

## Physicochemical Properties and Biological Activities of *Tenebrio molitor* Fermented by Several Kinds of Micro-organisms

Sung-Ho Jang, So-Yeon Sim, Hee-Young Ahn, Kwon-Il Seo and Young-Su Cho\*

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

Received March 16, 2018 / Revised April 10, 2018 / Accepted April 11, 2018

In this study, *Tenebrio molitor* (*T. molitor*) was fermented with *Lactobacillus plantarum* JBMI F3 (F3), *Lactobacillus plantarum* JBMI F5 (F5), *Lactobacillus gasseri* Ba9 (Ba9), *Aspergillus kawachii* KCCM 32819 (Ak), *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023 (Sc), and *Bacillus subtilis* KACC 91157 (Bs). After fermentation, the fermented products were extracted by water, ethanol, and methanol, and their physicochemical and biological properties were investigated. In a DPPH assay, the water extracts of the fermented products of *T. molitor* showed high antioxidant ability. Among the water extracts, the fermented product by Bs showed the highest DPPH radical scavenging activity. The total contents of phenolic compounds and flavonoids were highest in the fermented products by Ak and Bs, respectively. Reducing activity was detected the most high activity on ethanol extract of fermented product by Bs. The water extract of the fermented product by Bs exhibited strong enzymatic activity for fibrinogen and starch hydrolysis. Based on the observed physicochemical and biological properties, the fermented products of *T. molitor* by microorganisms can likely be applied as functional materials in various industries.

**Key words** : Antioxidative activity, *Bacillus subtilis*, fermentation, fibrinolytic activity, *Tenebrio molitor*

### 서 론

옛날부터 인간은 곤충을 식용으로 이용해 왔으며, 곤충은 그 중에 따라 영양성분의 차이가 있긴 하지만 일반적으로 50~60%의 단백질이 함유되어 있고, 8.1~59%의 조지방, 4.9~12.1%의 Fe와 비타민 B군 등을 함유하고 있다고 알려져 있다 [22]. 또한 육류에 비해 Fe, Vitamin A, 불포화지방산 등이 비교적 풍부하며, 필수 아미노산 및 식이섬유 또한 풍부하다 [17].

갈색거저리는 딱정벌레 목 갈색거저리 과에 속하고, 야행성 곤충으로 알려져 있으며 대량으로 사육 및 공급할 수 있는 체계가 이미 구축되어 있어서 산업화에 용이하다는 장점이 있다 [27]. 또한 GABA의 생성을 촉진하는 Glutamic acid가 다량 함유되어 있고, 혈중 HDL의 함량을 높이고 LDL의 함량을 낮춰주는 효과가 있는 Oleic acid가 많이 존재한다는 영양학적 가치뿐만 아니라 [27], *Candida albicans*에 대해 항 진균 효능을 가지고 [6], TNF- $\alpha$ , il-6 및 NO 발현을 농도의존적으로 억제하는 등 항 염증 효과 또한 존재한다는 연구결과 [22]를 통해 식용뿐만 아니라 약용으로써의 가치도 충분하다고 할 수 있다. 이

러한 다방면의 연구결과 덕분에 2014년 7월, 식품의약품안전처로부터 한시적인 식품 원료로 인정받았다 [25].

한편, 다양한 미생물을 이용하여 발효를 진행한 연구는 여전히 부족한 실정이다. 여기서 발효란, 미생물이 자신이 가지고 있는 효소를 이용, 유기물을 분해 또는 합성 등 다양한 과정을 통해 산화, 환원시키는 것을 말한다. 이를 통해 유기물의 소화 및 흡수를 용이하게 하고, 새로운 약성이나 약효를 띄게 할 수 있다는 사실이 지속적으로 보고되고 있으며 [14], 이를 위해 본 연구에서는 갈색거저리 분말을 총 6종의 균주로 발효하였다. 균주는 3종의 유산균과 곰팡이, 효모, 바실러스 각각 1종, 총 6종의 균을 사용하였다. 유산균은 유산발효를 하여 부패방지 및 항균물질을 분비하여 식중독균을 억제하며, 장내 pH를 낮추어 부패세균들의 증식을 억제하는 역할을 한다고 보고되어져 있고, *Aspergillus kawachii*는 일반적으로 백국균이라고 불리는 균주로, 유기산과 내산성 당화효소를 생산하는 능력이 뛰어나, 양조과정 중 산성환경 유지 및 알코올 수율 향상에 기여하는 균으로 알려져 있다 [5, 12]. *Saccharomyces cerevisiae*는 알코올을 생산하는 능력이 탁월하여 포도주 등 주류를 생산하는데 주로 사용되는 효모이며 [18], *Bacillus subtilis*는 단백질 분해력이 상당하여, 이를 통해 가용성 추출물의 함량 증가, 유리아미노산 및 oligo-peptide 등 다양한 생리활성 물질을 생산하는 특성이 있어 [11] 단백질 함량이 매우 높은 갈색거저리를 이들 균주로 발효시켰을 경우 상당한 시너지 효과가 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구는 갈색거저리를 다양한 관점에서 바라보고,

