

Hepatoprotective Effect of *Bacillus subtilis*-fermented Silkworm (*Bombyx mori* L.) Extract on Non-alcoholic Fatty Liver in Rats

Tae-Hoon Kim^{1†}, Hee-Young Ahn^{1†}, Young-Wan Kim¹, So-Yeon Sim¹, Hyun-Dong Cho², Man-Do Kim³, You-Jung Lee³ and Young-Su Cho^{1*}

¹Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 45746, Korea

³GSP Co., Ltd. #451, Gamcheonhang-ro, Saha-gu, Busan 49455, Korea

Received July 26, 2017 / Revised September 8, 2017 / Accepted September 13, 2017

The aim of this study was to investigate the potential effects of extracts from silkworm *Bombyx mori* L. fermented with *Bacillus subtilis* KACC 91157 at levels of 5%(v/w) and 10%(v/w) in Sprague-Dawley rats intoxicated with 1%(w/w) orotic acid (OA) for 10 days. The rats were divided into a normal group (N), a control group (C: OA), and treatment groups (SP10: OA + 10% extracts from *B. mori* L.; BSP5: OA + 5% extracts from *B. mori* L. fermented with *B. subtilis* KACC 91157; BSP10: OA + 10% extracts from *B. mori* L. fermented with *B. subtilis* KACC 91157). Serum activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine transferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and lactate dehydrogenase (LDH) increased following OA feeding, but the rise was slightly reduced by administration of BSP10. The total lipid, free fatty acid, phospholipid, total cholesterol, and triglyceride contents in serum were significantly lower in the OA treatment groups than in the N group. However, the contents slightly increased following the administration of BSP10. Glutathione concentrations in liver and serum were reduced in the OA-induced fatty liver, but they increased following the administration of BSP10. Hepatocytes in the OA-induced fatty liver contained numerous large droplets. However, SP10, BSP5, and BSP10 feeding prevented OA-induced lipid droplet accumulation in hepatocytes. Accordingly, extracts from silkworm powder fermented with *B. subtilis* could be an ideal material as a dietary supplement in healthy functional foods to improve the effects of fatty liver.

Key words : *Bacillus subtilis*, bioconversion, *Bombyx mori* L., fatty liver, fermentation, orotic acid

서 론

지방간질환은 간에서 관찰되는 대표적 만성 대사 증후군으로 간 조직 내 지방 함량이 증가한 상태를 나타내며 단순 지방 침착에서부터 지방간염까지 다양한 증상이 발현된다[20]. 그 중 비알코올성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease)은 간 조직 내 지방축적이 관찰되나 음주, C형 간염, 약물 등의 특정 원인이 배제되어 발병한 경우를 말한다[13, 24]. 비알코올성 지방간의 발병은 비만, 당뇨, 고지혈증 및 고혈압 등과 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되며 간 세포 내에 지방이 축적되면서 지방대사 및 합성의 불균형을 초래한다[2]. 비알코올성 지방간 환자의 약 20%가 염증을 동반하고 그 중 약 25% 가량은

간섬유화(liver fibrosis) 혹은 간경변(liver cirrhosis)으로 진행되며 최종적으로 말기 간 질환으로 발전하는 것으로 알려져 있다[2]. 최근 식생활의 서구화 및 운동부족으로 인해 국내 비만 인구는 꾸준히 증가하고 있는 추세이며 당뇨와 비만 성인의 60~80%에서 소견을 보이는 비알코올성 지방간 질환에 대한 유병률 또한 높아지고 있는 것으로 보고되었다[17]. 심할 경우에는 간암으로까지 진행될 수 있는 지방간 질환의 완화와 간 경변으로의 진행을 억제하기 위해서는 적절한 운동과 식이 요법이 보조 되어야하며 지방간을 감소시키는 의약품이나 기능성 식품소재 개발에 대한 연구도 요구되는 실정이다.

최근 새로운 생물자원인 식·약용 곤충의 중요성이 조명되면서 곤충 소재 관련 산업 및 연구가 활성화 되고 있다. 국내에서도 기존의 식품공전에 등재된 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*), 누에(*Bombyx mori* L.) 번데기, 백강잠(*Bombyx corpus*), 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충, 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 유충, 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충, 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*) 외에 2017 년에 식품의약품안전처로부터 새로운 식품원료로 굼벵이가 등록되어 총 8 종의 곤충이 식품원료로써 이용 가능한 것으로 알려져 있다. 누에(*Bombyx mori* L.)는 누에나방과에 속하는 유충으로 과거에는

† Authors contributed equally.

*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.

잠사 산업에 주로 이용되어 왔지만 국내 기능성 식품 시장 및 생명과학 기술의 발달로 인해 화장품, 식품, 의료용 소재 등으로도 취급되고 있다 [15]. 누에는 단백질, 유리 아미노산, 단일불포화지방산 혹은 다가불포화지방산, 미네랄, 섬유질 및 deoxynojirimycin 등이 풍부하여 높은 영양학적 가치를 갖는 것으로 평가되며[19, 27], 이에 따른 혈청 중 활성산소 억제 효능[7], 혈당강하 효능[29], 간 독성 예방[28], 고지혈증 개선 [18], 운동능력 향상[32] 등의 연구가 보고되어 있다.

