

Physicochemical Properties and Biological Activities of *Protaetia brevitarsis seulensis* Larvae Fermented by Several Kinds of Micro-organisms

So-Yeon Sim, Hee-Young Ahn, Kwon-Il Seo and Young-Su Cho*

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

Received February 23, 2018 / Revised March 20, 2018 / Accepted March 21, 2018

In this study, the biological activities of aqueous, ethanol, and methanol extracts of larvae of the edible insect *Protaetia brevitarsis seulensis*, fermented using several kinds of microorganisms, were tested in *in vitro* experimental models. Six effective microorganisms were used for fermentation, namely *Lactobacillus plantarum* JBMI F3, *Lactobacillus plantarum* JBMI F5, *Lactobacillus gasseri* Ba9, *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023, and *Bacillus subtilis* KACC 91157. Biological activities (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl [DPPH] free radical scavenging activity, reducing power, and fibrinolytic activity), and biochemical properties (phenolic compounds and flavonoids) were examined in aqueous, ethanol, and methanol extracts from *P. brevitarsis seulensis* powder and fermented *P. brevitarsis seulensis* powder. The total phenolic compounds and flavonoid contents were highest in the aqueous extract of *B. subtilis*-fermented *P. brevitarsis seulensis* powder. DPPH radical scavenging activity and reducing power were stronger in the fermented group than the nonfermented group. Fibrinolytic activity were highest in the extract from *B. subtilis*-fermented *P. brevitarsis seulensis* powder. The α -amylase activity in starch was higher in the fermented group than the nonfermented group, but there was no significant difference. These results provide basic data to understand the biological activities of bioactive materials derived from fermented *P. brevitarsis seulensis* larvae for the development of functional foods.

Key words : Antioxidative activity, edible insect, fermentation, larvae, *Protaetia brevitarsis seulensis*

서 론

전세계적으로 거저리, 굼벵이 및 번데기 등과 같은 여러 곤충들의 우수한 영양학적 및 생리학적 가치가 보고됨에 따라, 국내에서도 식용 및 약용 자원으로서 주목 받고 있는 추세다. 한편, 아프리카에서는 메뚜기, 흰개미 그리고 산누에나방과 애벌레를 섭취하고, 한국과 일본은 누에 번데기, 멕시코는 나비 애벌레를 통조림으로 상품화하여 식용곤충식품으로 해외로 수출한다[15].

본 연구에서 사용된 흰점박이 꽃무지 유충(굼벵이)은 흙 속에 사는 풍뎡이 류의 유충들을 일반적으로 부르는 말을 지칭한다[9]. 굼벵이는 단백질이 풍부하고 항산화력 뿐만 아니라 간 기능 개선[18] 및 당뇨병 치료에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[22]. 또한, 여러 가지 약리적인 효과도 갖추고 있어 기능성 식품의 대체 재료로 많이 알려져 있으며, 실제로 국내에서 식용으로 사용할 수 있다는 의미로 '꽃뎡이'라고도 부른

다. 주요 유효성분으로서 올레산, 리놀레산 등의 불포화 지방산 함량이 높고, 동물성 식이 섬유인 키틴질, 각종 미네랄과 비타민 등의 풍부한 영양분을 가지고 있다[12]. 특히 인돌 알칼로이드라는 물질이 있어 혈전 치유 효과까지 갖추고 있다[25]. 따라서, 이러한 유효 성분 및 생리 활성 효능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 민간요법 및 대량 생산을 모색함과 동시에 산업화를 서두르고 있는 실정이다[21].

오늘날 소비자들이 점차적으로 친환경적인 제품을 선호함에 따라 발효를 이용한 생물학적인 방법이 자연스럽게 각광을 받고 있다[3]. 발효란, 유산균, 곰팡이, 효모, 바실러스 등의 유익한 미생물을 이용하여 기존 식품의 효능에서 새로운 생리 활성 부여 및 여러 가지 유용 성분의 증가[1], 흡수율 증가, 유용한 장내 미생물의 증가 등의 이점을 더하는 것을 말한다[20]. 본 연구에서 사용된 발효 균주로는 3종의 유산균 그리고 곰팡이, 효모, 바실러스 각각 1종으로 총 6종의 균주로 발효를 진행하였다. 유산균을 이용한 천연물 발효 공정은 천연 소재 추출물의 활성 성분 및 생리 활성의 증가를 쉽게 극대화 할 수 있는 방법이기도 하며, 많은 연구를 통해 널리 알려져 있다[24]. 곰팡이 중 하나인 *A. kawachii*는 흑국균의 백색변이주로, 탄수화물과 단백질을 분해하며, 구연산과 내산성 당화 효소[1] 및 유기산도 잘 생산해서 입국을 제조하기가 용이하고 pH를 산성으로 변화시켜 안전하게 해주는 이점이 있다. 효모는 진핵세포를 갖고 있는 고등 미생물로서 이미 오래 전부터 주류,

*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.

빵 등의 발효 식품에 매우 유용하게 이용 되어져 왔으며, 같은 방법으로, 효모 중 하나인 *S. cerevisiae*는 동물 사료로 사용되는 대안적인 방법으로, 농업에서 나온 고체 잔여물을 이용한 고상발효에서 이용되어 사료를 만드는 방법도 존재한다[6]. *B. subtilis*는 대표적인 세균 중 하나로, 항혈전 효과를 지니고 단백질 분해력이 뛰어난 미생물로서 발효시킬 시 균생육이 촉진됨과 동시에 균주가 생산해 내는 효소의 작용으로 가용성 추출물의 함량이 증가하고, 단백질이 저분자 단백질로 전환되는 이화작용 등 다양한 생리활성을 나타낸다[8].