#### \*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.

보다 폭넓은 활용을 추구하고자 상기 6 종의 유용 균주를 이용한 발효 갈색거저리의 이화학적 특성 및 생리활성을 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 발효 조건

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

### 실험재료의 추출

본 연구에서 사용한 갈색거저리 분말 및 발효 갈색거저리 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  $\mu$ l를 취하여 당도계(Hand refractometer, Kruss, Germany)를 사용하여 total soluble solids ( $^{\circ}$ Brix)를 측정하였다. 갈색거저리 분말 및 발효 갈색거저리를 water, ethanol, methanol 10% (w/v) 농도로 추출한 추출물의 pH는 pH meter (SevenCompact<sup>TM</sup> pH/Ion S220, Mettler-Toledo Ag, Switzerland)로 측정하였다. 적정 산도는 100 ml 삼각 플라스크에 25 ml 늪금까지 3차 정제수를 넣은 후 시료를 100  $\mu$ 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.

Total acidity (acetic acid, %, W/V)

$$= \frac{[\text{titrated } 0.1 \text{ N NaOH ml} \times 0.0006]}{\text{sample ml}} \times 100$$

### Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량은 Jia 등의 방법[13]에 따라 측정하였다. 각 시료의 용매별 추출물 1% (w/v) 농도에 정제수와 5% NaNO<sub>2</sub> 용액 및 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 잘 혼합하여 반응시킨 용액을 spectrophotometer (Spectramax Plus 384)의 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 함량은 표준 물질로서 (+)-catechin hydrate을 일정 농도(20~200  $\mu$ g/ml)로 시료와 동일한 방법으로 측정된 후 작성한 표준 곡선으로부터 mg/100 g으로 계산하여 나타내었다.

### Phenolic compound 함량 측정

Phenolic compound의 함량은 갈색거저리 분말과 발효 갈색거저리 분말 추출물 시료에 Folin-ciocalteu's phenol reagent를 이용하여 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 변함으로써 값을 비교하는 윌리인 Folin-Denis법[26]으로 spectrophotometer (Spectramax Plus 384)의 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준 곡선 함량은 tannic acid를 일정 농도(0-500  $\mu$ g/ml)로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정 한 후 함량을 mg/100 g로 나타내었다.

### DPPH free radical에 의한 전자 공여 활성

갈색거저리 분말과 발효 갈색거저리 분말 추출물의 항산화 활성 측정은 Blois 방법에 따라 측정하였다[4]. 각 시료 추출물 1%의 농도 시료 용액에서 DPPH ( $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) free radical scavenging 활성을 spectrophotometer (Spectramax Plus 384, Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, USA)[23]의 528 nm에서 흡광도를 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 갈색거저리 분말 추출물의 흡광도 차를 백분율(%)로 표시하였다.

DPPH free radical scavenging activity (%)

$$= \frac{1 - (\text{sample absorbance } 528 \text{ nm})}{(\text{control absorbance } 528 \text{ nm})} \times 100$$

Control: Absorbance of distilled water at 528nm

### Cu 환원력 측정

Cu-환원력 측정은 갈색거저리 분말 및 발효 갈색거저리 분말 추출물 1% 농도의 시료 용액에 0.01 M CuCl<sub>2</sub> 7.5 mM ethanolic neocuprorine solution, 1 M NH<sub>4</sub>OAc buffer를 혼합하여 상온에서 30 min 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 환원력 비교를 위하여 합성 항산화제 BHT를 각각 1.00%, 0.50%, 0.01%, 0.05%, 0.01% 5개의 농도로 동일한 방법으로 spectrophotometer (Spectramax Plus 384)에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cu-환원력 실험은 강한 환원력을

가질수록 진한 Orange/Yellow 색을 나타낸다.

**효소 기질 분해 활성**

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% I<sub>2</sub>) 용액을 10 min간 처리한 후 용액을 버리고 clear zone 의 환의 크기를 측정하였다. 이 실험은 starch의 나선형 사슬 중간에 I<sub>3</sub>-이온이 들어가게 되면서 청남색으로 색이 변하게 되는데, α-amylase가 starch를 분해시키면 요오드가 결합하지 않기 때문에 분해된 부분이 clear zone으로 나타나게 되는 원리이다.

**혈전용해 효소 활성 측정**

갈색거저리 분말과 발효 갈색거저리 분말 추출물의 혈전용해 효소 활성은 fibrin plate법[2]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 가하여 균일하게 혼합하기 위해서 잘 흔들어준다. 15 min 정도 균질 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.

**통계처리**

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준 오차(mean ± SE)로 표시하였고, 각 실험 군간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 나타내었다[8].

