

Antioxidant Activities of *Protaetia brevitarsis* Larvae Fermented by *Lactobacillus acidophilus*

Min Jeong Park and Soo Jeong Cho*

Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea

Received September 22, 2022 / Revised October 7, 2022 / Accepted October 24, 2022

This study was carried out to evaluate the effect of fermentation by *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity of *Protaetia brevitarsis* larvae fed with mushroom substrates (king oyster mushroom). The total polyphenol content of the *P. brevitarsis* larvae extracts (PLEs) (93.33 ± 0.98 mg GAEs/extract g) was higher than that of the fermented *P. brevitarsis* larvae extracts (FPLEs) (65.02 ± 1.32 mg GAEs/extract g). The flavonoid contents of the PLEs and FPLEs were 18.3 ± 1.57 QEs mg/extract g and 17.69 ± 0.95 QEs mg/extract g, respectively. The DPPH radical scavenging activity showed no significant difference between the PLEs and FPLEs at a concentration of 2–4 mg/ml. However, at a concentration of 8 mg/ml or more, the DPPH radical scavenging activity of the FPLEs was higher than that of the PLEs. The reducing power of the FPLEs was also higher than that of the PLEs, and more than twice as high at a concentration of 1.6 mg/ml or more. The ORAC value of the FPLEs (79.22 ± 0.72 μ M TEs/extract g) was higher than that of the PLEs (74.34 ± 0.37 μ M TEs/extract g). A WST-1 assay of the RAW 264.7 cells indicated that the PLEs and FPLEs showed no cytotoxicity.

Key words : Antioxidant, DPPH radical scavenging activity, *Lactobacillus acidophilus*, ORAC value, *Protaetia brevitarsis* larvae

서 론

산소는 인체 대사 과정에서 필수불가결한 분자이지만, 인체 대사 과정에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 비공유 전자를 가진 불안정한 산소 화합물로서 반응성이 크다는 특징이 있으며, 과도하게 생성된 활성산소종은 산화적 스트레스를 유발하여 세포의 산화적 손상을 유발할 뿐만 아니라 암, 치매, 당뇨병, 류마티스 관절염과 같은 퇴행성 질환이나 노화를 유발할 수 있다[3, 4, 14, 16, 26, 40]. 인체는 이와 같은 활성산소종에 의한 산화적 손상을 방어하기 위해 super oxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등과 같은 내인성 항산화 효소를 생성하고 있고, 인체 대사 과정에서 생성되는 활성산소종을 제거하여 산화적 스트레스로부터 인체를 방어할 수 있는 물질인 항산화제에는 비타민 C, 비타민 E, glutathione 등이 있다. 항산화제는 초기에는 식품첨가물

로서 연구되고 있었지만, 지금은 산화적 스트레스와 질병의 상관관계에 관한 연구결과들이 발표되면서 질병 및 노화 예방효과가 있는 기능성 식·의약품 소재로서 연구되고 있다[1, 26]. 현재 사용되고 있는 항산화제는 대부분 합성 항산화제이며, 합성 항산화제는 천연 항산화제에 비해 항산화 활성이 높다는 장점이 있으나, 최근 들어 합성 항산화제의 안전성 문제가 제기되면서 인체에 안전하면서 항산화 효과가 우수한 천연물유래 식·의약품 소재 개발의 필요성이 대두되고 있다.

천연물유래 식·의약품 소재에 관한 연구는 주로 한약재를 중심으로 식물자원에 관한 연구가 많이 진행되어왔지만, 최근 들어 곤충의 다양성과 약리효과에 관한 연구결과들이 보고됨에 따라 곤충자원의 식·의약품 소재화에 관한 연구가 많은 관심을 받고 있다[6]. 현재 곤충은 새로운 농가 소득자원이므로써 주로 애완·학습용, 천적, 꽃의 수정을 돕는 화분 매개, 관광상품 및 바이오 소재 등으로 사용되고 있다[43]. 그러나, 식용곤충에는 단백질, 비타민, 불포화지방산 등 다양한 영양소가 함유되어 있고, 번식력이 좋다는 장점이 있어서 유엔식량 농업기구(Food and Agriculture Organization of the United Nations)에서는 곤충을 미래 식량난을 해결할 수 있는 대안으로 주목하고 있으며, 같은 양의 단백질을 생산한다고 가정했을 경우 식용곤충의 온실가스 배출량은 축산업의 10분의 1에 불과

*Corresponding author

Tel : +82-55-772-3397, Fax : +82-55-772-3399

E-mail : sjcho@gnu.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.

