

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

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 February 5, 2018 / Revised March 19, 2018 / Accepted March 20, 2018

The aim of this study was to investigate the potential effects of extracts from silkworm (*Bombyx mori* L.) that was fermented with *Bacillus subtilis* KACC 91157 at the levels of 1%(v/w), 2.5%(v/w), and 5%(v/w) in alcohol-fed rats. Sprague-Dawley rats were divided into seven groups: normal group (N), alcohol treated group (C), silymarin treated group (PC, positive control), 5% silkworm powder treated group (SP5), 1% *Bacillus subtilis*-fermented silkworm powder treated group (BSP1), 2.5% BSP treated group (BSP2.5), and 5% BSP treated group (BSP5). The activities of AST, ALT, ALP, and LDH in the serum and the triglyceride concentrations in the liver and serum were increased by alcohol feeding but were reduced in the BSP5 group. In addition, the contents of total lipids, free fatty acids, and total cholesterol were increased in the alcohol-fed group but were reduced in the BSP5 group. The activities of ADH, ALDH and ADH, ALDH protein levels in the liver were increased in the BSP5 group. The TBARS contents in the liver, serum, liver mitochondria, and liver microsomes were slightly decreased in the BSP5 group compared to the C group. The hepatocytes in alcohol-fed rats contained numerous large droplets; however, BSP5 treatment prevented alcohol-induced lipid droplet accumulation in the hepatocytes. Based on these results, extracts from *Bacillus subtilis*-fermented silkworm (*Bombyx mori* L.) have significant potential for development into a functional health food that can improve alcoholic fatty liver conditions.

**Key words** : Alcoholic fatty liver, *Bacillus subtilis*, *Bombyx mori* L., fermentation

### 서 론

알코올성 지방간은 과도한 알코올 섭취로 인해 중성지방이 간 조직 내에 축적되는 질환이다. 알코올은 체내 당 대사 및 지질대사에 영향을 미쳐 간세포의 NADH/NAD<sup>+</sup>의 비율과 지방 합성에 필요한 전구체를 증가시켜 중성지방의 합성을 증가시키고 분해는 감소시킨다. 또한, 과잉 생성된 acetaldehyde는 간세포 내 주요 단백질과 지질의 기능을 저하시켜 단백질 합성 감소 및 중성지방 축적을 유도하여 간세포의 손상을 일으키고, 지속적인 알코올 섭취 시 지방간에서 간 경변, 간암으로까지 진행되기도 한다[16].

누에나방과(Bombycidae)에 속하는 누에(*Bombyx mori* L.)는 약 5천년전 중국에서 최초로 사육되기 시작하여 한국, 일본 등지에서 생사 생산을 위해 오늘날까지 이용되고 있는 유용 곤충 중 하나로, 최근 인조 견사의 등장으로 실용성과 비용 측면에서 경쟁력을 잃게 되어 섬유 재료 이외에 식품, 화장품,

의료용 소재 등의 기능성 소재로의 연구가 시도되고 있다[29, 34]. 누에는 단백질, 지방산, 필수 아미노산 및 n-3 계열의 고도 불포화 지방산 등의 함량이 높아 간 기능 개선, 혈액순환 등과 관련된 건강기능식품의 소재로서 가능성이 제시되고 있다[10, 36].

최근 발효식품의 기능성분 및 생리활성이 알려지면서 발효 식품에 대한 세계적인 관심이 집중되고 있다[3]. 발효는 유용 미생물이 당질을 이용하여 알코올, 유기산, CO<sub>2</sub> 등의 산물을 생성하는 것으로 식품의 발효는 독성물질 파괴, 소화성 증진, 가용성 성분 함량 증가, 생리활성 물질 생성 및 가수분해효소의 생성 등 영양학적인 가치가 높다[28]. 고초균(*Bacillus subtilis*)은 호기성균으로 다양한 가수분해 효소를 생산하며 주로 콩 발효식품에 이용되고 있다. 청국장은 대표적인 고초균 발효식품 중 하나로, 발효과정을 거치면서 고초균에 의해 탄수화물 및 단백질 가수분해 효소, 혈전 용해 효소, 기능성 펩타이드 및 고분자 점질물 등의 생리활성 물질을 생성한다[20]. 이중 고분자 점질물은 고초균의 대사물질 중 하나로 glutamic acid의 중합체인  $\gamma$ -polyglutamic acid (PGA)와 과당의 중합체인 levan으로 구성되어 있다[35]. 특히 PGA는 미생물 고분자 물질로서 면역증진, 항암 등의 생리활성 기능을 가지고 있으며 식품, 화장품, 의약품 등으로 응용되고 있는 기능성 소재이다[31].

Yoon [34] 등의 연구에 따르면 누에 추출 분말을 흰 쥐에

#### \*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.

급여시켜 당 대사와 지질대사에 대한 개선효과를 보고한 바 있으며, Ahn [1] 등은 *Bacillus subtilis* 균주와 *Aspergillus kawachii* 균주로 발효하여 얻은 발효누에 분말을 orotic acid-유발 지방간 모델 흰 쥐에 급여하여 지방간 개선효과를 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 최적발효조건이 확립되어 있는 *Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 농도별 발효누에 추출물을 제조하고, 알코올 급여 흰 쥐에 급여하여 알코올성 간 손상에 대한 개선효과를 검토하고자 하였다.

**재료 및 방법**

**실험재료**

누에분말은 2017년 3월 열풍 건조된 분말을 보은누에토종 농장(충북 보은, 한국)에서 구입하였다. 발효 균주는 본 연구실에서 분리·등록한 단백질 분해능이 우수한 *Bacillus subtilis* KACC 91157 균주[27]를 사용하여 열풍 건조 누에분말을 발효시켜 사용하였다. 전 배양시킨 *Bacillus subtilis* 균주를 살균한 열풍 건조 누에분말에 5%(v/w) 수준으로 접종하여 30℃에서 72시간 발효시킨 후 8시간 동안 열풍 건조하였다. 수용성 추출물은 건조된 발효누에 분말 100 g을 칭량하여 10배수의 정제수를 가한 후 37℃ 항온수조에서 3시간씩 교반하면서 3회 반복 추출하였으며 추출액은 Whatman NO.2 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)로 여과한 다음, 감압농축기(Buchi Rotavapor R-215, Flawil, Switzerland)로 50℃에서 농축하여 용매를 제거시키고 동결건조(Eyela FUD-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)하여 실험동물에 사용하였다.

**식이조성 및 사육조건**

실험동물은 5주령의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰 쥐를 (주)대 한바이오링크(충북 음성, 한국)에서 구입하여 일주일 간 시판 고형 사료를 급여하면서 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 체중이 동일하게 난괴법(randomized complete block design)으로 분류하여 사육실 온도(22±2℃)와 습도(55±5%) 및 명암주기(명주기: 07:00~19:00)가 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다. 식이조성은 Table 1과 같으며, 정상군(N, Normal), 알코올 투여 대조군(C, Control), 알코올+누에 추출물 5%(v/w) 투여군(SP5), 알코올+발효누에 추출물 1%(v/w) 투여군(BSP1), 알코올+발효누에 추출물 2.5%(v/w) 투여군(BSP2.5), 알코올+발효누에 추출물 5%(v/w) 투여군(BSP5) 과 간 기능 개선제로 알려진 silymarin을 식이 중에 0.1%(v/w) 농도로 투여한 양성 대조군(PC, Positive control)의 총 7 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험동물은 각 군마다 6마리씩 나누고, 사육 기간 중 식이 섭취량은 매일 측정하였으며 체중은 매주 한번씩 일정한 시간에 측정하였다. 이 때 알코올 투여는 실험동물에서 알코올에 의한 급성 독성을 막기 위해 알코올 농도를 처음 10%로 시작하여 최종 30% 농도로 1주일마다 단계적으로 높여 본 실험을 시작하면서 시료를 병용하였다. 본 연구는 동아대학교 동물실험윤리심의위원회의 승인(승인 번호: DIACUC-승인-16-29)을 받아 진행하였다.