**결과 및 고찰**

**당도, pH 및 적정산도의 변화**

갈색거저리추출물과 유용균주를 이용한 발효 갈색거저리추출물의 당도 측정 결과는 다음과 같다(Table 1). 10% Water 추출물의 경우 갈색거저리추출물의 당도는 2.0°Brix로 나타났고, Ba9 균주 발효 추출물은 1.2°Brix, F3, F5, Sc 균주 발효 추출물은 모두 1.0°Brix로 발효 전보다 감소하는 경향을 띠었다. 반면에 Bs 균주 발효 추출물은 3.0°Brix, Ak 균주 발효 추출물은 6.8°Brix로 증가한 결과값을 나타냈다. Ethanol 추출물의 경우, 갈색거저리추출물이 19.8°Brix로 측정되었고, 발효 후 추출물들은 평균 20.3°Brix로 발효 전보다 증가하였으며, Metha-

Table 1. Total soluble solids of Water, Ethanol and Methanol extract of Tenebrio molitor (T.molitor) fermented using several kinds of micro-organisms

Composition	Total soluble solids (°Brix)			
	DW	Ethanol	Methanol	
T. Molitor	N	2.0±0.00	19.8±0.00	0
	F3	1.0±0.00	20.2±0.00	0
	F5	1.0±0.20	20.2±0.20	0
	Ba9	1.2±0.00	20.2±0.20	0
	Ak	6.8±0.20	20.4±0.00	0
	Sc	1.0±0.00	20.4±0.00	0
	Bs	3.0±0.00	20.4±0.00	0

Values are mean ± S.E, n=3

N : Non-fermented

F3: Fermented by Lactobacillus plantarum F3

F5: Fermented by Lactobacillus plantarum F5

Ba9: Fermented by Lactobacillus gasserii Ba9

Ak: Fermented by Aspergillus kawachii KCCM 32819

Sc: Fermented by Saccharomyces cerevisiae KACC 93023

Bs: Fermented by Bacillus subtilis KACC 91157

anol 추출물은 모두 0°Brix로 일정하였다.

갈색거저리추출물과 유용균주를 이용한 발효 갈색거저리추출물의 용매 별 pH는 다음과 같다(Table 2). 발효 전 10% Water 추출물에 비교해 보았을 때, F3, F5, Ba9 및 Ak 균주 발효 추출물들은 pH가 감소하였고, Bs 균주 발효 추출물과 Sc 균주 발효 추출물은 증가하였다. Ethanol과 Methanol 추출물의 pH는 발효 전과 발효 후 대부분이 유사한 수치를 나타냈으나, Ak 균주 발효 추출물에서만 감소하는 경향을 나타내었다.

갈색거저리추출물과 유용균주를 이용한 발효 갈색거저리추출물의 각 용매 별 산도는 다음과 같다(Table 3). 10% Water 추출물에서 Ak, Bs 균주 발효 추출물을 제외한 모든 균주 발효 추출물은 수치가 감소하였고, Ak 균주 발효 추출물은 발효 전보다 상당히 증가한 수치를 나타냈다. Ethanol 추출물에서는 갈색거저리추출물에 비해 모든 발효 추출물들의 수치가

Table 2. pH of Water, Ethanol and Methanol extract of Tenebrio molitor (T.molitor) fermented using several kinds of micro-organisms

Composition	pH			
	DW	Ethanol	Methanol	
T. Molitor	N	5.64±0.01	6.64±0.02	6.65±0.01
	F3	5.47±0.01	6.40±0.01	6.36±0.02
	F5	5.41±0.02	6.39±0.01	6.36±0.01
	Ba9	4.92±0.01	6.58±0.02	6.48±0.03
	Ak	4.97±0.02	4.77±0.01	4.93±0.01
	Sc	6.48±0.01	6.61±0.01	6.48±0.01
	Bs	7.10±0.03	6.70±0.03	6.60±0.01

Values are mean ± S.E, n=3.

Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 3. Acidity of Water, Ethanol and Methanol extract of *Tenebrio molitor* (T.molitor) fermented using several kinds of micro-organisms

Composition	Acidity (%)		
	DW	Ethanol	Methanol
N	1.50±0.02	2.16±0.01	1.38±0.00
F3	1.14±0.03	1.80±0.02	1.62±0.02
F5	1.32±0.04	1.86±0.02	1.86±0.04
<i>T. Molitor</i>			
Ba9	1.32±0.01	1.86±0.03	1.62±0.01
Ak	3.24±0.02	2.04±0.01	1.68±0.02
Sc	0.90±0.03	1.92±0.03	1.38±0.01
Bs	1.80±0.03	2.04±0.01	1.62±0.03

Values are mean ± S.E, n=3.

Abbreviations are the same as in Table 1.

감소하는 경향을 나타내었고, Methanol 추출물에서는 Sc 균주 발효 추출물을 제외하곤 평균 1.68%로 발효 전 추출물보다 전반적으로 수치가 증가하는 경향을 나타내었다.

