

흰점박이꽃무지(*Protoetia brevitaris*) 함유 음료의 *in vitro* 항산화 관련 생리활성효능 및 안전성 검증

박재희¹ · 김소윤¹ · 강민구² · 윤민수² · 이양일² · 박은주^{1*}

¹경남대학교 식품영양학과
²거제시 농업기술센터

Antioxidant Activity and Safety Evaluation of Juice Containing *Protoetia brevitaris*

Jae-Hee Park¹, So Yun Kim¹, Mingu Kang², Minsoo Yoon², Yang il Lee², and Eunju Park^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea

²Geoje-si Agricultural Technology Center, Gyeongnam 656-802, Korea

Abstract

The purpose of this study was to assess the antioxidant activity of vegetable extracts (pumpkin, aloe, and artichoke) containing *Protoetia brevitaris* (PB) and the clinical and pathological changes in ICR mice after a single oral administration. The total polyphenol (TP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability, total radical trapping antioxidant potential (TRAP), oxygen radical absorbance activity (ORAC), and single cell gel electrophoresis assay were done to measure their antioxidant activities. The effect of vegetable extracts containing PB in TP and the ORAC value was significantly higher than those without PB. In addition, all extracts had effective DPPH· scavenging and ABTS·+ scavenging activities. The protective effect of vegetable extracts with/without PB on H₂O₂-induced DNA damage was found. In a single-dose toxicity study, mortality, body weight, physiological signs, and biochemical analysis were analyzed. Seventy mice were randomly assigned to 7 experimental groups and were administered three vegetable extracts with and without PB (2 g/kg). A full 14 days after administration, no mice mortality was observed in any group. Body weight, physiological signs, and biochemical analysis were never significantly different from those of the control group. Taken together, these findings indicate that vegetable extracts containing PB with antioxidant activities and safety could be applied as medicinal and edible resources in an industrial area.

Key words: *Protoetia brevitaris*, antioxidant, total phenol, ICR mouse, acute oral toxicity

서 론

국민들의 건강에 대한 관심 증가와 더불어 평균수명의 증가는 노인 인구의 증가를 의미하며, 그것은 각종 만성질환에 대한 관심의 증가를 의미한다. 이에 대한 치료법으로 의약품을 이용하였지만 최근 이로 인해 일어날 수 있는 부작용을 최소화시키고 건강을 유지시키거나 질병을 예방할 수 있는 기능성식품의 활용이 최근 소비자들의 경향이며, 이에 따라 2000년 이후 기능성식품 시장은 지속적으로 확대되고 있다(1,2). 따라서 수입 개방화로 인한 외국의 기능성식품과의 경쟁에서 값비싼 로열티를 주고 외국산 식품의 구입보다는 국내산 식품원료를 이용하여 개발된 제품의 생리활성을 검증하여 소비활성화와 연계가 된다면 국가 및 지역의 소득증대, 고용인력 창출 외 긍정적인 경제적 파급효과를 기대할 수 있다.

최근 천연물질에서 추출된 기능성 물질을 활용한 수험생용, 직장인용 식품, 차 및 음료 개발이 요청됨에 따라 기능성 음료시장이 확대되고 있으며, 다양한 제품 개발 등은 기업체에 활용제품으로 실용화하여 매출신장과 더불어 식품시장에 큰 변화를 불러일으키고 있다(3). 이 중 곤충은 애완·학습용, 천적, 꽃의 수정을 돕는 화분매개, 관광 상품 및 바이오 소재 등으로 사용되면서 최근 새로운 농업소득으로 각광받고 있다(4).

민간요법으로 사용되고 있는 제조(蟻螞, *Protoetia brevitaris*, PB), 일명 굼벵이는 파혈행어(破血行瘀), 산결소종(散結消腫), 청혈해독(淸血解毒) 등의 효능이 있어 통풍(痛風), 어혈협통(瘀血脇痛), 그리고 단독(丹毒) 등의 여러 질병에 대한 한방 치료처방제로 사용되어 왔으며, 특히 간암 등의 간질환에 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 있어 널리 사용되고 있다(5). 현재 농가에서 인공 사육되어 주로 사용

*Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-505-999-2139

되고 있는 종은 딱정벌레목, 꽃무지과 곤충인 흰점박이꽃무지가 주종을 이루고 있다.