본 연구에서는 이처럼 유의한 효능을 가지는 유용 미생물들을 이용하여 기존의 곰팡이의 효과로부터 발효를 통한 시너지 효과를 기대하며 이화학적 특성 및 생리활성 효능을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 발효 조건

본 연구에서 사용한 건조 곰팡이는 2017년 6월 토종마을(경주, 경북)에서 구입하였으며, 분말화 시킨 후 냉장 보관하였다. 발효 균주로는 3종의 유산균 *Lactobacillus plantarum* JBMI F3 (F3), *Lactobacillus plantarum* JBMI F5 (F5), *Lactobacillus gasseri* Ba9 (Ba9)는 (재)전주농생명소재연구원으로부터 분양 받아 사용하였고, 1종의 곰팡이 *Aspergillus kawachii* KCCM 32819 (Ak), 1종의 효모 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023 (Sc), 1종의 바실러스 *Bacillus subtilis* KACC 91157 (Bs)로 총 6종의 균주는 본 연구실내 보관중인 균주를 사용하였다. 전 배양 시킨 6종의 균주를 각각 원심 분리를 통해서 10%(v/w) 만큼의 균체만 얻은 후 곰팡이 분말 10 g에 접종하고 Ak, Sc, Bs는 30°C, F3, F5, Ba9의 3 종의 유산균은 37°C에서 3일간 고상 발효하였다. 발효과정 중간에 발효물의 건조를 막기 위해 멸균된 증류수로 촉촉하게 버무려 주었다. 3일간 발효 후 발효물을 2일 동안 자연 건조한 후 분말화하여 냉장 보관하였다.

실험재료의 추출

본 연구에서 사용한 곰팡이 분말 및 발효 곰팡이 분말 100 g을 각각 취해 10배의 정제수를 가한 후 37°C 항온수조에서 3시간씩 교반하면서 3회 반복 추출하였으며, 95% 에탄올 및 95% 메탄올을 수용성 추출물과 동일한 방법으로 추출한 후 추출액을 모아 Adventec 110 mm No.2 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)로 여과하여 실험재료로 사용하였다.

당도, pH 및 산도 측정

당도는 시료 500 μ l를 취하여 당도계(Hand refractometer, Kruss, Germany)를 사용하여 total soluble solids ($^{\circ}$ Brix)를 측정하였다. 곰팡이 분말과 발효 곰팡이 분말을 water, ethanol,

methanol 10%(w/v) 농도로 추출한 추출물의 pH는 pH meter (SevenCompactTM pH/Ion S220, Mettler-Toledo Ag, Switzerland)로 측정하였다. 적정 산도는 100 ml 삼각 플라스크에 25 ml 눈금까지 3차 정제수를 넣은 후 시료를 100 μ l 가한 후 1% phenolphthalein 용액 3방울 떨어뜨리고 0.1 N NaOH로 적정한 후 그 소모량을 총 산도로 환산하였다. 추출물의 총 산도는 acetic acid 값인 0.0006을 계산식에 적용하였다.

$$\text{Total acidity (acetic acid, \%, W/V)} = \left[\frac{\text{(titrated 0.1 N NaOH ml} \times 0.0006)}{\text{sample ml}} \right] \times 100$$

DPPH free radical에 의한 전자 공여 활성

곰팡이 분말과 발효 곰팡이 분말 추출물의 항산화 활성 측정은 Blois 방법에 따라 측정하였다[5]. 각 시료 추출물 1%의 농도 시료 용액에서 DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) free radical scavenging 활성을 spectrophotometer (Spectramax Plus 384, Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, USA) [28]의 528 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 대조군으로 사용한 합성 항산화제 Butylated hydroxytoluene (BHT)를 0.05% 농도로 첨가하여 시료와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical scavenging activity는 발효 전/후 곰팡이 분말 추출물의 흡광도 차를 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity(\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{(sample absorbance 528nm)}}{\text{(control absorbance 528nm)}} \right\} \times 100$$

Control: Absorbance of distilled water at 528nm

페놀성 화합물 함량 측정

페놀성 화합물의 함량은 곰팡이 분말과 발효 곰팡이 분말 추출물 시료에 Folin-ciocalteu's phenol reagent를 이용하여 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 변함으로써 값을 비교하는 원리인 Folin-Denis법[31]로 spectrophotometer (Spectramax Plus 384)의 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준 곡선 함량은 tannic acid를 일정 농도(0-500 μ g/ml)로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정 한 후 함량을 mg/100 g로 나타내었다.

Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량은 Jia 등의 방법[17]에 따라 측정하였다. 각 시료의 용매별 추출물 1%(w/v) 농도에 정제수와 5% NaNO₂ 용액 및 10% AlCl₃ · 6H₂O를 잘 혼합하여 반응시킨 용액을 spectrophotometer (Spectramax Plus 384)의 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 함량은 표준 물질로서 (+)-catechin hydrate을 일정 농도(20~200 μ g/ml)로 시료와 동일한 방법으로 측정 한 후 작성한 표준 곡선으로부터 mg/100 g으로 계산 하여 나타내었다.

