

## Effects of Microbial Fermentation on the Antioxidant Activities of *Protaetia brevitarsis* Larvae

Han Bi Kim, Hye Soo Kim and Soo Jeong Cho\*

Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

Received December 11, 2023 / Revised December 19, 2023 / Accepted December 20, 2023

This study was carried out to evaluate the effect of fermentation by *B. subtilis* (BPLE), *L. brevis* (LPLE), *S. cerevisiae* (SPLE) and *C. militaris* (CPLE) on the antioxidant activity of *Protaetia brevitarsis* larvae fed with mushroom substrates (king oyster mushroom). The total polyphenol content of *Protaetia brevitarsis* larvae (PLE), BPLE, LPLE, SPLE and CPLE were  $58.07 \pm 0.67$ ,  $83.33 \pm 0.98$ ,  $79.21 \pm 1.32$ ,  $61.02 \pm 0.87$  and  $57.90 \pm 1.02$  mg GAEs/extract g, respectively. The flavonoid contents of the PLE, BPLE, LPLE, SPLE and CPLE were  $17.35 \pm 1.57$ ,  $19.49 \pm 0.95$ ,  $16.90 \pm 1.57$ ,  $18.12 \pm 0.95$  and  $16.99 \pm 0.95$  mg QEs/extract g, respectively. The DPPH radical scavenging activity showed no significant difference between the PLE, BPLE, LPLE, SPLE and CPLE at a concentration of 0.2 mg/ml. However, at a concentration of 0.4 mg/ml or more, the DPPH radical scavenging activity of the BPLE and LPLE was higher than that of the PLE. The reducing power of the BPLE and LPLE was also higher than that of the PLE, and more than twice as high at a concentration of 0.8 mg/ml or more. The ORAC value of the BPLE ( $79.77 \pm 0.82$   $\mu$ M TEs/extract g) was higher than that of the PLE ( $61.34 \pm 0.97$   $\mu$ M TEs/extract g). A WST-1 assay of the RAW 264.7 cells indicated that the PLE, BPLE, LPLE, SPLE and CPLE showed no cytotoxicity.

**Key words :** Antioxidant, *Bacillus subtilis*, DPPH radical scavenging activity, ORAC value, *Protaetia brevitarsis* larvae

### 서 론

우리나라는 경제성장과 의료 기술의 발전으로 빠른 속도로 고령화 사회에서 초고령 사회로의 진입을 앞두고 있으며, 이에 따라 노화와 건강한 노년에 대한 소비자들의 관심이 증가하고 있다. 노화의 여러 가지 원인 중 하나로 활성산소종이 있다. 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡 등과 같은 인체 대사 과정에서 생성되는 대사산물로써 체내 방어기전에 의해 대부분 소실되지만, 반응성이 큰 비공유 전자를 가진 불안정한 자유 라디칼(free radical)이기 때문에 스트레스, 과도한 운동, 흡연, 과식, 환경오염 등에 의해 과도하게 생성되면 세포 및 DNA 손상, 지질의 과산화와 같은 산화적 스트레스를 유발하여 노화, 대사성 질환 및 암, 치매, 당뇨병, 류마티스 관절염과 같은 퇴행성 질환을 유발할 수 있다고 알려지면

서 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다[2, 3, 11, 13, 21, 22, 37]. 항산화제에는 항산화 효소, 천연 항산화제, 합성 항산화제가 있다. 항산화 효소는 체내 방어기전으로 체내에 존재하며, 대표적인 항산화 효소에는 ascorbate peroxidase (APX), mcatalase, glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx), catalase (CAT) 등이 있다. 천연 항산화제는 대부분 페놀성 화합물이며 대표적인 천연 항산화제에는 비타민 C와 E, tocopherol 등이 있고, 대표적인 합성 항산화제에는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butyl hydroquinone (TBHQ), propyl gallate (PG) 등이 있다. 천연 항산화제는 인체에 부작용이 거의 없다는 장점이 있으나 가격이 비싸고 지용성이며 단일 제제로 사용할 경우 우수한 항산화력을 나타내지 못한다는 단점이 있다. 합성 항산화제는 항산화력이 우수하고 가격이 저렴하여 경제성이 높다는 장점이 있어서 널리 사용되고 있으나 높은 농도로 장기간 복용할 경우 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환기계 등에 부작용이 나타날 수 있다는 인체 유해성과 안정성 문제가 보고되면서 인체에 안전하면서 항산화력이 우수하고 경제성이 높은 천연물 유래 항산화 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[30, 32].