최근 유산균, 효모, 곰팡이 등 유용미생물을 이용한 발효 기술의 진보로 생리활성 효능이 증진된 발효 산물의 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 탄수화물과 단백질 등의 고분자 물질을 저분자 물질로 분해할 수 있는 미생물들은 국내뿐만 아니라 여러 아시아 국가에서도 양조, 발효식품 및 기능성 식품 제조에 광범위하게 이용되고 있다[5, 31]. 특히, 단백질 분해력이 뛰어난 *Bacillus* 속 미생물은 균 증식에 따른 효소 작용으로 고분자 물질 및 미분해성 물질들의 분해를 촉진시킬 수 있으며, Cha 등[5]은 단백질 함량이 높은 누에 분말을 *Bacillus* 속 미생물로 발효시켜 얻은 발효누에에서 항산화, 혈전용해 및 tyrosinase 활성 저해 등의 생리활성 효능이 증가하는 것으로 보고한 바 있다. 본 연구진은 최근 유용 미생물의 종류에 따른 발효 누에의 생리활성 효능을 비교하여 각각의 최적발효조건을 확립하였으며, 같은 종류의 누에 분말일지라도 발효 조건 및 시간에 따라 영양성분 및 효능이 달라질 수 있음을 제시하였다[6]. 하지만 누에 분말에 비해 생산단가, 영양성분 및 생리활성 효능이 비교적 뛰어나 기능성 식품 및 음료분야에서 활용가치가 높은 *Bacillus* 속 미생물로 발효한 누에 분말의 비알코올성 지방간 개선에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 최적발효조건이 확립된 *Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 누에 발효 분말 추출물을 제조하고 비알코올성 지방간이 유도된 흰쥐에게 급여하여 농도 별 지방간 개선효과를 검토하였으며, 비알코올성 지방간증 예방치료를 위한 소재개발의 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

누에분말은 2017년 3월 열풍건조된 분말을 보은누에토종농장(보은, 충북)에서 구입하였다. 발효 균주로는 본 연구실에서 분리, 등록된 단백질 분해능이 우수한 *Bacillus subtilis* KACC 91157 균주[5]를 사용하여 열풍건조누에분말을 발효시켜 시료로 사용하였다. 전 배양 시킨 *Bacillus subtilis* 균주를 살균한 열풍건조 누에 분말에 5%(v/w) 수준으로 접종하여 37°C에서 48시간 발효시킨 후 6시간 동안 열풍 건조하였다. 수용성 추출물은 건조된 발효누에분말 100 g을 취해 10배수의 정제수를 가한 후 37°C 항온수조에서 3시간씩 교반하면서 3회 반복 추

출하였으며 추출액은 Whatman NO.2 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)로 여과한 다음, 감압농축기(Buchi Rotavapor R-215, Flawil, Switzerland)로 50°C에서 농축하여 각각의 용매를 제거시키고 동결건조(Eyela FUD-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)하여 실험동물에 사용하였다.

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.

식이조성 및 사육조건

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 (주대한 바이오링크(충북 음성, 한국)에서 구입하여 일주일 간 시판 고형사료를 급여하면서 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 체중이 동일하게 난괴법(randomized complete block design)으로 분류하여 사육실 온도(22±2°C)와 습도(55±5%) 및 명암주기(명주기 : 07:00~19:00)가 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다. 식이 조성은 Table 1과 같으며, 정상군(N, Normal), 오르틴산(Orotic acid)투여 대조군(C, Control), C + 누에 추출물 투여군 10%(SP10), C + *Bacillus subtilis* 발효 누에 추출물 5% 투여군(BSP5), C+ *Bacillus subtilis* 발효

Table 1. Compositions of experimental diets (%)

Ingredients	N	Orotic acid			
		C	SP10	BSP5	BSP10
Casein	20	20	15	17.5	15
Corn starch	15	15	15	15	15
Sucrose	45	44	39	41.5	39
Cellulose	5	5	5	5	5
Corn oil	10	10	10	10	10
Mineral mixture ¹⁾	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ²⁾	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Orotic acid	0	1	1	1	1
SP	0	0	10	0	0
BSP	0	0	0	5	10
Total (%)	100	100	100	100	100

N : Normal

C : Control, Orotic acid

SP10 : Silkworm extract 10%

BSP5 : *Bacillus subtilis* fermented silkworm extract 5%

BSP10 : *Bacillus subtilis* fermented silkworm extract 10%

¹⁾AIN 93 M-MX mineral mix, MP biomedical, Illkirch, France

²⁾AIN 93 VX vitamin mix, MP biomedical, Illkirch, France

누에 추출물 10% 투여군(BSP10)의 총 5군으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험동물은 각 군마다 6마리씩 나누고, 사육 기간 중 식이 섭취량은 매일 측정하였으며 체중은 처음 시작일과 마지막 실험일에 측정하였다. 본 연구는 동아대학교 동물실험 윤리심의위원회의 승인(승인번호: DIACUC-승인-16-29)을 받아 진행하였다.

동물실험, 시료 채취 및 분석시료 조제

동물실험은 10일간 각 군별로 조제사료를 급여하면서 사육한 후, 실험 최종일 12시간 이상 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 혈액을 채취하고, 약 30분간 실온에 방치시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 얻어 혈청 생화학적 분석에 제공하였다. 채혈 후 각 조직을 적출하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 분석시료로 제공하였다.