**총 Phenolic compound 및 Flavonoid 함량**

Phenolic compound에서 phenolic hydroxyl 그룹은 단백질 또는 효소 단백질, 기타 거대 분자들과 결합하는 성질, 항산화 능력이 있다고 알려져 있다. 그리고 Phenolic compound에 속하는 flavonoid류는 라디칼 소거능, 지질 산화능이 뛰어난 것으로 보고되었다[1].

총 Phenolic compound 및 Flavonoid 함량 측정 결과는 다음과 같다(Table 4). 갈색거저리 10% Water 추출물은 총 Phenolic compound가 10.97 mg/100 g 함유되어 있었고, F3, F5, Ba9, Sc 균주 발효 추출물들은 각각 7.37 mg/100 g, 7.39 mg/100 g, 7.72 mg/100 g, 7.54 mg/100 g으로 발효 후 함량이 감소하는 경향을 보였지만, Bs 균주 발효 추출물은 16.37 mg/100 g, Ak 균주 발효 추출물은 29.97 mg/100 g으로 총 Phenolic compound 함량이 증가한 결과를 나타내었다. Flavonoid 함량은 기존의 갈색거저리 10% Water 추출물이 2.13 mg/100 g에 비해 F3, Ba9 균주 발효에서 각각 2.01 mg/100 g, 2.08

mg/100 g으로 감소하였고, F5, Ak, Sc 균주 발효에서는 각각 2.68 mg/100 g, 2.08 mg/100 g, 2.17 mg/100 g으로 소폭 증가하였으며, Bs 균주 발효에서는 7.17 mg/100 g으로 가장 큰 증가를 보였다. Ethanol 추출물에서의 총 Phenolic compound 및 Flavonoid 함량은 Phenolic compound의 경우 갈색거저리 추출물이 3.59 mg/100 g, 발효 후 추출물들이 평균 4.34 mg/100 g으로 발효 했을 때 함량이 전반적으로 증가하였고, 특히 Bs 균주 발효 추출물이 5.61 mg/100 g으로 유의적인 증가를 보였다. Flavonoid 함량의 경우 대부분의 발효 추출물들이 감소하였으나, Bs 균주 발효 추출물만 3.74 mg/100 g으로 증가하였다. *Bacillus*를 이용하여 발효를 진행했을 때 단백질의 광범위한 가수분해와 발효과정에서 일어나는 phytosterol의 증가[3]에 의해 Phenolic compound가 발효 전보다 많아졌을 것으로 사료된다.

Methanol 추출물에서의 총 Phenolic compound 및 Flavonoid 함량의 경우 모든 균주 발효 추출물들은 유의적인 수치를 띄지 않았다.

**DPPH Free radical scavenging activity**

DPPH Free radical scavenging activity는 항산화 활성을 측정하는데 널리 쓰이는 방법들 중 하나이며, 수소-전달 기작을 이용하여 시료의 항산화능을 측정하는 원리이다[20]. 이는 홀전자를 가지고 있는 Free radical과 시료의 -OH기가 붙어서 Free radical의 radical 생성반응을 종결시키는 것에 기인하며, 이 반응에 의해 DPPH가 보라색에서 노란색으로 변화, 이를 흡광도 측정을 통해 항산화능을 알아보는 것이다.

갈색거저리 및 발효 갈색거저리 분말 1% 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 결과는 다음과 같다(Fig. 1). 합성 항산화제인 Butylated hydroxytoluene (BHT)를 대조군으로 사용하였으며, 이는 약 90%정도의 항산화능을 나타내었다. Water로 추출한 갈색거저리추출물은 36.06%의 항산화능을 나타내었다. Beak 등[21]의 연구에 따르면 갈색거저리는 블루베리와 비슷한 항산화능을 가지고 있어, 그 자체로도 상당한 효능이 있다고 볼 수 있다. 반면에, Ak 균주 발효 추출물에서 46.19%,

Table 4. The concentration of total phenolic compounds and total flavonoids compounds in Water, Ethanol and Methanol extract of *Tenebrio molitor* (T.molitor) fermented using several kinds of micro-organisms

Composition	Total phenolic compounds concentration (mg%)			Flavonoids concentrations (mg%)		
	Water	Ethanol	Methanol	Water	Ethanol	Methanol
N	10.97±0.84	3.59±0.36	4.18±0.05	2.13±0.22	3.23±0.51	1.51±0.40
F3	7.37±0.60	4.30±0.25	4.05±0.10	2.01±0.10	1.93±0.25	1.45±0.13
F5	7.39±0.33	4.31±0.18	3.49±0.16	2.68±0.18	2.02±0.60	1.48±0.13
<i>T. Molitor</i>						
Ba9	7.72±0.68	4.27±0.05	3.63±0.20	2.08±0.08	1.86±0.35	1.47±0.08
Ak	29.97±1.68	3.70±0.30	4.24±0.62	2.41±0.72	1.12±0.09	1.25±0.47
Sc	7.54±0.15	3.83±0.45	4.12±0.18	2.17±0.10	2.53±0.41	1.90±0.02
Bs	16.37±0.45	5.61±0.76	3.85±0.12	7.17±0.29	3.74±0.23	1.94±0.03

Values are mean ± S.E, n=3.