하기 때문에 환경적인 측면에서도 식용곤충은 유용한 생물자원이다[39]. 우리나라에서는 오래전부터 누에(*Bombyx mori*) 유충과 번데기, 백강잠, 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*) 등의 곤충을 식·약용으로 사용해왔으며, 누에(*Bombyx mori*) 유충과 번데기, 백강잠, 벼메뚜기(*Oxya chinensis sinuosa*), 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor*), 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma*), 흰점박이꽃무지 유충(*Protaetia brevitarsis*) 등은 식품의약품안전처에 일반식품으로 등록되어 있다[31]. 그 중에서도 흰점박이꽃무지(White-spotted flower chafer)는 딱정벌레목(Coleoptera) 꽃무지과(Cetoniinae)에 속하는 식·식성(食植性) 곤충으로써 알, 유충, 번데기, 성충의 시기를 거치는 완전변태를 하며, 유충은 ‘굳벵이’, ‘제조(*Protaetia brevitarsis*)’, ‘꽃벵이’ 등으로 불리고 있다[19, 23, 24, 27, 37]. 예로부터 흰점박이꽃무지 유충은 과혈행어(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), 단독(丹毒) 등의 질병 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며[30], 동의 보감에 의하면 간암, 간경화, 간염, 누적된 피로의 해소, 월경불순, 시력 감퇴, 백내장, 금창, 산후풍, 악성종기, 구내염, 과상풍, 중풍 등의 성인병 치료에 효과가 있다[9, 20, 30]. 최근에는 유용생물 자원으로써 곤충에 대한 관심이 증가하면서 흰점박이꽃무지 유충에 관한 다양한 연구들이 진행되어 흰점박이꽃무지 유충의 생리활성, 식중독균 및 중금속 등 유해물질에 대한 안전성, 먹이원에 따른 흰점박이꽃무지의 품질 등에 관한 연구가 보고되고 있다[11, 17, 31]. 흰점박이꽃무지 유충의 생리활성에 관한 최근 연구에 의하면 흰점박이꽃무지 유충에는 단백질뿐만 아니라 올레산, 리놀레산 등의 불포화 지방산이 많이 함유되어 있고, 동물성 식이 섬유인 키틴질, 각종 미네랄과 비타민 등이 풍부하며[13], 인돌 알칼로이드가 함유되어 있어서 혈전 치유 효과[28]가 있고, 항산화 활성과 간 기능 개선 및 당뇨병 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[19, 27, 37]. 흰점박이꽃무지 유충은 여러 가지 약리작용을 갖고 있기 때문에 기능성 식의약품 소재로써 개발 가능성이 높은 생물자원이지만, 흰점박이꽃무지 유충에 대한 인식과 특유의 냄새로 인해 선호도가 낮다는 단점이 있어서 산업화되지는 못하고 있는 실정이다. 따라서 흰점박이꽃무지 유충의 이와 같은 단점을 개선할 수 있다면 흰점박이꽃무지 유충은 기능성 식의약품소재로써 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

흰점박이꽃무지 유충의 단점을 개선할 수 있는 전처리 방법으로 발효법을 들 수 있다. 발효는 곰팡이, 효모, 유산균, 바실러스 등의 미생물에 의해 유기물의 화학변화가 일어나는 과정으로 식의약품 소재의 전처리 과정에 많이 이용되고 있으며, 발효의 장점으로는 새로운 생리활성 부여, 유용성분의 증가, 흡수율 증가, 유용 장내 미생물 증가

등이 있다[2, 21]. 발효에 이용되는 미생물 중에서도 유산균은 오랜 시간 동안 식품 발효에 사용되어 왔으며, 발효 과정을 통해 다양한 영양물질, 향기성분, 항균물질 등이 생산되어 원료의 풍미와 제품 수명에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[32, 41]. 그리고 유산균은 probiotics로써 사람의 장내에 서식하면서 장내 균총 개선, 면역 조절 작용, 콜레스테롤 저하, 병원성 세균들의 생육 억제, 유당 불내증 개선 등 다양한 역할을 하고 있다[18, 42].

본 연구에서는 유산균 발효가 흰점박이꽃무지 유충의 항산화 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 흰점박이꽃무지 유충을 유산균으로 발효하고, 흰점박이꽃무지 유충(*P. brevitarsis* larvae extracts, PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충(fermented *P. brevitarsis* larvae extracts, FPLE) 추출물의 항산화 활성을 비교하였다.

재료 및 방법

유산균을 이용한 흰점박이꽃무지 유충 발효 및 추출물 제조

본 실험에 사용된 흰점박이꽃무지 유충은 큰느타리버섯 수확후배지를 식이한 유충으로 농업회사법인 도다움(경남 진주시 명석면 소재)에서 제공받아 흐르는 물에 3회 세척한 다음 물기를 제거하고 건조기에서 약 72시간 동안 건조하여 사용하였다. 건조된 흰점박이꽃무지 유충은 분쇄기로 분쇄한 다음 10% (w/w) 분말 유산균(*Lactobacillus acidophilus*)을 접종하여 밀봉한 후 5일 동안 30°C에서 발효하였다. 발효된 흰점박이꽃무지 유충은 80% 에탄올(1:4=v/v)에 침지한 후 상온에서 3회 반복 추출하였고, 추출물은 Watman filter paper (No. 2)로 여과한 다음 회전압축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 농축하였다. 흰점박이꽃무지 유충 추출물(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충 추출물(FPLE)의 조추출물 수율은 각각 23.3% (w/v)와 33.4% (w/v)였다.

