

Biological Activity and Biochemical Properties of Water Extracts from *Bacillus subtilis*-fermented Silkworm (*Bombyx mori* L.) Powder by Origin

Tae-Hoon Kim, Hee-Young Ahn, Young-Wan Kim, So-Yeon Sim, Kwon-Il Seo and Young-Su Cho*

Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

Received September 29, 2017 / Revised November 10, 2017 / Accepted November 22, 2017

The aim of this study was to investigate biological activity and biochemical properties of extracts from *Bacillus subtilis*-fermented silkworm (*Bombyx mori* L., SP) powder of different origin (Buan, Namwon, and Boeun). An additional aim was to determine the inhibition of cancer cell (B16-F10, HT-29, LNcaP, and MCF-7) proliferation and nitric oxide (NO) production from lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. Biological activities (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl [DPPH], free radical scavenging activity, fibrinolytic activity, antiproliferation activity, and anti-inflammatory activity) and biochemical properties (compositional amino acid contents, and mineral contents) were examined in water extracts from silkworm powder and *B. subtilis*-fermented silkworm powder. The highest amino acid contents were detected in Buan silkworm powder (BU). After fermented, the highest contents were found in *B. subtilis*-fermented Buan silkworm powder (BBO). The major minerals detected were K, Ca, and Mg. Rates of these minerals, especially those of Na increased after fermented. DPPH radical scavenging activity and fibrinolytic activity were stronger in the fermented group than non-fermented group. DPPH radical scavenging activity and fibrinolytic activity were highest in the extract from BBO. The inhibition activities of LNcaP and MCF-7 cells viability were significantly decreased in the BBO, and there was no inhibition activity in other cancer cells (B16-F10 and HT-29). An SRB assay of the cell viability of RAW 264.7 cells exposed to extracts of silkworm powder and *B. subtilis*-fermented silkworm powder revealed no toxicity in any of the groups. Compared with the LPS-treated group, the biggest reduction in NO production was detected in the BBO group. Based on these results, extracts from Boeun silkworm powder fermented with *B. subtilis* could be a candidate material as a dietary supplement for use in healthy functional foods.

Key words : *Bacillus subtilis*, *Bombyx mori* L., biochemical property, biologiccal activity, fermentation

서 론

최근 새로운 생물학적 자원으로서 곤충의 중요성이 부각되면서 신소재로서 다양한 분야에 이용되고 있다. 국내 곤충산업은 2010년 '곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률' 발표를 시작으로 '제 1차 곤충산업 육성 5개년 계획(2011-2015)'의 수립을 통해 곤충자원의 조사 및 유용곤충의 발굴, 곤충자원의 R&D 강화, 곤충농가 육성지원, 전문인력의 양성 및 교육 강화 등의 정책을 통해 곤충산업의 확대를 모색하고 있으며, 농식품, 의약품, 화장품, 기능성 바이오소재 및 산업신소재 그리고 생체모방 공학 등의 융·복합 영역으로 곤충자원의 활용이 대폭 확대될 것으로 기대하고 있다[27].

누에(*Bombyx mori* L.)는 누에나방과(Bombycidae)의 유충으

로 동의보감, 본초강목 등의 고서에도 기록되어 있으며 예로부터 영양실조, 폐결핵, 풍사, 익정, 중풍 등에 민간약으로 이용되어져 왔다[6]. 과거에는 주로 잠사 산업에만 이용되어져 왔지만 최근 국내 기능성 식품 시장 및 생명과학 기술의 발달로 인해 화장품, 식품, 의료용 소재 등으로도 취급되고 있다[11, 27]. 또한 누에는 단백질, 유리 아미노산, 단일불포화지방산 또는 다가불포화지방산, 미네랄, 섬유질 및 deoxyojirimycin 등이 풍부하여 영양학적으로 높은 가치를 가지며[12, 24], 활성산소 억제[8], 고지혈증 개선[12], 간 독성 예방[25], 혈당강하[26] 등의 연구가 보고되어 있다.

발효는 미생물 특히, 유용미생물인 probiotics가 당질을 이용하여 산물로서 알코올, 유기산, CO₂ 등을 생성하는 것으로 식품의 발효를 통해 독성물질 파괴, 소화성 증진, 비타민 생성, 가용성 성분의 함량 증가 및 다양한 생리활성 물질을 생성할 뿐만 아니라 탄수화물, 단백질, 지질 등을 분해하는 가수분해 효소 및 기타 효소를 생성하여 영양학적 가치가 높고 건강기능성을 증진시키는 효과를 갖는다[7, 22].

누에분말의 에탄올 추출물을 흰 쥐에 투여하였을 때, 혈청과 뇌 조직 내 malondialdehyde (MDA)와 과산화수소(H₂O₂)의 함량을 감소시켜 체내 활성산소의 과도한 생성을 억제하고

*Corresponding author

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

E-mail : choys@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

세포의 산화적 손상을 감소시켰다는 보고가 있었으며[13], 단백질 분해력이 뛰어난 미생물이나 식육연화 효과가 있는 과즙액으로 발효시킨 누에분말은 단백질 농도가 증가하고, 항산화 활성, 혈전용해 효소활성, tyrosinase 저해 활성 등의 생리활성이 발효 전과 비교하여 증가하는 것으로 알려져 있다[6, 8, 17]. 이처럼 다양한 생리활성을 가지는 누에분말과 유용미생물을 이용하여 발효한 발효누에분말의 기능적 효능 분석에 대한 연구가 전반적으로 많이 이루어져 있지만, 곤충산업시장이 성장함에 따라 다양한 지역에서 누에를 사육하고있음에도 불구하고 산지별 누에분말에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 산지별 누에분말을 *Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 발효시켜 산지별 누에분말의 유용성분 및 생리활성 변화를 비교 분석하고 건강기능식품 소재로 활용하기 위한 기초자료를 얻고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