Abbreviations are the same as Table 1.

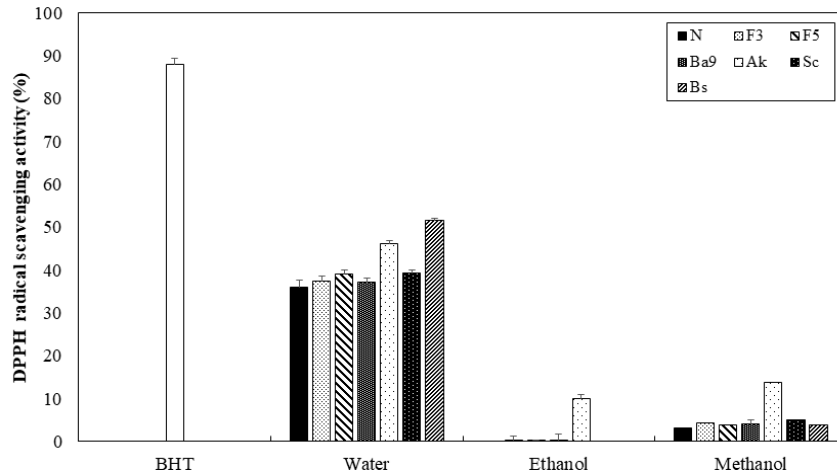


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of Water, Ethanol and Methanol extract of *Tenebrio molitor* (*T.molitor*) fermented using several kinds of micro-organisms. BHT: butylated hydroxytoluene (0.05%). Values are mean  $\pm$  S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at  $p<0.05$ . Abbreviations are the same as in Table 1.

Bs 균주 발효 추출물은 51.54%로 유의적인 증가를 나타내었고, F3, F5, Ba9, Sc 균주 발효에서는 각각 37.33%, 38.95%, 37.19%, 39.32%로 소폭 상승하는 모습을 보였다. Ethanol, Methanol 추출물은 항산화능이 거의 나타나지 않았고, Ak 균주로 발효한 갈색거저리 추출물의 경우 적은 라디칼 소거능을 가졌으나 유의적인 수치는 아니었다. 결과적으로, water를 이용하여 추출한 균주 발효 추출물이 다른 용매에 비해 우수한 항산화능을 가지고 있으며, 그 중에서 Bs 균주를 이용한 추출물이 가장 강력한 항산화능을 나타내었다. Kaur 등[16]의 연구에 의하면 채소 내 Phenolic compound의 항산화능이 퇴행성 질환으로 인한 사망률을 낮춰주는 효과가 역학조사를 통해 밝혀지는 등 Phenolic compound와 항산화능의 관계는 충분히 증명되었으며, 위와 같은 결과는 Bs에 의해 발효된 갈색거저리가 다량의 Phenolic compound를 함유하고 있어 높은 항산화능을 가지게 된 것이라 짐작할 수 있다.

**Cu 환원력 측정**

Cu<sup>2+</sup>는 킬레이트 활성이 높을수록 산화-반응에 촉매작용을 감소시키는 능력을 측정하는 지표로서 사용되고, 반응 물질의 OD 값이 높을수록 환원력의 세기가 높다고 볼 수 있다 [9].

Cu 환원력을 측정된 결과값은 다음과 같다(Table 5). 갈색거저리 1% Water 추출물은 0.32의 Cu 환원력을 나타내었는데, F3, Ba9, Ak, Sc 균주 발효물의 경우 각각 0.29, 0.3, 0.29, 0.32 로 보다 감소하거나 같은 수치를 나타내었고, F5 균주 발효물은 0.39, Bs 균주 발효물은 0.5로 유의적인 증가를 나타내었다. Ethanol 추출물의 경우 모든 균주 발효 추출물이 평균 0.72로 갈색거저리추출물보다 더 높은 수치를 나타내었고, Methanol 추출물 역시 평균 0.67로 발효 전보다 증가한 경향을 나타내었다.

**효소-기질 분해능 측정**

$\alpha$ -amylase는 다당류를 단당류로 가수분해하는 효소로써 [24], 사람이 탄수화물을 섭취하게 되면 가장 먼저 분비되어 소화를 촉진하는 효소이기도 하다[19]. 이  $\alpha$ -amylase가 starch를 분해하는 능력을 이용하여 효소-기질의 반응 정도를 측정해 볼 수 있다.