총 폴리페놀 함량 측정

추출물의 총 폴리페놀 함량은 Singleton 등[38]의 방법에 따라 항산화 물질에 의해 Folin-Ciocalteu reagent가 환원되어 몰리브덴이 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 측정하였으며, 표준물질은 gallic acid (Sigma aldrich, USA)를 사용하였다.

추출물 100 μ l에 2% sodium carbonate (Na_2CO_3) 용액 2 ml를 첨가한 후 3분 동안 반응시킨 다음 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μ l를 첨가하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액의 흡광도는 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를 이용하여 720 nm에서 측정하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

추출물의 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등[44]의 방

법에 따라 colorimetric assay법으로 측정하였으며, 표준물질은 quercetin (Sigma aldrich, USA)을 사용하였다.

추출물 1 ml에 증류수 4 ml를 첨가한 다음 5분 동안 반응시킨 후 5% sodium nitrate (NaNO₂) 용액 0.3 ml와 10% aluminium nitrate (Al(NO₃)₃·9H₂O) 용액 3 ml를 첨가하여 6분 동안 반응시켰고, 반응액에 1 M sodium hydroxide (NaOH) 용액 2 ml를 첨가한 다음 증류수로 10 ml로 정량한 후 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼소거 활성

추출물의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois 등[5]의 방법에 따라 짙은 보라색을 띠는 안정한 라디칼인 DPPH가 항산화 물질의 전자공여능에 의해 수소 혹은 전자를 받아 탈색되는 원리를 이용하여 측정된 다음 시료첨가구와 대조구의 흡광도 비를 백분율로 나타내었으며, 양성 대조구는 ascorbic acid (Sigma aldrich, USA)를 사용하였다.

추출물 50 ul에 0.15 mM DPPH (Sigma aldrich, USA)를 200 ul 첨가한 후 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{DPPH 라디칼소거 활성(\%)} = \left[\frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \right] \times 100$$

환원력 측정

추출물의 환원력은 Oyaizu 등[35]의 방법에 Fe³⁺이온을 Fe²⁺로 환원시키는 능력을 측정하여 확인하였으며, 시료첨가구와 대조구의 흡광도 비를 백분율로 나타내었다.

추출물 1 ml에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) 2.5 ml과 1% potassium ferricyanide 2.5 ml을 첨가한 후 50°C에서 20분 동안 반응시킨 다음 냉각시켰다. 냉각시킨 반응액에 10% trichloroacetic acid (TCA) 2.5 ml를 첨가한 후 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 다음 상등액 1 ml에 증류수 3 ml과 0.1% ferric chloride 1 ml를 첨가하였고, 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

추출물의 peroxy 라디칼 소거능을 나타내는 oxygen radical absorbance capacity (ORAC)는 Cao 등[7]의 방법에 따라 peroxy 라디칼의 생성과 소멸에 의한 fluorescent 감소를 측정하여 확인하였으며, 표준물질은 trolox (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

추출물 10 ul와 300 mM 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH, Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 20 ul, 250 nM fluorescein (Sigma-al-

drich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 2.7 ml을 혼합한 다음 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를 이용하여 1시간 동안 2분마다 485 nm (excitation wavelength)와 535 nm (emission wavelength)에서 형광을 측정하였다.

흰점박이꽃무지 유충(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충(FPLE)의 세포독성

추출물의 세포독성은 수용성인 tetrazolium salt WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulphonate, Biovison, USA)이 세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase와 반응하면 붉은색의 formazan으로 변하는 원리를 이용하여 확인하였으며[15], 양성 대조구는 0.04% adenosine을 사용하였다.

추출물의 세포독성을 확인하기 위해 사용된 세포주는 RAW 264.7이며, 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB 10092)으로부터 분양받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Rockville, MD, USA)과 1%의 penicillin-streptomycin (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, GIBCO) 배지에서 3일 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였고, RAW 264.7 세포 배양액에 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/ml 농도의 추출물을 처리한 다음 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 추출물이 처리된 RAW 264.7 세포 배양액에 tetrazolium salt WST-1 용액을 첨가한 4시간 동안 다음 37°C에서 배양한 후 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 5회 이상 반복실험을 수행하여 얻어진 결과이며, SAS (Statistical analysis system, USA) program을 이용하여 평균값과 표준오차를 구하였고, Duncan's 다중검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

흰점박이꽃무지 유충(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충(FPLE) 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀은 phenolic hydroxyl (-OH)기를 가지고 있어서 단백질과 같은 거대분자와 결합하여 항산화, 항암, 항균 등의 다양한 생리활성을 나타내는데[36], 곤충의 외표피층에는 지질체에서 합성되는 폴리페놀이 다량 함유된 다가가 페놀층이 존재하고 있어서 곤충은 항산화물질인 폴리페놀 함량이 높고 항산화 활성이 높은 생물자원이다[11]. 추출물 PLE와 FPLE의 총 폴리페놀 함량은 각각 65.02±

