

Effect of *Tenebrio molitor* Larvae Fermented with *Saccharomyces cerevisiae* M1 (KACC 93023) on Non-alcoholic Fatty Liver-induced Rats

So-Yeon Sim[†], Sung-Ho Jang[†], Young-Su Cho and Hee-Young Ahn*

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

Received January 13, 2020 / Revised March 4, 2020 / Accepted March 6, 2020

In this study, *Tenebrio molitor* (brown mealworm) larvae powder was fermented with *Saccharomyces cerevisiae* M1 (KACC 93023). The fermented and non-fermented powders were subsequently administered to rats with induced non-alcoholic fatty liver disease to compare the degree of improvement. The rats exhibited abnormal lipid metabolism due to orotic acid, and the group that were fed the fermented larvae powder showed similar weight to normal rats. AST, ALT, ALP, and LDH activities, all known indicators of liver health, and various other lipid-related indicators appeared positive, suggesting improvement. The lipid peroxide and glutathione content in the liver tissue and serum were similar to or better than those of the normal group. Finally, morphological observations of liver tissue using H&E and oil red O stainings revealed that the fermented powder group showed markedly reduced fat along with normal hepatocyte shape and arrangement. To summarize, it was confirmed that dietary brown mealworm larvae improve non-alcoholic fatty liver function, and, when fermented with yeast, most indicators showed positive improvements to almost normal levels. As such, the fermented powder can be considered to improve non-alcoholic fatty liver, suggesting that it may be used as a material for various products in the future.

Key words : Ferment, non-alcoholic fatty liver, orotic acid, *Saccharomyces cerevisiae*, *Tenebrio molitor* larvae

서 론

2000년대로 접어들면서, 전 세계는 각종 환경문제에 의해 유발된 식량 관련 문제에 직면하였다. 또한 인구의 폭발적인 증가까지 겹치게 되면서 그 중요성은 더욱 부각되고 있는 실정이다[14]. 그 대체재로 주목받고 있는 곤충은 일반적으로 단백질이 다량 함유되어 있고, 미네랄 및 불포화 지방산 역시 상당량 존재하며, 이에 초점을 맞춘 식·약용 소재화 관련 연구들이 최근 활발히 진행되고 있다[17].

갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor* larvae)은 식용 소재로 연구 중인 곤충들 중 하나로 전 세계에 분포하며, 한국에도 이미 대량생산 농가가 존재할 정도로 대중적이다. 또한 단백질 등 영양적 가치가 높아 식품 소재로써 활용될 가치가 충분하다[25]. 이를 위해서 검증해야 할 것은 안전성인데, 국내 갈색거저리 유충 분석 결과 유해 미생물인 *E. coli* O157:H7이 미 검출

되었다는 보고와 함께 일부 중금속인 수은이 검출되었으나, 일반식품 기준치 이하로 정량되었고 이외에 다른 유해 중금속은 발견되지 않았다는 보고[28]가 잇따르고 있다. 또한 동결 건조한 갈색거저리 유충 분말을 SD rat에 하루 3,000 mg/kg 씩, 총 28일 동안 경구 투여 후 실시한 다양한 독성 검사에서 신체의 특이적 변화가 없었다는 연구사례[23]도 보고됨에 따라 식품으로써 사용할 수 있는 근거를 제시하였다. 또한 다양한 방법으로 가공된 갈색거저리 분말이 간암세포주가 이식된 실험 쥐에서 암세포의 성장을 억제하는 것을 확인한 연구결과[16]와 사염화탄소로 급성 간 손상을 유발한 마우스의 다양한 지표 분석 결과, 긍정적인 효과를 나타냈다는 결과[20] 등이 속속 보고되고 있어 활용 범주가 더욱 확대될 수 있을 것으로 기대된다.

발효는 천연물이 가진 유효성분을 증가시켜 활용 범주를 확장시키는 가공법 중 하나로 오랜 기간 동안 다양한 분야에서 활용되어져 왔으며, 유산균, 효모, 세균, 곰팡이 등이 주 미생물로써 사용되고 있다[26]. 갈색거저리 유충은 50% 이상의 단백질로 구성되어 있고, 지방 역시 34% 이상 함유하고 있는데, 특히 다른 곤충들에 비해 Oleic acid, Linoleic acid 등 여러 지방산들의 비중이 상당히 높은 것으로 알려져 있다[21]. 발효는 이러한 고분자 물질들을 분해하여 유효성분을 만들어내는 특성이 있으므로 가장 적합한 가공방법이라 판단된다. 특히 *Saccharomyces cerevisiae*로 발효를 진행했을 때, 항산화능과 환원력에서 긍정적인 결과가 나타났다는 연구 사례[4]

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

*Tel : +82-51-200-5746, Fax : +82-51-200-5746

E-mail : ahnhy@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.

도 있으나 효모로 곤충을 발효한 사례는 아직 미미하여 검증 및 연구가치가 충분할 것으로 사료된다.

비 알코올성 지방간은 음주력이 거의 없으나 지방간과 조직학적으로 염증소견을 보이는 경우[15]를 말하며 발병원인은 고지방식품 섭취, 인슐린 저항성에 의해 유리지방산 합성 증가, VLDL의 중성지방 분비 감소에 의한 지방축적 등이 꼽힌다[13]. 지방간이 지방간염으로 악화되게 되면 간경변증, 간암으로까지 이어지는 경우가 다수이며, 간경변증까지 진행될 경우 회복이 불가하기 때문에 가능한 빠른 시기에 치료를 받는 것이 가장 좋은 것으로 알려져 있다[22]. 이를 치료하는 방법은 저탄수화물 식사 등을 통한 식이요법 및 간 내 지방의 산화를 유도하기 위한 운동, 약물치료, 직접적인 수술 등이 있는데, 약물치료의 경우 인슐린 민감성, 비타민 E 등을 투여하여 호전시키는 방법을 주로 활용하나 공인된 약물은 아직 존재하지 않아[12] 관련 연구 및 개발이 시급한 실정이다.