**동물실험, 시료 채취 및 분석 시료 조제**

동물실험은 4주 간 각 군별로 조제사료를 급여하면서 사육한 후, 실험 최종일 12시간 이상 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 혈액을 채취하고, 약 30분 간 실온에 방치시킨 후 3,000 rpm에

Table 1. Compositions of experimental diets

Ingredients	N	Alc					
		C	PC	SP5	BFSP1	BFSP2.5	BFSP5
Casein	20	20	19.9	20	20	20	20
Corn starch	15	15	15	15	15	15	15
Sucrose	45	45	45	40	44	42.5	40
Cellulose	5	5	5	5	5	5	5
Corn oil	10	10	10	10	10	10	10
Mineral mixture <sup>1)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
vitamin mixture <sup>2)</sup>	1	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
SP	0	0	0	5	0	0	0
BSP	0	0	0	0	1	2.5	5
Silymarin	0	0	0.1	0	0	0	0
Total	100	100	100	100	100	100	100

N: Normal, C: Control, PC: Silymarin, SP5: Silkworm extract 5%, BSP1: *Bacillus subtilis* fermented silkworm extract 1%, BSP2.5: *Bacillus subtilis* fermented silkworm extract 2.5%, BSP5: *Bacillus subtilis* fermented silkworm extract 5%.

<sup>1)</sup>AIN 93 M-MX mineral mix, MP biomedical, Illkirch, France.

<sup>2)</sup>AIN 93 VX vitamin mix, MP biomedical, Illkirch, France.

서 20분 간 원심분리하여 얻은 혈청을 혈청 생화학적 분석에 제공하였다. 채혈 후 각 조직을 적출하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 분석 시료로 제공하였다.

#### 혈청 지질농도 및 생화학적 지표분석

혈청 중의 total lipid, total cholesterol, HDL-cholesterol, free fatty acid, phospholipid, total protein, albumin 농도 및 AST, ALT, ALP, LDH 활성은 의료 전문 수탁 검사기관인 서울의과학연구소(경기도 용인, 한국)와 동남의화학연구소(부산, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

#### 혈중 alcohol 및 acetaldehyde 농도 측정

혈청에 함유된 alcohol 및 acetaldehyde 농도는 시판용 R-Biopharm 사의 UV-Test kit (Darmshadt, Germany)를 이용하여 측정하였다. 즉, 혈중 alcohol 농도는 NAD와 phosphate buffer (pH 9.0) 3 ml 혼합액에 혈청 0.1 ml를 첨가한 후 약 3분 간 반응하여 340 nm 흡광도를 측정하고, 혼합액에 ADH 0.05 ml를 첨가하여 20°C에서 10분 간 incubation시켜 340 nm 흡광도에서 생성된 NADH 농도에 따른 흡광도의 변화를 관찰하였다. 이 때 혈액 중의 alcohol 농도는 표준용액을 이용하여 계산하였다.

혈중 acetaldehyde 농도는 NAD와 phosphate buffer (pH 9.0) 3 ml 혼합액에 혈청 0.2 ml를 첨가한 후 약 3분 간 반응하여 340 nm 흡광도를 측정하고, 혼합액에 ALDH 0.05 ml를 첨가하여 20~25°C에서 5분간 반응시켜 흡광도 340 nm에서 생성된 NADH의 농도에 따른 흡광도의 변화를 관찰하였다. 이 때 혈액 중의 acetaldehyde 농도는 표준 용액을 이용하여 계산하였다.

#### 간 조직의 분획 조제

간 조직으로부터 homogenate 분획 조제는 간을 일정량 취해 ice-cold potassium phosphate buffer 용액(0.1 M/L potassium phosphate containing 1mM/L sodium EDTA and 1 mM/L dithiothreitol, pH 7.4)을 9배량 첨가하여 IKA-ULTRA-TURRAX T25 basic homogenizer (IKA-WERKEGMBH & Co., KG, Staufen, Germany)를 이용하여 균질액을 제조하였다. Homogenate 용액을 먼저 800x g에서 10분 간 원심분리하고, 상등액을 다시 고속원심분리기(VS-24SMTi, Vision Scientific Co., Ltd.)에서 10,000x g으로 20분 간 원심분리하여 침전된 pellet은 mitochondria 분획으로 하였다. 이 때 microsome이 함유된 상등액은 105,000x g에서 60분 간 초원심분리하여 상층의 cytosol 분획과 침전된 microsome 분획을 얻어 실험에 사용하였다. Homogenate, mitochondria, microsome 분획의 단백질 농도는 Bradford 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다[6].

#### ADH 및 ALDH 효소 활성 측정

간 조직 유래의 ADH 활성은 Bergmeyer의 방법[5]을 변형하여 340 nm 흡광도에서 NADH의 생성속도를 측정하였다. 즉, 반응액 조성은 증류수 1.5 ml, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) 0.75 ml, 20 mM NAD<sup>+</sup> 0.3 ml, ethanol 0.3 ml, 효소원 0.15 ml를 cuvette에 넣고 총 3 ml이 되도록 조절하여 30°C에서 5분 간 pre-incubation 시킨 후, 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 간 조직 유래의 ALDH 활성은 Koivula [19] 등의 방법을 약간 변형하여 acetaldehyde에서 acetate를 생성하는 효소로 NAD로부터 NADH를 생성하는 원리를 이용하였다. 즉, 반응액의 조성은 증류수 2.2 ml, 1.0 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 0.3 ml, 20 mM NAD<sup>+</sup> 0.1 ml, 1.0 M acetaldehyde 0.1 ml, 3.0 M KCl 0.1 ml, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 ml, 효소원 0.1 ml를 총 3 ml이 되도록 조절하여 cuvette에 넣고 30°C에서 5분 간 pre-incubation한 후, 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

#### Western blot 분석

정량된 ADH 및 ALDH 효소 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 각 well 당 100 µg을 loading하여 전기영동하였다. 분리된 단백질은 300 mA의 조건으로 4°C에서 16시간 동안 nitrocellulose membrane으로 충분히 transfer하였다. 이 membrane을 blocking agent인 5% skim milk로 1시간 동안 실온에서 non-specific binding protein을 blocking한 후, TBST buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)로 세척하였다. Blocking 시킨 membrane을 primary 및 secondary antibody로 반응시킨 후 TBST buffer로 세척하였다. Primary antibody는 세척된 membrane에 ADH (diluted 1:4000, Cell signaling)와 goat anti-rabbit IgG (diluted 1:4000, Cell signaling)으로 incubation 시켰다. Nitrocellulose membrane 상의 단백질은 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate의 image analysis 방법으로 검출하였다. 각각 반응된 ADH 및 ALDH protein band의 상대적 density는 densitometer(Lumi-Imager F1, Roche, Siwzerland)로 정량하였다.

#### 과산화지질 측정

분획한 homogenate, mitochondria 및 microsome 생체막의 과산화지질 함량은 TBARS 방법[26]에 준하여 측정하였다. 단백질 1 mg을 함유한 분획 용액 1 ml에 각각 TBA (thiobarbituric acid) 시약 2 ml를 가하여 잘 혼합하고, 끓는 물에서 30분 간 반응시킨 뒤 실온에서 방냉하여 3,000 rpm으로 10분 간 원심분리한 후 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Glutathione 함량 측정

각 조직의 glutathione 함량은 조직 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml과 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를

가하여 혼합한 후 원심분리 시킨 뒤 상등액 0.3 ml에 5,5'-di-thios (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 발색시약을 첨가하여 412 nm 흡광도에서 측정하였으며, glutathione의 표준 검량 곡선에 의해 함량을 산출하여 조직 g당 mg으로 표시하였다[33].