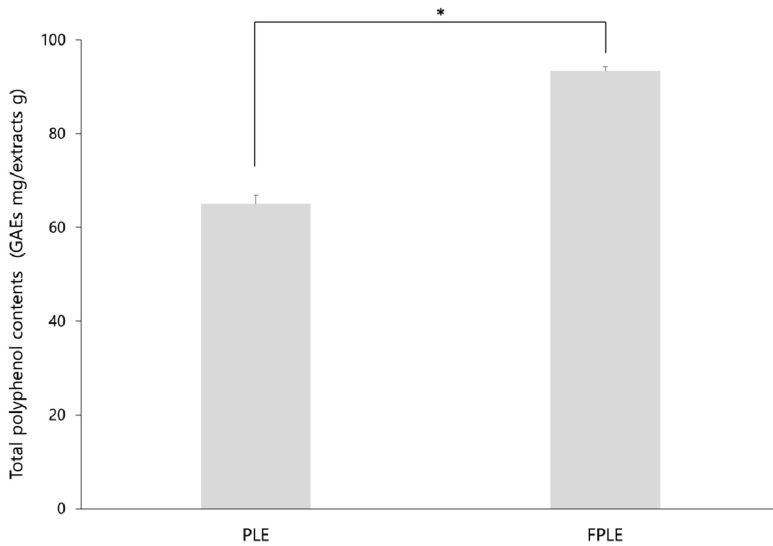


Fig. 1. Total polyphenolic contents of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE) and fermented *P. brevitarsis* larvae extracts (FPLE). Values are expressed as mean ± SD (n=3), Values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

1.32 mg GAEs/extract g과 93.33 ± 0.98 mg GAEs/extract g으로 PLE에 비해 FPLE의 폴리페놀 함량이 더 높게 나타났으며(Fig. 1), 발효산물인 FPLE의 폴리페놀 함량이 PLE에 비해 높게 나타났기 때문에 유산균 발효에 의해 항산화 물질인 폴리페놀이 증가한 것으로 판단된다. 유용미생물을 이용한 발효 곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성 효과에 관한 Sim 등[37]의 보고에서도 곰팡이 추출물에 비해 발효 곰팡이 추출물의 폴리페놀 함량이 높게 나타났고, *Lactobacillus brevis*를 활용한 흰점박이꽃무지 유충과 산양삼의 발효물에 대한 특성 연구[29]에서도 *L. brevis* SM61을 이용한 발효물의 폴리페놀 함량이 흰점박이꽃무지 유충 열수 추출물에 비해 높다고 보고하였다.

플라본 구조의 노란색 식물 색소를 총칭하는 플라보노이드에는 안토시아닌, 플라보놀, 플라본, 카테킨, 플라바논 등이 있으며, 항산화, 에스트로젠, 항암 등 다양한 생리활성을 나타낸다[10, 22, 26, 33]. 추출물 PLE와 FPLE의

플라보노이드 함량은 각각 18.3 ± 1.57 mg QEs/extract g과 17.69 ± 0.95 mg QEs/extract g으로 두 시료 간에 유의적 차이는 없었다(Fig. 2). 유용미생물을 이용한 발효 곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성 효과에 관한 Sim 등[37]의 보고에 의하면, 곰팡이 추출물(0.76 mg/100 g)에 비해 발효 곰팡이 추출물(4.19 mg/100 g)의 플라보노이드 함량이 높게 나타났다. 추출물 PLE와 FPLE의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 Sim 등[37]의 연구결과보다 높게 나타난 이유는 본 연구에 사용된 흰점박이꽃무지 유충은 큰느타리버섯 수확후배지를 식이하여 사육한 유충이기 때문에 먹이원에 따른 영향으로 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높게 나타난 것으로 판단된다. Noh 등[34]은 흰점박이꽃무지 유충의 가공 전 먹이류 종류에 따른 영양성분 변화에 관한 보고에서 흰점박이꽃무지 유충의 절식군과 다양한 대체 먹이 급여군에서 페놀 함량의 유의적 차이가 있다고 보고하였다.

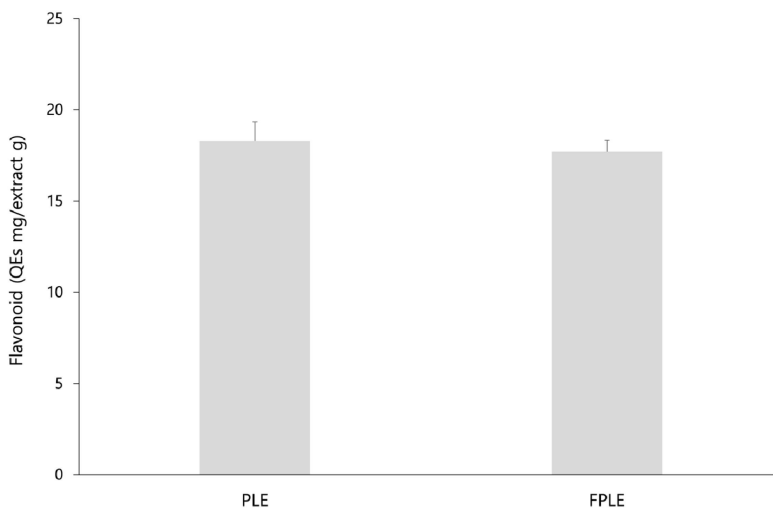


Fig. 2. Total flavonoid contents of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE) and fermented *P. brevitarsis* larvae extracts (FPLE). Values are expressed as mean ± SD (n=3), Values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