지금까지 흰점박이꽃무지와 관련된 연구들은 산란 및 생육특성(6,7), 에탄올 및 사염화탄소의 간 손상에 미치는 흰점박이꽃무지와 그 유충의 영향(8), 항세균 및 항균성 단백질(9-11), 항암효과(12)에 대해 보고되었다. Yoon 등(4)과 Hwang 등(13)에 의해 흰쥐를 이용한 흰점박이꽃무지 균질액의 독성시험을 통해 흰점박이꽃무지 균질액의 안전성은 규명되었다. 그러나 여전히 식용으로써 흰점박이꽃무지를 이용하여 제조한 식품 섭취에 대해서는 여전히 법적으로 규제되어 있어, 약용 및 식용 자원으로 이를 적극 활용하기 위해서는 흰점박이꽃무지를 활용하여 제조한 식품의 항산화활성 및 안전성과 관련된 연구들이 시급한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 흰점박이꽃무지의 기능성식품 재료 활용 가능성을 검증하기 위해 상용되고 있는 배즙, 알로에 즙, 돼지감자 즙에 흰점박이꽃무지 첨가 시 그 생리활성 규명 및 급성경구독성시험을 통해 흰점박이꽃무지 함유 즙의 항산화활성 및 안전성 검증을 실시하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 준비

모든 음료에는 건표고버섯 500 g, 헛개절편 900 g, 인진쑥 2단, 생강 300 g, 대추 300 g을 기본으로 하고 여기에 각각 호박, 알로에, 돼지감자 15 kg을 첨가한 것을 대조군으로 하였다. 그리고 각각 대조군 음료에 흰점박이꽃무지(엔토리서치, 3령유충) 2 kg 첨가한 것을 실험군으로 하여 원적외선 바이오 증탕기(대조산업, 경기도)로 12시간 증탕한 후 레토르트 파우치(1 pack, 120 mL)로 포장한 후 냉장보관하면서 분석시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

추출 시료 100 μ L에 증류수 900 μ L를 넣고 1 N Folin 시약 1 mL를 혼합하여 실온에서 3분 방치 후 10% Na_2CO_3 1 mL를 첨가하여 암실에서 1시간 동안 반응시켜 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀은 gallic acid로 표준 검량곡선을 작성하여 계산하였으며 1 pack에 대한 mg gallic acid equivalent(GAE)로 나타내었다.

항산화활성 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능은 시료 20 μ L에 0.2 mM DPPH 용액 80 μ L를 가한 후 상온에서 10분간 반응시켜 495 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging activity (RSA, \%)} = \frac{(1 - \text{absorbance of sample}) / \text{absorbance of blank}}{\text{Total radical trapping antioxidant potential (TRAP) as-}}$$

say는 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate (ABTS, 150 μ M)와 metmyoglobin(2.5 μ M)을 H_2O_2 (75 μ M)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 흡광도를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 흡광도의 억제 정도는 시료(0.84% plasma)에 들어 있는 항산화능에 비례한다. 시료를 6분 동안 30°C에서 배양한 후 UV/VIS spectrometer로 740 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 표준곡선을 이용하여 계산하였으며, TEAC(trolox equivalent antioxidant capacity, mM)로 표현하였다.

Peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 형광의 감소를 변화에 대한 흰점박이꽃무지 함유 음료의 항산화활성은 peroxy radical scavenging capacity(ORAC_{ROO}) 분석법(14)을 이용하여 측정하였다. Peroxy radical의 생성을 위해 20 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)를 사용하였고, 형광표준용액은 40 nM fluorescent를 제조하여 GENios fluorescence plate reader(Tecan, Salzburg, Austria)로 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 측정하였다. 결과는 vitamin E 수용성 유도체인 trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroma-2-carbonyl acid) 1 μ M에 의해 보호된 curve area와 비교하여, 그 값은 μ M Trolox equivalents(TE)로 표현하였다.

DNA 손상 측정(Comet assay)

신선한 전혈 5 mL을 Histopaque 1077을 이용해 백혈구만을 분리해 낸 후 본 실험에 사용하였다. 호박, 알로에, 돼지감자 음료에 흰점박이꽃무지 첨가 또는 무첨가군을 각각 1, 5, 10, 50 μ g/mL의 농도로 백혈구에 처리하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 백혈구에 산화적 손상을 주기 위해 200 μ M의 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 4°C에서 5분간 처리한 뒤 PBS로 세척하였다. 대조군은 백혈구에 PBS만을 처리하였으며, 양성대조군은 추출물 대신 PBS를 사용하여 반응시킨 후 200 μ M H_2O_2 를 처리하였다. Comet assay를 위해 반응을 끝낸 백혈구를 150 μ L의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 미리 코팅된 슬라이드 위로 세포현탁액과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 하고 커버글래스로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. 젤이 굳으면 커버글래스를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ L로 한 겹 더 덮었다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM tris)에 사용 직전 1% Triton X-100을 섞은 후 슬라이드를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 후, 슬라이드를 전기영동 수조에 배열하고 4°C의 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na_2EDTA , pH>13)를 채워 20분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하

였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 수조를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris buffer(pH 7.4)에 5분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 슬라이드를 건조시켰다. 20 µg/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 커버글래스로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 이미지는 comet image analyzing system(Komet 5.0, Kinetic Imaging, Liverpool, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 백혈구의 H₂O₂에 의한 DNA 손상 및 각 시료에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA %함량(tail intensity)을 측정하여 나타내었다. 각각의 처리구에서 2개의 슬라이드를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

실험동물 및 사육관리

본 연구는 K대학교의 동물윤리심의위원회(IACUC)의 승인을 받아(인증번호 KUICA_11_02) 수행되었으며, 연구기간은 2011년 7월 8일~29일에 시행되었다. 암수 각각 70마리의 ICR 마우스(5 weeks old upon receipt, SLC, Japan)를 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도(20~25°C)와 습도(50%)가 조절된 사육실에서 마우스용 polycarbonate 사육 상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기(light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(Halan, Madison, WI, USA)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 모든 실험동물은 투여일 및 최종 부검일 18시간 전 절식을 실시하였다.