혈청 지질농도 및 생화학적 지표분석

혈청 중의 total lipid, total cholesterol, triglyceride, free fatty acid, phospholipid 농도 및 aspartate aminotransferase, alanine transferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase 분석은 의료 전문 수탁 검사기관인 서울의과학연구소(경기도 용인, 한국)와 동남의화학연구소(부산, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

Glutathione 함량 측정

간 조직의 glutathione 함량은 간 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml과 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml을 가하여 혼합하고 원심분리시킨 뒤 상등액 0.3 ml에 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 발색시약을 첨가하여 412 nm 흡

광도에서 측정하여 glutathione의 표준 검량 곡선에 의해 함량을 산출하였으며 간 조직 g 당 mg으로 표시하였다[4].

간 조직의 병리조직학적 관찰

동물해부 직후 적출한 간을 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거시킨 상태에서 조직의 일정한 부위의 일부를 취하여 10% 중성포르말린 용액에 고정하여 통상적인 조직처리인 파라핀 포매 과정을 거쳐 3~4 μm 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 한 후 광학현미경(Olympus BX41, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다[9].

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean ± SE)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다[14].

결과 및 고찰

누에분말의 발효 및 아미노산 함량 변화

누에분말의 조단백질 55~65%, 조지방 9~14% 및 고도불포화 지방산으로 구성되어 있으며, 이중 50% 이상을 차지하는 단백질을 분해시켜 간기능에 효능이 있는 아미노산 및 펩타이드를 얻기 위하여 본 연구실에서 분리, 등록된 단백질 분해능이 우수한 *Bacillus subtilis* KACC 91157 균주로 발효시킨 누에분말에 대한 아미노산 함량 변화를 관찰하였다. 누에분말(SP) 및 고초균 발효누에분말(BSP)의 아미노산 농도(mg/100 g dry matter)는 alanine, glycine, valine, leucine, lysine 순으로 함유되어 있었다(Fig. 1). 누에분말에 비해 고초균 발효누에분말에서 glycine, aspartic acid, glutamic acid를 포함한 대부분의

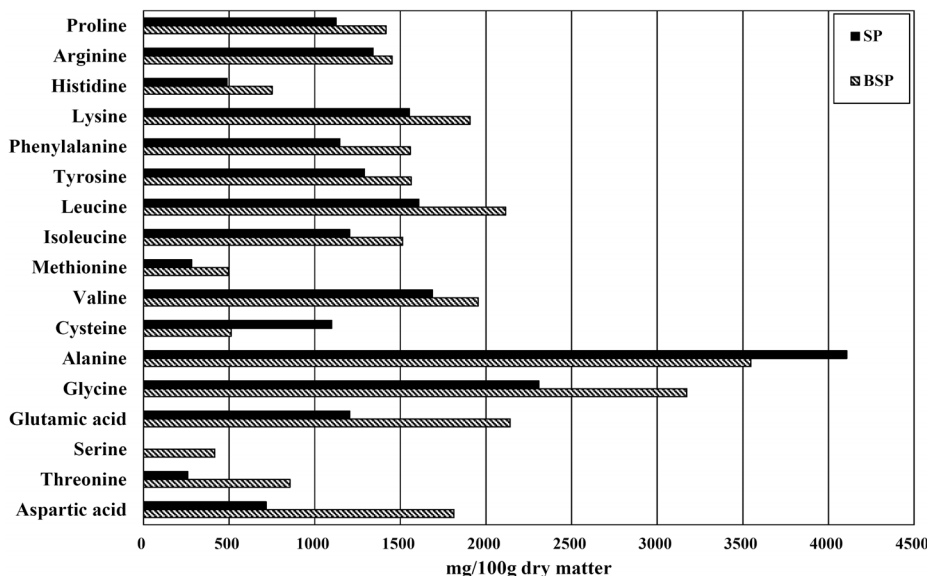


Fig. 1. Compositional amino acids of silkworm powder (SP) and *Bacillus subtilis* fermented silkworm powder (BSP). SP: Silkworm powder, BSP: *Bacillus subtilis* fermented silkworm powder.

아미노산 함량이 모두 증가하였으며, 특히 고초균으로 발효를 진행함으로써 비발효 누에분말에서는 확인할 수 없었던 serine이 0.416 mg/100 g으로 생성됨을 확인하였다. 한편, 알코올성 간 독성 관련 연구에서 glycine, alanine, arginine, serine, aspartic acid 와 같은 단일 아미노산 처리에 의해서도 간 기능 개선효과가 보고 되었으며, 콩나물, 북어, 영지를 시료로 간 보호 효과를 검토한 결과 단백질 함량이 높은 콩나물이 개선 효과가 가장 높았으며, 그 구성 아미노산 조성에서도 arginine, aspartic acid, glutamic acid 가 다량 함유되어 있음을 확인하였다[16, 23]. 따라서 고초균 발효누에분말에는 간 보호 효과가 있는 glycine, alanine, glutamic acid 와 같은 아미노산을 다량 함유하고 있으므로 간 기능 개선 건강보조식품 소재로서의 활용가치가 높을 것으로 여겨진다.