곤충은 절지동물문 곤충강에 속하는 동물을 총칭하며,

#### \*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.

현재까지 알려진 곤충은 백만 개 이상의 종으로 지구상에 존재하는 전체 동물의 75%를 차지하고 있다. 역사적으로 곤충은 농경문화 정착 이전 시대부터 식량자원으로 이용되어 왔으며, 문헌에는 1,900여종의 식용곤충이 기록되어 있다. 현재 아시아에서는 메뚜기, 누에 번데기 또는 유충 등을 식용곤충으로 섭취하고 있다[22]. 식용 곤충에는 필수아미노산이 풍부한 단백질, 불포화지방산이 다량 함유된 지방, 칼슘, 철분 등 다양한 영양소가 함유되어 있고, 번식력이 좋으며, 가축에 비해 온실가스와 암모니아 방출이 적기 때문에 친환경적이라는 장점이 있어서 유엔식량농업기구(Food and Agriculture Organization of the United Nations)에서는 곤충을 미래 식량난을 해결할 수 있는 대안으로 주목하고 있다[36].

우리나라에서는 2019년부터 식용곤충을 가축으로 인정하고 있으며, 식품의약품안전처로부터 식품원료로 인정받은 식용 곤충은 식용 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*), 아메리카왕거저리유충(*Zophobas atratus*), 수벌번데기(*Apis mellifera* L.), 풀무치(*Locusta migratoria*) 등 10종이다. 또한 ‘주기’, ‘산해경’, ‘신농보초경’, ‘명의별록’, ‘본초’, ‘본초강목’ 등의 문헌에 의하면 중국에서는 300 종 이상의 곤충이 약용자원으로 이용되어 왔다. 우리나라에서의 ‘동의보감에 의하면 약 95종의 곤충이 약용으로 쓰일 수 있다고 기록되어 있다[22].

식용곤충 중에서도 ‘꽃뽕이’, ‘제조(*Protaetia brevitarsis*)’ 또는 ‘꽃뽕이’라 불리는 흰점박이꽃무지 유충은 파혈행어(破血行瘀), 산결소종(散結消腫), 청혈해독(淸血解毒) 등의 효능이 있어 한의약에서 널리 사용되고 있다[15, 18, 19, 22, 31, 34]. 흰점박이꽃무지 유충에 관한 최근 연구결과에 의하면 흰점박이꽃무지 유충에는 올레산, 리놀레산 등의 불포화 지방산과 동물성 식이 섬유인 키틴질, 각종 미네랄과 비타민 등이 풍부하고, 인돌 알칼로이드 등이 함유되어 있으며[10, 24], 혈전 치유 효과[24], 항산화 활성, 간 기능 개선, 항당뇨 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다[15, 22, 34]. 또한 흰점박이꽃무지 유충은 산양삼[8], 큰느타리 버섯수확후배지[31] 등 먹이원에 따라 품질 및 생리활성에 차이가 있는 것으로 보고되고 있다. 이처럼 흰점박이꽃무지 유충은 기능성 식의약품 소재로써 개발 가능성이 높은 생물자원이지만, 흰점박이꽃무지를 식의약품소재로 개발하기 위해서는 곤충 특유의 냄새를 개선할 수 있는 전처리법의 개발이 필요하다. 있다[31].