Cu 환원력 측정

Cu-환원력 측정은 곰팡이 분말 및 발효 곰팡이 분말 추출물 1% 농도의 시료 용액에 0.01 M CuCl₂, 7.5 mM ethanolic neocuprorine solution, 1 M NH₄OAc buffer를 혼합하여 상온에서 30 min 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 환원력 비교를 위하여 합성 항산화제 BHT를 각각 1.00%, 0.50%, 0.10%, 0.05%, 0.01% 5개의 농도로 동일한 방법으로 spectrophotometer (Spectramax Plus 384)에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cu-환원력 실험은 강한 환원력을 가질 수록 진한 Orange/Yellow 색을 나타낸다.

혈전용해 효소 활성 측정

곰팡이 분말과 발효 곰팡이 분말 추출물의 혈전 용해 효소 활성은 fibrin plate법[4]을 변형하여 lysed zone으로 측정하였다. 0.6% fibrinogen (Sigma, St. Louis MO, USA)을 0.05 M sodium borate buffer (pH 7.5)에 37°C에 1시간 용해시킨 후 petri dish에 10 ml씩 분주하고, thrombin (1,000 unit, Sigma)을 40 unit/ml의 농도로 희석 한 후 총 20 unit가 되도록 하여 균일하게 혼합하기 위해서 잘 흔들어준다. 15 min 정도 균침 과정을 거친 뒤 fibrin clot을 형성시킨 후에 사용하였다. Fibrin 배지에 paper disc를 얹고, 시료 용액을 50 µl씩 점적하여 37°C incubator에서 반응시켜 일정한 시간 간격을 두고 최대 6시간까지 fibrin이 분해되어 생기는 환의 면적을 측정하였다. 직경은 서로 수직인 두 개의 지름을 측정하였고, 투명대가 타원인 경우에는 가장 긴 지름과 가장 짧은 지름을 측정하여 투명대의 면적을 구하였다.

효소 기질 분해 활성

효소 기질 분해활성 실험에서 대표적인 전분 분해능을 가지는 α-amylase 활성도를 측정하였다. 1% 농도의 starch를 약한 heating과 stir를 통해서 녹이고, 2% agar는 따로 녹인 후 starch와 섞어서 멸균 한 후 적당한 두께의 배지를 만든다. Paper disc에 시료 용액 50 µl씩 점적한 후 30 min 뒤에 떼어내고, KI+I solution (2% KI, 0.2% I₂) 용액을 10 min간 처리한 후 용액을 버리고 clear zone 의 환의 크기를 측정하였다. 이 실험은 starch의 나선형 사슬 중간에 I₃- 이온이 들어가게 되면서 청남색으로 색이 변하게 되는데, α-amylase가 starch를 분해시키면 요오드가 결합하지 않기 때문에 분해된 부분이 clear zone으로 나타나게 되는 원리이다.

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준 오차(mean ± SE)로 표시하였고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 나타내었다[13].

결과 및 고찰

당도, pH 및 적정산도의 변화

곰팡이 분말 및 발효 곰팡이 분말 추출물의 당도 변화는 Table 1과 같다. 10% 수용성 추출물의 당도를 비교했을 때 곰팡이 분말 추출물의 당도는 2.8°Brix이며, Ak 균주 발효에서 3.8°Brix, F3, F5, Ba9, Sc의 균주발효 추출물은 모두 4.0°Brix로 증가하였고, Bs 균주발효가 5.0°Brix로 당도함량의 높은 증가도를 보였다. Ethanol 추출물의 경우에도 곰팡이 분말 추출물이 19.2°Brix에서 평균 19.7°Brix로 유의적으로 증가하였으며, methanol 추출물은 모두 0°Brix로 일정하였다.

다음으로, 곰팡이 분말 및 발효 곰팡이 분말 추출물의 pH는 Table 2와 같다. 수용성 추출 곰팡이 분말 추출물의 pH는 F3, F5, Ak 및 Sc 균주발효 추출물에서 유의적으로 증가하였다.

Table 1. Total soluble solids of aqueous, ethanol and methanol extract of *P. brevitarsis seulensis* larvae fermented using several kinds of micro-organisms

| Composition | Total soluble solids (°Brix) | | | |
|--|------------------------------|-----------|-----------|-----|
| | Water | Ethanol | Methanol | |
| N | 2.8±0.01 | 19.2±0.00 | 0.0 | |
| F3 | 4.0±0.00 | 19.6±0.00 | 0.0 | |
| <i>P. brevitarsis seulensis</i> larvae | F5 | 4.0±0.20 | 19.8±0.00 | 0.0 |
| Ba9 | 4.0±0.00 | 19.6±0.00 | 0.0 | |
| Ak | 3.8±0.00 | 19.8±0.00 | 0.0 | |
| Sc | 4.0±0.00 | 19.6±0.02 | 0.0 | |
| Bs | 5.0±0.02 | 19.8±0.00 | 0.0 | |

Values are mean ± S.E, n=3

N: Non-fermented

F3: Fermented by *Lactobacillus plantarum* JBMI F3

F5: Fermented by *Lactobacillus plantarum* JBMI F5

Ba9: Fermented by *Lactobacillus gasseri* Ba9

Ak: Fermented by *Aspergillus kawachii* KCCM 32819

Sc: Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023

Bs: Fermented by *Bacillus subtilis* KACC 91157

Table 2. pH of aqueous, ethanol and methanol extract of *P. brevitarsis seulensis* larvae fermented using several kinds of micro-organisms

| Composition | pH | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Water | Ethanol | Methanol | |
| N | 5.76±0.01 | 7.51±0.02 | 7.73±0.01 | |
| F3 | 5.94±0.02 | 7.26±0.01 | 7.56±0.02 | |
| <i>P. brevitarsis seulensis</i> larvae | F5 | 6.01±0.01 | 7.28±0.01 | 7.57±0.02 |
| Ba9 | 5.72±0.03 | 7.28±0.01 | 7.60±0.02 | |
| Ak | 6.73±0.01 | 7.35±0.02 | 7.45±0.01 | |
| Sc | 6.28±0.01 | 7.39±0.03 | 7.65±0.02 | |
| Bs | 5.53±0.01 | 7.32±0.01 | 7.57±0.01 | |

Values are mean ± S.E, n=3.

Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 3. Acidity of aqueous, ethanol and methanol extract of *P. brevitarsis seulensis* larvae fermented using several kinds of micro-organisms

| Composition | Acidity (%) | | | |
|--|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | Water | Ethanol | Methanol | |
| <i>P. brevitarsis seulensis</i> larvae | N | 1.02±0.01 | 1.02±0.02 | 1.02±0.01 |
| | F3 | 1.44±0.02 | 1.02±0.01 | 0.96±0.01 |
| | F5 | 1.02±0.01 | 1.02±0.02 | 1.26±0.02 |
| | Ba9 | 1.02±0.01 | 1.08±0.02 | 1.08±0.03 |
| | Ak | 1.32±0.03 | 0.96±0.03 | 1.5±0.02 |
| | Sc | 1.20±0.01 | 0.96±0.01 | 1.26±0.01 |
| | Bs | 1.26±0.01 | 1.20±0.01 | 0.90±0.01 |

Values are mean ± S.E, n=3.

Abbreviations are the same as in Table 1.

Ethanol과 methanol 추출물의 pH는 곰팡이 분말 및 발효 곰팡이 분말에서 유사한 수준이었다.

곰팡이 분말과 발효 곰팡이 분말 추출물의 적정산도는 Table 3과 같다. 10% 수용성 추출물에서 F5 균주발효 추출물을 제외한 모든 균주발효 추출물에서 증가하였다. Ethanol 추출물에서 기존의 곰팡이 분말 추출물이 1.02%에 비해서 Ak, Sc 균주발효 곰팡이 추출물에서 모두 0.96%로 낮아진 반면에 Bs 균주발효에서는 1.20%로 증가하였다. Methanol 추출물에서 곰팡이 분말 추출물의 적정산도 1.02%와 비교했을 때 F3과 Bs 균주발효에서 각각 0.96%, 0.90%로 낮아졌으며, 나머지 발효 곰팡이 분말 추출물은 평균 1.27%로 증가하였다.

DPPH free radical에 의한 전자 공여 활성

항산화 활성 측정 방법 중 DPPH free radical을 이용한 소거 활성 측정은 DPPH의 free radical인 안정된 유리기를 환원시킴으로써 짙은 자주색에서 탈색되는 정도를 지표로 하여 항산화 능력을 측정하는 방법으로 이용되고 있다[2]. 일반적으로

식물체가 자외선에 의해 발생하는 활성산소나 세균 등의 침투와 같은 극한 상황에서 버틸 수 있도록 스스로 만들어낸 영양소인 파이토케미칼 즉, 식물영양소들은 수산기(-OH)를 가지고 있는 polyphenol 화합물로 DPPH free radical에 의한 전자공여 활성을 가지는 것으로 알려져 있다.

곰팡이 분말 및 발효 곰팡이 분말 1% 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군으로 사용된 합성 항산화제인 Butylated hydroxytoluene (BHT)는 약 90%가 넘는 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 수용성으로 추출한 곰팡이 분말 추출물은 14.05%의 낮은 활성을 나타낸 반면에, Ak 균주발효 추출물에서 46.33%, Sc 균주발효 추출물은 53.89%, Bs 균주발효 추출물은 50.58%, F3, F5, Ba9 균주발효에서는 각각 55.69%, 56.98%, 57.81%의 높은 라디칼 소거 활성을 보였다. 발효 곰팡이 분말 추출물들이 평균 53.54%로 훨씬 증가하는 경향을 보였다. 약용 곤충인 청동풍뎅이 성충 및 유충을 대상으로 한 실험에서 곤충이 기존에 가지고 있는 항산화 활성이 높다는 결과[33]와 다소 비슷하였다. 에탄올, 메탄올 추출물은 라디칼 소거 활성이 전혀 나타나지 않았다. 따라서 본 실험에서 유용 미생물을 이용한 발효 곰팡이 분말 수용성 추출물이 기존의 곰팡이 분말 추출물보다 항산화 활성이 크게 증가한 것을 보여주었다.

총 페놀성 화합물 및 flavonoid 함량

천연물에 존재하는 생리활성물질은 대부분 페놀성 화합물 [26]이며 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사 산물 중[16]의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며, 항균, 항알레르기, 항산화, 항암 등의 효과 및 생리 활성 기능을 가진다[7]. 플라보노이드는 페닐기 2개가 C3 사슬을 매개하여 결합한 형태로 C6-C3-C6의 탄소 골격 구조로 되어 있다. 천연 항산화제인 플라보노이드에는 flavonol, flavanone, isoflavone, anthocyanidin이 속해 있으며 폴리페놀류에 포함된다[27]. 총 페놀성 화합물