**간 조직의 병리조직학적 관찰**

해부 직후 적출한 간을 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거시킨 상태에서 조직의 일정한 부위의 일부를 취하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 통상적인 조직처리인 파라핀 포매 과정을 거쳐 3~4 μm 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색한 후 광학현미경(Olympus BX41, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다[8].

**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[11].

**결과 및 고찰**

**체중, 식이 및 음료 섭취량 변화**

각 군의 체중 변화량과 식이 및 음료 섭취량은 Table 2와 같다. 정상군과 알코올 급여군의 체중 증가량을 비교하였을 때 알코올 급여군은 정상군에 비해 체중이 유의적으로 증가하는 경향을 나타내지 않았다. 이는 알코올 섭취가 성장에 영향을 미친 것으로 사료되며, 식이 섭취량 및 음료 섭취량 역시 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 한편 알코올은 소장에서의 영양소 및 식이성분의 흡수를 방해하여 영양 불균형을 초래함으로써 체중 증가량의 감소를 가져온다고 보고된 바 있다 [12].

**각 장기의 절대중량**

알코올 섭취 시 알코올의 독성으로 인해 간 경변이 초래되고 간세포의 cytosol에 지방, 단백질 등이 축적되어 세포 용적이 증가됨에 따라 간 비대 현상이 나타나는 것으로 보고된 바 있다[23].

각 군의 장기 무게는 Table 3과 같다. 간 조직의 무게는 N 군과 비교하였을 때 알코올 투여군에서 유의적으로 증가하는 경향을 보여 알코올 투여에 의한 알코올성 지방간 유발되었음을 확인할 수 있었다. C 군은 13.87 g을 나타내어 가장 높은 수치를 보였으며 SP 및 BSP 투여군에서 간 조직의 무게가 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 BSP5 군에서는 11.32 g의 무게를 보이며 PC 군과 비슷한 수준의 무게를 나타

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	252.75±2.46 <sup>a</sup>	419.63±5.07 <sup>a</sup>	166.88±3.56 <sup>a</sup>	18.91±0.12 <sup>a</sup>	23.48±1.74 <sup>a</sup>
C	267.17±1.35 <sup>b</sup>	410.33±9.57 <sup>ac</sup>	143.17±8.63 <sup>ab</sup>	16.32±0.28 <sup>b</sup>	17.47±0.87 <sup>b</sup>
PC	256.33±1.82 <sup>a</sup>	409.50±7.97 <sup>ac</sup>	153.17±7.34 <sup>ac</sup>	15.66±0.39 <sup>bd</sup>	13.69±1.29 <sup>bc</sup>
SP5	265.50±1.41 <sup>b</sup>	404.50±8.45 <sup>ac</sup>	139.00±8.64 <sup>bc</sup>	14.97±0.34 <sup>cd</sup>	14.08±0.57 <sup>bc</sup>
BSP1	264.00±2.70 <sup>b</sup>	399.50±12.18 <sup>ab</sup>	135.50±9.85 <sup>bc</sup>	14.80±0.51 <sup>cd</sup>	15.72±1.98 <sup>bc</sup>
BSP2.5	253.33±2.28 <sup>a</sup>	371.17±12.52 <sup>b</sup>	117.83±10.83 <sup>b</sup>	14.00±0.70 <sup>c</sup>	12.74±1.01 <sup>c</sup>
BSP5	257.00±0.82 <sup>a</sup>	389.83±10.32 <sup>bc</sup>	132.83±9.59 <sup>bc</sup>	14.20±0.50 <sup>c</sup>	13.01±0.77 <sup>c</sup>

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 absolute weight in alcohol feeding rats

Group	Liver	Kidney	Heart	Spleen	Testis	Perimental fat Pad	Epididymal fat Pad
N	10.17±0.18 <sup>a</sup>	2.58±0.06 <sup>a</sup>	1.35±0.02 <sup>a</sup>	0.82±0.02 <sup>a</sup>	3.58±0.09 <sup>a</sup>	9.25±0.71 <sup>a</sup>	9.47±0.48 <sup>a</sup>
C	14.68±0.04 <sup>b</sup>	2.72±0.08 <sup>ab</sup>	1.23±0.02 <sup>bc</sup>	0.79±0.05 <sup>a</sup>	3.63±0.07 <sup>a</sup>	5.47±0.68 <sup>b</sup>	5.36±0.41 <sup>b</sup>
PC	10.75±0.22 <sup>ae</sup>	2.80±0.07 <sup>ab</sup>	1.30±0.04 <sup>ac</sup>	0.79±0.03 <sup>a</sup>	3.59±0.08 <sup>a</sup>	7.65±1.17 <sup>ab</sup>	7.30±0.59 <sup>c</sup>
SP5	13.24±0.17 <sup>c</sup>	2.95±0.08 <sup>b</sup>	1.25±0.02 <sup>ab</sup>	0.86±0.06 <sup>a</sup>	3.98±0.10 <sup>b</sup>	5.90±0.79 <sup>b</sup>	5.86±0.65 <sup>bc</sup>
BSP1	12.08±0.38 <sup>d</sup>	2.78±0.14 <sup>ab</sup>	1.25±0.03 <sup>ab</sup>	0.75±0.05 <sup>a</sup>	3.79±0.17 <sup>ab</sup>	5.95±0.97 <sup>b</sup>	6.19±0.44 <sup>bc</sup>
BSP2.5	11.62±0.32 <sup>de</sup>	2.57±0.08 <sup>a</sup>	1.18±0.04 <sup>b</sup>	0.76±0.03 <sup>a</sup>	3.62±0.12 <sup>a</sup>	6.01±0.45 <sup>b</sup>	6.42±0.56 <sup>bc</sup>
BSP5	10.82±0.50 <sup>ae</sup>	2.63±0.09 <sup>a</sup>	1.18±0.05 <sup>b</sup>	0.78±0.05 <sup>a</sup>	3.68±0.07 <sup>ab</sup>	6.45±0.74 <sup>ab</sup>	6.60±0.54 <sup>bc</sup>

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.

내었다. 신장, 심장, 비장 및 고환의 무게는 각 군마다 수치상의 유의적인 차이를 보이지 않았으며 신장 주위 지방과 고환 주위 지방은 정상군에서 높은 수치를 보였으나 알코올 투여군에서는 낮은 수치를 보여 알코올 투여에 따라 정상적인 지질 대사가 이루어지지 않은 것으로 사료된다.

**혈중 AST, ALT, ALP 및 LDH 활성 변화**

간 손상의 임상지표로 알려진 AST, ALT, ALP 및 LDH 활성을 Fig. 1에 나타내었다. 혈중 AST 및 ALT 활성은 간세포 손상 시 간세포에 장애 또는 괴사가 진행되어 AST 및 ALT가 혈중으로 유리됨에 따라 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다 [30]. AST 및 ALT 활성은 정상군에 비해 알코올 투여군에서 유의적으로 높은 활성을 보였으며 이는 알코올 투여로 인한 간 손상에 기인하는 것으로 사료된다. 한편 BSP 투여군은 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 보였으며 특히 BSP5 군에서 가장 낮은 활성을 보여 고초균 발효누에 추출물의 급여가 알코올성 간 손상에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

ALP는 간, 뼈, 백혈구, 장, 태반 등에 널리 분포하고 있으며 간염, 간 경변 등을 포함하는 모든 간 질환에서 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다[17]. ALP 활성 또한 정상군에 비해 알코올 투여군에서 활성이 유의적으로 증가하였으며 BSP 투여군에서 농도에 의존적으로 활성이 감소하여 BSP5 군에서는 정상군에 가까운 수치를 나타내어 간 기능 개선에 긍정적인 영향을 준 것으로 사료된다. 한편, 해당계 효소로서 급성 간염, 간암 등에서 활성이 증가하는 것으로 알려진 LDH [15] 또한 정상군에 비해 알코올 투여군에서 활성이 유의적으로 증가하여 알코올 독성에 의한 간 독성을 확인하였으며 BSP 투여군에

서 농도의존적으로 감소하는 경향을 보여 알코올성 간 손상에 긍정적인 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 고초균 발효누에 추출물은 알코올성 간 손상에 대한 개선효과를 가지는 것으로 확인할 수 있었다.