흰점박이꽃무지 유충(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충(FPLE) 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

추출물 PLE와 FPLE의 항산화 활성은 DPPH에 의한 라디칼 소거 활성을 측정하여 확인하였다(Fig. 3). DPPH 라디칼은 수소 원자나 전자를 공여할 수 있는 항산화 물질의 능력을 평가할 때 사용되며, 항산화 물질은 자유라디칼에 전자를 공여하여 라디칼의 공유결합을 증가시키는 전자공여능이 높을수록 활성산소를 효과적으로 제어할 수 있다[8]. 추출물 PLE와 FPLE의 DPPH 라디칼 소거능은 2-4 mg/ml의 농도에서는 두 시료 간에 유의적 차이가 나타나지 않았지만, 8 mg/ml 이상의 농도에서는 PLE에 비해 FPLE의 DPPH 라디칼 소거 활성이 우수하였다. 따라서, PLE에 비해 폴리페놀 함량뿐만 아니라 항산화 활성 평가 지표인 DPPH 라디칼 소거 활성도 발효산물인 FPLE에서 높게 나타났기 때문에 유산균 발효에 의해 항산화 활성이 증가한 것으로 판단된다. 유용미생물을 이용한 발효 곰팡

이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성 효과에 관한 Sim 등[37]의 보고에서도 곰팡이 추출물에 비해 발효 곰팡이 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 높게 나타났다.

흰점박이꽃무지 유충(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충(FPLE) 추출물의 환원력

환원력은 ferric-ferricyanide (Fe^{3+}) 혼합물이 수소를 공여하여 ferrous (Fe^{2+})로 전환되는 능력을 흡광도 값으로 나타낸 것으로 환원력이 높을수록 흡광도 값이 크고 진하게 발색된다[12]. 추출물 PLE와 FPLE의 환원력은 추출물의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었고, PLE에 비해 FPLE의 환원력이 우수하였으며 1.6 mg/ml 이상의 농도에서는 PLE에 비해 FPLE의 환원력이 2배 이상 높게 나타났다(Fig. 4). 따라서, 발효산물인 FPLE은 PLE에 비해 폴리페놀 함량뿐만 아니라 항산화 활성 평가 지표인 DPPH 라디칼 소거 활성과 환원력이 높게 나타났기 때문

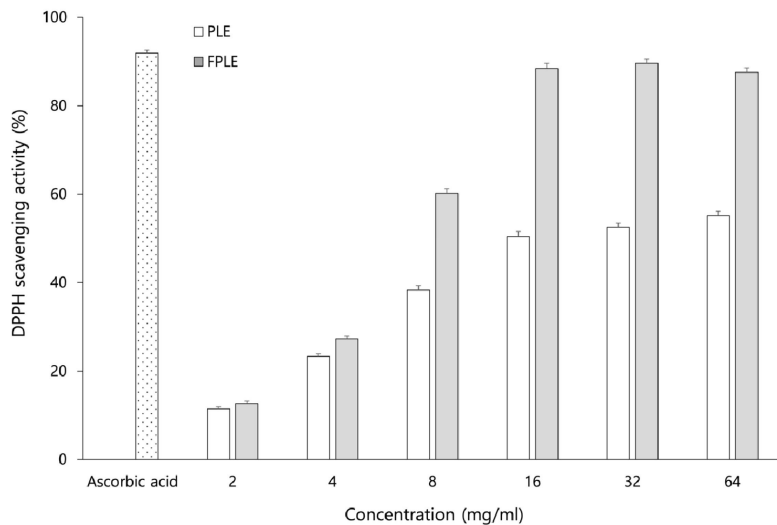


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE) and fermented *P. brevitarsis* larvae extracts (FPLE). Values are expressed as mean ± SD (n=3), Values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

