648.
- Rhee WJ, Park JH, Hahn JS, Park TH (2013) Anti-apoptotic mechanism of silkworm hemolymph in HeLa cell apoptosis. Process Biochem **48**, 1375~1380.
- Shim SB, Chun YJ (2012) The study on skin safety and efficacy of *Codonopsis Lanceolata* root fermentation extract. J Korea Academia-Industrial cooperation Soc **13**(11), 5623~5627.
- Welker NE, Campbell LL (1967) Comparison of the α -amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. J Bacteriol **94**(4), 1131~1135.
- Weng TM, Chen MT (2010) Changes of protein in natto (a fermented soybean food) affected by fermenting time. Food Sci Technol Res **16**, 537~542.
- Wu CH, Chou CC (2009) Enhancement of aglycone, Vitamin K2 and superoxide dismutase activity of black soybean through fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at different temperatures. J Agric Food Chem **57** (22), 10695~10700.
- Yang B, Yang H, Li J, Li Z, Jiang Y (2011) Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. Food Chem **124**, 551~555.
- Yang JC (2012) The evaluation on the effectiveness as a cosmetic material of oil extracted from *Schizandra Chinensis* seed. J Korean Oil Chem Soc **29**(2), 231~237.
- Zhang R, Li J, Liu K, Li A, Peng J, Hong H (2011) Apoptosis induced by actinomycin D in *Spodoptera litura* cells and the effect of two insect hemolymph on apoptosis. Bioinformatics and Biomedical Engineering pp. 1~4. (iCBBE) 5th International conference **112**, 254~260.