군 분리 및 시료의 투여

실험동물은 각 시료마다 암수 5마리씩 급성독성 평가를 실시하고자 하였다. 한국 식품의약품안전청 기준과 OECD 실험기준에 의거하여, 설치류 최고 한계투여용량인 2 g/kg을 최고 용량으로 설정하였다. 18시간 절식 후 쏬테(sonde)가 부착된 1 mL 주사기를 이용하여 경구 투여하였다. 식이와 음수에 따른 약물의 흡수 변화를 최소화하기 위해, 투여 후 대략 3시간 동안 사료와 음수 공급을 제한하였다.

임상증상의 관찰

모든 실험동물의 임상증상을 투여 전후에 각각 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에 관한 일반 증상을 관찰 기록하였으며, 투여일 이후에도 하루에 최소한 2번씩 모든 실험동물의 임상증상을 관찰 기록하였다.

체중 측정

모든 실험동물의 체중을 투여 전 1일, 투여직전, 투여 후 2일 간격으로 각각 측정하여 체중증가량인 증체량을 각각의

체중을 이용하여 산출하였다.

육안부검

투여 14일 후 모든 실험동물은 18시간 절식을 실시하였으며, isoflurane(4 mL/kg)을 적신 수건을 넣고 쥐를 넣은 후 밀폐시켜 흡입마취 시켰다. 폐, 심장, 신장, 비장, 간, 뇌를 위주로 이상 육안소견을 각각 관찰 기록하였다.

장기 중량의 측정

모든 실험동물은 육안부검 소견을 관찰 기록한 후 폐, 심장, 신장, 비장, 간, 뇌에 대한 절대 중량을 각각 측정하였다.

생화학적 분석

혈장 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤 농도는 Allain 등의 방법(15)과 중성지방 농도는 lipase-glycerol phosphate oxidase 방법(16)에 따라 비씨에스 진단 키트(Bioclinal system, Korea)를 사용하여 측정하였으며, Aspartate transaminase(AST) 및 alanine transaminase(ALT) 역시 같은 키트를 사용하였다. LDL-콜레스테롤은 Friedewald 등(17)에 의한 계산법[총콜레스테롤 - (HDL 콜레스테롤 + 중성지방/5)]으로 산출하였다.

통계처리

모든 자료는 MS의 excel database system을 이용하여 입력한 후 SPSS-PC+ 통계 package(version 14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준편차(standard deviation, SD) 또는 표준편차(standard error, SE)를 구하고 각 군별로 유의성 검증을 위해서 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F 값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군 간의 유의성 차이를 검증하였다. 변수들 간의 관계를 검증하기 위해 Pearson's correlation coefficients인 r 계수로 검증하였다.

결과 및 고찰

흰점박이꽃무지 함유 음료의 총 페놀함량

총 페놀함량 측정은 항산화 연구에 폭넓게 이용되는 방법으로, 천연에 존재하는 주요한 폴리페놀 화합물들은 라디칼 소거능과 강력한 항산화능을 포함한 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있다.

흰점박이꽃무지를 함유한 호박, 알로에, 돼지감자 음료 1 pack의 총 페놀함량은 66.35~100.98 mg/pack으로 Fig. 1과 같다. 음료들 중에서는 돼지감자+흰점박이꽃무지군에서 100.98 mg/pack으로 유의적으로 가장 높았으며, 그 다음은 돼지감자> 알로에+흰점박이꽃무지> 호박+흰점박이꽃무지> 알로에, 호박 순으로 나타났다. 흰점박이꽃무지 무침가군보다 첨가군에서 총 페놀함량이 유의적으로 높은 것으로 나타났는데, 이는 곤충 외부의 표피층에는 지질체에서 합성

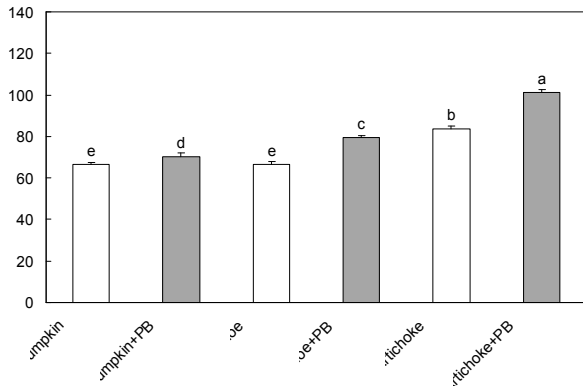


Fig. 1. Total polyphenol contents of various juice (pumpkin, aloe, artichoke) with/without *Protactia brevitaris* S. (PB). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test.