이에 본 연구에서는 식품의 가공방법 중 하나인 발효를 통해 생리활성이 강화된 갈색거저리 유충 분말을 비 알코올성 지방간이 유발된 흰 쥐에 급여하였다. 그 후 다양한 지표분석을 통해 발효 갈색거저리 유충이 비 알코올성 지방간의 개선 효과를 가지는 식·약품의 소재로써 활용가치가 있는지 여부를 판단하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료, 식이제조

본 연구에서 사용한 건조 갈색거저리 유충은 2017년 6월 경기도 양주시 광적면 인섹트리(양주시, 경기)에서 구입하였으며, 분말화 시킨 후 냉장 보관하였다. 발효 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* M1 (KACC 93023)으로, 본 연구실 내 보관중인 균주를 사용하였다. 위 균주를 전배양한 후 원심 분리하여 10% (v/w) 만큼의 균체를 수득하였다. 그 후 갈색거저리 분말에 이를 접종하고 30°C에서 3일간 고상 발효를 진행하였다. 발효 과정 중 발효물의 건조를 막기 위해 멸균된 증류수를 분무하였고, 발효 후 1일 동안 열풍 건조를 실시하여 얻은 시료를 최종 시료로 선정 및 사용하였다. 식이조성은 Table 1처럼 구성하였는데, 대조군 식이는 N군 식이에 지방간을 유도하는 orotic acid를, T와 FT군은 대조군 조성에 갈색거저리 유충 분말, 발효 갈색거저리 유충 분말을 각각 더하여 시료를 제조한 후 급여하였다.

실험동물 및 사육조건 설정

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 효창 사이언스(대구, 대한민국)에서 구입하였고, 동물 사육실은 온도 22±2°C, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(명주기: 07:00~19:00)으로 설정하였다. 본 사육에 들어가기에 앞서 1주일간 시중에 판매하고 있는 고형사료와 물을 급여하며 충분히 적응시킨

Table 1. Diet composition used in the experiment (%)

Ingredients	N ⁴⁾	Orotic acid ³⁾		
		C ⁵⁾	T ⁶⁾	FT ⁷⁾
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn starch	15.0	14.0	9.0	9.0
Sucrose	44.5	44.5	44.5	44.5
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0
Corn oil	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mixture ¹⁾	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture ²⁾	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Orotic acid	-	1.0	1.0	1.0
T	-	-	5.0	-
FT	-	-	-	5.0
Total (%)	100	100	100	100

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

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

³⁾Fatty liver induced by orotic acid: Diet for C, T, FT

⁴⁾N: Normal

⁵⁾C: Control

⁶⁾T: *Tenebrio molitor* larvae, Non-fermented

⁷⁾FT: *Tenebrio molitor* larvae fermented by *Saccharomyces cerevisiae* KACC 93023 for 3 days

후 실험을 진행하였다. 사육 기간 중 식이 섭취량은 매일, 체중은 7일을 주기로 일정한 시간에 측정하였다. 본 실험은 동아대학교 동물실험 윤리심의 위원회의 승인(승인번호: DIACUC-승인-17-23)을 받아 진행하였다.

분석시료 조제

동물실험은 조제한 식이를 10일간 급여한 후, 실험 최종일 24시간 전에 절식시켰다. 해부는 에테르로 가볍게 마취시킨 후 실시하였다. 혈청은 개복 후 복부 대동맥에서 채혈을 실시하고, 이를 약 30분간 실온에 방치시킨 후 4°C, 3,000 rpm, 15 min간 원심분리 하여 얻은 것을 생화학적 분석에 사용하였다. 각 조직은 적출하여 0.9% 농도의 생리 식염수로 세척 후 여과지로 물기를 제거한 것을 무게 측정 및 분석시료로 사용하였다.

적출된 간 조직은 Homogenate 분획으로 제조하여 실험에 사용하였다. 장기 일부를 채취한 후 그 무게의 9배에 해당하는 potassium phosphate buffer 용액을 첨가하여 homogenizer로 균질화하였다. 그 후 균질액 상층에 있는 기포가 제거될 수 있도록 일정시간 차가운 곳에서 방치하였고, 충분히 안정된 시료를 실험에 사용하였다.

혈청 내 생화학적 지표 및 지질 분석

혈청 내 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) 분석 및 total cholesterol, total lipid, phospholipid, free fatty acid, triglyceride 농도 측정은 의료전

문수탁검사 기관인 동남의화학연구소(부산, 대한민국)와 서울 의과학연구소(용인, 대한민국)에 의뢰하여 분석하였다.

간 조직 및 혈청 내 과산화지질 함량

간조직을 균질화하여 얻은 분획물과 혈청 내 과산화지질 함량은 TBARS법에 준하여 측정하였다. 단백질 1 mg을 함유한 분획 용액 1 ml에 TBA시약 2 ml씩 가한 후 잘 섞고, 이를 끓는 물에서 약 30 min간 반응시켰다. 그 후 ice에서 충분히 식히고 획득한 용액을 3,000 rpm, 10 min간 원심분리 하였다. 이를 통해 얻은 시료 중 상등액만을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

글루타치온 함량 측정

간 조직 및 혈청 내 글루타치온 함량은 조직 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml, 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml을 각각 가하여 혼합 후 원심분리 한 용액에 5,5'-dithiobis (2- nitrobenzoic acid) 발색시약을 첨가하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 후 표준 검량 곡선에 준한 함량을 산출하여 조직 g당 mg으로 표시하였다[3].

간 조직 내 미네랄(Fe, Zn) 함량 측정

간 조직 내 미네랄 함량은 AOAC 분석 방법에 준하여 측정하였다[1]. 먼저, 간 조직 1 g을 취한 후 550°C에서 3시간 동안 회화시켰다. 다음으로 해당 시료를 6 N HCl로 산분해시키고 수욕상에서 산을 완전히 제거한 후, 다시 3 N HCl을 가한 후 최종적으로 여과를 진행하였다. 그 후 원소 종류에 따라 적절한 농도로 희석하였으며, 이를 원자 흡광 분광 광도계(Analyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 분석하였다.