체중, 식이 및 음료 섭취량 변화

Orotic acid는 우유 핵산 중에 많은 비율을 차지하고 있으며, carbamyl phosphate와 aspartic acid 등의 폐환 반응에 의하여 생성된 pyrimidine nucleotide 생합성의 중간생성물로 알려져 있다[26]. 식이 중에 1% 수준으로 첨가하여 흰쥐에 1주일 이상 섭취시켰을 때 간장 중의 중성지방을 이상적으로 축적시켜 지방간을 유발시키는 것으로, 간 독성에는 큰 영향을 미치지 않으면서도 지질대사에는 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 비알코올성 지방간 동물모델로 많이 이용되고 있다[8]. Orotic acid 1% 수준을 첨가하여 지방간을 유도한 흰

쥐에 고초균 발효 누에 추출물 5%(BSP5 군) 및 10%(BSP10 군)이 미치는 영향을 살펴보기 위해 대조군인 누에 추출물 10%(SP10 군)와 함께 10일간 기본식이에 첨가하여 투여하였다. N 군은 32.17 g의 체중이 증가한 것에 비해 C 군은 18.00 g의 체중 증가량을 보이며 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. 이는 orotic acid 투여에 의해 성장에 영향을 미친 것으로 사료되며 식이 섭취량은 N 군에 비해 C 군이 유의적으로 감소하였으나, SP10 군 및 BSP5, BSP10 군에서는 N 군에 비슷한 수준으로 증가하는 경향을 보였다. 음료섭취량은 각 군별로 통계상의 유의적인 차이를 보이지는 않았다(Table 2).

각 장기의 무게

각 장기의 무게는 체중에 대한 상대 중량(%)으로 나타내었으며 Table 3과 같다. 상대적 간 조직의 무게는 N 군 3.81%와 비교할 때 C 군에서 5.81%로 유의적으로 증가하는 수치를 보여 중성지방이 orotic acid에 의해 비정상적으로 축적되어 비알코올성 지방간을 유발 지방간의 대표적인 특성을 확인할 수 있었다. SP10 군 및 BSP5, BSP10 군의 간 조직의 무게는 C 군과 비교해서 유의적으로 감소한 수치를 보여 식이첨가에 의해 지방간 비대 현상을 개선시키는데 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료된다. 한편, 신장, 비장, 심장 조직의 무게는 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았고, 신장 주위 지방에서는 N 군과 C 군 간의 유의적인 차이는 없었지만 SP 및 BSP를 식이 급여 시킴으로서 유의적으로 무게가 증가하는 경향을 확인할 수

Table 2. Changes in body weight, weight gain, food intake and water consumption

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)	Water consumption (ml/day)
N	283.33±0.42 ^a	320.50±4.19 ^a	32.17±2.33 ^a	19.57±0.27 ^a	23.20±0.99 ^a
C	266.50±1.73 ^b	284.50±5.19 ^b	18.00±3.78 ^b	16.63±0.11 ^b	23.37±0.88 ^a
SP10	294.33±1.17 ^c	317.67±3.70 ^a	23.33±3.40 ^{ab}	18.30±0.32 ^c	21.70±0.49 ^a
BSP5	281.83±2.98 ^a	302.83±5.11 ^c	21.00±2.52 ^b	18.07±0.11 ^c	21.53±0.61 ^a
BSP10	284.00±2.91 ^a	315.67±6.36 ^{ac}	31.67±4.53 ^a	18.70±0.35 ^c	21.60±0.68 ^a

Values are mean ± S.E., n=6

Abbreviations are the same as in Table 1.

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

Table 3. Tissue relative weight (% of terminal body weight)

Group	Liver	Kidney	Heart	Spleen	Perimental fat Pad	Epididymal fat Pad
N	3.81±0.22 ^a	0.70±0.02 ^a	0.34±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a	0.39±0.04 ^{ac}	1.56±0.04 ^a
C	5.88±0.30 ^b	0.72±0.01 ^a	0.39±0.03 ^a	0.23±0.01 ^a	0.34±0.03 ^a	1.24±0.07 ^b
SP10	4.94±0.08 ^c	0.72±0.02 ^a	0.35±0.01 ^a	0.22±0.02 ^a	0.56±0.12 ^{ab}	1.28±0.06 ^b
BSP5	5.16±0.15 ^c	0.75±0.02 ^a	0.33±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a	0.79±0.22 ^{bc}	1.21±0.11 ^b
BSP10	4.71±0.19 ^c	0.74±0.02 ^a	0.34±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.88±0.15 ^b	1.26±0.07 ^b

Values are mean ± S.E., n=6

Abbreviations are the same as in Table 1.

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

있었고, 고환 주위 지방은 N 군과 C 군, SP10, BSP5 및 BSP10 투여군들 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

혈중 ALT, AST, LDH 및 ALP 활성 변화

간 손상의 임상적 지표로 사용되고 있는 ALT, AST, LDH, ALP 활성 측정을 통하여 간 기능 효능을 검증한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 혈청 ALT 및 AST 활성은 간 손상으로 인한 간 세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상 지표의 중요한 단서가 된다[3, 10].