되는 폴리페놀을 다량 함유하고 있는 다가 페놀층이 존재함으로 인한 것으로 사료된다(18).

흰점박이꽃무지 함유 음료의 항산화활성

DPPH assay는 빠르고 간단하게 식물이나 식품 추출물 또는 단일 화합물의 항산화능을 측정하기 위해 널리 사용되는 방법이다. DPPH는 항산화제와 만나면 매우 빠른 속도로 hydrogen radical의 전자를 받아들이면서 환원되어 안정한 화합물인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine으로 비가역적으로 전환되며 짙은 보라색이 옅어지는 특징을 가진다(19). 모든 음료의 DPPH 라디칼 소거능은 67.1~90.0%/pack 범위로 이는 비타민 C 50~1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 DPPH 라디칼 소거능 73.8~81.7%와 유사하거나 다소 높은 활성을 가지는 것으로 나타났으며, DPPH 라디칼 소거능은 알로에+흰점박이꽃무지(90.02%)에서 가장 높았다(Fig. 2).

TRAP assay는 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphnate) 양이온(ABTS · +)에 대한 항산화제의 소거능을 측정하는 방법이다(20). 모든 음료의 TRAP 값은 1.46~1.54 mM/trolox equivalent(TE)에 포함되며, 모든 음료군에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 2). Jeon 등(21)은 녹즙의 재료로 들어가는 케일의 TRAP 값을 1.32 mM로 보고하여, 흰점박이꽃무지 첨가/무첨가 배, 알로에, 돼지감자즙의 총 항산화능이 녹즙보다 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

ORAC assay는 산화물질에서 유도된 peroxy radical이 형광 probe와 반응하여 비형광의 생성물을 형성하는데, 항산화활성은 시간에 따른 비형광생성물의 양과 감소율을 평가하여 항산화활성을 측정한다(22). ORAC assay의 결과를 보면 특히 돼지감자+흰점박이꽃무지 첨가/무첨가군은 약 3000에 가까운 ORAC 값을 나타내었다(Fig. 2). 이는 Wolfe 등(23)의 연구결과와 비교 시 오렌지 100 g 섭취 시 나타나는 ORAC 값 2887과 거의 유사하며, 호박+흰점박이꽃무지 첨가군(2196)은 복숭아(2235) 100 g 섭취 시 나타나는 ORAC

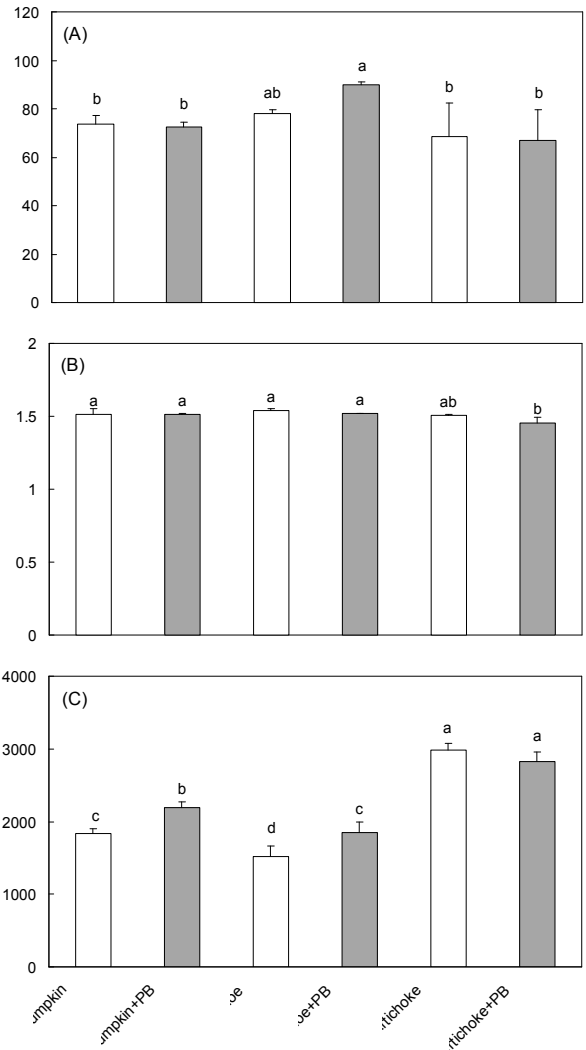


Fig. 2. Antioxidant activities of various juice (pumpkin, aloe, artichoke) with/without *Protactia brevitaris* S. (PB). (A) DPPH radical scavenging ability, (B) total radical trapping antioxidant potential (TRAP) and (C) ORAC assay. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test.

value와 유사한 값을 나타내었다. 알로에+흰점박이꽃무지군은 레몬 100 g 섭취 시 나타나는 ORAC 값 1848과 유사하였다.