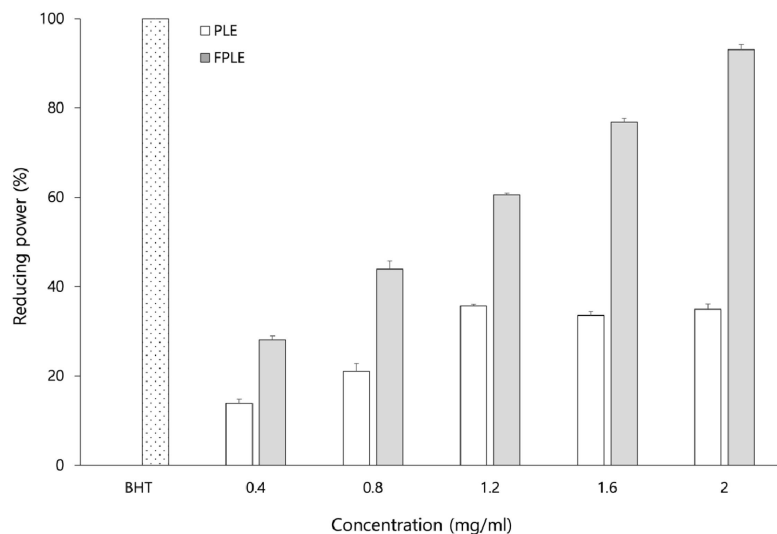


Fig. 4. Reducing power of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE) and fermented *P. brevitarsis* larvae extracts (FPLE). Values are expressed as mean ± SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

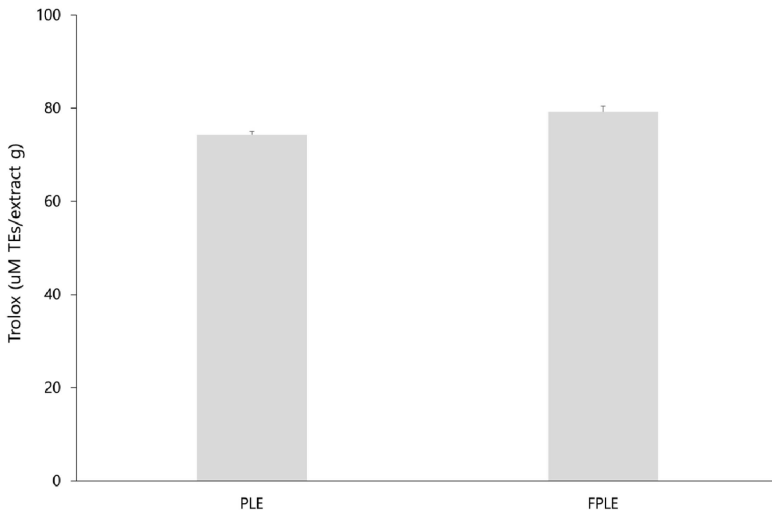


Fig. 5. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE) and fermented *P. brevitarsis* larvae extracts (FPLE). Values are expressed as mean ± SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

에 유산균 발효에 의해 항산화 활성이 증가한 것으로 판단된다.

흰점박이꽃무지 유충(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충(FPLE) 추출물의 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

수소 전자의 전달이론을 바탕으로 radical chain breaking antioxidant capacity를 측정하는 ORAC 지수는 친수성 및 소수성 성분 모두에 반응하기 때문에 응용범위가 넓다는 장점을 가지고 있다[26]. 추출물 PLE와 FPLE의 ORAC 지수는 각각 74.34±0.37 uM TE/extract g과 79.22±0.72 uM TE/extract g으로 PLE에 비해 FPLE의 ORAC 지수가 높게 나타났다(Fig. 5). 먹이원에 따른 흰점박이꽃무지 유충의 항산화 활성에 관한 연구[25]에서 Kim 등은 참나무톱밥과 큰느타리버섯 수확후배지를 각각 식이한 흰점박이꽃무지 추출물의 ORAC 지수는 각각 66.55±0.99 TE/extract g

과 76.32±0.48 uM TE/extract g으로 큰느타리 수확후배지를 식이한 흰점박이꽃무지의 ORAC지수가 참나무톱밥을 식이한 흰점박이꽃무지보다 높다고 보고하였다. 이상의 결과를 종합하면, 유산균으로 발효한 FPLE의 폴리페놀 함량 및 항산화 활성 평가지표인 DPPH 라디칼 소거 활성과 환원력, ORAC지수가 PLE에 비해 모두 높게 나타났기 때문에 흰점박이꽃무지 유충의 항산화 활성은 유산균 발효에 의해 증가된 것으로 판단된다.

RAW 264.7 세포에 대한 흰점박이꽃무지 유충(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충(FPLE) 추출물의 세포독성

RAW 264.7 세포에 대한 추출물 PLE와 FPLE의 세포독성은 RAW 264.7 세포에 추출물을 2-64 mg/ml의 농도로 처리한 다음 WST-1 assay로 확인하였다. 추출물 PLE와 FPLE를 각각 0, 2, 4, 8, 16, 32, 40, 64 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, RAW 264.7 세포는 90% 이상의 생존율을