H&E, Oil red O 염색을 통한 병리조직학적 관찰

먼저, 실험동물에서 적출한 간 조직을 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액 및 기타 잔여물을 세척하였다. 세척한 조직의 일부를 취하여 10% formalin 용액으로 고정시킨 후 실험에 따라 처리방법을 달리하여 시료를 제작하였다고, 이를 록원바이오융합연구재단(서울, 대한민국)에 의뢰 및 분석하였다.

H&E는 파라핀 포매 과정을 거친 후 3~4 μm 두께로 절편한 것을 hematoxylin and eosin으로 염색하였다. Oil red O는 조직을 액체질소로 냉각시킨 후 OCT compound를 이용하여 Block으로 제작하고, 이를 6~7 μm 두께로 절편하여 Oil red O 염색을 실시하였다. 해당 시료들은 베헤얼 슬라이드 스캐너 (Pannoramic MID, 3D Histech Ltd., Budapest, Hungary)로 관찰하였다.

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean ± S.E.)로 표시하였고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan’s multiple range test로 나타내었다[8].

결과 및 고찰

식이 섭취량 및 체중 변화

Orotic acid에 의해 비 알코올성 지방간이 유발된 흰 쥐에 *Saccharomyces cerevisiae* M1 (KACC 93023)으로 발효한 갈색겨 저리 유충 분말을 10일간 섭취시킨 후 그 소비량과 체중변화를 Table 2에 정리하였다. 정상군(N군)에 비해 대조군(C군)에서 체중이 눈에 띄게 증가함을 확인할 수 있었다. 한편, F군은 대조군보다 체중 증가량이 감소하였고, FT군에서는 정상군보다 더 낮은 체중 증가량을 나타내었다. 위 결과를 통해 판단해 본다면, orotic acid가 체내 지질대사에 부정적인 영향을 미쳐 급격한 체중증가가 나타났으나, 발효물을 급여할 시 이를 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다. 식이 및 수분 섭취량은 각 군별로 큰 차이를 나타내지 않았다.

각 군별 조직 무게 비교

각 군의 흰 쥐에서 적출한 장기 중량을 측정하여 Table 3에 정리하였다. 전체적으로 대조군에서 적출한 장기 무게들이 가장 무거운 것으로 나타났는데, 특히 간 조직의 무게가 가장 큰 폭으로 증가하였다. 이는 orotic acid가 간에서 혈중으로 지질을 운반하는 VLDL의 활성을 저해하여 간에 triglyceride가 축적, 지방간이 유발된다[9]는 연구결과를 근거로 판단했을

Table 2. Changes in body weight and dietary consumption

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)	Water consumption (ml/day)
N	202.43±5.50 ^a	236.00±9.43 ^a	32.86±9.26 ^a	23.03±5.22 ^a	19.71±5.46 ^a
C	217.50±11.55 ^b	258.75±12.06 ^b	41.25±4.80 ^b	24.91±6.86 ^a	19.54±11.55 ^a
T	216.00±7.10 ^b	253.17±8.93 ^b	37.17±4.36 ^{ab}	27.08±6.96 ^a	19.61±7.10 ^a
FT	204.83±7.83 ^a	229.17±13.11 ^a	24.33±6.19 ^c	25.00±3.16 ^a	19.50±1.91 ^a

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

Table 3. Each tissues absolute weight measurement

	Liver	Heart	Kidney	Spleen	Testis	Pararenal fat pad	Epididymal fat pad
N	8.43±0.77 ^a	1.03±0.07 ^a	2.06±0.08 ^a	0.53±0.10 ^a	2.78±0.36 ^a	2.33±0.66 ^a	3.07±0.66 ^a
C	11.11±1.83 ^b	1.09±2.30 ^a	2.30±0.62 ^b	0.62±0.04 ^b	2.84±0.11 ^a	3.08±0.71 ^b	3.54±0.85 ^a
T	10.18±0.64 ^{bc}	1.12±0.14 ^a	2.20±0.08 ^{ab}	0.64±0.07 ^b	2.99±0.22 ^a	2.52±0.25 ^{ab}	2.83±0.63 ^a
FT	9.34±1.02 ^c	1.02±0.11 ^a	2.08±0.19 ^a	0.53±0.07 ^a	2.85±0.15 ^a	2.04±0.66 ^a	2.69±0.67 ^a

Value are mean ± S.E., n=6.

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

Abbreviations are the same as in Table 1.

때, 정상적으로 대사되지 못한 지질이 쌓여 간의 무게가 증가된 것으로 사료된다. 또한 다른 조직들에서도 대조군이 가장 높은 수치를 나타낸 것은 간에서 발생한 지질대사 이상이 대부분의 조직에 영향을 미쳐 지방이 축적된 결과로 보여진다. 한편, T군은 전체적으로 대조군보다 낮은 중량을 나타냈으며, FT군은 대체적으로 정상군과 비슷하거나 더 낮은 장기 무게가 측정되었다. 이는 갈색거저리가 orotic acid에 의한 지질대사 이상을 개선시켰고, 이를 효모로 발효시켰을 때, 더욱 긍정적인 개선효과가 나타난 결과로 판단된다.

혈청 내 간 기능 지표 활성 변화

간 질환의 진단 및 생화학 검사에서 주로 확인하는 ALT, ALP, AST, LDH 활성을 비교하여 Fig. 1에 나타내었다. 간은 신체 내에서 가장 큰 기관으로 체내에서 이루어지는 상호 의존성 대사들을 주관하는 역할을 하고 있다. 이는 관련 지표들을 분석했을 때, 질병의 유무 및 심각성을 판단할 수 있음을 시사하며, 실제로 AST, ALT의 수치 상승은 바이러스 감염, 약물, 알코올, 독소 등 다양한 요인에 의해 발생한 세포 괴사에