**간 조직 및 혈중 중성지질 농도 변화**

간은 지질대사에 있어서 중요한 역할을 하는 조직으로 알려져 있으며, 간 조직 내 중성지질 대사와 혈중 중성지질 농도는 상관관계가 높은 것으로 알려져 있다[7]. 한편 알코올은 간 조직 내 triglyceride 형태로 지방 축적을 일으키는 것으로 알려져 있으며, Kim [18] 등에 의하면 알코올 투여에 의해 간 조직 내 중성지질 축적이 일어나는 것을 확인하기 위해 흰 쥐에 3 g/kg의 용량으로 알코올을 급여시킨 결과 수 시간 내에 간 조직 내 중성지질의 수준이 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서는 간 조직 및 혈중 중성지질 농도가 정상군과 비교하였을 때 알코올 투여군에서 유의적으로 증가하여 알코올성 지방간이 유발된 것을 확인할 수 있었다. 특히 BSP 투여군에서 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 보였으며, 특히 BSP5 군에서는 중성지질 농도가 정상군과 비슷한 수준으로 감소하여 고농도의 발효누에 추출물에 의해 알코올성 지방간이 어느정도 개선되는 것으로 생각할 수 있다.

한편 알코올 섭취는 혈중 중성지질 농도 또한 증가시키는 것으로 알려져 있으며[25], 본 연구 결과에서도 이와 같은 경향을 나타내었다(Fig. 2). 혈중 중성지질 농도는 C 군에서 가장 높은 수치를 보였으며 이는 알코올성 간 손상에 의한 지질대사 이상에 기인하는 것으로 사료된다. 양성 대조군인 PC 군은 혈중 중성지질 농도가 유의적으로 감소하여 정상군과 비슷한

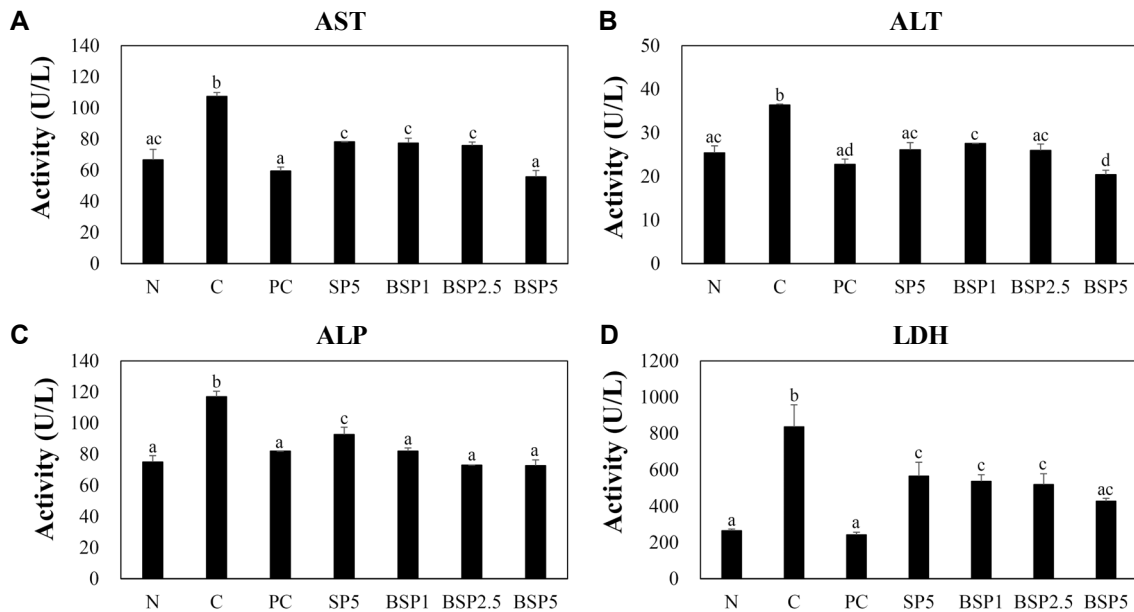


Fig. 1. Effects of SP and BSP on the activities of AST (A), ALT (B), ALP (C) and LDH (D) in alcohol feeding rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean ± S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at p<0.05.

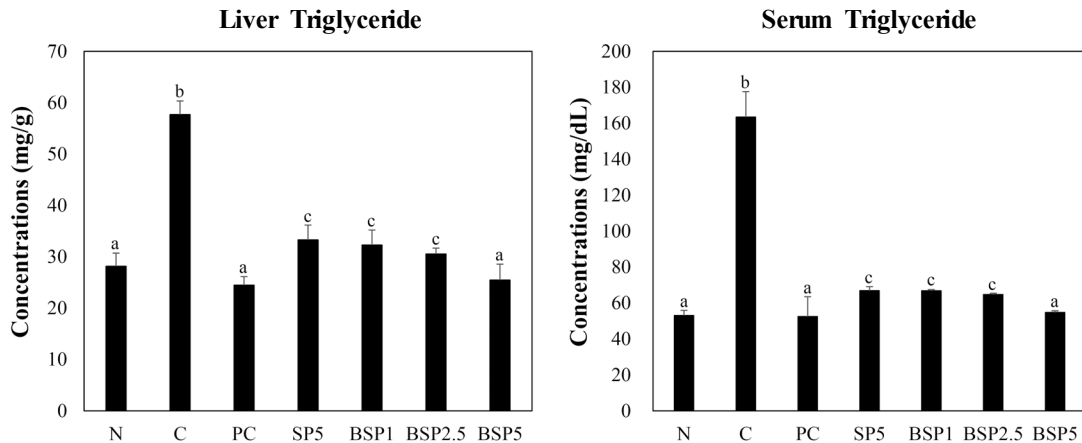


Fig. 2. Effects of SP and BSP on the concentrations of triglyceride in liver and serum in alcohol feeding rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean ± S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at  $p < 0.05$