본 연구에서 *in vitro* 항산화 측정 방법(총 폴리페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능, TRAP assay, ORAC assay)들 간의 상관관계를 분석해 본 결과 총 폴리페놀 함량과 ORAC assay에서 양의 상관관계($r=0.72$, $p < 0.01$)를 확인할 수 있었다. Lizcano 등(24)과 Silva 등(25)의 연구에서도 ORAC assay와 총 폴리페놀 함량 간의 양의 상관관계를 보고하였다.

산화적 스트레스에 의한 흰점박이꽃무지 함유 음료의 DNA 손상 보호능

산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 보호능 single-cell gel-electrophoresis(SCGE) assay로 잘 알려진 comet as-

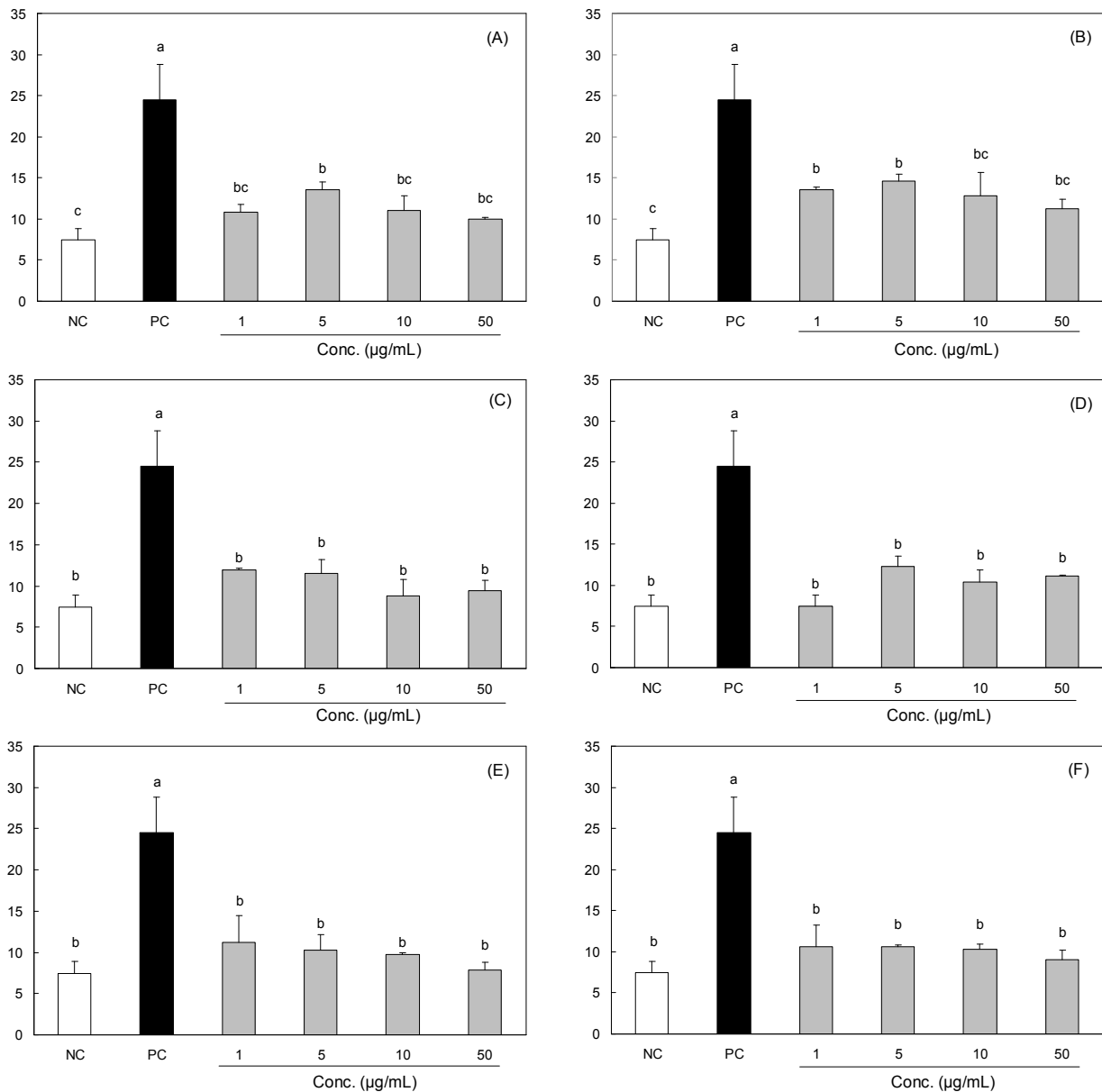


Fig. 3. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of various juice (pumpkin, aloe, artichoke) with/without *Protactia brevitarsis* S. (PB) on 200 μM H_2O_2 induced DNA damage in human leukocytes. NC, 1% DMSO (without oxidative stimulus) treated negative control; PC, 200 μM H_2O_2 treated positive control. (A) pumpkin, (B) pumpkin+PB, (C) aloe, (D) aloe+PB, (E) artichoke, (F) artichoke+PB. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test.

say는 활성산소에 의한 산화적 스트레스 유발 시 세포내의 DNA 손상 정도를 직접적으로 확인할 수 있는 유용한 지표로 사용되고 있다(26,27).