$\alpha$ -amylase에 의한 전분 분해능 결과는 다음과 같다(Fig. 2). 갈색거저리추출물의 경우 clear zone이 상당 부분 생성되었고, 이를 통해 발효 이전에도 갈색거저리는 어느 정도의 전분 분해능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 발효 후 갈색거저리 추출물들의 환을 비교해보면, Bs 균주 발효 추출물을 제외한 나머

Table 5. Reducing power in Water, Ethanol and Methanol extract of *Tenebrio molitor* (*T.molitor*) fermented using several kinds of micro-organisms

Composition	Conc. (%)	Cu-Reducing power		
BHT	1.00	2.54 $\pm$ 0.20		
	0.50	2.44 $\pm$ 0.05		
	0.10	1.41 $\pm$ 0.05		
	0.05	1.09 $\pm$ 0.06		
	0.01	0.34 $\pm$ 0.03		
<i>T. molitor</i>	Composition	DW	Ethanol	Methanol
	N	0.32 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.01
	F3	0.29 $\pm$ 0.00	0.69 $\pm$ 0.09	0.66 $\pm$ 0.05
	F5	0.39 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.08	0.59 $\pm$ 0.03
	Ba9	0.30 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.03
	Ak	0.29 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.11	0.68 $\pm$ 0.04
	Sc	0.32 $\pm$ 0.01	0.71 $\pm$ 0.07	0.69 $\pm$ 0.06
	Bs	0.50 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.09	0.77 $\pm$ 0.08

BHT: butylated hydroxytoluene (0.05%)

Values are mean  $\pm$  S.E, n=3.

Abbreviations are the same as Table 1.

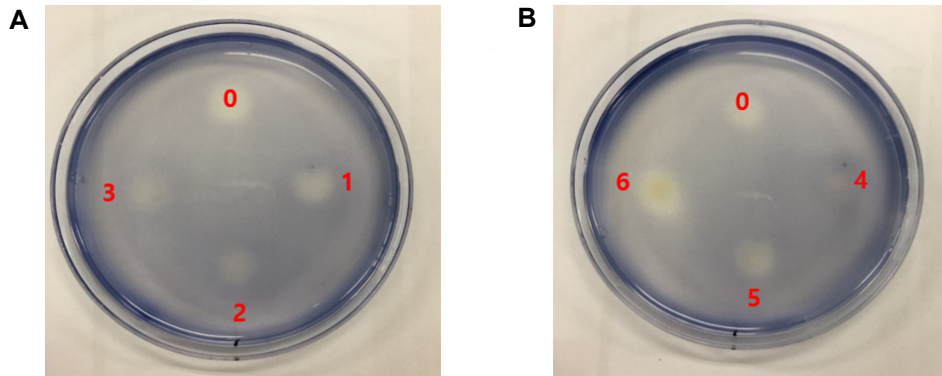


Fig. 2. Evaluation of enzyme activities in starch for the utilization of several kinds of micro-organisms in Water extract of *Tenebrio molitor* (*T.molitor*) fermented using several kinds of micro-organisms (A, B). 0: Non-fermented. 1: *Lactobacillus plantarum* JBMI F3. 2: *Lactobacillus plantarum* JBMI F5. 3: *Lactobacillus gasseri* Ba9. 4: *Aspergillus kawachii* KCCM 32819. 5: *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023, 6: *Bacillus subtilis* KACC 91157.

지 균주 발효 추출물들은 전분분해능이 없어지거나 오히려 발효 전보다 그 능력이 감소하는 경향을 나타내었다. 이 점을 미뤄볼 때 Bs 균주 발효 추출물만이 발효 후 α-amylase 활성이 증가했음을 알 수 있었다. Raul 등[9]은 *Bacillus subtilis*가 α-amylase를 생산하는 균주로 잘 알려져있다고 소개하였고, 이를 통해 유추해 볼 때 Bs에 의해 발효된 시료는 Bs에서 만들어진 α-amylase에 의해 전분분해능이 증가한 것으로 사료된다.

**발효 균주에 따른 Fibrinolytic activity**

혈액의 응고 기작은 혈관 벽에 혈소판이 점착, 응집하여 혈

소판 혈전을 형성하는 것으로부터 시작한다. 혈전의 축적에 의해 혈액순환이 방해 받게 되면, 영양소 및 산소가 전달되지 못하게 되며, 또한 이렇게 생성된 혈전들은 회복 후에도 분해되지 않고 심혈관계를 순환하게 되어 관련 질환의 요인이 된다[15].