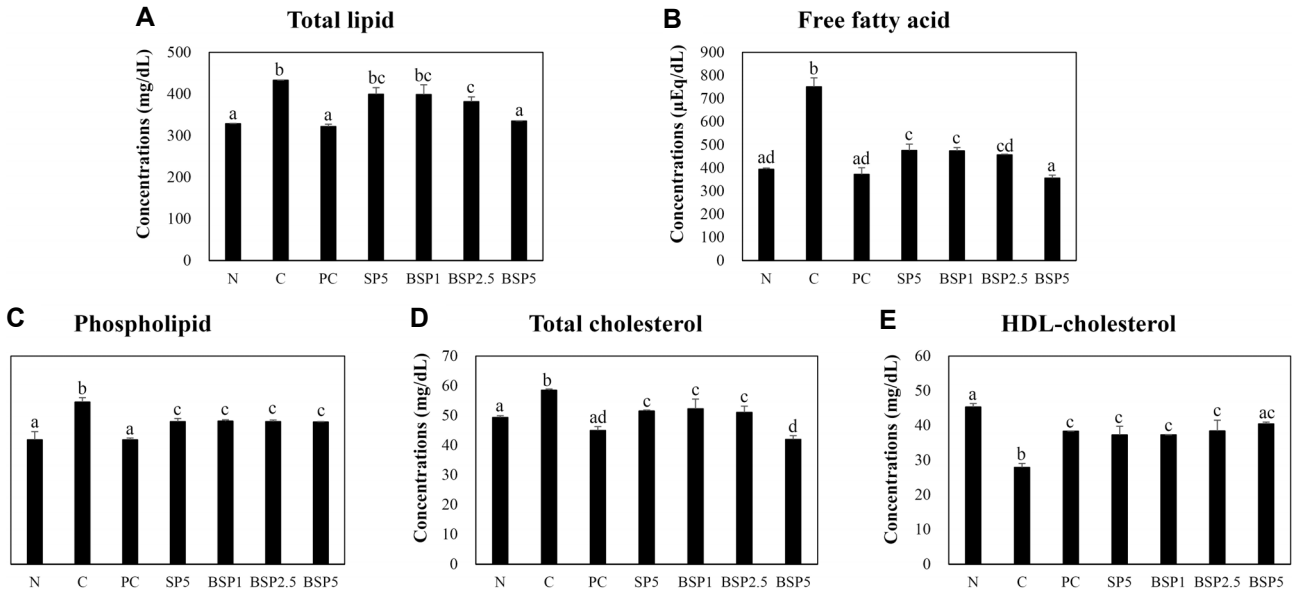


Fig. 3. Effects of SP and BSP on the concentrations of Total lipid (A), Free fatty acid (B), Phospholipid (C), Total cholesterol (D) and HDL-cholesterol (E) in alcohol feeding rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean ± S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at  $p < 0.05$

수준의 수치를 보였다. 또한 SP 및 BSP 투여군에서도 혈중 중성지질 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 BSP5 군에서는 정상군, PC 군과 비슷한 수준의 수치를 보여 혈중 중성지질 농도 감소에 효과적인 것을 알 수 있었다.

**혈중 지질 농도 변화**

혈중 지질농도는 심혈관계 질환의 진단 지표로 사용되고 있으며, 고콜레스테롤혈증, 고중성지질혈증 등도 심혈관계 질환의 위험 인자로 주목받고 있는 추세이다[25].

혈중 총 지질 농도는 혈중 중성지질 농도와 유사한 경향을 나타내었다. 정상군에 비해 알코올 투여군에서 수치가 유의적으로 증가하였으며, SP 및 BSP 투여군에서는 혈중 총 지질

농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 특히 BSP 투여군은 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 보였으며 BSP5 군에서는 정상군에 가까운 수치를 보였다. 또한 혈중 유리지방산의 농도 역시 정상군에 비해 알코올 투여군에서 높은 수치를 보였으며 SP 및 BSP 투여군 모두 C 군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 이를 통해 혈중 총 지질 농도와 혈중 유리지방산의 농도는 혈중 중성지질 농도와 상관관계가 높은 것으로 사료된다. 또한 혈중 총 콜레스테롤 농도 역시 정상군에 비해 알코올 투여군에서 높게 측정되었으며 SP 및 BSP 투여군에 의해 유의적으로 수치가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 BSP5 군에서는 가장 낮은 수치를 보여 고농도의 발효누에 추출물이 혈중 총 콜레스테롤 감소에 긍정적인 영향을 미치는

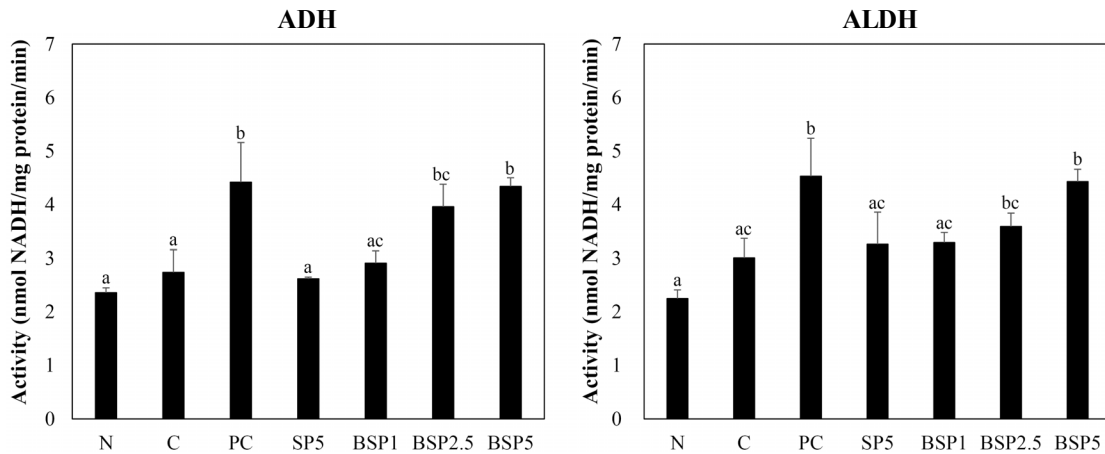


Fig. 4. Effects of SP and BSP on the activities of hepatic alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) in alcohol feeding rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean  $\pm$  S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at  $p < 0.05$

것으로 사료된다. 이 중 HDL-콜레스테롤은 동맥경화 수준의 지표로서 주로 간 조직에서 합성되며 혈관 내 침착된 LDL-콜레스테롤을 분리 및 간 조직으로 운반하여 에너지로 이용 또는 체외 배출을 촉진함으로써 심혈관계 질환의 유발을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다[13]. 혈중 HDL-콜레스테롤 농도는 정상군과 비교하여 알코올 투여군에서 낮게 측정되었다. SP 및 BSP 투여군에서는 C 군에 비해 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며 특히 BSP5 군에서는 정상군과 비슷한 수준의 수치를 나타내었다. 따라서 고초균 발효누에 추출물이 혈중 지질농도 개선에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

**혈중 alcohol 및 acetaldehyde 농도 변화**

알코올과 알코올의 대사산물인 acetaldehyde는 음주 후 숙취의 주요 원인 물질로 강력한 독성을 가지고 있어 생체 내 활성 아민류와 축합반응을 통해 간 손상의 주요 원인으로 작용하며 ALDH에 의해 대사되어 acetic acid를 생성한 후 이산화탄소와 물로 가수분해 되어 완전히 분해된다[21]. 알코올에 의한 간 독성은 ADH에 의해 환원된 형태의 hepatic nicotinamide adenine dinucleotide 및 acetaldehyde의 과도한 생성이 주요 원인인 것으로 알려져 있으며[24], acetaldehyde의 독성에 따른 미토콘드리아의 기능저하로 간 경변, 심장 및 뇌 기능저하 등이 보고되어 있다[14].

혈중 알코올 농도는 정상군에서는 검출되지 않았으나, 알코올 투여군에서 모두 검출되었다. 혈중 알코올 농도는 정상군에 비해 알코올 투여군에서 유의적으로 증가하였으며 SP 및 BSP 투여에 따라 감소하는 경향을 보였다. 또한 혈중 acetaldehyde 농도 역시 혈중 알코올 농도와 유사한 경향을 나타내었다(Table 4). 혈중 acetaldehyde 농도는 정상군에 비해 알코올 투여군에서 유의적으로 높은 수치를 보였으나 BSP 투여로 인해 감소하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 고초균 발효누에

에 추출물을 급여함으로써 혈중 알코올 및 acetaldehyde가 유의적으로 감소하였으며, 이는 고초균 발효누에 추출물 급여에 따라 ADH 및 ALDH 활성이 증가하는 것에 기인하는 것으로 사료된다.