흰점박이꽃무지 함유 음료의 200 μM H_2O_2 에 의한 DNA 손상 억제 효과는 Fig. 3과 같다. 건강한 성인의 백혈구에 산화적 스트레스를 유도하는 200 μM H_2O_2 처리 시 DNA 손상은 유의적으로 증가한 반면, 흰점박이꽃무지 함유 유무와 관계없이 모든 음료에서 그 손상은 유의적으로 감소되었다. 백혈구에 모든 시료들을 각각 처리하여 cell viability를 측정해본 결과 90% 이상을 나타내어 대조군 음료와 흰점박이꽃

무지 함유 음료군 모두에서 세포 독성은 나타나지 않았다.

대사과정에서 발생하는 부산물인 활성산소종은 그 양이 과다할 경우 생체 세포를 공격하여 과산화지질의 형성과 단백질 핵산(DNA, RNA)을 파괴하고 여러 가지 효소기능을 억제하여 만성질환 및 암 유발, 노화를 촉진시킨다(28). 그러나 식품 내 항산화성분은 지질과산화물을 통한 세포막의 변화, DNA 손상과 돌연변이를 차단하여 이들 질병 발생을 억제하게 된다. 따라서 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 보호 효과는 각각의 음료와 여기에 첨가된 흰점박이꽃무지에 함유되어 있는 총 폴리페놀을 포함한 다양한 생리활성 성분들

Table 1. Effect of various juice (pumpkin, aloe, artichoke) with/without *Protaetia brevitarsis* S. (PB) on weight gain of ICR mice (g/day)

	Male	Female
Control	0.08±0.05 ^{1)NS2)}	0.07±0.02 ^{NS}
Pumpkin	0.04±0.06	0.11±0.06
Pumpkin + PB	0.08±0.17	0.14±0.04
Aloe	0.11±0.04	0.21±0.13
Aloe + PB	0.20±0.08	0.16±0.03
Artichoke	0.09±0.03	0.24±0.06
Artichoke + PB	0.14±0.09	0.13±0.07

¹⁾Values±SE (n=5). ²⁾Not significant.

에 의한 것으로 사료되어지며, 흰점박이꽃무지에 함유된 생리활성 성분 규명에 관한 연구가 조속히 이루어져야 할 것으로 생각된다.

마우스를 이용한 급성경구독성 평가

급성경구독성시험에서 5주령의 ICR계 흰 마우스에 대조군을 포함한 시료 12가지를 2 g/kg으로 경구 투여한 결과 암수 모두 사망 예는 없었다. 또한 설사, 구토, 활동상태 등의 일반증상 및 임상증상에서도 대조군에 비해 특이적인 변화는 관찰되지 않았다. 시료 투여 후 14일 동안 체중을 측정 한 결과 시료들 간의 유의적 차이도 나타나지 않았다(Table 1). 대조군 및 시료 투여군의 모든 장기에서 육안적 소견상 특이 할만한 병적소견 또한 관찰되지 않았으며, 각 그룹별 장기 무게 역시 유의적 차이는 나타나지 않았다(Table 2).

혈액의 생화학적 검사(중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, AST, ALT)에서도 대조군과 비교 시 모든 음료 군에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Table 3). 따라서 본 연구결과에서 흰점박이꽃무지 함유 음

Table 2. Effect of various juice (pumpkin, aloe, artichoke) with/without *Protaetia brevitarsis* S. (PB) on organ weight of ICR mice (g)

Male	Brain	Heart	Liver	Kidney	Lung	Spleen
Control	0.38±0.03 ^{1)NS2)}	0.14±0.01 ^{NS}	1.34±0.11 ^{NS}	0.50±0.03 ^{NS}	0.19±0.02 ^{NS}	0.09±0.01 ^{NS}
Pumpkin	0.39±0.02	0.13±0.01	1.28±0.07	0.46±0.01	0.18±0.01	0.10±0.01
Pumpkin + PB	0.38±0.03	0.12±0.01	1.30±0.04	0.48±0.01	0.22±0.01	0.12±0.01
Aloe	0.39±0.03	0.12±0.02	1.22±0.06	0.47±0.03	0.17±0.01	0.10±0.02
Aloe + PB	0.38±0.05	0.14±0.01	1.25±0.06	0.49±0.02	0.19±0.02	0.11±0.01
Artichoke	0.40±0.02	0.13±0.01	1.28±0.03	0.46±0.00	0.18±0.01	0.11±0.01
Artichoke + PB	0.41±0.01	0.15±0.01	1.22±0.02	0.46±0.02	0.21±0.02	0.10±0.00
Female	Brain	Heart	Liver	Kidney	Lung	Spleen
Control	0.42±0.03 ^{NS}	0.10±0.01 ^{NS}	0.87±0.02 ^{NS}	0.30±0.01 ^{NS}	0.15±0.00 ^{NS}	0.08±0.00 ^{NS}
Pumpkin	0.39±0.02	0.11±0.01	0.94±0.03	0.31±0.01	0.17±0.01	0.10±0.01
Pumpkin + PB	0.37±0.02	0.11±0.01	0.95±0.07	0.30±0.02	0.16±0.01	0.09±0.01
Aloe	0.41±0.01	0.10±0.01	0.90±0.03	0.30±0.02	0.16±0.01	0.08±0.01
Aloe + PB	0.41±0.02	0.10±0.01	0.91±0.02	0.31±0.01	0.15±0.01	0.09±0.01
Artichoke	0.41±0.02	0.10±0.01	0.88±0.03	0.29±0.01	0.15±0.01	0.08±0.00
Artichoke + PB	0.41±0.02	0.10±0.02	0.90±0.04	0.31±0.01	0.15±0.01	0.08±0.02