산지별 누에분말(전남 부안, 전북 남원, 충북 보은)은 2017년 3월 열풍건조된 분말을 농촌진흥청(전북 전주, 한국)으로부터 분양받아 사용하였다. 발효 균주로는 본 연구실에서 분리, 등록된 단백질 분해능이 우수한 *Bacillus subtilis* KACC 91157 균주[6]를 사용하여 열풍건조누에분말을 발효시켜 시료로 사용하였다. 전 배양 시킨 *Bacillus subtilis* 균주를 살균한 산지별 열풍건조 누에분말에 5%(v/w) 수준으로 접종하여 30°C에서 72시간 발효시킨 후 6시간 동안 열풍 건조하여 얻은 발효누에분말 시료를 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용한 RAW 264.7, B16-F10 세포, HT-29 세포, LNCaP 및 MCF-7 세포는 ATCC로부터 분양 받아 실험에 이용하였다. 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic (GIBCO®/Invitrogen™, Gran Island, NY, USA)와 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 첨가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 한편, MCF-7 세포는 ATCC로부터 분양 받아 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic과 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640을 사용하여 위와 같은 조건에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

시료의 추출

산지별 누에분말 및 발효누에분말을 추출하기 위하여 10g을 각각 취해 10배수의 정제수를 가한 후 37°C 항온수조에서 3시간씩 교반하면서 3회 반복 추출하여, 추출액을 모아 Whatman NO.2 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)로 여과하여 얻은 여과액을 실험 재료로 사용하였다.

당도, pH 및 총 산도 측정

산지별 누에 및 발효누에의 당도는 1%(w/v) 수준의 수용성

추출물 300 µl를 취하여 당도계(Hand refractometer, Kruss, Germany)를 사용하여 °Brix로 표시하였다. pH는 시료 10 ml을 취하여 pH meter (SevenCompact™ pH/Ion S220, Mettler-Toledo AG, Switzerland)를 사용하여 측정하였으며, 총 산도는 시료 5 ml을 pH 8.3이 될 때까지 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 acetic acid의 양으로써 표시하였다.

$$\text{Total acidity (w/v, \%)} = (0.006 \times V \times F) / S \times 100$$

V: 0.1N NaOH의 소비량(ml), F: 0.1 N NaOH의 Factor, S: 검체량(ml)

아미노산 분석

구성 아미노산 분석은 시료 0.2 g에 15 ml performic acid, 6 N HCl 15 ml를 가하여, 110°C dry oven에서 24시간 이상 동안 산 가수분해 시켰다. 분해된 시료를 55°C Water bath에서 감압농축 한 후 pH 2.2 구연산 dilution buffer로 25 ml에 volumetric flask에 정용하여 일정량을 아미노산 자동분석기 Biochrom 30 (Biochrom, UK)를 이용하여 분석하였다.

미네랄 함량 측정

미네랄 함량은 AOAC 분석 방법[1]에 준하여 측정하였다. 즉, 각 건조 분말 1 g을 정확히 취해 550°C에서 3시간 회화시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시켜 수욕상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건조물에 3 N HCl를 가하여 여과한 후 원소 종류에 따라 각각 일정 비율로 희석하여 원자흡광 분광광도계(Analyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

DPPH에 의한 항산화 활성 측정

산지별 누에 추출물과 발효누에 추출물의 항산화 활성은 Blois 방법[4]에 따라 측정하였다. 즉, DPPH (α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl) 용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 Whatman NO.2 여과지로 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 합성 항산화제 Butylated hydroxytoluene (BHT)는 0.05%로 첨가하여 위와 동일한 방법으로 흡광도 감소를 측정하였다. DPPH free radical scavenging activity는 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율(%)로 표시하였다.

혈전용해 효소 활성 측정

산지별 누에 및 발효누에 추출물의 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 Whatman NO. 2 여과지로 여과하여 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 구하였으며, 투명대가 타원인 경우에는 가장 긴 지름과 가장 짧은 지름을 측정하여 투명대의 면적을 구하였다. 이 때 양성대조군으로 plasmin을 사용하였으며 plasmin의 혈전 용해 활성의 표준 곡선에 의해 활성을 산출하여 unit/ml로 표시하였다.

암세포 증식 억제능 측정

암세포 증식 억제능은 생존 세포 내의 단백질 총량을 흡광도로 나타내어 세포 사멸 정도를 확인하는 방법인 sulforhodamine B (SRB, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)법을 이용하여 측정하였다. Trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich Co.)에 의해 생존 세포만 well plate에 부착되며 이 세포의 단백질 내 염기성 아미노산 잔기가 SRB와 결합하여 마지막에 처리하는 Tris buffer에 녹아 나와 흡광도를 나타낸다[9]. 암세포 증식 억제능은 세포를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 48 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 시료를 첨가하고 24시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 12% TCA를 넣어 4°C에서 세포를 고정시키고 well을 세척한 후 0.4% SRB 용액을 첨가하여 염색하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid로 세척하고 10 mM Tris buffer를 첨가하여 SRB를 녹였다. 상등액을 96 well plate에 옮겨 microplate reader (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide 생성량 측정

RAW 264.7 마우스 대식세포를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 96 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 1 µg/ml의 LPS와 농도별 누에 및 발효누에 추출물(100, 500 및 1,000 ppm)을 첨가한 후 24시간 동안 반응시켰다. 배양 상등액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 NO 함량을 측정하였다. 배양 상등액 100 µl에 동량의 Griess (Sigma Aldrich Co.) 시약을 첨가하고 암실에서 10분간 반응시킨 후 micro plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 sodium nitrite (NaNO₂, Sigma Aldrich Co.)를 사용하여 얻은 표준직선을 기준으로 정량하였다.