**간 조직 ADH 및 ALDH 활성 변화**

체내로 들어온 알코올은 대부분 소화기관에서 흡수된 후 간에서 대사되어 분해되는데, 지속적인 알코올의 섭취는 영양소 흡수장애, 간 기능 손상 등을 초래한다. 알코올은 간세포 내 ADH (alcohol dehydrogenase)와 cytochrome P-450에 의해 acetaldehyde로 분해되고, ALDH (aldehyde dehydrogenase)에 의해 acetic acid를 생성한 후 이산화탄소와 물로 가수분해 되어 완전한 분해가 이루어진다. 또한 만성적 알코올 섭취에 따른 알코올 중독 시에는 MEOS (microsomal ethanol oxidizing system)에 의해 acetaldehyde가 생성되고, 생성된 acetaldehyde는 혈액을 통해 각 조직으로 운반되어 에너지 대사에 이용될 수 있으나, 간 조직 내에서 지방산 합성에 주로

Table 4. Effects of SP and BSP on the serum concentrations of alcohol and acetaldehyde in alcohol feeding rats

Group	Serum alcohol (mg/100 ml)	Serum acetaldehyde (mg/100 ml)
N	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	3.41 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>
C	0.05 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	8.26 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
PC	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>ac</sup>	3.99 $\pm$ 1.87 <sup>ac</sup>
SP5	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>bc</sup>	6.09 $\pm$ 0.15 <sup>bc</sup>
BSP1	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	5.88 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>
BSP2.5	0.02 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	5.87 $\pm$ 0.62 <sup>ab</sup>
BSP5	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	5.24 $\pm$ 0.44 <sup>ac</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E., n=6  
 Abbreviations are the same as in Table 1.  
 Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

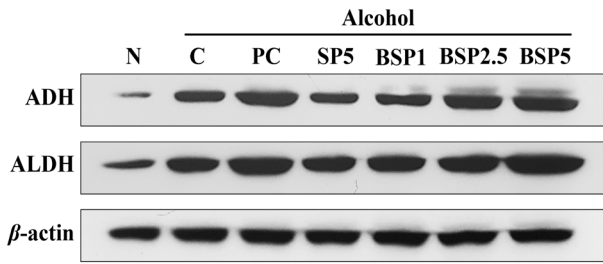


Fig. 5. Effects of SP and BSP on the activities of hepatic ADH and ALDH western blot analysis in alcohol feeding rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are different letters are significantly different at  $p < 0.05$

이용됨으로써 지방간의 원인이 되기도 한다[14, 19].

간 조직의 ADH 활성을 측정된 결과, 정상군과 C 군은 ADH 활성에 차이를 보이지 않았으나, BSP 투여군에서는 유의적으로 활성이 증가한 것으로 나타났다(Fig. 4). ALDH 활성 측정 결과 역시 ADH 활성과 비슷한 경향을 보였다. 정상군에 비해 C 군에서 약간의 활성 증가를 보였으며, PC 군, SP 및 BSP 투여군에서는 ALDH 활성이 유의적으로 증가하였다. 따라서 고농도의 발효누에 추출물이 알코올 급여 흰 쥐의 간 조직 내 ADH 및 ALDH 활성을 유의적으로 증가시키는 것으로 생각되며 알코올 급여 흰 쥐의 혈중 알코올 및 acetaldehyde 농도가 감소하는 결과를 어느정도 뒷받침 해주는 것으로 보여진다.

ADH 및 ALDH 단백질 발현량을 측정하여 Fig. 5에 나타내

었다. 정상군에서 가장 낮은 발현량을 보였으며 PC 군에서 가장 높은 발현량을 나타내었다. 또한 BSP5 군에서 PC 군과 유사한 수준의 단백질 발현량을 보이며 ADH 및 ALDH 효소 활성과 단백질 발현량이 상관관계가 높은 것을 알 수 있었다. 따라서 알코올 급여 흰 쥐에 고초균 발효누에 추출물을 병용하였을 때 알코올 대사와 관련된 ADH 및 ALDH 효소 활성과 단백질 발현량이 유의적으로 증가하여 양성 대조군과 유사한 수준을 나타내었으며 이러한 결과로 보아 고초균 발효누에 추출물은 간 조직 내 알코올 대사에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

**과산화지질 농도 변화**

생체 내 과산화지질은 독성 화합물 또는 약물에 의한 간 손상 유발에 있어 가장 중요한 인자로서 세포 내 유리 라디칼 생성의 증가 및 항산화력의 감소로 인해 증가하며, 다양한 퇴행성 질환의 주요 인자로 보고되어 있다[22]. 또한 간 독성의 지표로 사용되고 있는 혈중 AST 및 ALT 활성 등과 같이 간 독성의 지표로 사용되고 있다[4].

TBARS 법을 이용하여 조직 내 과산화지질 함량을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 간 조직의 과산화지질 농도는 정상군에 비해 알코올 투여군에서 유의적으로 높은 함량을 보여 알코올 급여에 의한 알코올성 지방간이 유발된 것으로 사료된다. 또한 SP 및 BSP 투여군에서 과산화지질 농도가 감소하는 경향을 보였으며 특히 BSP5 군에서는 가장 낮은 수치를 보여 고농도의 고초균 발효누에 추출물을 급여함에 따라 알코올성 간 손

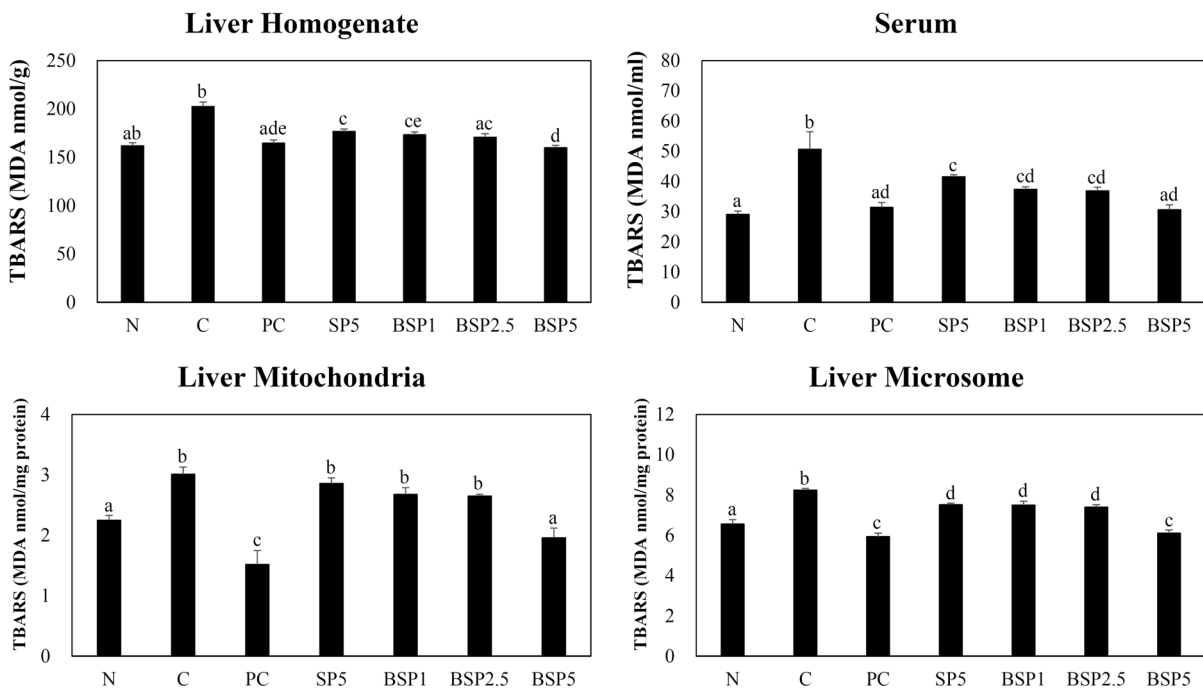


Fig. 6. Effects of SP and BSP on the TBARS concentrations in the hepatic fractions and serum of alcohol feeding rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean  $\pm$  S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at  $p < 0.05$