¹⁾Values±SE (n=5). ²⁾Not significant.

Table 3. Plasma biochemical analysis of ICR mice treated orally with various juice (pumpkin, aloe, artichoke) with/without *Protaetia brevitarsis* S. (PB) (mg/dL)

Male	TG ¹⁾	T-Chol	HDL-Chol	LDL-Chol	AST	ALT
Control	99.6±6.1 ^{2)NS3)}	65.5±3.1 ^{NS}	38.0±5.1 ^{NS}	10.5±5.3 ^{NS}	40.6±5.0 ^{NS}	43.0±3.8 ^{NS}
Pumpkin	116.3±8.0	74.0±6.4	36.0±5.4	10.8±6.1	45.0±8.0	41.3±1.9
Pumpkin + PB	110.0±5.8	76.3±2.8	37.0±6.1	17.4±6.2	41.3±1.9	44.0±1.3
Aloe	110.6±10.1	71.0±4.4	36.8±4.1	12.1±5.7	36.0±3.2	40.3±0.6
Aloe + PB	120.0±6.5	75.0±3.6	42.0±7.3	9.0±6.2	51.6±8.4	55.2±14.3
Artichoke	107.4±7.6	76.0±3.0	46.4±8.2	10.6±8.9	40.2±3.3	41.4±2.7
Artichoke + PB	118.2±8.6	80.8±2.9	49.0±3.7	8.7±5.4	56.2±12.7	45.4±3.4
Female	TG	T-Chol	HDL-Chol	LDL-Chol	AST	ALT
Control	84.6±8.5 ^{NS}	51.2±2.0 ^{NS}	14.6±1.9 ^{NS}	19.7±1.8 ^{NS}	40.4±3.5 ^{NS}	31.2±1.5 ^{NS}
Pumpkin	92.5±1.6	51.3±4.4	20.4±3.2	15.3±3.9	49.8±6.4	43.6±4.8
Pumpkin + PB	93.3±6.7	55.0±4.4	23.8±1.3	12.6±4.9	59.8±1.9	54.0±13.4
Aloe	76.3±6.4	53.0±1.9	17.2±1.5	20.8±2.4	53.6±10.4	46.4±10.2
Aloe + PB	78.3±6.0	50.8±4.3	21.6±2.1	9.6±4.8	45.6±4.4	31.4±0.9
Artichoke	79.8±7.3	53.2±3.3	16.8±1.2	22.8±1.1	49.4±6.6	41.6±5.9
Artichoke + PB	77.0±6.9	53.6±3.6	21.8±6.4	17.9±9.4	51.8±10.5	31.4±2.0

¹⁾TG, triglyceride; T-chol, total cholesterol; HDL-chol, HDL-cholesterol; LDL-chol, LDL-cholesterol; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase.

²⁾Values±SE (n=5). ³⁾Not significant.

료는 체중 kg당 2 g까지의 용량 내에서는 독성이 없는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 흰점박이꽃무지 함유 음료의 총폴리페놀 함량과 항산화활성(DPPH 라디칼 소거능, TRAP, ORAC assay, comet assay) 및 사용에 대한 안전성을 검증하기 위하여 ICR mouse를 사용하여 흰점박이꽃무지 무첨가군과 첨가군 단회 투여(2 g/kg) 시 나타나는 치사율, 체중, 생리적 증상, 장기무게, 생화학적 분석(triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, aspartate transaminase, alanine transaminase)을 통해 급성독성시험을 실시하였다. 흰점박이꽃무지를 함유한 호박, 알로에, 돼지감자 음료 1 pack의 총 페놀함량은 66.35~100.98 mg/pack, DPPH 라디칼 소거능은 67.1~90.0%/1 pack, TRAP 값은 1.46~1.54 μM/trolox equivalent(TE)를 보였으며, 모든 음료의 ORAC 값은 1500보다 높았다. 모든 음료는 인체 임파구에서 세포독성을 보이지 않았으며, H₂O₂에 대한 DNA 손상에 대한 보호효과는 유의적이었다. 흰점박이꽃무지 첨가/무첨가 음료의 ICR mouse 암수 각각에 경구투여(2 g/kg) 후 14일까지 치사된 실험동물은 관찰되지 않았으며, 체중, 생리적, 병리적 및 생화학적 분석에서 대조군과 비교 시 그룹들 간의 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 그러므로 2 g/kg의 흰점박이꽃무지 첨가/무첨가 음료를 ICR mouse에 단일 경구투여 시 독성이 없는 것으로 판명되었다. 본 연구에서 규명된 흰점박이꽃무지 함유 음료의 항산화활성과 안전성은 산업적 측면에서 약용 및 식용 자원으로 적극적인 활용을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구결과물은 2011 거제시 용역과제에 의해 수행됨.