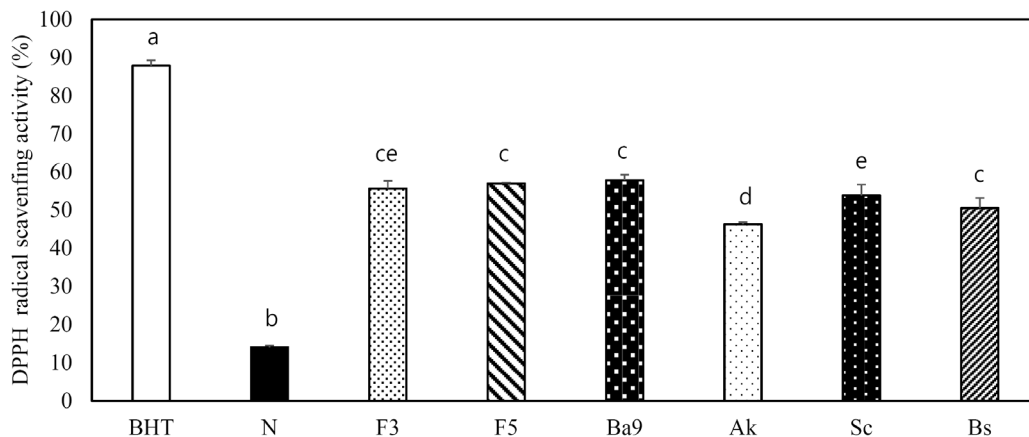


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of aqueous extract of *P. brevitarsis seulensis* larvae fermented using several kinds of micro-organisms. BHT: butylated hydroxytoluene (0.05%). Values are mean ± S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$. Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 4. The concentration of total phenolic compounds and total flavonoids compounds in aqueous, ethanol and methanol extract of *P. brevitarsis seulensis* larvae fermented using several kinds of micro-organisms

| Composition | Total phenolic compounds concentrations (mg%) | | | Flavonoids concentrations (mg %) | | | |
|--|---|------------|-----------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Water | Ethanol | Methanol | Water | Ethanol | Methanol | |
| <i>P. brevitarsis seulensis</i> larvae | N | 10.07±0.36 | 2.31±0.15 | 2.44±0.25 | 1.53±0.19 | 2.50±0.28 | 0.30±0.00 |
| | F3 | 18.74±0.34 | 3.25±0.04 | 3.34±0.20 | 4.07±0.05 | 3.23±0.15 | 1.01±0.10 |
| | F5 | 19.43±0.52 | 3.33±0.13 | 3.68±0.27 | 4.44±0.31 | 3.35±0.46 | 0.79±0.10 |
| | Ba9 | 19.54±0.59 | 3.18±0.12 | 3.66±0.36 | 3.95±0.09 | 3.24±0.28 | 0.95±0.08 |
| | Ak | 19.66±0.46 | 3.38±0.16 | 3.44±0.40 | 5.33±0.10 | 4.49±1.48 | 1.57±0.17 |
| | Sc | 18.89±0.64 | 3.58±0.55 | 3.46±0.19 | 4.48±0.07 | 3.00±0.20 | 0.94±0.13 |
| | Bs | 26.51±0.57 | 4.54±0.49 | 5.11±0.09 | 8.38±0.72 | 3.22±0.89 | 0.85±0.07 |

Values are mean ± S.E, n=3.

Abbreviations are the same as Table 1.

측정 결과 수용성으로 추출한 곰팡이 분말 10% 추출물은 5.28 mg/100 g에 비해 F3, F5, Ba9, Ak, Sc 균주발효는 각각 9.61 mg/100 g, 9.96 mg/100 g, 10.01 mg/100 g, 10.07 mg/100 g, 9.69 mg/100 g로 함량이 증가하였고, Bs 균주발효가 13.50 mg/100 g로 폴리페놀 함량이 크게 증가한 결과를 나타내었다 (Table 4).

플라보노이드 함량은 기존의 곰팡이 분말 추출물의 0.76 mg/100 g에 비해 F3, F5, Ba9, Ak, Sc 균주 발효에서 각각 2.03 mg/100 g, 2.22 mg/100 g, 1.98 mg/100 g, 2.67 mg/100 g, 2.24 mg/100 g로 증가하였고, Bs 균주발효에서 4.19 mg/100 g로 큰 증가율을 보였다(Table 4). Ethanol, methanol 추출물에서의 총 페놀성 화합물과 플라보노이드 함량은 곰팡이 분말 추출물보다 발효 곰팡이 분말 추출물에서 비교적 증가하였지만 수용성 추출물의 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량에는 미치지 않았다.

Cu 환원력 효과

Cu 환원력에 의한 항산화 반응은 수소 원자를 제공하는 유리 라디칼의 연쇄 반응이다. 또한 과산화 반응에서 일정한 전구 물질과 반응하여 과산화 물질의 형성을 방해하는데, 플라보노이드 화합물을 이 안정된 생성물로 이들을 환원시키기 위하여 유리기와 반응 또는 전자를 공여함으로써 환원형에서 반응하고 유리 라디칼 연쇄 반응을 종료하는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 환원력의 세기가 높을수록 항산화 활성이 높음을 알 수 있다[29]. 곰팡이 분말 추출물의 1% 수용성 추출물에서 Cu 환원력이 0.14에 비해 발효 곰팡이 분말 추출물은 F3, F5, Ba9 균주발효에서 각각 0.44, 0.43, 0.46, Ak는 0.41, Sc는 0.45 그리고 Bs 균주발효에서는 0.47로 기존의 곰팡이 분말 추출물보다 환원력이 크게 증가함을 보였다(Table 5).