ALT, AST 활성은 N 군에 비해 OA 투여군에서 유의적인 증가를 나타내었다. SP10, BSP5 및 BSP10 투여군은 C 군에 비해 ALT, AST 활성이 감소하는 경향을 보였다. AST 활성은 SP 투여군과 BSP 투여군 간의 통계상 유의적인 차이를 보인 반면에, ALT 활성은 유의적인 차이 없이 모두 감소하는 경향을 보였다.

ALP는 인산모노에스테르(phosphomonoester)를 가수분해하는 효소로 체내에 널리 분포하고 있으며 급성 간염, 간암, 부갑상선 기능 항진증 등에 의해 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다[25]. N 군에 비해 C 군, SP10, BSP5 및 BSP10 투여군에서 ALP 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 보였으나, SP10 투여군과 BSP5 및 BSP10 투여군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며, 특히 BSP 투여군에서 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, LDH는 해당계 효소로서 체내 각 조직에 널리 분포하고 있으며 간질환, 악성종양 및 백혈병 등에서 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다[25]. LDH 활성은 C 군에 비해 SP10 투여군, BSP5 및 BSP10 투여군에서 감소하는 경향을 보였으나, 통계상의 유의적인 차이는 없었다.

OA 투여에 의한 효소활성 증가현상은 SP 투여군과 BSP 투여군에서 감소하는 경향을 보였으며, 특히 BSP 투여군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보여 간 손상이 개선되는 것을

보여주었다. 따라서 BSP 투여는 ALT, AST, LDH 및 ALP 활성을 유의적으로 감소시킴으로서 orotic acid 유발 비알코올성 간 질환을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재로 활용할 가능성이 있는 것으로 사료된다.

혈청 지질농도

간은 지질과 지질대사에 관련된 중요한 조직으로 특히 혈중 중성지질 농도 조절과 밀접한 관련성 있다[12, 30]. 혈중 지질 관련인자를 선별하여 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Total lipid, free fatty acid, phospholipid, total cholesterol 및 triglyceride 농도는 N 군에 비해 C 군, SP10, BSP5 및 BSP10 투여군에서 현저히 감소함으로서 이는 간 조직에서 혈중으로 분비되는 지질 운반체 VLDL (very low density lipoprotein)의 분비 저하에 기인하는 것으로 사료된다(Fig. 3). 그러나 SP 및 BSP 투여에 의해 혈중 지질농도의 수준을 증가시킴으로서 간 조직에서 축적되는 지질농도의 수치가 낮아지는 경향을 보여 어느정도 지방간이 개선되는 것을 확인하였다. 특히 BSP10 투여군에서는 total lipid, phospholipid, total cholesterol 및 triglyceride 농도가 SP10 및 BSP5 투여군에 비해 유의적으로 증가된 수치를 나타내어 지질대사에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. 한편, Lee 등[21]의 연구에서는 누에 peptide를 고지방식이 유발 비만쥐에 급여하여 지방형성 억제 효과가 관찰되었다고 보고하였으며, 누에 추출물을 흰쥐에 급여함으로서 당 대사와 지질대사의 개선효과가 보고되어 있다[32].

Glutathione 함량 측정

Glutathione은 L-glutamate, L-cysteine 및 glycine으로 구성된 non-protein thiol tripeptide의 항산화물질로 최근 연구에서 동물 간 조직내 독성 제거 반응을 통한 항산화 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다[10, 11, 22]. 조직내 glutathione 수준은 지질과산화 농도, 활성 유리기 및 산화

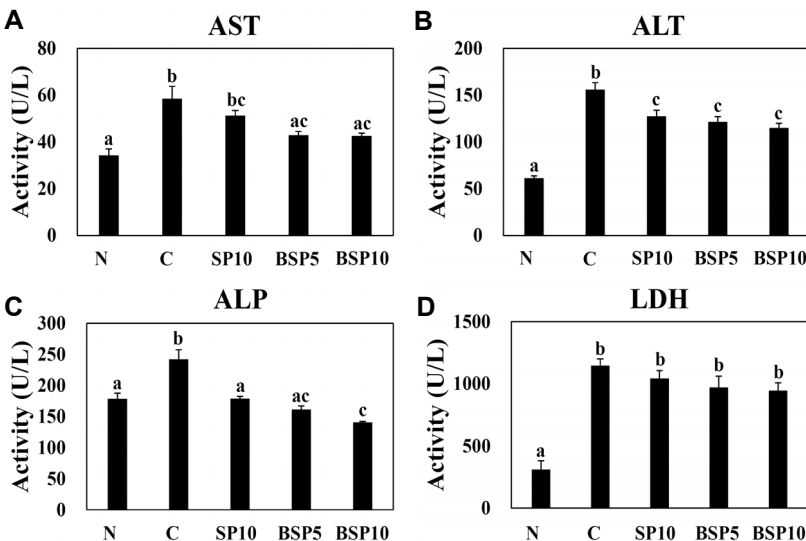


Fig. 2. Effects of SP and BSP on the activities of AST (A), ALT (B), ALP (C) and LDH (D) in orotic acid-induced fatty liver model rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean ± S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at p<0.05.