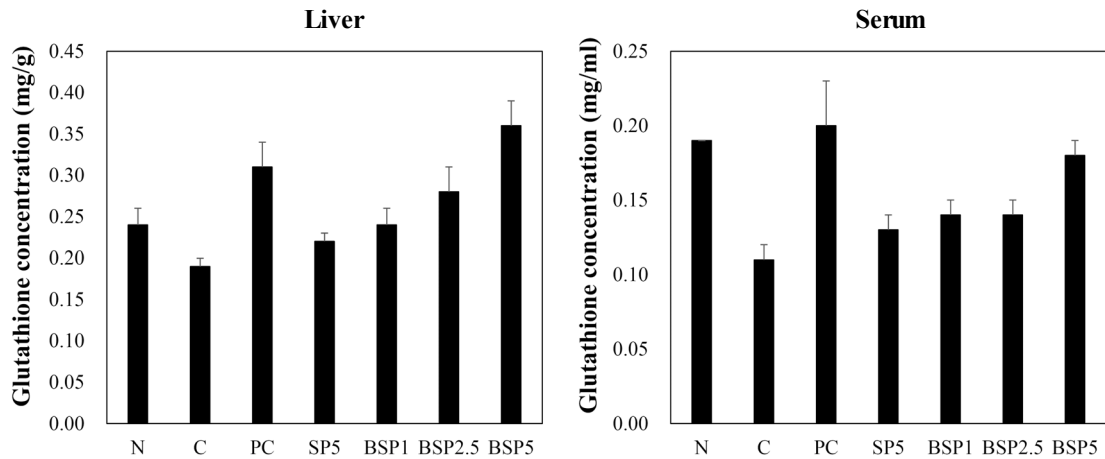


Fig. 7. Effects of SP and BSP on glutathione concentration in the liver and serum of alcohol feeding rats. Abbreviations are the same as in Table 1. Values are mean  $\pm$  S.E., n=6. Values are different letters are significantly different at  $p < 0.05$

상이 어느정도 개선된 것으로 사료된다. 혈중 과산화지질 농도 역시 간 조직의 과산화지질 농도와 비슷한 경향을 보였다. 알코올 급여로 인해 증가된 과산화지질 농도는 SP 및 BSP 투여군에서 유의적인 차이를 나타내지 않아 농도에 의존적인 경향을 볼 수 없었으나 BSP5 군에서는 정상군과 비슷한 수준까지 과산화지질 농도의 감소 경향을

보여 고초균 발효누에 추출물의 급여가 혈중 과산화지질 농도에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 또한 간 조직의 mitochondria와 microsomes의 과산화지질 농도 역시 유사한 경향을 나타내었다. 한편 알코올성 간 독성 모델 흰 쥐에 *Monascus Purpureus* 균주를 이용한 발효당귀를 급여하였을 때 알코올 투여 대조군에 비해 과산화지질 농도가 감소하였으며, 비발효 당귀 급여군과 비해서도 유의적으로 감소하는 경향을 보여 당귀를 발효함으로써 과산화지질 함량 감소에

개선효과가 있는 것으로 보고되었다[2]. 본 연구에서도 이와 유사한 결과를 나타내었으며 고초균 발효누에 추출물을 급여함으로써 알코올성 간 손상 모델 흰 쥐의 조직 내 과산화지질 함량 감소에 개선효과를 가지는 것으로 사료된다.

**Glutathione 함량 변화**

L-glutamate, L-cysteine 및 glycine으로 구성된 non-protein tripeptide 항산화 물질인 glutathione은 간 조직 내 독성 제거 반응에 의한 체내 항산화 작용에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[9]. 또한 조직 내 glutathione 농도는 과산화지질, 활성 유리기 및 산화기 등의 작용으로부터 세포를 방어하는 항산화 작용과 상관관계가 높다. 흰 쥐에서 알코올 급여를 하였을 때 간 조직 및 혈중 glutathione 농도가 저하되었으나, SP 및 BSP 투여로 인해 glutathione 농도가 회복되는

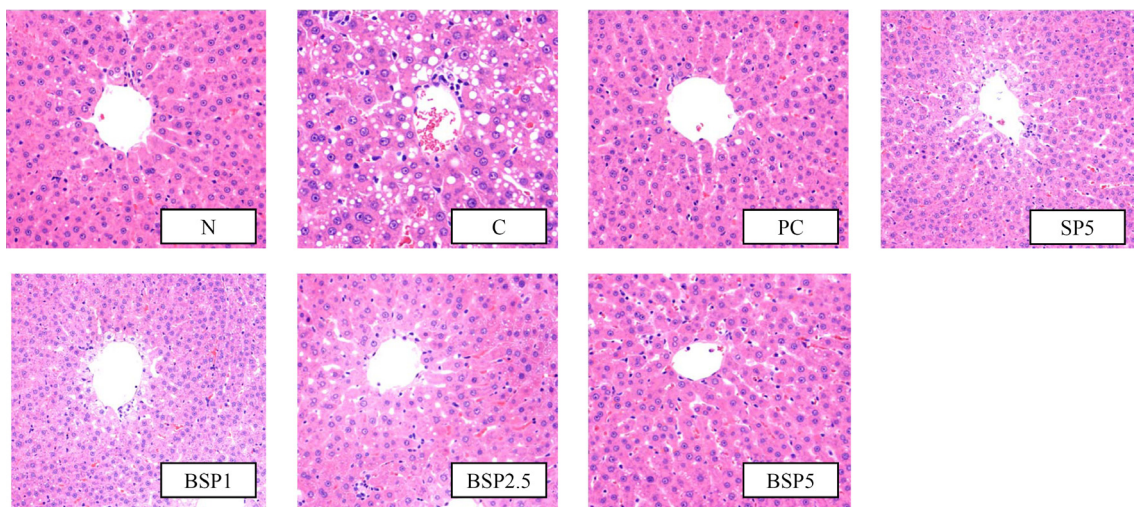


Fig. 8. Effects of SP and BSP on the hepatic histopathologic changes in alcohol feeding rats. The liver section were stained with hematoxylin and eosin (magnification  $\times 200$ ). Abbreviations are the same as in Table 1.

것으로 확인되었다(Fig. 7). BSP 투여군에서는 농도에 의존적으로 glutathione 농도가 회복되었으며 특히 BSP5 군은 간 조직 및 혈중 glutathione 농도가 정상군과 유사한 수준으로 회복되어 고초균 발효누에 추출물이 알코올 투여로 인한 간 조직 및 혈중 glutathione 농도 감소의 회복에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. 한편 glutathione 고함유 효모를 알코올성 간 손상 동물모델 흰 쥐에 급여하여 간 손상 회복에 대한 개선효과가 보고된 바 있다[9].

**간 조직의 morphology 변화**

지방간은 과도한 알코올 섭취로 인한 간 손상 유발의 초기 단계로 간세포내 산소나 영양분 등의 불균형을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 간세포 내 지방 입자는 지방간이 유발됨에 따라 지방구의 수와 부피가 증가한다[32]. 실험동물을 해부한 직후 간 조직을 적출하여 병리학적 검사를 실시한 결과, 정상군에서는 간 소엽의 구조가 잘 유지되어 있었으며, 간세포는 둥근 핵을 가지고 규칙적으로 배열되어 있었다(Fig. 8). 알코올 투여 대조군은 간세포 내 지방구의 수와 크기가 증가하여 알코올성 지방간의 유발이 일어난 것을 확인하였다. 이러한 현상은 SP 및 BSP 투여군에서 개선되는 경향을 보였으며, 특히 BSP5 군에서는 정상군과 유사한 간 소엽을 보이며 알코올성 간 손상에 대한 개선효과를 가지는 것으로 사료된다.