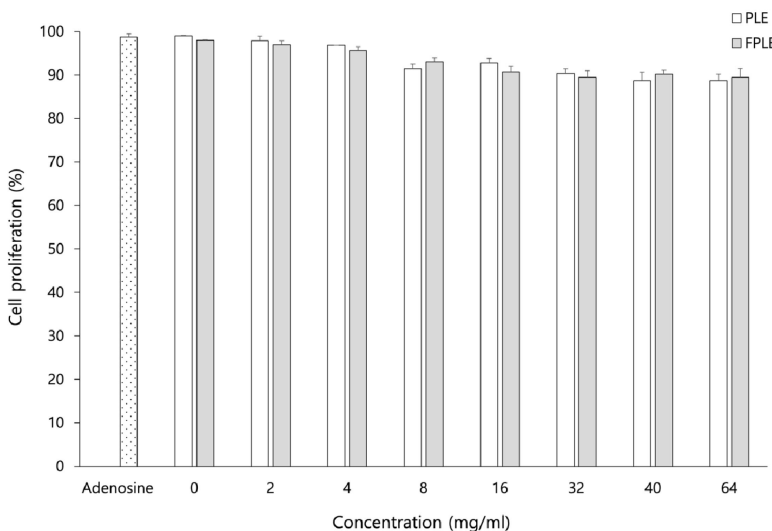


Fig. 6. Effects of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE) and fermented *P. brevitarsis* larvae extracts (FPLE) on cell proliferation in RAW 264.7 cell. The RAW 264.7 cell was incubated for 24 hr in DMEM media with different concentration of PLE and FPLE. The cell proliferation was determined using WST-1 assay. Values are expressed as mean ± SD (n=3), Values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

나타내었으므로 PLE와 FPLE은 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 판단된다(Fig. 6). Lee [29]의 *L. brevis*를 활용한 흰점박이꽃무지 유충과 산양삼의 발효물에 대한 특성 연구에서도 흰점박이꽃무지 유충 추출물은 93-100% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 이상의 결과를 종합해보면, 큰느타리버섯 수확후배지를 식이한 흰점박이꽃무지 유충은 유산균 발효에 의해 폴리페놀 함량과 항산화 활성이 증가되기 때문에 발효법은 흰점박이꽃무지 유충을 식의약품 소재로 개발하는 과정에 필요한 전처리 과정이라고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2022년 경상국립대학교 학술연구지원사업에 의해 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Aburjai, T. and Natsheh, F. M. 2003. Plants used in cosmetics. *Phytother. Res.* **17**, 987-1000.
- 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.
- Aitken, R. J., Bukingham, D. and Harkiss, D. 1993. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effect of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 441-450.
- Baublis, A. J., Lu, C., Clydesdale, F. M. and Decker, E. A. 2000. Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**, 308S-311S.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Bukkens, S. G. F. 1996. The nutritional value of edible insects. *Ecol. Food. Nutr.* **36**, 287-319.
- Cao, G., Alessio, H. M. and Cutler, R. G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 303-311.
- Cha, J. Y. 2009. Functional components and biological activities of marketing black garlic. M.S. dissertation. Gyeongsang National University, Jinju, Korea.
- 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.
- Choi, K. H., Nam, H. H. and Choo, B. K. 2013. Effect of five Korean native *Taraxacum* on antioxidant activity and nitric oxide production inhibitory activity. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **21**, 191-196.
- Choi, M. H., Kim, K. H. and Yook, H. S. 2019. Antioxidant activity and quality evaluation of the larvae of *Protaetia brevitarsis* after feeding with Korean *Panax ginseng*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **48**, 403-409.
- Chung, H. J. 2010. Antioxidative activities of different part extracts of *Physalis alkekengi* var. *francheti* (winter cherry). *Kor. J. Food Preserv.* **17**, 867-873.
- 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.
- Droge, W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Francoeur, A. M. and Assalian, A. 1996. Microcat: A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on wst-1. *Biochemica* **3**, 19-25.
- Halliewell, B. and Gutteridge, J. M. 1990. Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-12.
- Hwang, S. Y., Lee, Y. G., Hwang, S. G., Lim, H. B., Kim, Y. I., Jang, K. H., Byng, H. J., Lee, D. W. and Lee, H. C. 2001. Subchronic toxicity of *Protaetia brevitarsis* in rats. *Kor. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **15**, 703-707.
- Jeppsson, B., Mangell, P. and Thorlacius, H. 2011. Use of probiotics as prophylaxis for postoperative infections. *Nutrients* **3**, 604-612.
- 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, I. J., Kim, H. K., Chung, C. K., Kim, S. J. and Oh, D. 2000. Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 479-484.
- 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.
- Kim, D. J., Oh, S. K., Yoon, M. R., Chun, A. R., Hong, H. C., Lee, J. S. and Kim, Y. K. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the 70% ethanol extracts from brown and milled rice by cultivar. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 467-473.
- Kim, H. G. and Kang, K. H. 2005. Bionomical characteristic of *Protaetia brevitarsis*. *Kor. J. Appl. Entomol.* **44**, 139-144.
- Kim, H. G. and Kang, K. H. 2006. Imago's flight and larval activities of *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera: Scarabaeidae) and *Allomyrina dichotoma* (Coleoptera: Dynastinae). *Kor. J. Appl. Entomol.* **45**, 139-143.
- Kim, H. S., Park, H. Y., Kwon, H. S., Lee, S. H., Ha, J., Lee, S. W. and Cho, S. J. 2019. Variations in antioxidant activity in *Protaetia brevitarsis* larvae depending on the feeding source. *J. Mushrooms* **17**, 261-267.
- Kim, S. C., Kwon, H. S., Kim, C. H., Kim, H. S., Lee, C. Y. and Cho, S. J. 2016. Comparison of antioxidant ac-