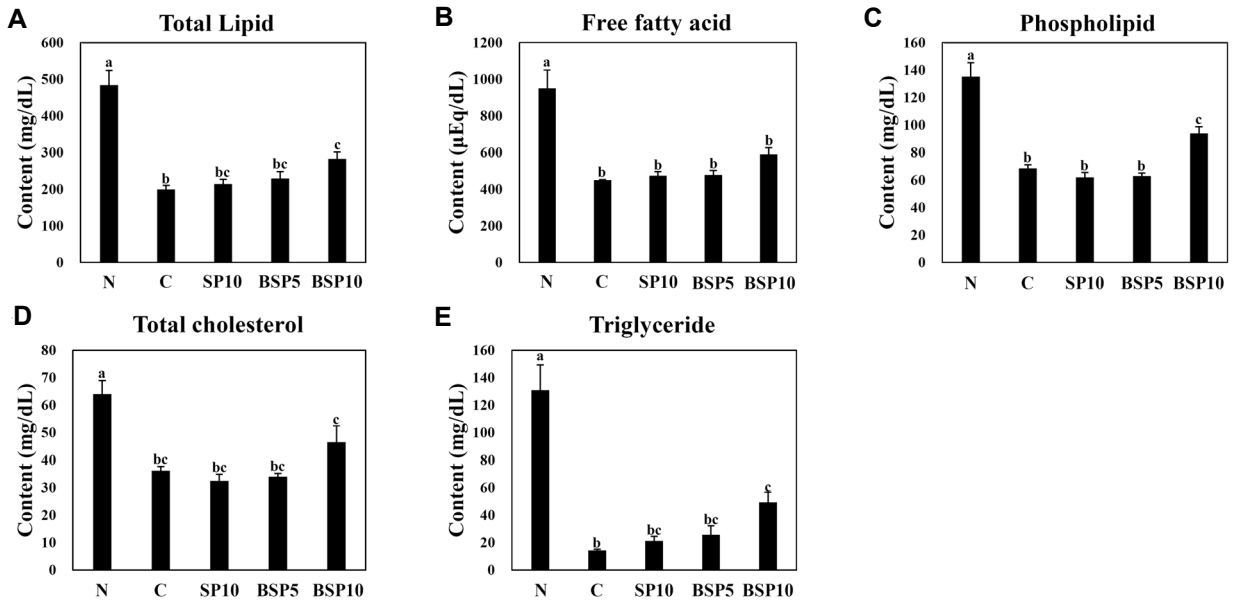


Fig. 3. Effects of SP and BSP on the contents of Total lipid (A), Free fatty acid (B), Phospholipid (C), Total cholesterol (D) and Triglyceride (E) in orotic acid-induced fatty liver model rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean \pm S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at $p < 0.05$.

기의 독성 작용으로부터 세포를 방어하는 항산화 시스템과 밀접한 관련이 있다. 간 조직 내 glutathione 함량은 N 군에서 가장 높은 수치를 나타냈고, C 군에서 가장 낮은 수치를 보였다. SP10 투여군은 C 군과 유사한 수치를 보여 glutathione 함량 변화에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 그러나 BSP 투여군에서는 농도의존적으로 glutathione 함량이 증가했으며, 특히 BSP10 투여군에서는 N 군에 가까운 수치를 나타내어 고초균 발효누에 추출물이 간 조직 내 glutathione 함량 변화에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다(Fig. 4). 한편, 혈중 glutathione 함량 또한 N 군에서 높은 수치를 보였고

C 군에서 낮은 수치를 나타냈다. SP10 투여군에서는 C 군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나 BSP 투여군에서는 농도의존적으로 glutathione 함량이 증가하였으며, BSP10 투여군에서는 N 군에 가까운 수치를 보여 고초균 발효누에 추출물이 혈중 glutathione 함량 변화에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이러한 결과로 보아 일반 누에가 간 조직 및 혈중 glutathione 함량에 큰 영향을 미치지 못하지만 고초균으로 발효시킴으로써 glutathione 함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

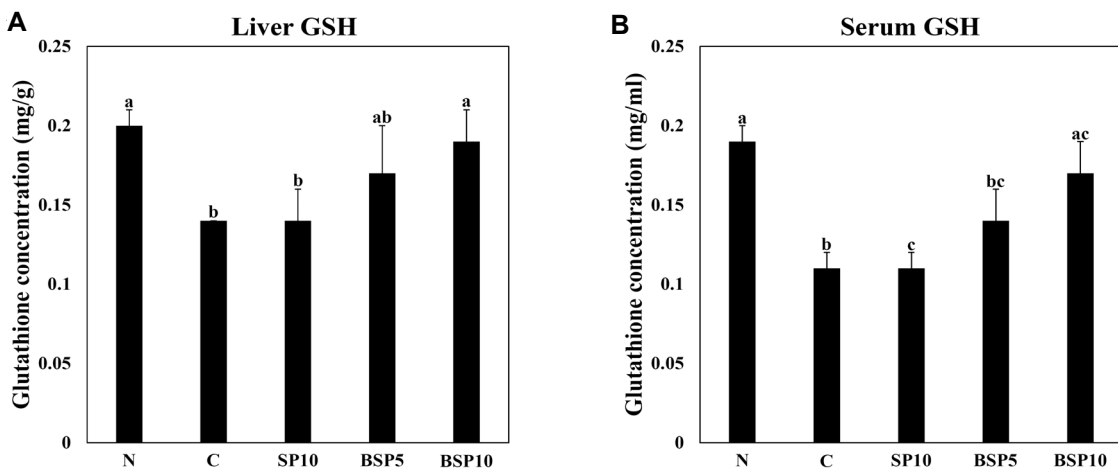


Fig. 4. Effects of SP and BSP on glutathione concentration in the liver (A) and serum (B) of orotic acid-induced fatty liver model rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean \pm S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at $p < 0.05$.