문 헌

- Choi SK, Choi HS. 2004. Purification and characterization of an anticoagulant from corn silk. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1262-1267.
- Ko EM, Kim BY. 2004. Antimicrobial activity of ε-polylysine mixtures against food-borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 705-710.
- Ko SB, Hyun CS, Kang KW. 2011. A study on setting the direction of development for the functional and mixed drinks using the Jeju water. *J Korean Academia-Industrial Cooperation Soc* 12: 2133-2141.
- Yoon WJ, Lee JA, Kim JY, Kim SB, Park SY. 2007. Antioxidant activity and physiological function of the *Anomala albopilosa* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 670-677.
- Lee HC, Hwang SY, Hwang SG, Jeon BH, Lee DW. 2001. Acute oral toxicity of *Protaetia brevitarsis* homogenate in rats. *Korean J Oriental Medical Physiology Pathology* 15: 543-547.
- Kim KH, Son JS. 1991. Oviposition activities of larger black chafer (*Holotrichia morosa* Waterhouse) and Korean black chafer (*H. diomphalia* Bates). *Korean J Appl Entomol* 30: 265-270.
- Park HY, Park SS, Oh HW, Kim JI. 1994. General characteristics of the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* reared in the laboratory. *Korean J Entomol* 24: 1-5.
- Lee HC, Hwang SG, Kang YK, Sohn HO, Moon JY, Lim HB, Jeon BH, Lee DW. 2001. Influence of *Protaetia brevitarsis* extract on liver damage induced by carbon tetrachloride and ethanol in rats. *Korean J Life Sci* 11: 405-414.
- Lee SY, Moon HJ, Kurata S, Kurama T, Natori S, Lee BL. 1994. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a Coleopteran insect *Holotrichia diomphalia*. *J Biochem* 115: 82-86.
- Lee SY, Moon HJ, Kurata S, Kurama T, Natori S, Lee BL. 1995. Purification and cDNA cloning of antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biol Pharm Bull* 18: 1049-1052.
- Lee SY, Moon HJ, Kawabata S, Kurata S, Natori S, Lee BL. 1995. A sapecin homologue of *Holotrichia diomphalia*: purification, sequencing and determination of disulfide pairs. *Biol Pharm Bull* 18: 457-459.
- Yoo YC, Shin BH, Hong JH, Lee J, Chee HY, Song KS. 2007. Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protaetia brevitarsis* Larva. *Arch Pharm Res* 30: 361-362.
- Hwang SY, Lee YG, Hwang SG, Lim HB, Kim YI, Jang KH, Jeon BH, Lee DW, Lee HC. 2001. Subchronic toxicity of *Protaetia brevitarsis* in rats. *Kor J Ori Med Physiol Pathol* 15: 703-707.
- Kim GN, Shin JG, Jang HD. 2009. Antioxidant and anti-diabetic activity of *Dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. *Food Chem* 117: 35-41.
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470-475.
- McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 29: 538-542.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
- Boo KS. 2005. *Hormone and physiology of insect*. Seoul Univ. press, Seoul, Korea. p 11.
- Bondent V, Brand-Williams W, Bereset C. 1997. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical methods. *LWT-Technol* 30: 609-615.
- Park JH, Seo BY, Lee SC, Park E. 2010. Effects of ethanol extracts from stalked sea squirt (*Styela clava*) on antioxidant potential, oxidative DNA damage and DNA repair. *Food Sci Biotechnol* 19: 1035-1040.
- Jeon EJ, Kim JS, Park YK, Kim ST, Kang MH. 2003. Protective effect of yellow-green vegetable juices on DNA damage in Chinese hamster lung cell using comet assay. *Korean J Nutr* 36: 24-31.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized method for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and biological and food samples. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
- Wolfe KL, Kang X, He, X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. 2008. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food*

- Chem* 56: 8418-8426.
24. Lizcano LJ, Bakkali F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. 2010. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem* 119: 1566-1570.
 25. Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem* 101: 1012-1018.
 26. Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
 27. Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.
 28. Wickens AP. 2001. Ageing and the free radical theory. *Resp Physiol* 128: 379-391.

(2011년 9월 1일 접수; 2011년 12월 26일 채택)