의해 이루어진다[18]고 보고되고 있다. 실제로 본 연구에서 AST, ALT 분석 결과 orotic acid에 의해 비 알코올성 지방간이 유발된 대조군이 정상군보다 높은 활성을 나타내었다. 또한 T, FT군에서 정상군과 비슷하거나 더 낮은 활성을 나타내었고, 이를 앞선 연구결과를 토대로 판단해본다면 갈색거저리 유충 및 발효물이 간 손상을 일부 개선시키는 효과가 있다고 사료된다. ALP는 뼈, 간, 신장 등에서 다양한 조직에 분포되어 있고, 간염, 간경변 등 간 관련 질환을 가지고 있는 환자들의 대부분에서 ALP농도가 증가하였다고 보고된 바 있다[2]. 또한 LDH 역시 급성 세포 사멸 및 괴사에 의해 혈중으로 방출되며, 특히 종양의 급속 성장 시 그 수치가 상승하는 등 병리학적으로 조직손상 여부를 확인하는 지표로 사용되고 있어[19] 두 효소의 활성 수치 파악을 통해 신체 이상 여부를 판단할 수 있을 것으로 사료된다. ALP, LDH 활성은 대조군에서 모두 높게 측정되었고, 이는 조직 손상에 의해 나타난 결과로 보인다. LDH는 갈색거저리 유충 및 발효물을 투여한 군이 대조군보다 확연히 낮은 수치를 나타내어 개선 효과를 확인하였다. ALP의 경우 T군과 대조군의 수치가 흡사하였으나, 발효물을

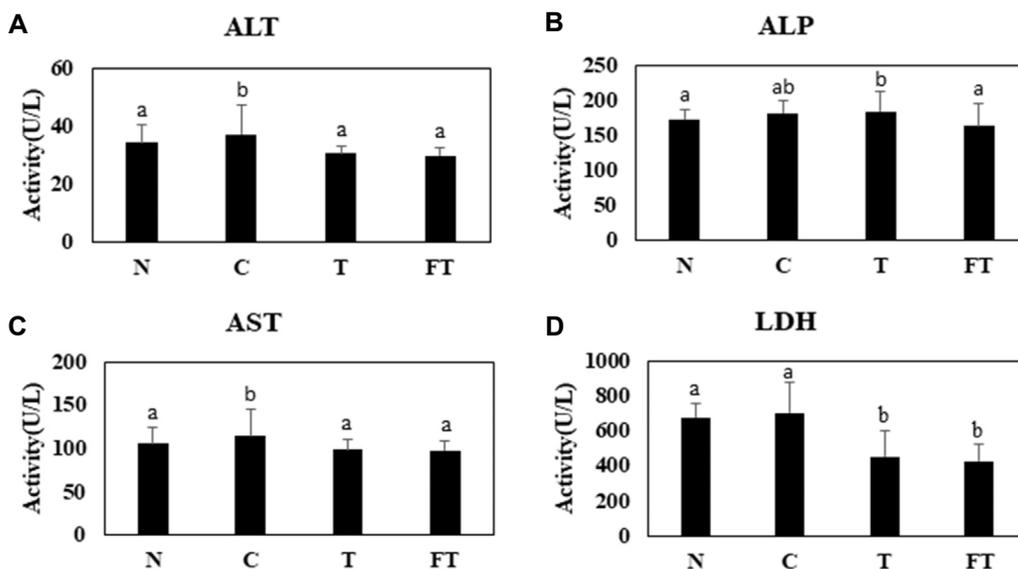


Fig. 1. Effect of *T. molitor* larvae and fermented *T. molitor* larvae on the activities of ALT (A), ALP (B), AST (C) and LDH (D). Values are mean ± S.E., n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$. Abbreviations are the same as in Table 1.

급여한 FT군의 경우 정상군과 비슷한 수치까지 내려가는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 발효가 ALP 활성에 긍정적인 효과를 미치는 것으로 판단되었다.

혈청 지질 농도 비교

혈청 내 지질농도를 비교하여 Fig. 2에 나타내었다. 먼저 지방 축적은 간으로 유입되는 중성지방의 축적과 제거의 불균형이 발생했을 때 이루어진다. 또한 비 알코올성 지방간이 유발되면 비만 유무에 상관없이 인슐린 저항성, 중성지방 수치 등이 높게 나타났다는 보고가 있다[10]. Total lipid 함량 측정 결과 대조군에서 가장 많은 함량을 나타내었고, 발효 갈색거저리 분말에서 가장 적은 것으로 나타났다. 이는 Total lipid 내에 Total cholesterol, Triglyceride, Phospholipid 등 다양한 형태의 지질이 포함되어져 있다는 점을 고려할 때, 여러 지표들을 추가적으로 확인하여 결과의 근거를 확립할 필요가 있다. 먼저 Total cholesterol의 경우 T군과 FT군에서 높은 함량을 나타내었다. 특히 T군의 경우 HDL, LDL 모두 가장 높은 함량을 보였고, 이로 인해 Total cholesterol이 가장 높게 측정되었다고 판단된다. 반면에 갈색거저리 발효물의 경우 대조군

에 비해 HDL은 높고 LDL은 낮은 수치를 나타내었는데, HDL은 항산화, 항염증, 항혈전 등 이로운 역할을 하고 LDL은 혈장 체류 시간을 증가시켜 콜레스테롤의 축적, 결과적으로 동맥 경화를 일으키는 잠재적 인자[27]임을 고려해본다면, 발효과정에서 콜레스테롤 함량에 긍정적인 요인으로 작용했다고 사료된다. Triglyceride의 경우, 지질 대사에 이상이 생긴 대조군이 가장 높은 수치를 띄었고, T군은 정상군과 비슷하였으며, FT군은 가장 낮은 중성지질 함량을 나타내었다. 이를 통해 대사 이상으로 인한 혈중 중성지질 축적을 발효물이 일정부분 개선했다고 판단된다. 마지막으로 Phospholipid의 경우 각 군별로 약간의 차이가 있었으나 유의미적인 판단을 내릴 수 없을 만큼 미미하였다. 이 모든 것을 종합해볼 때, 대조군은 orotic acid에 의해 지질 대사 이상이 일어나 대부분의 지표에서 수치가 증가하였고, 발효 갈색거저리를 급여했을 때 정상군에 가장 근접한 수치를 나타냈기에 발효물이 비 알코올성 지방간에 의한 지질 대사 이상을 개선시키는 효과가 있다고 판단된다.