이러한 결과로 보아 고초균 발효누에 추출물을 알코올성 간 손상 모델 흰 쥐에 급여하였을 때 혈중 간 기능 지표 효소 활성의 감소, 간 조직 및 혈중 중성지방 농도 개선, 조직 내 과산화지질 농도 개선 등의 효과를 보여 알코올성 간 손상에 대한 개선효과를 가지는 건강기능식품의 소재로서 활용할 가치가 높은 것으로 사료된다.

**감사의 글**

본 연구는 2018년도 동아대학교 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

**Refernces**

1. Ahn, H. Y., Cha, J. Y., Park, K. 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.
2. Ahn, H. Y., Park, K. R., Kim, Y. R., Yoon, K. H., Kim, J. W. and Cho, Y. S. 2013. Effects of *Monascus*-fermented *Angelica gigas* Nakai on the contents of serum lipid and tissue lipid peroxidation in alcohol feeding rats. *J. Life Sci.* **23**, 1371-1380.
3. Ann, Y. G. 2011. [Lactic acid bacteria] Probiotic lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Nutr.* **24**, 817-832.
4. Baldi, E., Burra, P., Plebani, M. and Salvagnini, M. 1993. Serum malonaldehyde and mitochondrial aspartate amino-

- transferase activity as markers of chronic alcohol intake and alcoholic liver disease. *Ital. J. Gastroenterol.* **25**, 429-432.
5. Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Grassl, M. 1974. Methods of enzymatic analysis. Vol. 2, Samples, reagents, assessment of results. *Verlag Chemie.*
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
7. 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 phosphohdrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Human Nutr.* **56**, 349-358.
8. 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.
9. 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.
10. Cho, C. H., Cha, W. S. and Kim, J. S. 1989. Effect of temperature, time and pH on the extraction of protein in a chrysalis of silkworm. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**, 65-68.
11. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **11**, 1-42.
12. Faulkner, P., Mendenhall, C. L., Bradford, R. H. and Furman, R. H. 1969. Effect of ethanol on glycerolipid metabolism in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 501-509.
13. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. and Dawber, T. R. 1977. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham Study. *Am. J. Med.* **62**, 707-714.
14. Helander, A. and Tottmar, O. 1988. Effect of acute ethanol administration on human alcohol aldehyde dehydrogenase activity. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **12**, 643-646.
15. Ki, H. Y., Song, S. W., Ha, C. S. and Han, S. S. 1993. Effects of the population density on growth and various physiological values of Sprague-Dawley rats. *Kor. J. Lab Ani. Sci.* **9**, 71-82.
16. Kim, J., Choi, I. W. and Noh, S. K. 2014. Protective effect of Citrus unshiu peel extract on ethanol-induced fatty liver in rats. *J. Kor. Soc Food Sci. Nutr.* **43**, 187-193.
17. Kim, K. A. 2009. Understanding and application of liver function tests. *Kor. J. Med.* **76**, 163-168.
18. Kim, M. H. and Kwon, O. H. 1992. Relationship of hepatic triglyceride accumulation by ethanol to activities of lipogenic enzymes in rat liver. *Kor. Biochem. J.* **25**, 499-505.
19. Koivula, T., Koivusalo, M. and Lindros, K. O. 1975. Liver aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1807-1811.
20. Kim, Y. S., Gwon, J. S., Gwon, G. S., Son, H. Y. and Gwon, H. Y. 2004. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from Chungkook-jang and fermentational characteristics of JB-1. *Kor. J. Microbial Biotechnol.* **32**, 291-296.

21. 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 determinant in rat liver. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 802-808.
22. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**, 464-478.
23. Lieber, C. S. 1985. Alcohol and the liver: metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury. *Acta Med. Scand. Suppl.* **703**, 11-55.
24. Lieber, C. S. 1994. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* **106**, 1085-1105.
25. Mannunen, V., Tenkanen, L., Koskinen, P., Huttunen, J. K., Manttari, M., Heinone, O. P. and Frick, M. H. 1992. Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart study. Implications for treatment. *Circulation* **85**, 37-45.
26. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
27. 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.
28. Park, K. Y. 2012. Increased health functionality of fermented foods. *Food Ind. Nutr.* **17**, 1-8.
29. Park, S. W., Choi, G. H., Goo, T. W., Kim, S. R. and Kang, S. W. 2011. Characterization of the promoter controlling the stage-specific gene expression of *Bombyx mori*. *J. Life Sci.* **21**, 1466-1472.
30. Plaa, G. L. and Hewitt, W. R. 1989. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. Principles and methods of toxicology. Raven press, New York, 339.
31. Shin, I. L., Van, Y. T. and Chang, Y. N. 2002. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 213-220.
32. Shon, M. Y., Cha, J. Y., Lee, C. H., Park, S. H. and Cho, Y. S. 2007. Protective effect of administrated glutathione-enriched *saccharomyces cerevisiae* FF-8 against carbon tetrachloride(CCl<sub>4</sub>)-induced hepatotoxicity and oxidatives stress in rats. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 967-974.
33. Woolliams, J. A., Wiener, G., Anderson, P. H. and McMurray, C. H. 1983. Improved method for the determination of blood glutathione. *Res. Vet. Sci.* **34**, 253-256.
34. Yoon, J. W., Lee, S. G. and Lee, K. B. 2005. Effects of silkworm extract powder on plasma lipid and glucose in rat. *Kor. J. Food. Nutr.* **18**, 140-145.
35. Youn, H. K., Choi, H. S., Hur, S. H. and Hong, J. H. 2001. Antimicrobial activities of viscous substance from Chongkukjang fermented with *Bacillus sp.* *J. Fd. Hyg Safety* **16**, 188-193.
36. Yun, E. Y., Kim, S. H., Kang, W. S., Jin, B. R., Kim, K. Y., Kim, H. R., Han, M. S. and Kang, S. K. 1997. Molecular cloning and expression of the novel attacin-like antibacterial protein gene isolated from the *Bombyx mori*. *Kor. J. Appl. Entomol.* **36**, 331-340.

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

김태훈 · 안희영 · 김영완 · 심소연 · 서권일 · 조영수\*

(동아대학교 생명공학과)

본 연구는 누에 분말을 단백질 분해력이 뛰어난 *Bacillus subtilis* KACC 91157 균주로 발효하여 얻은 발효누에 추출물(BSP)을 식이 중에 각각 1%, 2.5%, 5% 수준으로 첨가하여 알코올 투여와 함께 4주 동안 흰쥐에 급여한 후 알코올성 지방간 개선에 미치는 영향을 검토하고자 하였다. 알코올 급여로 인해 증가된 혈중 AST, ALT, ALP 및 LDH 활성은 BSP5군에서 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 발효누에 추출물은 간 조직 및 혈중 중성 지질 농도를 정상 수준으로 회복시켜주고, 간 조직 내 ADH, ALDH 활성 증가에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 조직 내 과산화지질 함량을 측정해본 결과 BSP5군에서 유의적으로 감소시켜주는 것을 확인할 수 있었다. 간 조직의 병리학적 관찰 결과 알코올 투여 대조군은 간세포 내 지방구의 수와 크기가 증가하였으나 BSP 투여군에서 유의적으로 지방구가 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과로 보아 고초균 발효누에 추출물은 알코올성 지방간에 대한 개선효과를 가지는 건강기능식품 소재로서 활용할 가능성이 높은 것으로 사료된다.