- tivities of pileus and stipe from white beech mushrooms (*Hypsizygos marmoreus*). *J. Life Sci.* **26**, 928-935.
27. 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.
 28. 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.
 29. Lee, Y. D. 2018. Properties of aqueous extract of *Protaetia brevitarsis* larva and mountain ginseng fermented by *Lactobacillus brevis*. *J. Food Hyg. Saf.* **33**, 369-374.
 30. Lee, H. C., Hwang, S. Y., Hwang, S. G., Jeon, B. H. and Lee, D. W. 2001. Acute toxicity of *Protaetia brevitarsis* homogenate in rats. *Kor. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **15**, 543-547.
 31. Lee, S. U., Kim, J. W., Bae, S. M., Hwang, Y. H., Lee, B. J., Honh, K. P. and Park, C. G. 2018. Evaluation of spent mushroom substrates as food for white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* seulensis (Coleoptera: Cetoniidae). *Kor. J. Appl. Entomol.* **57**, 97-104.
 32. Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 67-78.
 - Relationship between the extent of coronary artery disease and indicators of free radical activity. *Clin. Cardiol.* **15**, 706-707.
 33. Middleton, E. and Kandaswami, C. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.* **48**, 115-119.
 34. Noh, C. W., Jeon, S. H., Son, D., Cho, Y. S. and Lee, B. J. 2015. Changes of nutritive component with before processing feeding type for larva of *Protaetia brevitarsis*. *J. Kor. Soc. Int. Agric.* **27**, 675-681.
 35. Oyaizu M. 1986. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307-315.
 36. Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.
 37. Sim, S. Y., Ahn, H. Y., Seo, K. I. and Cho, Y. S. 2018. Physicochemical properties and biological activities of *Protaetia brevitarsis* seulensis larvae fermented by several kinds of microorganisms. *J. Life Sci.* **7**, 827-834.
 38. Singleton, V. L. 1981. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.* **27**, 149-242.
 39. Srivastava, S. K., Badu, N. and Pandey, H. 2009. Traditional insect bioprospecting-as human food and medicine. *Indian J. Tradit. Knowl.* **8**, 485-494.
 40. Verckei, A., Toncsev, H., Feher, J. and Hajdu, E. 1992. Relationship between the extent of coronary artery disease and indicators of free radical activity. *Clin. Cardiol.* **15**, 706-707.
 41. Vyas, U. and Ranganathan, N. 2012. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res. Pract.* doi: 10.1155/2012/872716.
 42. Wallace, T., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M. D., Gibson, G., Hentges, E. and Sanders, M. E. 2011. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr. Rev.* **69**, 392-403.
 43. 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.
 44. Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1998. The determination flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.

초록 : 유산균 발효가 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 유충의 항산화활성에 미치는 영향

박민정 · 조수정*

(경상국립대학교 제약공학과)

본 연구에서는 유산균 발효가 큰노타리버섯 수확후배지를 식이한 흰점박이꽃무지 유충의 항산화 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 흰점박이꽃무지 유충을 유산균으로 발효시키고, 흰점박이꽃무지 유충(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충(FPLE) 추출물의 항산화 활성을 비교하였다. 추출물 PLE와 FPLE의 총 폴리페놀 함량은 각각 65.02 ± 1.32 mg GAEs/extract g과 93.33 ± 0.98 mg GAEs/extract g이었고, 플라보노이드 함량은 각각 18.3 ± 1.57 mg QEs/extract g과 17.69 ± 0.95 mg QEs/extract g이었다. 추출물 PLE와 FPLE의 DPPH에 의한 라디칼소거 활성은 2-4 mg/ml의 농도에서는 두 시료 간의 유의적 차이를 나타나지 않았지만, 8 mg/ml 이상의 농도에서는 추출물 PLE에 비해 FPLE의 DPPH 라디칼 소거능이 우수하였다. 추출물 PLE와 FPLE의 환원력도 추출물 PLE에 비해 FPLE이 우수하였으며 1.6 mg/ml 이상의 농도에서는 PLE에 비해 FPLE의 환원력이 2배 이상 높게 나타났다. 추출물 PLE와 FPLE의 ORAC 지수는 각각 74.34 ± 0.37 uM TEs/extract g과 79.22 ± 0.72 uM TEs/extract g으로 추출물 PLE에 비해 FPLE의 ORAC 지수가 높게 나타났고, RAW 264.7 세포에 대한 추출물의 세포독성은 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합하면, 큰노타리버섯 수확후배지를 식이한 흰점박이꽃무지 유충은 유산균 발효에 의해 항산화물질인 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었으며, 발효법은 흰점박이꽃무지 유충을 식의약품 소재로 개발하는 과정에 필요한 전처리 과정이라고 판단된다.