간 조직 및 혈청 내 과산화지질 농도 측정

지질 과산화는 활성 산소종(ROS)과 지질을 포함하는 DNA,

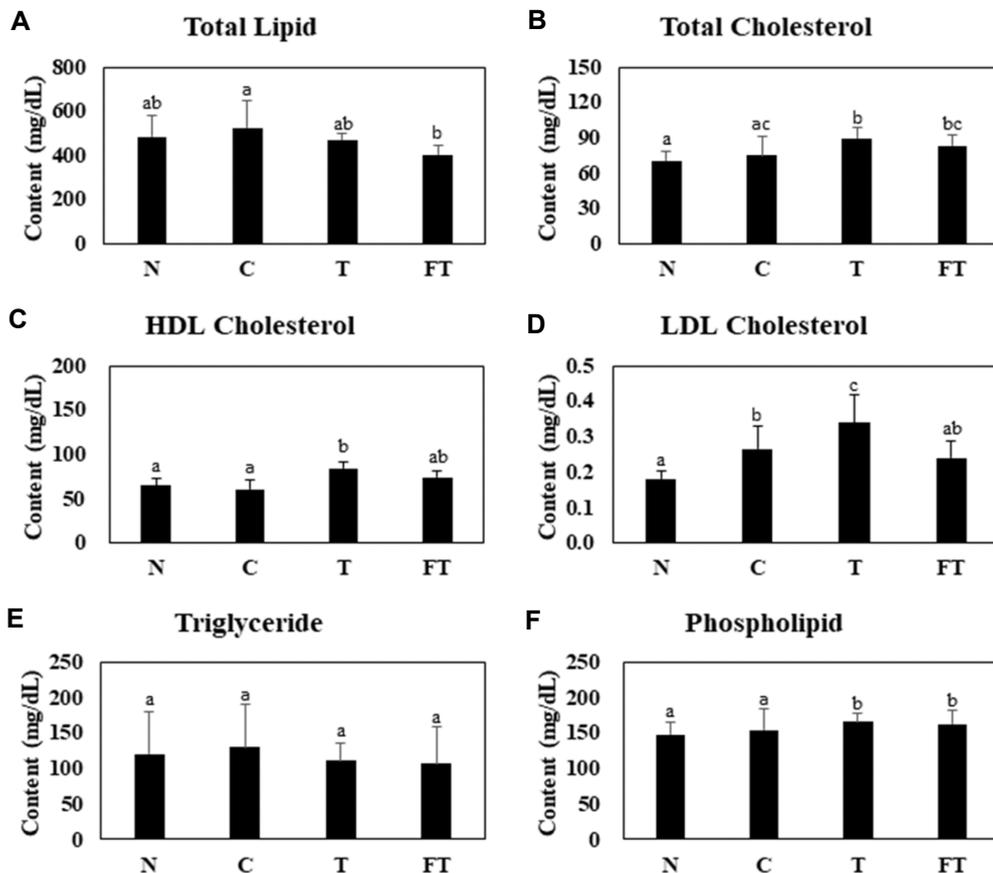


Fig. 2. Effect of *T. molitor* larvae and fermented *T. molitor* larvae on the concentration of Total lipid (A), Total cholesterol (B) (HDL, LDL cholesterol) (C, D), Triglyceride (E) and Phospholipid (F). Values are mean ± S.E., n=6. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations are the same as in Table 1.

불포화 지방산(PUFAs) 등이 반응했을 때 발생하며, 이는 산화적 스트레스라고도 불린다. 특히 생성산물 중 하나인 MDA (Malondialdehyde)는 산화적 스트레스의 정도에 따라 그 함량도 같이 변화한다는 보고[7]가 있어 MDA 함량 측정을 통해 조직의 산화적 스트레스 여부를 판단해 볼 수 있을 것이라 사료된다.

TBARS법을 활용하여 MDA 농도를 측정된 결과 값은 다음과 같이 나타났다(Fig. 3). 먼저, 간 조직의 경우 대조군이 가장 많은 MDA함량을 가지고 있었다. 이는 Orotic acid에 의해 산화적 스트레스가 발생, 지질 과산화가 발생하여 나타난 결과로 보여지며, T군의 경우 대조군보다 약간 낮은 함량을 보였으나 수치적으로 큰 차이는 보이지 않았다. 하지만 FT군에서는 정상치에 가까운 정도로 MDA함량이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 혈청 내 MDA함량 측정결과 역시 앞선 결과와 비슷하게 나타났는데, 대조군에서 가장 높은 MDA함량을 나타내었고, T군에서 일부 개선, FT군에서 정상치에 가깝게

수치가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 비 알코올성 지방간이 발병하게 되면 산화적 스트레스가 발생, 과산화 지질 농도가 상승하게 되고, 갈색거저리 유충 섭취 시 이를 일부 완화시키는 효과가 있으며, 발효 진행 시 더욱 효과적인 수치감소를 기대할 수 있을 것이라 사료된다.

간 조직 및 혈청 내 글루타치온 함량

알코올 중독자와 비 알코올 중독자의 간을 비교해 본 결과, 알코올을 섭취한 군에서 더 낮은 글루타치온 함량이 검출되었다[24]는 연구결과를 토대로 판단해 보았을 때, 글루타치온이 항산화 여부 판단과 동시에 간 건강의 지표로 사용될 수 있다고 생각되어 그 함량을 측정해 보았다(Fig. 4). 간 조직의 경우 대조군과 T군이 낮은 수치를 띄었고, 차이는 매우 미미하였다. 하지만 발효를 진행한 FT군에서는 정상군보다 더 높은 함량이 측정되었고, 이는 발효물이 간 손상을 개선시킨 결과로 사료된다. 혈청에서도 비슷한 경향을 나타냈는데, 대조군에서 글