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean ± SE)로 표시하였으며, 각 실험

군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다[10].

결과 및 고찰

당도, pH 및 총 산도 변화

산지별 누에 및 발효누에 추출물의 당도, pH 및 총 산도 변화를 Table 1에 나타내었다. 부안누에(BU), 남원누에(NW) 및 보은누에(BO)군의 당도는 각각 3.40, 3.60, 3.60 °Brix로 나타났으며, 발효 부안누에(BBU), 발효 남원누에(BNW) 및 발효 보은누에(BBO)군의 당도는 각각 4.20, 4.20, 4.40 °Brix로 발효 전과 비교하여 발효함으로써 당도가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. BU군의 pH는 6.87로 나타났으나 발효에 의해 6.72로 유의적으로 감소하였고 NW군과 BO군의 pH는 각각 6.60, 6.69로 나타났으며 발효에 의해 각각 6.79, 6.95로 유의적으로 증가하였다. 한편, BU군과 BBU군의 산도는 각각 0.76, 0.60%로 발효에 의해 감소하는 경향을 나타내었고, NW군과 BNW군의 산도는 각각 0.76, 0.80%로 발효에 의해 유의적인 증가를 보였으나 BO군과 BBO군은 모두 0.85%의 산도를 보여 발효에 의한 유의적인 차이를 보이지 않았다.

구성 아미노산 함량 변화

BU군의 구성 아미노산 총 함량은 305,826 ppm으로 glutamic acid, glycine, alanine, aspartic acid 순으로 함유되어 있었으나 BBU군의 구성 아미노산 총 함량은 213,553 ppm으로 검출되었으며 glutamic acid, glycine을 포함한 대부분의 아미노산 함량이 모두 감소하였다. 또한 NW군의 구성 아미노산 총 함량은 252,164 ppm으로 검출되었으나 발효함으로써 alanine, glycine, glutamic acid를 포함한 대부분의 아미노산 함량이

Table 1. °Brix, pH and total acidity of extracts from silkworm powder and *Bacillus subtilis*-fermented silkworm powder

Sample	°Brix	pH	Total acidity (%)
BU ¹⁾	3.40±0.06 ^a	6.87±0.01 ^a	0.76±0.01 ^a
NW ²⁾	3.60±0.12 ^a	6.60±0.00 ^b	0.76±0.01 ^a
BO ³⁾	3.60±0.06 ^a	6.69±0.01 ^c	0.85±0.01 ^b
BBU ⁴⁾	4.20±0.12 ^b	6.72±0.01 ^{cd}	0.60±0.01 ^c
BNW ⁵⁾	4.20±0.00 ^b	6.79±0.06 ^d	0.80±0.01 ^d
BBO ⁶⁾	4.40±0.00 ^b	6.95±0.00 ^e	0.85±0.01 ^b

¹⁾BU: Buan silkworm powder.

²⁾NW: Namwon silkworm powder.

³⁾BO: Boeun silkworm powder.

⁴⁾BBU: Buan silkworm powder fermented with *Bacillus subtilis*.

⁵⁾BNW: Namwon silkworm powder fermented with *Bacillus subtilis*.

⁶⁾BBO: Boeun silkworm powder fermented with *Bacillus subtilis*.

Values are mean ± S.E., n=3.

Values with different letters are significantly different at p<0.05.

감소하여 구성 아미노산 총 함량이 75,119 ppm으로 크게 감소하였다(Table 2). 반면에 BO군의 구성 아미노산 총 함량은 214,160 ppm으로 검출되었으며, 아미노산 농도는 alanine, glycine, valine, leucine, lysine 순으로 함유되어 있었고 BBO군의 구성 아미노산 총 함량은 271,900 ppm으로 aspartic acid, glutamic acid, glycine을 포함한 대부분의 아미노산 함량이 증가하였다. 특히 BO군에서는 검출되지 않았던 serine이 4,164 ppm 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 현재까지 알코올성 간 독성과 관련된 연구에서는 arginine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, serine과 같은 단일 아미노산 처리에 의해 간 독성 개선효과가 보고된 바 있으며[18, 29], 숙취해소에 널리 이용되고 있는 콩나물의 구성 아미노산 조성에서도 aspartic acid, arginine, glutamic acid가 많이 함유되어 있어 간 보호 효과를 보였다고 하였다[18]. 또한 sericin 단백질의 구성 아미노산 조성에서도 serine 31%, aspartic acid, 17.8%, glycine

19.1%의 함량을 보였으며, 알코올성 간 독성에 대해 개선효과가 보고된 바 있다[14]. 이러한 결과로 보아 *B.subtilis* 균주를 이용하여 발효한 보은누에분말은 aspartic acid, glutamic acid, glycine 및 serine과 같은 아미노산을 많이 함유하고 있어 간 기능 개선효과를 가지는 건강기능성 식품 소재로서의 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.