발효 균주에 따른 혈전용해 활성

체내에서 혈액 응고 반응계와 혈전 용해 반응계가 상호 보완적으로 조절됨으로써 혈액순환을 용이하게 해준다고 알려져 있다[30]. 혈전의 생성은 활성화된 thrombin에 의해 혈장

단백질인 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 생성되며, 혈전 용해 효소 활성을 가진 물질들은 혈액 응고의 기질인 fibrin을 가수분해하여 혈전증[19]을 완화시킬 수 있고, 최근에는 각종 천연물 또는 발효물에서 혈전 용해 활성 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서 6종의 유용 미생물을 이용한 발효 곰팡이의 혈전 용해능 결과는 Fig. 2에서 나타내었다. Fibrin plate 위에 paper disc를 올려놓은 뒤 수용성 10% 추출한 곰팡이 분말 추출물 및 발효 곰팡이 분말 추출물을 50 µl씩 점적하여 1시간 마다 분해된 크기를 확인 한 결과, 1시간 후 바로 혈전 용해 활성이 보였다. 6시간 후에 곰팡이 분말 추출물의 혈전 용해능 활성이 적은 반면에 발효 곰팡이 분말 추출물에서 혈전 용해 활성이 크게 증가함을 볼 수 있었다. 곰팡이 분말 및 발효 곰팡이 분말의 수용성 추출물의 혈전 용해 활성이 2.88 unit에 비해 F3, F5, Ba9 균주발효에서는 각각 39.2 unit, 39.2 unit, 42.0

Table 5. Reducing power in aqueous, ethanol and methanol extract of *P. brevitarsis seulensis* larvae fermented using several kinds of micro-organisms

| Composition | Conc. (%) | Cu-Reducing power | | |
|--|-----------|-------------------|-----------|-----------|
| BHT | 1.00 | 2.54±0.20 | | |
| | 0.50 | 2.44±0.05 | | |
| | 0.10 | 1.41±0.05 | | |
| | 0.05 | 1.09±0.06 | | |
| | 0.01 | 0.34±0.03 | | |
| Composition | Water | Ethanol | Methanol | |
| <i>P. brevitarsis seulensis</i> larvae | N | 0.14±0.00 | 0.18±0.02 | 0.13±0.02 |
| | F3 | 0.44±0.02 | 0.32±0.03 | 0.21±0.02 |
| | F5 | 0.43±0.01 | 0.34±0.02 | 0.21±0.02 |
| | Ba9 | 0.46±0.00 | 0.32±0.04 | 0.18±0.02 |
| | Ak | 0.41±0.02 | 0.41±0.04 | 0.29±0.02 |
| | Sc | 0.45±0.02 | 0.31±0.03 | 0.16±0.01 |
| | Bs | 0.47±0.02 | 0.27±0.03 | 0.13±0.01 |

BHT: butylated hydroxytouluene (0.05%)

Values are mean ± S.E, n=3.

Abbreviations are the same as Table 1.

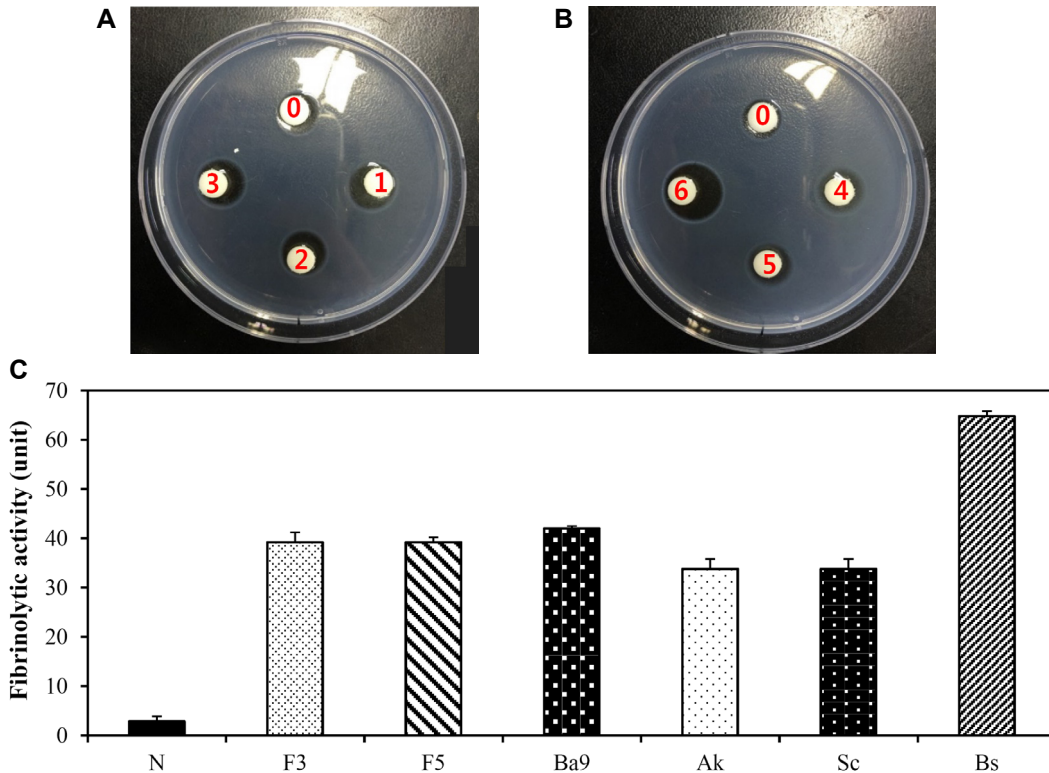


Fig. 2. Fibrinolytic activities in aqueous extract of *P. brevitarsis seulensis* larvae fermented using several kinds of micro-organisms (A, B, C). 0: Non-fermented, 1: *Lactobacillus plantarum* JBMI F3, 2: *Lactobacillus plantarum* JBMI F5, 3: *Lactobacillus gasseri* Ba9, 4: *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, 5: *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023, 6: *Bacillus subtilis* KACC 91157, Abbreviations are the same as Table 1.