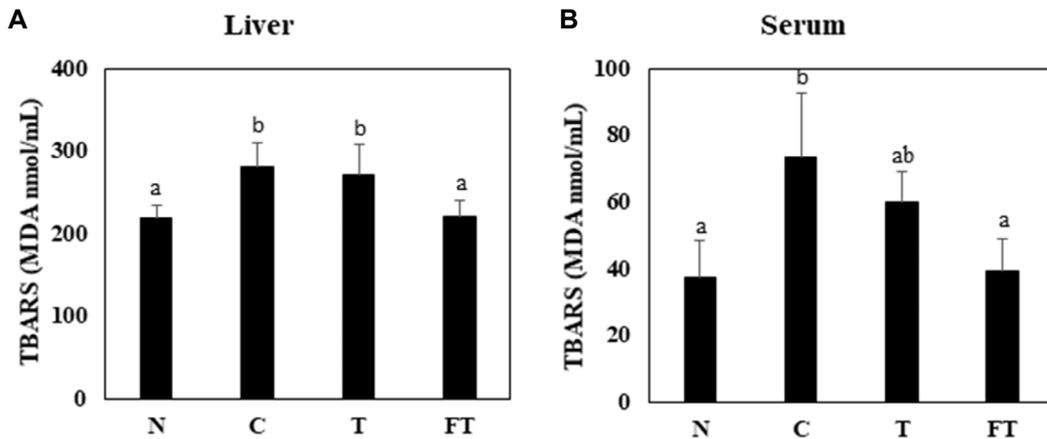


Fig. 3. Effect of *T. molitor* larvae and fermented *T. molitor* larvae on the TBARS concentrations in the liver (A) and serum (B). Values are mean ± S.E., n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$. Abbreviations are the same as in Table 1.

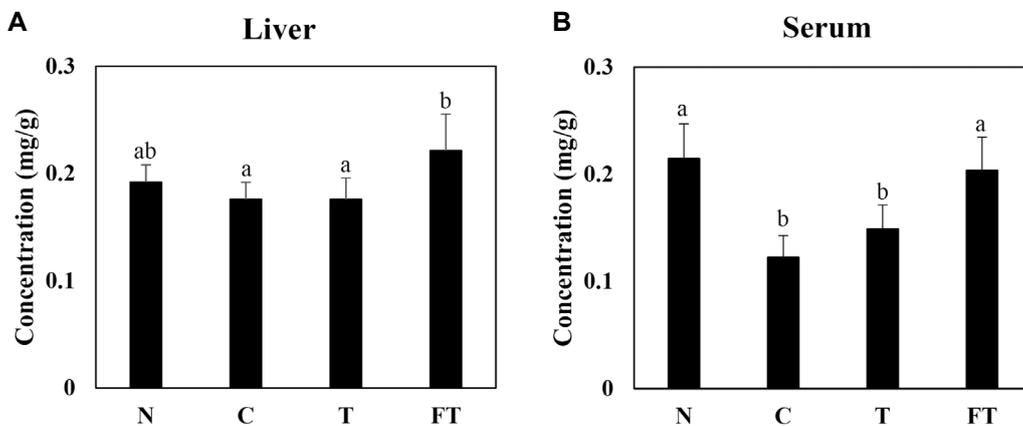


Fig. 4. Effect of *T. molitor* larvae and fermented *T. molitor* larvae on the glutathione concentrations in the liver (A) and serum (B). Values are mean ± S.E., n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$. Abbreviations are the same as in Table 1.

루타치온 함량이 확연히 감소하였으나, 갈색거저리 유충과 그 발효물을 급여했을 때 그 수치가 정상군에 가깝게 개선됨을 확인할 수 있었다. 이를 통해 갈색거저리 유충을 발효시킨다면, 지질 관련 수치를 더욱 개선시킬 뿐만 아니라 글루타치온 함량 증가를 통해 비 알코올성 지방간에 의한 과산화물 형성 및 반응 완화에 도움을 줄 수 있을 것이라 판단된다.

간 조직 내 미네랄 함량 변화

체내에 유해물질이나 약물이 들어오게 되면 superoxide radical이나 hydrogen peroxide가 과다하게 생성될 수 있고 이로 인해 조직에 치명적인 손상을 일으킬 수 있다[11]. 이들이 체내에 존재하는 전이금속 이온인 철, 구리 등과 반응하게 될 경우 활성 산소종이 생성되고, DNA와 단백질, 지질 등과 무작위로 반응하여 손상을 유발할 수 있다고 보고되어진다[5].

간 조직 내 철 및 아연 함량은 다음과 같다(Table 4). 먼저, 철의 경우 대조군에서 1.29 ppm이 검출되었다. 이는 orotic acid에 의해 다량으로 생성된 과산화물과 철이 반응하여 정상군에 비해 그 함량이 감소하게 된 것으로 사료된다. T군의 경우 대조군보다 더 낮은 1.12 ppm의 함량을 나타냈으나, 발효 과정을 거친 FT군의 경우 1.64 ppm으로 정상군 수치인 1.77 ppm만큼 수치를 개선시켰다. 이는 발효물이 과산화물 생성 및 반응을 억제하였고, 그 결과 간 조직 내 철 함량 수치를 정상까지 회복시킨 것이라 판단된다.

아연은 항산화 활성을 가지며, 불포화지방산의 과산화에 대항하는 작용도 있다고 보고되고 있다[6]. 각 군별 아연 함량 측정 결과, 대조군에서 가장 낮은 0.27 ppm, T군은 0.29 ppm으로 가장 높은 수치를 나타내었다. 하지만 이는 전체 평균수치인 0.28 ppm과 흡사하여 유의적인 차이는 아닌 것으로 판단된다.