미네랄 함량

산지별 누에 및 발효누에분말의 미네랄 함량을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 미네랄 성분 조성은 Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn으로 나타내었으며, 전체적으로 K, Ca, Mg 순으로 높은 비율을 차지하였다. K와 Ca는 각각 379.27, 71.43 ppm으로 BBU군에 가장 많이 함유되어 있었고, Mg는 40.67 ppm으로 BBO군에 가장 높은 함유량을 나타내었다. 특히 Na 함량은 BU, NW 및 BO군에서 각각 4.47, 1.40, 1.32 ppm으로 낮은

Table 2. Compositional amino acids in silkworm powder and *Bacillus subtilis*-fermented silkworm powder

Sample Amino acids	BU	NW	BO	BBU	BNW	BBO
Aspartic acid	27,221	14,746	7,164	6,120	250	18,124
Threonine	10,711	6,029	2,587	2,737	336	7,556
Serine	7,364	1,497	-	251	222	4,164
Glutamic acid	34,051	18,673	12,048	8,736	287	21,415
Glycine	33,706	29,329	23,092	24,594	6,973	31,726
Alanine	31,960	38,232	41,067	34,763	19,763	35,475
Cysteine	4,173	5,925	10,989	10,140	4,274	5,127
Valine	20,090	18,854	16,875	17,227	5,721	19,549
Methionine	5,000	3,799	2,816	4,285	873	4,968
Isoleucine	15,990	14,587	12,032	13,138	3,436	15,137
Leucine	23,251	20,055	16,080	17,931	5,236	21,153
Tyrosine	14,459	12,389	12,905	14,351	6,420	15,638
Phenylalanine	16,579	13,834	11,465	13,067	4,399	15,589
Lysine	20,370	18,320	15,523	16,625	5,907	19,080
Histidine	9,913	7,440	4,876	5,558	1,310	7,516
Arginine	16,537	15,708	13,403	13,498	4,950	14,520
Proline	14,450	12,747	11,240	10,531	4,843	14,163
Total	305,826	252,164	214,160	213,553	75,199	271,900

Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 3. Mineral concentrations of silkworm powder and *Bacillus subtilis*-fermented silkworm powder

Ingredients	K	Ca	Mg	Na	Zn	Fe	Mn	Cu
BU	340.10±4.36 ^a	64.93±0.67 ^a	38.27±0.39 ^a	4.47±0.05 ^a	1.11±0.01 ^a	0.87±0.01 ^a	0.51±0.01 ^a	0.07±0.00 ^a
NW	349.03±2.32 ^a	52.00±0.55 ^b	40.10±0.21 ^{bc}	1.40±0.04 ^b	1.56±0.03 ^b	0.92±0.01 ^b	0.95±0.01 ^b	0.06±0.01 ^b
BO	340.13±3.05 ^a	58.30±0.25 ^c	38.83±0.22 ^{ad}	1.32±0.03 ^b	2.37±0.05 ^c	1.27±0.02 ^c	1.07±0.01 ^c	0.06±0.01 ^b
BBU	379.27±4.36 ^b	71.43±0.60 ^d	40.33±0.27 ^b	22.40±0.32 ^c	1.28±0.01 ^d	1.05±0.02 ^d	0.50±0.01 ^a	0.07±0.01 ^a
BNW	360.07±3.60 ^c	50.47±1.08 ^b	39.53±0.22 ^{cd}	20.47±0.07 ^d	1.57±0.02 ^b	0.85±0.01 ^a	0.89±0.01 ^d	0.06±0.00 ^b
BBO	344.07±2.30 ^a	59.07±0.44 ^c	40.67±0.07 ^b	18.10±0.25 ^e	2.42±0.03 ^c	1.24±0.02 ^c	1.01±0.01 ^e	0.06±0.00 ^b

Abbreviations are the same as in Table 1.

Values are mean ± S.E., n=3

Values with different letters are significantly different at p<0.05.

함량을 보였으나, 발효 후 각각 22.40, 20.47, 18.10 ppm을 보이며 유의적으로 크게 증가하였다. Zn, Fe, Mn 및 Cu는 소량 함유되어 있었다. 측정된 원소 대부분 발효 전과 비교하여 발효 후에 함량이 증가한 수치를 나타내어 누에를 발효함으로써 미네랄 함량이 증가한 것으로 사료되며, 인체에 중요한 필수 미네랄 함량이 증가하는 것으로 보아 발효누에가 영양학적 측면에서도 우수한 것으로 생각된다.

DPPH를 이용한 자유라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼 소거활성 측정은 비교적 안정한 라디칼인 DPPH를 소거시킬 수 있는 항산화물질의 활성을 측정하는 것으로 DPPH는 자유라디칼에서 특유의 색을 나타내다가 전자 또는 수소원자에 의해 전자가 쌍을 이루게 되면 비라디칼 형성에 의해 탈색되는 색도상의 차이를 측정하는 원리를 이용한 가장 일반적인 항산화 활성 측정 방법이다[2, 20, 28].

산지별 누에 및 발효누에 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. BU, NW 및 BO군은 발효 전과 비교하였을 때 발효함으로써 자유 라디칼 소거 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, BO군은 29.83% 활성을 보였으나, BBO군은 49.03%의 활성을 보이며 가장 높은 활성을 나타내었다. Cha [7] 등의 연구에 따르면 열풍건조 누에분말을 *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus kawachii* 균주로 발효하여 DPPH radical 소거 활성을 측정해본 결과, 발효 전과 비교하여 radical 소거활성이 증가하는 것을 볼 수 있었으며 특히 *Aspergillus kawachii* 균주를 이용하여 발효한 것보다 *Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 발효한 것이 더 높은 활성을 보였음을 보고하였다. 한편, 국내에 자생하는 곤충 76종의 304종 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거활성을 측정해본 결과 방아깨비, 가시길쭉바구미, 알락수염노린재, 송장벌레과 유충 4종에서만 radical 소거활성을 확인할 수 있었다고 하였다[23]. 이처럼 극소수의 곤충에서만 radical 소거활성이 나타난 것에 비해 누에는 자체에 항산화 활성을 가지며 미생물 발효를 통해 그 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 특히, BBO군에서 가장 높은 활성을 보여 건강기능식품 소재로써 활용할 가치가 높아 보인다.