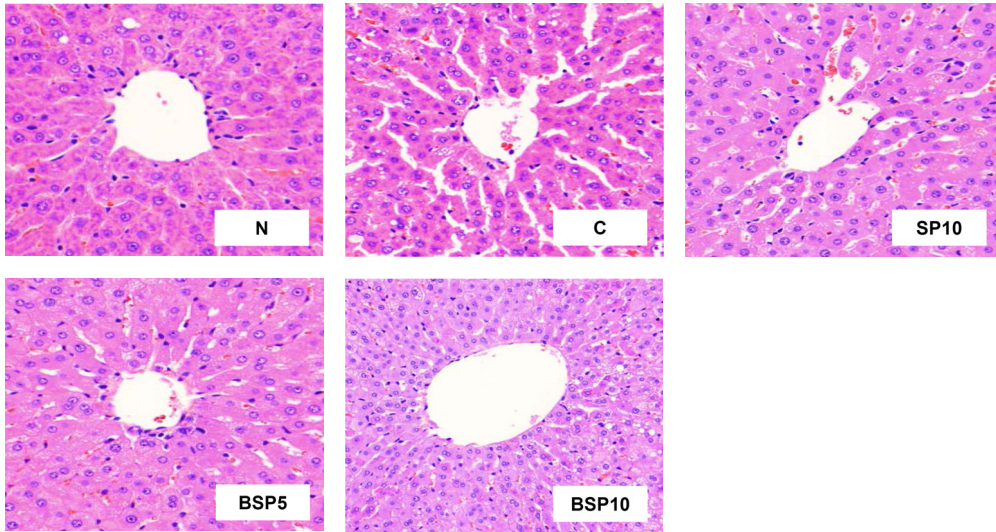


Fig. 5. Effects of SP, BSP5 and BSP10 on the hepatic histopathologic changes in orotic acid feeding rats. The liver section were stained with hematoxylin and eosin (magnification $\times 200$). Abbreviations are the same as in Table 1.

간 조직의 morphology 변화

H&E 염색을 통한 간 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다.

N 군은 간 소엽의 구조가 잘 유지되었으며, 간 세포는 뚜렷한 등근 핵을 가지고 있으면서 그 간격이 일정하고, 세포 간극이 좁은 잘 짜여진 소엽구조를 하고 있었다. C 군, SP10, BSP5 및 BSP10 투여군은 소포성 지방변성이 소엽 중심대에 주로 나타나 있었으며, 간 조직에 전체적으로 지방세포가 균일하게 배열되어 있어 전형적인 지방간 유발이 관찰되었다. 그러나 BSP10 투여군에서는 간 소엽을 구성하고 있는 간 세포들이 전반적으로 균일하게 배열되어 있어 N 군의 간 소엽과 비슷한 양상을 보이며 지방간 개선에 효과가 있는 것으로 보였다. 한편, Ahn 등[1]의 연구에서는 누에분말을 발효시켜 orotic acid 유발 지방간 모델 흰쥐에 급여시킴으로서 지방간 개선효과를 관찰할 수 있었다고 보고하였다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 산업통상자원부의 “R&D 재발견 프로젝트”의 지원을 받아 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다(N0002293).

References

- Ahn, H. Y., Cha, J. Y., Park, K. R., Kim, Y. R. and Cho, Y. S. 2013. Improvement effect of fermented silkworm (*Bombyx mori* L) powder against orotic acid-induced fatty liver rats. *J. Life. Sci.* **23**, 789-795.
- Arog, C. K. and Caldwell, S. H. 2009. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* **13**, 511-531.
- Baldi, E., Burra, P., Plebani, M. and Salvagnini, M. 1993. Serum malondialdehyde and mitochondrial aspartate aminotransferase activity as markers of chronic alcohol intake and alcoholic liver disease. *Ital. J. Gastroenterol.* **25**, 429-432.
- Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B. M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab Clin. Med.* **61**, 882-888.
- Cha, J. Y., Kim, Y. S., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Park, B. K. and Cho, Y. S. 2009. Biological activity of fermented silkworm powder. *J. Life. Sci.* **19**, 1468-1477.
- 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.
- 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.
- Cha, J. Y., Maeda, Y., Oogami, K., Yamamoto, K. and Yanagita, T. 1998. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydase activity in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 508-513.
- Cha, J. Y., Jun, B. S. and Cho, Y. S. 2004. Prevention of orotic acid-induced fatty liver in rats by capsaicin. *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 597-602.
- Cha, J. Y., Kim, H. S., Kang, S. C. and Cho, Y. S. 2009. Alcoholic hepatotoxicity suppression in alcohol fed rats by glutathione-enriched yeast FF-8 strain. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 1411-1416.
- Cha, J. Y., Heo, J. S. and Cho, Y. S. 2008. Effect of zinc-enriched yeast FF-10 strain on the alcoholic hepatotoxicity in alcohol feeding rats. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 1207-1213.