간 조직의 병리학적 관찰

적출할 간 조직을 전처리한 후 H&E 염색을 통해 관찰해보았다(Fig. 5). N군에 비해 대조군에서 세포의 불균일한 배치 및 형태 변화가 다수 발견되었다. 이는 지방구가 세포 사이사이에 형성되면서 나타난 결과로 보이며, 갈색거저리 유충을 투여한 T군에서도 상당수의 지방구가 발견되나 그 크기와 수가 상대적으로 줄어들었음을 관찰, 일부 개선된 결과를 볼 수 있었다. 또한 발효물을 급여한 FT군에서는 정상군과 거의 동

Table 4. Effect of *T. molitor* larvae and fermented *T. molitor* larvae on the nonheme iron and zinc contents of liver

	N	C	T	FT
Fe	1.77±0.20 ^a	1.29±0.28 ^{bc}	1.12±0.16 ^b	1.64±0.09 ^{ab}
Zn	0.28±0.03 ^a	0.27±0.01 ^a	0.29±0.01 ^a	0.28±0.03 ^a

Value are mean ± S.E., n=6.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations are the same as in Table 1.

일한 세포 형태 및 배열을 확인하였으며, 이는 발효과정이 orotic acid에 의해 손상된 간세포의 형태 및 배열을 정상화 시키는데 기여하는 것으로 판단된다.

추가적으로 간 조직에 대해 Oil red O 염색을 실시한 후 관찰해보았다(Fig. 6). Oil red O 염색시약은 지용성 염료로 지방조직과 반응 시 붉게 변하는 특성이 있는데, 이를 바탕으로 결과를 고찰해보는다면 대조군에서 상당수의 지방이 분포되

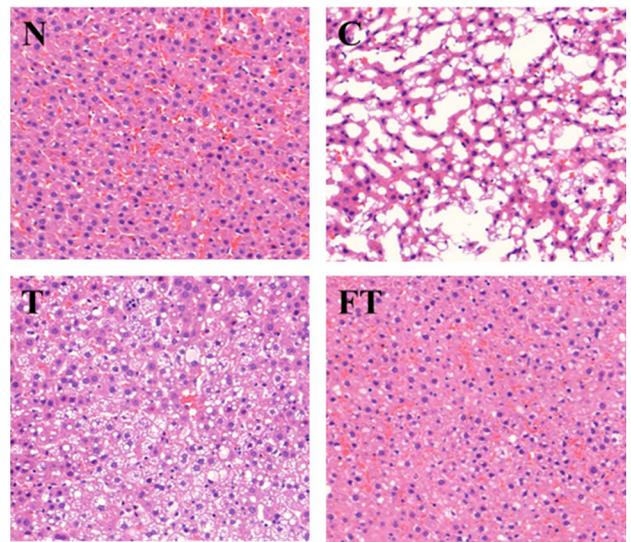


Fig. 5. Effect of *T. molitor* larvae and fermented *T. molitor* larvae on the hepatic histopathologic changes (magnification × 10). Hepatocyte staining was carried out with the hematoxylin and eosin staining method. Abbreviation are the same as in Table 1.

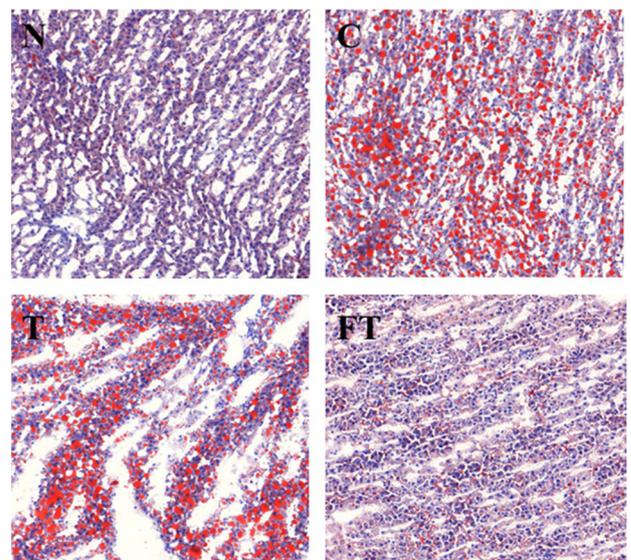


Fig. 6. Effect of *T. molitor* larvae and fermented *T. molitor* larvae on the histological image of adipocytes (magnification ×20). Abbreviation are the same as in Table 1.

어 있다고 판단된다. 또한 T군에서도 다수의 지질이 관찰되었으나, FT군에서는 붉은 점이 확연히 줄어들었음을 확인하였고, 이는 발효물이 비 알코올성 지방간에 의한 조직 내 지방축적을 보다 억제시킨 결과로 보여진다.