발효 균주에 따른 Fibrinolytic activity는 다음과 같다(Fig. 3). Fibrin plate 위에 paper disc를 올려놓은 뒤 갈색거저리 10% Water 추출물 과 각 균주 발효 10% Water 추출물들을 50 μl씩 점적하여 1시간마다 분해한 크기를 확인 하였고, 최종적으로 6시간 후에 그 크기를 재어 계산하였다. 그 결과 갈색

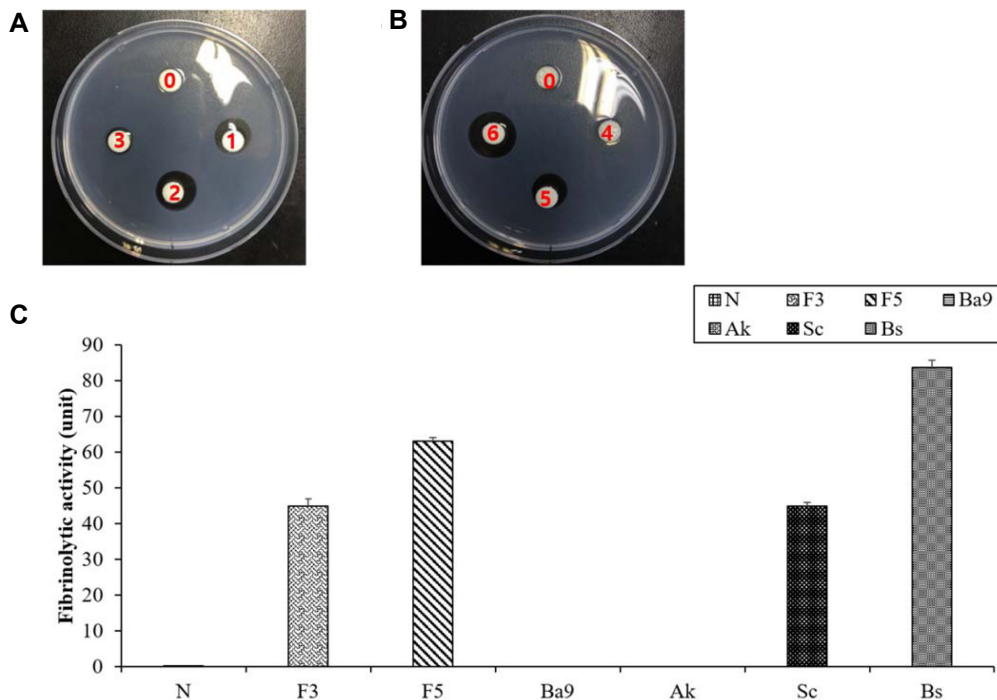


Fig. 3. Fibrinolytic activities in Water extract of *Tenebrio molitor* (*T.molitor*) fermented using several kinds of micro-organisms (A, B, C). Abbreviations are the same as in Table 1 and Fig. 2.

거저리 10% Water 추출물의 Fibrinolytic activity가 나타나지 않았던 것에 비해 F3, F5, Sc, Bs 균주 발효 추출물에서는 각각 44.9 unit, 63.1 unit, 44.9 unit, 83.7 unit 로 Fibrinolytic activity가 새로 활성화 되었음을 알 수 있었다. 특히 Bs 균주 발효 추출물의 결과값이 가장 높은 점으로 미뤄, 갈색거저리를 Bs 균주로 발효함으로써 Fibrinolytic activity의 효능을 기대할 수 있다는 유의적인 결과를 도출해 낼 수 있었다. Huang 등[10]의 연구에서는 갈색거저리로부터 Fibrinolytic enzyme를 성공적으로 분리해냈으며, 값싸고 대규모의 양산이 가능하다고 시사하였다. 본 연구의 결과에서 또한 거저리의 Fibrinolytic activity를 확인 할 수 있었고, 발효과정을 통해 Fibrinolytic activity가 기존보다 증가함을 확인하였다. 이로써, Bs 균주를 이용한 발효 거저리 분말은 혈전증 치료제 소재로서의 이용 가치가 높을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다(317039-4).