혈전 용해 활성

혈관 내 혈전이 생성되면 혈액순환을 방해하여 고혈압, 뇌졸중, 협심증, 동맥경화 등의 혈관계 질환을 일으키는데, 이 때 혈전 용해 효소의 활성화에 의해 혈전 생성이 억제되어 각종 혈관계 질환을 예방하는데 효과가 있다고 알려져 있다[21]. 자연계에 존재하는 *Bacillus subtilis*, *Fusarium pallidorosorum*, *Katsuwonus pelamis*, *Streptococcus aureus* 등의 미생물이나 청국장, 된장, natto (nattokinase) 등과 같은 전통 발효 식품으로부터 혈전 용해 효소를 분리하기 위해 많은 연구개발이 이뤄졌으며, Cha [6] 등의 연구에 따르면 동결건조 누에분말의 70% 메탄올 추출물에서는 혈전 용해 활성이 약하게 나타난 반면에 열풍건조 누에분말의 추출물에서는 활성이 나타나지 않아 누에분말의 건조 방법에 따라 혈전 용해 활성이 달라지는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 산지별 누에분말에 *Bacillus subtilis* 균주를 5%(v/w) 접종하여 48시간 발효시킨 발효누에 추출물의 혈전 용해 활성을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 발효누에 추출물의 혈전 용해 활성은 발효 전 누에 추출물군과 비교하여 전체적으로 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, BO군은 혈전 용해 활성을 나타내지 않았으나, 발효를 통해 6.50 unit의 활성을 나타내며 가장 높은 활성을 보였다. 따라서 누에분말을 *Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 발효함으로써 혈전 용해 활성이 증가하며, 특히 BO의 *B.subtilis* 발효가 혈전 용해 활성 증가에 가장 효율적인 것으로 사료된다.

암세포 성장억제 효능

산지별 누에분말 및 발효누에분말 추출물의 피부암 세포(B16-F10), 대장암 세포(HT-29), 전립선 암세포(LNcaP) 및 유방암 세포(MCF-7)에 대한 세포 성장억제 효과를 측정하기 위해 각각의 암세포에 누에분말 추출물과 발효누에분말 추출물을 100, 500, 1,000 µg/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 반응시킨 후 SRB assay를 이용하여 확인하였다(Fig. 3). B16-F10 세포에 산지별 누에 및 발효누에 추출물을 농도별로 희석하여 처리하였을 때, 대조군(Con)과 비교하여 농도에 상관없이 세포 생존율에 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3A). 또한, HT-29 세포에 누에분말 및 발효누에분말 추출물을 농도별로

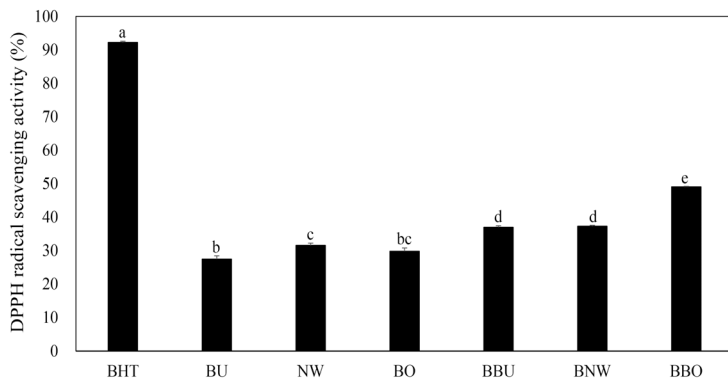


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of extracts from silkworm powder and *Bacillus subtilis*-fermented silkworm powder. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean ± S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at p<0.05.

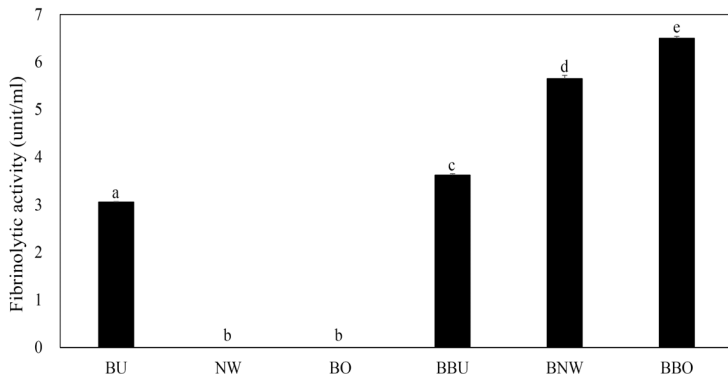


Fig. 2. Fibrinolytic activities of extracts from silkworm powder and *Bacillus subtilis*-fermented silkworm powder. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean \pm S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

희석하여 처리하였을 때, BU, NW, BO, BBU 및 BNW 군은 농도에 상관없이 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았으며, BBO군은 고농도로 처리한 군에서 세포 생존율이 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의적으로 큰 차이를 보이지는 않았다 (Fig. 3B). LNcaP 세포에서 BU 및 NW군은 발효와 상관없이 세포 성장억제 효능을 보이지 않은 반면에 BO 및 BBO군은 대조군과 비교하여 세포 생존율을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 특히, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 BBO군에서는 세포