감사의 글

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

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 12th ed., *Association of official analytical chemists*. Washington, D.C. U.S.A.
2. Baltazar, G. Jr., Shiva, A., Julia, J., Dean, J., Mary, J. C., George, Y. D. and Viola, T. K. 1995. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin. Chem.* **41**, 1560-1566.
3. Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B. M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Clin. Lab. Med.* **61**, 882-888.
4. 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.
5. Cheol, U. B. 2001. The effect of long - term regular running aerobic exercise on the activation of antioxidation enzymes and lipid peroxidation. *Int. J. Healthc. Med. Sci.* **40**, 829-839.
6. Cho, S. Y., Kim, M. J. and Lee, M. K. 1994. The effect of zinc levels on free radical generating system in cadmium treated rats. *Prev. Nutr. Food Sci.* **23**, 725-730.
7. Dimitrios, T. 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* **524**, 13-30.
8. Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
9. Hebbachi, A. M., Seelaender, M. C., Baker, B. W. and Gibbons, G. F. 1997. Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B is associated with decreased intercellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids. *Biochem. J.* **325**, 711-719.
10. Hye, J. Y., Yong, H. L. and Bong, S. C. 2014. Causal relationship of non-alcoholic fatty liver disease with obesity and insulin resistance. *Kor. Diabetes J.* **15**, 76-81.
11. In, C. S. and Hyun, C. K. 1995. Effects of Biphenyldimethyl Dicarboxylate (DDB) on the lipid peroxidation and oxygen free radical scavenging enzyme activities in mercuric chloride-induced hepatotoxic rats. *Biomol. Ther.* **3**, 223-228.
12. Jae, S. K. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease. *Kor. J. Gastroenterol.* **56**, 6-14.
13. Jin, T. H., Tae, G. N., Min, Y. C., Jae, H. P. and Hyo, K. C. 2017. Effect of tartary buckwheat sprout on non-alcoholic fatty liver disease through anti-histone acetyltransferase activity. *Prev. Nutr. Food Sci.* **46**, 169-176.
14. Ki, H. P. and Gun, Y. K. 2018. Quality and characteristics of manufacturing sunsik with edible insect (Mealworm). *Culi. Sci. Hos. Res.* **24**, 13-23.
15. Kwang, E. L., Yoo, M. K., Eun, S. K., Hae, J. K., Hae, W. C., Si, H. L., Hyeung, J. K., Dae, J. K., Soo, K. K., Chul, W. A., Bong, S. C., Sung, K. L., Hyun, C. L. and Kap, B. H. 2002. Metabolic significance of non-alcoholic fatty liver disease in non-obese adults. *Kor. J. Med.* **63**, 488-495.
16. Lee, J. E., Lee, A. J., Jo, D. E., Cho, J. H., Youn, K., Yun, E. Y. and Kang, B. H. 2015. Cytotoxic effects of *Tenebrio molitor* larval extracts against hepatocellular carcinoma. *Prev. Nutr. Food Sci.* **44**, 200-207.
17. Min, H. B., Jae, S. H., Mi, A. K., Soo, H. K., Tae, W. G. and Eun, Y. Y. 2017. Comparative analysis of nutritional components of edible insects registered as novel foods. *J. Life Sci.* **27**, 334-338.
18. Mohd, A. H., Marghoob, H. and Abdelmarouf, H. M. 2013. Comparative levels of ALT, AST, ALP and GGT in liver associated diseases. *Eur. J. Exp. Biol.* **3**, 280-284.
19. Pelizzari, G., Basile, D., Zago, S., Lisanti, C., Bartoletti, M., Bortot, L., Vitale, M. G., Fanotto, V., Barban, S., Cinausero, M., Bonotto, M., Gerratana, L., Mansutti, M., Curcio, F., Fasola, G., Minisini, A. M. and Puglisi, F. 2019. Lactate dehydrogenase (LDH) response to first-line treatment predicts survival in metastatic breast cancer: first clues for a cost-effective and dynamic biomarker. *Cancers* **11**, 1243.
20. Ra, Y. C., Ju, R. H., Hyo, S. R., Kyung, W. P., Kyung, Y. K. and Mi, K. L. 2019. The Effects of defatted *Tenebrio molitor* larva ferment extract on CCl4-induced liver damage in mice. *Prev. Nutr. Food Sci.* **48**, 501-508.
21. Sang, H. P. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease: treatment. *Kor. J. Med.* **79**, 481-489.
22. So, R. H., Eun, Y. Y., Ji, Y. K., Jae, S. H., Eun, J. J. and Kyoung, S. M. 2014. Evaluation of genotoxicity and 28-day oral dose toxicity on freeze-dried powder of *Tenebrio molitor* larvae (Yellow Mealworm). *Toxicol. Res.* **30**, 121-130.
23. Spencer, S., Kenneth, P. R. and Charles, S. L. 1983. Depressed hepatic glutathione and increased diene conjugates in alcoholic liver disease. *Am. J. Dig. Dis.* **28**, 585-589.
24. Su, Y. H. and Soo, K. C. 2015. Quality characteristics of muffins containing mealworm (*Tenebrio molitor*). *Culi. Sci. Hos. Res.* **21**, 104-115.
25. Sampat, G., So, M. L., Chuleui, J. and Meyer-Rochow, V. B. 2017. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* **20**, 686-694.
26. Um, J. N., Min, J. W., Joo, K. S. and Kang, H. C. 2017. Antioxidant, anti-wrinkle activity and whitening effect of

- fermented mixture extracts of *Angelica gigas*, *Paeonia lactiflora*, *Rehmannia chinensis* and *Cnidium officinale*. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **25**, 152-159.
27. Verge's, V. 2009. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **23**, 681-685.
28. Yoo, J., 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*). *Prev. Nutr. Food Sci.* **42**, 249-254.

초록 : *Saccharomyces cerevisiae* M1 (KACC 93023)으로 발효한 갈색 거저리 유충이 비 알코올성 지방간 유발 흰 쥐에 미치는 영향

심소연[†] · 장성호[†] · 조영수 · 안희영*
(동아대학교 생명공학과)

본 연구에서는 밀웜으로 잘 알려진 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor* larvae)분말을 *Saccharomyces cerevisiae* M1 (KACC 93023)으로 발효하였다. 그 후 발효물을 orotic acid에 의해 비 알코올성 지방간이 유발된 흰쥐에 급여하여 개선 여부를 판단해보았다. Orotic acid로 인해 지질 대사에 이상이 생긴 대조군의 경우 장기 무게 및 체중이 증가한 것에 반해 발효 갈색거저리 유충 분말을 급여한 군에서는 정상군과 흡사한 증상을 나타냈다. 그리고 간 건강의 지표로 알려진 AST, ALT, ALP 및 LDH 활성 역시 가장 낮았으며, 각종 지질 관련 지표들도 긍정적으로 나타나 개선 효과가 있는 것으로 판단된다. 또한 간 조직 및 혈청 내 과산화지질, glutathione 함량 역시 정상군과 흡사하거나 더 뛰어난 수치를 띄었다. 마지막으로 H&E 염색, Oil red O 염색을 통한 간 조직의 형태학적 관찰 결과, 발효 갈색거저리를 급여한 군에서 정상군과 흡사한 간세포의 형태 및 배열과 함께 염색된 지방이 눈에 띄게 감소된 모습을 나타내었다. 위 결과를 종합해보면, 일반 갈색거저리를 급여하였을 때 일부 실험에서 수치가 개선됨을 확인할 수 있었고, 이를 효모로 발효시켰을 경우 대부분의 지표에서 정상치에 가까울 만큼 더욱 긍정적인 개선 효과를 나타내었다. 이를 통해 발효물이 비 알코올성 지방간의 개선에 도움을 주는 것으로 판단, 향후 다양한 제품의 소재로 활용될 가능성을 시사하였다.