unit로 14배 이상의 효과를 보였고, Ak와 Sc 균주 발효에서는 33.8 unit으로 동일하였다. 그리고 Bs 균주 발효에서는 64.8 unit로 혈전 용해 활성이 가장 크게 증가하였다. Ethanol, methanol 추출물에서는 혈전 용해 활성이 전혀 나타나지 않았다. 기존의 흰점박이 꽃무지 애벌레 추출물에서 분리 정제한 혈전 용해 효소 단백질은 비교적 높은 혈전 용해능을 갖고 있다는 결과와 일치하였으며[14, 19], 유용 미생물을 이용한 발효 곰팡이 분말 추출물에서 더더욱 뚜렷한 혈전 용해 활성의 증가로 건강 식품으로 활용할 수 있는 소재의 가능성이 크다.

효소 기질 분해능

α -amylase는 탄수화물의 α -D-(1,4)-glucan 결합을 분해하는 효소로서 사람, 동물, 미생물, 곤충 등의 탄수화물 대사에 필수적인 효소이다[23]. 일반적으로 amylase는 매우 다양한 미생물로부터 생산되는 효소로, 전분을 가수분해하며 소당류 및 glucose와 같은 식품 산업에서 활용될 수 있는 당류를 생산한다[32]. Amylase는 미생물 유래의 amylase에 비하여 경제적인 가치는 없으나 천연의 소화 효소로서의 이용가치에 대한 평가가 필요한 부분이다[10]. α -amylase에 의한 전분 분해능 결과는 Fig. 3과 같다. α -amylase가 starch를 분해시키면 clear zone

이 나타나게 되는데 곰팡이 분말 추출물보다 발효 곰팡이 분말 추출물의 clear zone이 더 큰 것을 볼 수 있다. 따라서 발효 곰팡이 분말 추출물의 α -amylase 활성이 증가함을 보여 준다. 곰팡이를 이용한 갈색 거저리 유충의 발효 분말 추출물도 기존의 갈색 거저리 유충보다 amylase 활성도가 높아짐을 보고 된 바와 같이[11] 비슷한 곤충의 유충인 흰점박이 꽃무지 유충 또한 유용 미생물을 이용한 발효물의 전분 분해능 활성도가 증가됨을 볼 수 있다.

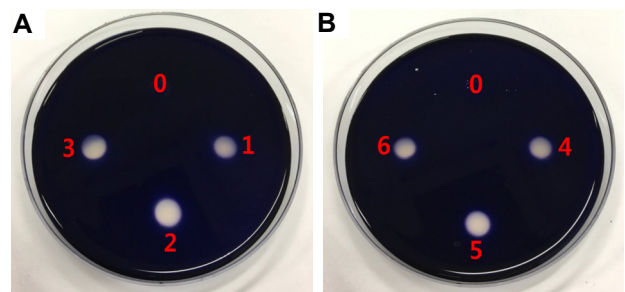


Fig. 3. Evaluation of enzyme activities in starch for the utilization of several kinds of micro-organisms in aqueous extract of *P. brevitarsis seulensis* larvae fermented using several kinds of micro-organisms (A, B). Abbreviations are the same as Fig. 2.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다(317039-4).