생존율이 68.27%까지 감소하여 LNcaP 세포의 세포 성장을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3C). 또한 MCF-7 세포에 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 BBO를 처리하였을 때, 세포 생존율이 81.67%로 감소하여 세포 성장을 유의적으로 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3D). 이를 통해 산지별 누에분말 중 BU 및 NW군은 발효와 상관없이 B16-F10, HT-29, LNcaP 및 MCF-7 세포에 대해 성장 억제능이 없는 것을 확인할 수 있었으며, BO군은 *Bacillus subtilis* 균주로 발효함으로써 B16-

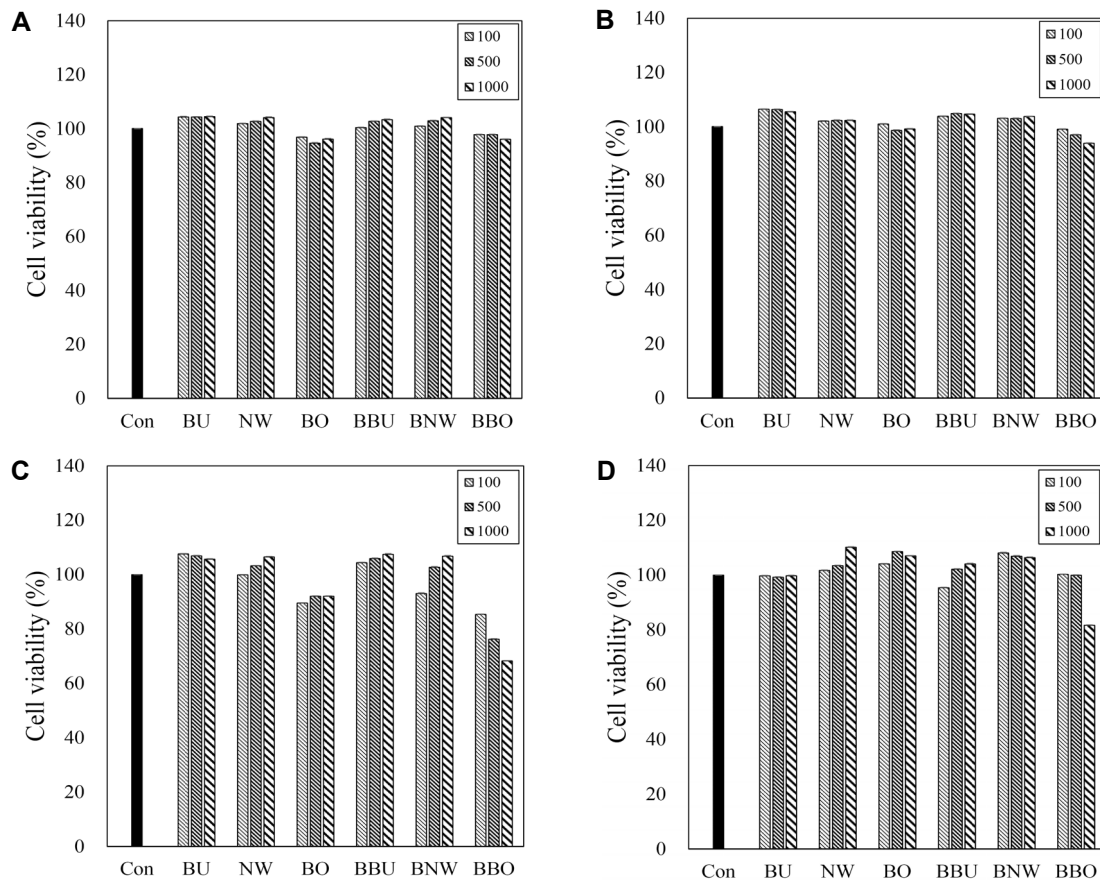


Fig. 3. Inhibition of the cell growth viability by extracts from silkworm powder and *Bacillus subtilis*-fermented silkworm powder in (A) B16-F10 cell, (B) HT-29 cell, (C) LNcaP cell, (D) MCF-7 cell. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean \pm S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

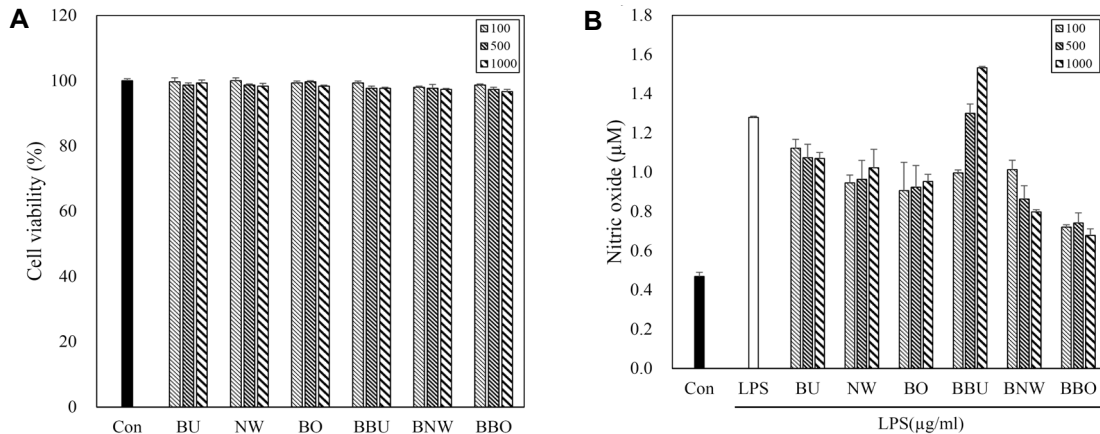


Fig. 4. Macrophage stimulating activity in RAW 264.7 cell by extracts from silkworm powder and *Bacillus subtilis*-fermented silkworm powder. (A) Cell viability was measured by SRB assay. (B) Nitric oxide (NO) production was measured in culture media by Griess reagent. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean \pm S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

F10 및 HT-29 세포보다 LNcaP 및 MCF-7 세포에 대한 성장 억제능이 더 효과적인 것으로 확인할 수 있었고, 특히 LNcaP 세포에 대한 성장 억제능이 우수한 것으로 확인하였다.