12. Cha, J. Y., Cho, Y. S., Kim, I., Anno, T., Rahman, S. M. and Yanagita, T. 2001. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Human Nutr.* **56**, 349-358.
13. Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Charlton, M. and Sanyal, A. J. 2012. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease. practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Disease, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* **142**, 1592-1609.
14. Duncan, D. B. 1957. Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* **13**, 164-176.
15. 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.
16. 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 in rat liver. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 802-808.
17. Jeong, E. H., Jun, D. W., Cho, Y. K., Choe, Y. G., Rye, S. H., Lee, S. M. and Jang, E. C. 2013. Regional prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in Seoul and Gyeonggi-do. *Korea Clin. Mol. Hepatol.* **19**, 266-272.
18. Kang, P. D., Kim, J. W., Jung, I. Y., Kim, K. Y., Kang, S. W., Kim, M. J. and Ryu, K. S. 2006. Study on the unsaturated fatty acids in the pupae of silkworm, *Bombyx mori*. *Kor. J. Seric. Sci.* **48**, 21-24.
19. 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.
20. Kim, N. H. 2013. The analysis of non-pharmacological intervention study for nonalcoholic fatty liver disease: intervention types and measurement parameters. *J. Kor. Biol. Nurs. Sci.* **15**, 43-53.
21. Lee, S. H., Park, D. S., Yang, G. E., Bae, D. K., Yang, Y. H., Kim, T. K., Kim, D. J., Kyung, J. B., Yeon, S. H., Koo, K. C., Lee, J. Y., Hwang, S. Y., Joo, S. S. and Kim, Y. B. 2012. Silk and silkworm pupa peptides suppress adipogenesis in preadipocytes and fat accumulation in rats fed a high-fat diet. *Eur. J. Nutr.* **51**, 1011-1019.
22. Li, Y. G., Ji, D. F., Chen, S. and Hu, G. Y. 2008. Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. *Alcohol Alcohol.* **43**, 246-253.
23. Yin, M., Ikejima, K., Arteel, G. E., Seabra, V., Bradford, B. U., Kono, H. and Rusyn, I. and Thurman, R. G. 1998. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1014-1019.
24. Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C. and McCullough, A. J. 1999. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* **116**, 1413-1419.
25. Park, Y. M., Lim, J. H., Lee, J. E. and Seo, E. W. 2015. Protective effect of semisulcospira libertine extract on induced hepatitis in rats. *J. Life Sci.* **25**, 539-547.
26. Pottenger, L. A. and Getz, G. S. 1971. Serum lipoprotein accumulation in the livers of orotic acid fed rats. *J. Lipid Res.* **12**, 450.
27. Rumpold, B. A. and Schluter, O. K. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 802-803.
28. 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.
29. 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.
30. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. 1978. A novel fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experimentia* **43**, 1110-1111.
31. Tsukahara, M., Shinzato, N., Tamaki, Y., Namihira, T. and Matsui, T. 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.
32. Yang, S. J., Kim, C. Y., Lee, J. B., Kang, S. S. and Lee, J. J. 2013. The effects of the mulberry and silkworm intake on androgen receptor mRNA and myogenic regulatory factors expression of rats muscle for resistance exercise. *J. Seric. Entomol. Sci.* **51**, 99-106.
33. Yoon, J. W., Lee, S. G. and Lee, K. B. 2005. Effects of silkworm extract powder on plasma lipids and glucose in rat. *Kor. J. Food Nutr.* **18**, 140-145.

초록 : 고초균 발효누에 추출물이 비알코올성 지방간 유발 흰쥐에 미치는 간 기능 개선 효과

김태훈^{1*} · 안희영^{1*} · 김영원¹ · 심소연¹ · 조현동² · 김만도³ · 이유정³ · 조영수^{1*}

(¹동아대학교 생명공학과, ²경북대학교 식품공학과, ³쥬지에스피)

누에 분말에 단백질 분해력이 뛰어난 *Bacillus subtilis* KACC 91157 균주를 이용하여 Orotic acid-유발 지방간의 개선 효과를 알아보기 위해 발효누에 추출물을 식이에 5%, 10% 수준으로 각각 첨가하였다. 발효누에 추출물은 orotic acid 지방간 유발 흰쥐의 간 기능 생화학적 지표로 이용되는 AST, ALT, ALP 및 LDH 활성을 감소시켜주고, 혈청 지질농도를 정상 수준으로 회복시켜주어 지방간 개선에 도움을 주었다. 또한 지방간 유발로 저하된 glutathione 농도를 증가시켜주는 것을 확인할 수 있었다. 간 조직의 병리학적 관찰 결과 SP10 투여군과 BSP5 투여군에 비해 BSP10 투여군에서 간 소엽을 구성하는 간 세포들이 전반적으로 균일하게 배열되어 정상군의 간 소견과 비슷한 양상을 보여 지방간 개선에 효과가 있는 것으로 보였다. 이러한 결과 보아 고초균 발효누에 추출물은 지방간 개선효과를 가지는 건강기능식품 소재로서 활용 가능성이 높은 것으로 사료되어 진다.