References

- Ahn, H. Y., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2012. Biological activity and chemical characteristics of fermented *Acanthopanax senticosus* by mold. *J. Life Sci.* **22**, 1704-1711.
- Ahn, H. Y., Cha, J. Y., Jeong, Y. K. and Cho, Y. S. 2013. Antioxidative activity and chemical characteristics of cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* JLM0636 Powder. *J. Life Sci.* **23**, 249-258.
- Ahn, H. Y., Park, K. R., Kim, Y. R., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2013. Chemical characteristics in fermented cordycepin-enriched *Cordyceps militaris*. *J. Life Sci.* **23**, 1032-1040.
- Astrup, T. and Müllertz, S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
- Camacho-Ruiz, L., Perez-Guerra, N. and Roses, R. P. 2003. Factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid state fermentation. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **2**, 531-542.
- Cha, J. Y., Kim, H. J., Chung, C. H. and Cho, Y. S. 1999. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1310-1315.
- 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**, pp.81-88.
- Cho, D. H., Cho, Y. M. and Lee, J. I. 2003. Fruitbody formation of *Cordyceps militaris* in *Allomyrina dichotoma* *Linnaeus*. *Kor. J. Plant Res.* **16**, 1-7.
- Cho, E. H., Choi, A., Choi, S. J., Kim, S. Y., Lee, G. S., Lee, S. S. and Chae, H. J. 2009. α -amylase activity of radish and stability in processing. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 812-815.
- Choi, Y. H., Lee, J. E., Kim, E. M. and Park, S. Y. 2012. Quality changes of steamed rice bread with addition of active gluten and rice Nuruk. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 253-258.
- Chung, M. Y., Gwon, E. Y., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2013. Analysis of general composition and harmful material of *Protaetia brevitarsis*. *J. Life Sci.* **23**, 664-668.
- Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
- Han, K. J. and Kim, M. D. Study on the origins and main treatments of grub used in experiments, and research directions on the efficacy of grubs. *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* **23**, 158-165.
- Hanboonsong, Y. 2010. Edible insects and associated food habits in Thailand. Forest insects as food: humans bite back. **173**.
- Heo, J. S., Cha, J. Y., Kim, H. W., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Heo, S. J. and Cho, Y. S. 2010. Bioactive materials and biological activity in the extracts of leaf, stem mixture and root from *Angelica gigas* Nakai. *J. Life Sci.* **20**, 750-759.
- Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
- Kang, I. J., Chung, C. K., Kim, S. J., Nam, S. M. and Oh, S. H. 2001. Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in carbon tetrachloride administered rats. *Appl. Microsc.* **31**, 9-18.
- Kang, M. S., Kim, S., Cho, J. S., Kim, H. S., Kim, I. H., Park, H. S., Seo, E. H. and Yim, C. H. 2007. An experimental study on the thrombolytic activities of *Holotrichia* Extracts. *J. Sasang Constitutional Med.* **19**, 160-170.
- Kim, D. H., Han, S. B., Park, J. S. and Han, M. J. 1994. Fermentation of antler and its biological activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 233-237.
- Korea Drug Association. 2002. *The Hankook-saengyark bo.* **253**, 6-6.
- Kwak, K. W., Han, M. S., Nam, S. H., Choi, J. Y., Lee, S. H., Choi, Y. C. and Park, K. H. 2014. Detection of insect pathogen *Serratia marcescens* in *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe) from Korea. *Int. J. Indust. Entomol.* **28**, 25-31.
- Lee, B. B., Park, S. R., Han, C. S., Han, D. Y., Park, E. J., Park, H. R. and Lee, S. C. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 405-409.
- Lee, J. J., Son, H. Y., Choi, Y. M., Cho, J. H., Min, J. G., Oh, H. G., Jang, Y. A., Kim, H. N., Yang, J. C., Lee, J. W. and Kim, B. A. 2016. Physicochemical components and antioxidant activity of *Sparassis crispa* mixture fermented by lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Preserv.* **23**, 361-368.
- Lee, J., Lee, W., Kim, M., Hwang, J. S., Na, M. and Bae, J. S. 2017. Inhibition of platelet aggregation and thrombosis by indole alkaloids isolated from the edible insect *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe). *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 1217-1227.
- Lee, Y. S., Joo, E. Y. and Kim, N. W. 2006. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepista nuda*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1309-1314.
- Oh, M. H. and Yoon, K. Y. 2017. Biological activity of crude polyphenol fractions of *Cedrela sinensis* isolated using different extraction methods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **49**, 438-443.
- Oomah, B. D., Cardador Martínez, A. and Loarca Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* **85**, 935-942.
- Sa, Y. J., Kim, J. S., Kim, M. O., Jeong, H. J., Yu, C. Y., Park, D. S. and Kim, M. J. 2010. Comparative study of electron donating ability, reducing power, antimicrobial activity and inhibition of α -glucosidase by *Sorghum bicolor* extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **42**, 598-604.

30. Sohn, H. Y., Kwon, C. S., Son, K. H., Kwon, G. S., Ryu, H. Y. and Kum, E. J. 2006. Antithrombin and thrombosis prevention activity of buckwheat seed, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 132-138.

31. Swain, T. and Hillis, W. E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 63-68.

32. Yang, S. J., Lee, D. H., Park, H. M., Jung, H. K., Park, C. S. and Hong, J. H. 2014. Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from *Doenjang*. *Kor. J. Food Preserv.* **21**, 286-293.

33. Yoon, W. J., Lee, J. A., Kim, J. Y., Kim, S. B. and Park, S. Y. 2007. Antioxidant activity and physiological function of the *Anomala albopilosa* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 670-677.

초록 : 유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과

심소연 · 안희영 · 서권일 · 조영수*
(동아대학교 생명공학과)

본 연구는 유용 미생물을 이용하여 흰점박이 꽃무지 유충을 발효시킨 분말을 수용성, 에탄올, 메탄올 용매별 추출하여 항산화 등의 실험에 임하였다. 발효 균주로는 3종의 유산균 *Lactobacillus plantarum* JBMI F3, *Lactobacillus plantarum* JBMI F5, *Lactobacillus gasseri* Ba9, 1종의 곰팡이 *Aspergillus kawachii* KCCM 32819, 1종의 효모 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023, 1 종의 바실러스 *Bacillus subtilis* KACC 91157 총 6종의 유용 미생물 균주를 사용하였다. 발효 곰팡이 분말 추출물의 유효성분(총 페놀 함량 및 플라보노이드 함량)과 생리 활성 효능(DPPH 자유 라디칼 소거 활성, 환원력 실험, 혈전용해능, α-amylase 활성)을 비교 검토하였다. 총 페놀 함량 및 플라보노이드 함량은 바실러스 균주 발효 곰팡이 분말의 수용성 추출물에서 높은 수치를 나타내었다. 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 자유 라디칼 소거능 및 환원력 실험을 수행한 결과, 비발효균 보다 발효균에서 우수한 항산화능을 보였고, 그 중 바실러스 균주를 이용한 발효 추출물이 긍정적인 효과를 나타내었다. 혈전 용해능에서 또한, 바실러스 균주 발효 곰팡이 추출물에서 우수한 혈전 용해능을 확인하였고, 효소-기질 분해능 실험의 α-amylase 활성은 비발효균보다 발효균에서 높은 효과를 확인하였으나 발효균주간 유의적인 차이는 없었다. 따라서, 유용 미생물을 이용한 발효 곰팡이 추출물의 유효성분 및 생리활성이 강화됨을 확인하였고, 이는 건강 식품 소재로의 이용 가능성이 높다고 판단된다.