RAW 264.7 대식세포의 염증반응에 미치는 영향

다양한 질병으로부터 인체 방어를 위한 가장 중요한 전략 중 하나로 면역조절을 들 수 있다. 수많은 면역세포 중 인체 내에 광범위하게 존재하고 있는 대식세포는 선천면역계를 담당하는 면역세포로 이물질, 노폐물 및 생체 내 불필요한 세포 등을 포식하여 제거한다[5, 16]. 활성산소종 중 하나로 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO는 반응성이 높은 생체 생성분자로서, NOS (nitric oxide synthase)에 의해 L-arginine으로 생성되며 특히 iNOS (inducible NOS)가 염증반응에 크게 관여하는 것으로 알려져 있다[15]. 산지별 누에 및 발효누에 추출물의 염증반응 억제활성을 알아보기 위하여 흰쥐의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS (lipopolysaccharide)와 산지별 누에 및 발효누에 추출물을 농도별로 희석하여 처리하고 대식세포 활성화에 중요한 NO 생성량을 측정하여 결과를 Fig. 4에 나타내었다. RAW 264.7 대식세포에 대한 누에 및 발효누에 추출물의 세포독성을 알아보기 위해 시료를 100, 500, 1,000 µg/ml 농도로 희석하여 24시간 동안 처리한 결과, 모든 시료에서 RAW 264.7 대식세포의 세포 생존율에 유의적인 영향을 미치지 않았음을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 대식세포의 염증반응 억제활성을 측정해본 결과 무처리군인 대조군 (Con)에 비해 LPS를 단독 처리한 양성대조군인 LPS군의 NO 생성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, LPS와 100, 500, 1000 µg/ml 농도의 시료를 병용 처리한 군에서는 양성대조군과 비교하여 NO 생성량이 유의적으로 변화하였다(Fig. 4B). BU, NW 및 BO군은 LPS군과 비교하여 NO 생성량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 한편 BBU군에서는 농

도에 비례하여 NO 생성량이 증가하는 경향을 보였고, BNW 및 BBO군에서는 LPS군 및 발효 전 누에추출물 처리군과 비교하여 NO 생성량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 1,000 µg/ml 농도의 BBO군에서는 0.679 µM 농도로 가장 감소된 NO 생성량을 나타내어 가장 높은 염증반응 억제활성을 보였다. iNOS는 NO 생성에 있어 중요한 역할을 하는 효소이며 세포 내 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시켜 NO를 생성하며, NO가 과량 생성되면 염증성 cytokine의 발현을 유도하여 조직 손상, 유전자 변이, 신경세포 손상 등을 유발하는 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다[19, 30]. 본 실험의 결과를 통해 세 곳의 산지별 누에분말 중 NW 및 BO를 *Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 발효함으로써 염증반응 억제활성이 증가하였으며, 특히 BO의 *Bacillus subtilis* 균주로 발효한 것이 염증반응 억제활성 증가에 가장 효율적인 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부의 “R&D 재발견 프로젝트”의 지원을 받아 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다(N0002293).

References

1. A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 12th ed., Association of official analytical chemists. Washington, D.C., U.S.A
2. Ancerewicz, J., Miqliavacca, E., Carrupt, P. A., Testa, B., Bree, F., Zini, R., Tillement, J. P., Labidalle, S., Guyot, D., Chauvet-Monges, A. M., Crevat, A. and Le Ridant, A. 1998. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 113-120.