### References

- An, S. I. 2005. Antioxidative and physiological activities of some phenolic compounds. Department of Food and Biotechnology Graduate School of Technology Hankyong National University.
- Astrup, T. and Müllertz, S. 1991. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
- Bijoy, M., Jayati, S. and Prabir, K. Sarkar. 2008. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Res. Int.* **41**, 586-593
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
- Chang, H. G. and Park, Y. S. 2003. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. *J. Appl. Biol. Chem.* **46**, 367-375.
- Chung, S. J., Lee, Y. H., Chung, J. H., Lee, B. R. and Han, D. M. 1995. Antifungal Effect and activity spectrum of crude antifungal proteins from hemolymph of larvae of *Tenebrio molitor* in Korea. *Hanguk Kyun Hakoe Chi* **23**, 232-237.
- Dibyangana, R., Tania, B., Suchita, M., Shrayan, K. D. and Suvroma, G. 2014. Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation. *Biochem. Res. Int.* **2014**, 568141.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
- Ahn, H. Y., Choe, D. J., Kim, B. K., Lee, J. H. and Cho, Y. S. 2015. Bioactive materials and antioxidant properties of fermented rice-bran extract. *Saengmyeong Gwahag Hoeji* **25**, 1014-1020.
- Huang, M. X., Ye, Y., Chen, Y. and Han, Y. L. 2012. Partial purification and characterization of fibrinolytic enzymes from yellow mealworm. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **18**, 153-161.
- 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*. *Saengmyeong Gwahag Hoeji* **21**, 81-88.
- Jeong, M. E., Kang, S. A. and Cheong, C. 2014. Physicochemical characteristics of the mash quality of Cheongju prepared using different Nuruks. *JKAIS.* **15**, 5150-5158.
- 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
- Lee, J. H., Um, Y. R., Shim, K. S., Jeon, W. K., Lee, J. H. and Ma, J. Y. 2009. Acute toxicity study on fermented Ssanghwa-tang extracts in mice. *Kor. J. Orient. Int. Med.* **30**, 780-787.
- Kaur, C. and Kapoor, H. C. 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* **37**, 153-161.
- Kim, H. A., Lee, S. H., Choi, Y. C., Park, K. H., Hwang, J. S., Kim, N. J. and Nam, S. H. 2013. Comparison of fibrinolytic activity from Korean indigenous insects. *J. Seric. Entomol. Sci.* **51**, 147-152.
- Kim, S. Y., Son, Y. J., Kim, S. H., Kim, A. N., Lee, G. Y. and Hwang, I. K. 2015. Studies on oxidative stability of *Tenebrio molitor* Larvae during cold storage. *Kor. J. Food Cook Sci.* **31**, 62-71
- Chae, K. S., Jung, J. H., Yoon, H. H. and Son, R. H. 2014. Antioxidant activity and main volatile flavor components of mulberry wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* B-8. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 1017-1024.
- Lee, S. Y., Kim, J. H., Park, J. M., Lee, I. C. and Lee, J. Y. 2014. Antioxidant activity and inhibition activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Smilax China* L. *Kor. J. Food Preserv.* **21**, 254-263.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F. and Yang, Q. 2012. Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. *Food Chem.* **134**, 1885-1891.
- Baek, M. H., Seo, M. C., Kim, M. A., Yun, E. Y. and Hwang, J. S. 2017. The antioxidant activities and hair-growth promotion effects of *Tenebrio molitor* Larvae extracts (TMEs). *Saengmyeong Gwahag Hoeji* **27**, 1269-1275.
- Kang, M. S., Kim, M. J., Han, J. S. and Kim, A. J. 2017. Fatty acid composition and anti-inflammatory effects of the freeze dried *Tenebrio molitor* Larva. *Kor. J. Food Nutr.* **30**, 251-256.
- 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.
- Phonesavanh, P., Kim, K. K., Lim, J. C., Lee, K. Y., Park, C. H. and Choe, M. 2015. Saccharification of *Fagopyrum esculentum* by amylase treatments increases phenolic compound content and antioxidant activity. *J. East Asian Soc. Diet Life* **25**, 139-145.

25. Hwang, S. Y., Bae, G. K. and Choi, S. K. 2015. Preferences and purchase intention of *Tenebrio molitor* (Mealworm) according to cooking method. *Culi. Sci. Hos. Res.* **21**, 100-115.
26. 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.
27. Yoo, J. M., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2013. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 249-254.

---

### 초록 : 유용 미생물을 이용한 발효갈색거저리 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성 효과

장성호 · 심소연 · 안희영 · 서권일 · 조영수\*

(동아대학교 생명공학과)

본 연구는 미생물을 이용하여 갈색거저리를 발효시킨 분말을 water, ethanol, methanol 용매별로 추출하여 다양한 실험을 행하였다. 균주는 3종의 유산균 *Lactobacillus plantarum* JBMI F3 (F3), *Lactobacillus plantarum* JBMI F5 (F5), *Lactobacillus gasseri* Ba9 (Ba9), 1종의 곰팡이 *Aspergillus kawachii* KCCM 32819 (Ak), 1종의 효모 *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023 (Sc), 1종의 바실러스 *Bacillus subtilis* KACC 91157 (Bs) 총 6종의 균주를 사용하였다. 각 균주를 이용한 발효 후 갈색거저리의 효능을 알아보기 위해 DPPH assay, 총 phenolic compound 및 Flavonoid 함량, Cu 환원력, Fibrinolytic activity, 효소-기질 활성 분석을 진행하였다. 그 결과, DPPH assay 결과, Water 추출물이 전반적으로 높은 항산화능을 보였고, 그 중 Bs 균주 발효 추출물이 우수한 라디칼 소거능을 보였다. 총 phenolic compound 및 Flavonoid의 경우, phenolic compound는 Ak발효균이 가장 함량이 많았고, Flavonoid는 Bs발효균이 가장 높았다. 환원력은 ethanol - Bs발효균에서 높은 수치를 확인하였고, Fibrinolytic activity 및 전분분해능은 water - Bs발효균에서 우수한 효과를 나타냈다. 위와 같은 결과를 토대로 발효 갈색거저리 분말은, 기존 갈색거저리 분말보다 항산화능 및 생리활성 측면에서 효능이 상당부분 향상됨을 알 수 있었다. 그러므로 발효거저리분말은 식품산업전반에서 높은 이용가치를 증명하는 기초 연구자료로 활용될 것이다.