3. Astrup, T. and Mullertz, S. 1991. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
5. Byun, E. B., Jang, B. S., Sung, N. Y. and Byun, E. H. 2016. Immunomodulatory activity of crude polysaccharide separated from *Cudrania tricuspidata* leaf. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 1099-1106.
6. Cha, J. Y., Kim, Y. S., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Park, B. K., Jun, B. S. and Cho, Y. S. 2009. Biological activity of fermented silkworm powder. *J. Life Sci.* **19**, 1468-1477.
7. Cha, J. Y., Kim, Y. S., Ahn, H. Y., Kang, M. J., Heo, S. J. and Cho, Y. S. 2011. Biological activity and biochemical properties of silkworm (*Bombyx mori* L.) powder fermented with *Bacillus subtilis* and *Aspergillus kawachii*. *J. Life Sci.* **21**, 81-88.
8. Cha, J. Y., Kim, Y. S., Kang, P. D., Ahn, H. Y., Eom, K. E. and Cho, Y. S. 2010. Biological activity and chemical characteristics of fermented silkworm powder by mold. *J. Life Sci.* **20**, 237-244.
9. Cho, H. D., Kim, J. H., Hong, S. M., Lee, J. H., Kim, D. H. and Seo, K. I. 2016. Sorghum extract enhances caspase-dependent apoptosis in primary prostate cancer cells and immune activity in macrophages. *J. Life Sci.* **26**, 1431-1437.
10. Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
11. Hwang, E. H., Kang, B. G., Kim, B. R. and Lee, H. J. 2001. Protein quality evaluation and effect of plasma lipid contents of acid hydrolysates of cocoon in rats fed by high cholesterol, high triglyceride and high sucrose diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 1004-1009.
12. Kang, P. D., Kim, J. W., Sohn, B. H., Kim, K. Y., Jung, I. Y., Kim, M. J. and Ryu, K. S. 2000. Accumulating pattern of α -glycosidase inhibitor in various silkworm varieties. *Kor. J. Seric Sci.* **48**, 25-27.
13. Kang, Y. K., Choi, M. J. and Nam, S. H. 2014. Effect of ethanolic extract of silkworm on reactive oxygen species formation *in vivo*. *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* **28**, 379-383.
14. Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N. and Nomura, M. 1998. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 145-147.
15. Kim, Y. S., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, E. H., Park, P. J. and Jeong, J. H. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1205-1210.
16. Kwon, D. H., Kang, H. J., Choi, Y. H., Chung, K. T., Lee, J. H., Kang, K. H., Hyun, S. K., Kim, B. W. and Hwang, H. J. 2016. Immunomodulatory activity of water extract of *Ulmus macrocarpa* in Macrophages. *J. Life Sci.* **26**, 50-58.
17. Kwon, H. J., Lee, K. H., Kim, J. H., Chun, S. S., Cho, Y. J. and Cha, W. S. 2006. Effect of protease on the extraction and properties of the protein from silkworm pupa. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 304-308.
18. Lee, J. H., Kim, N. K., Lee, D. Y. and Lee, C. H. 1999. Protective effect of selected amino acids and food extracts on ethanol toxicity deterrent in rat liver. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 802-808.
19. Lim, H. R. and Shin, S. W. 2010. Effects of the essential oil components from *Ligusticum chuanxiong* on proinflammatory mediators of RAW264.7 macrophage cells. *Nat. Prod. Sci.* **16**, 259-264.
20. Nieva, M. M., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethopharmacol.* **71**, 109-114.
21. Ok, M. and Cho, Y. S. 2005. Screening of fibrinolytic enzyme producing from microorganism in Korean fermented soybean paste and optimum conditions of enzyme production. *Kor. J. Food Preserv.* **12**, 643-649.
22. Park, K. Y. 2012. Increased health functionality of fermented foods. *Food Ind. Nutr.* **17**, 1-8.
23. Park, Y. J., Heo, J. C., An, S. M., Yun, E. Y., Han, S. M., Hwang, J. S., Kang, S. W., Yun, C. Y. and Lee, S. H. 2005. High throughput-compatible screening of antioxidative substances by insect extract library. *Kor. J. Food Preserv.* **12**, 482-488.
24. Rumpold, B. A. and Schluter, O. K. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 802-803.
25. Ryu, K. S., Lee H. S. and Kim, S. Y. 1999. Effects of *Bombyx mori* larvae extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *J. Life Sci.* **9**, 375-381.
26. Ryu, K. S., Lee, H. S., Chung, S. H. and Kang, P. D. 1997. An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative condition of silkworm powder. *Kor. J. Seric Sci.* **39**, 79-85.
27. Shin, H. J., Kwon, K. S., Hong, S. M., Kim, H. G., Park, K. H., Choi, J. Y., Kim, S. W., Yu, K. and Kwon, O. Y. 2016. Cloning of the *Bombyx mori* short neuropeptide F receptor (BsNPF-R) cDNA. *J. Life Sci.* **26**, 721-726.
28. Shon, M. Y., Lee, J., Choi, J. H. and Park, S. K. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *cheongkukjang*. *J. Food Compos. Anal.* **20**, 113-118.
29. Yin, M., Ikejima, K., Arteel, G. E., Seabra, V., Bradford, B. U., Kono, H., Rusyn, I. and Thurman, R. G. 1998. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1014-1019.
30. Yun, H. Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**, 291-316.

초록 : 산지별 고초균 발효누에의 이화학적 특성 및 생리활성

김태훈 · 안희영 · 김영완 · 심소연 · 서권일 · 조영수*

(동아대학교 생명공학과)

본 연구는 건강기능성 식품의 소재로서 활용하기 위해 부안, 남원 및 보은의 산지별 누에분말을 단백질 분해능이 뛰어난 *Bacillus subtilis* KACC 91157 균주로 발효시켜 제조한 발효누에 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성을 평가하였다. 구성 아미노산 함량은 부안 누에균(BU)에서 가장 높았으나, 발효 후에는 보은 발효누에균(BBO)에서 가장 높은 함량을 보였다. 미네랄 함량은 K, Ca, Mg 순으로 함유되어 있었으나, Na가 가장 높은 미네랄 함량의 증가율을 보였다. DPPH를 통한 자유라디칼 소거능과 혈전용해 효소활성은 발효 전에 비하여 발효누에균에서 높게 나타났으며, 특히 BBO균에서 가장 높은 활성을 보였다. 전립선암 세포(LNcaP)와 유방암 세포(MCF-7) 성장 저해능은 BBO균에서 가장 높게 나타났으며 LPS 처리 RAW 264.7세포의 NO생성 억제활성 역시 BBO균에서 가장 높게 나타났다. 이와 같이 산지별 고초균 발효누에 추출물을 비교해본 결과 보은 누에가 건강기능성 식품의 소재로서 활용할 가치가 높은 것으로 사료된다.