발효는 식의약품 소재의 전처리 과정에 많이 이용되고 있는 방법이며, 미생물에 의해 식의약품 소재 중 유기물의 화학변화가 일어나는 과정으로 새로운 생리활성 부여, 유용성분의 증가, 흡수율 증가, 유용 장내 미생물의 증가

등의 장점이 있다[3, 16, 31]. *Bacillus* 속과 *Lactobacillus* 속 균주들은 오랜 시간 동안 김치, 요거트 등 다양한 발효 식품에 이용되어 왔으며, 발효 과정 동안 다양한 영양물질, 향기성분, 항균물질 등을 분비하여 원료의 풍미와 제품 품질에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[26, 38]. 그리고 유산균은 probiotics로써 사람의 장내 미생물로 장내 균총 개선, 면역 조절 작용, 콜레스테롤 저하, 병원성 미생물의 생육 억제, 유당 불내증 개선 등 다양한 역할을 하고 있다[14, 31, 39].

본 연구에서는 미생물 발효가 흰점박이꽃무지 유충의 항산화 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 이전 연구[31]에서 참나무톱밥 식이에 비해 품질이 우수하다고 확인된 큰느타리 수확후배지 식이 흰점박이꽃무지 유충을 *B. subtilis*, *L. brevis*, *S. cerevisiae*, *C. militaris*로 발효한 다음 흰점박이꽃무지 유충 추출물(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충 추출물(BPLE, LPLE, SPLE, CPLE)의 항산화 활성을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 흰점박이꽃무지 유충 발효

본 실험에서는 큰느타리버섯 수확후배지를 식이한 후 6일 동안 절식시킨 흰점박이꽃무지 유충을 흐르는 물에 3회 세척한 다음 물기를 제거하고 건조기에서 약 72시간 동안 건조한 후 분쇄하여 사용하였다.

건조된 흰점박이꽃무지 유충을 발효하기 위해 사용된 *Bacillus subtilis* KACC17047, *Lactobacillus brevis* KACC 10553, *Saccharomyces cerevisiae* KACC30008, *Cordyceps militaris* KACC43320 균주는 국립농업과학원 농업미생물은행(KACC)에서 분양받았다. 분양받은 *B. subtilis*는 tryptic soy agar (TSA; BD, Franklin Lakes, USA), *L. brevis*는 de man, rogosa and sharpe agar (MB cell, Seoul, Korea), *S. cerevisiae*는 yeast malt agar (YM agar; MB cell, Seoul, Korea), *C. militaris*는 mushroom complete medium agar (MCM agar; MB cell, Seoul, Korea) 배지에 각각 계대한다음 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 사용하였다.

흰점박이꽃무지 유충 발효를 위해 10%(w/w)의 *B. subtilis*, *L. brevis*, *S. cerevisiae*, *C. militaris* 배양액을 흰점박이꽃무지 유충 분말에 접종한 다음 밀봉하여 30°C에서 5일 동안 배양하였다.

### 흰점박이꽃무지 유충 추출물 제조

추출물을 제조하기 위해 80% 에탄올(1:4=v/v)에 흰점박이꽃무지 유충을 침지한 후 상온에서 3회 반복 추출하였고, 추출물은 Watman filter paper (No. 2)로 여과한 다음 회전감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 감압농축하였다. 흰점박이꽃무지 유충

추출물(PLE)과 *B. subtilis*로 발효한 흰점박이꽃무지 유충 조추출물(BPLE), *L. brevis*로 발효한 흰점박이꽃무지 유충 조추출물(LPLE), *S. cerevisiae*로 발효한 흰점박이꽃무지 유충 조추출물(SPLE), *C. militaris*로 발효한 흰점박이꽃무지 유충 조추출물(CPLE)의 수율은 각각 22.6%(w/v), 33.5%(w/v), 33.9%(w/v), 28.3%(w/v)와 24.7% (w/v)였다.

#### 총 폴리페놀 함량 측정

추출물의 총 폴리페놀 함량은 Singleton 등[35]의 방법에 따라 항산화 물질에 의해 Folin-Ciocalteu reagent가 환원되어 몰리브덴이 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 측정하였으며, gallic acid (Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA)를 표준물질로 사용하였다.

추출물 100  $\mu$ l에 2% sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 용액 2 ml를 첨가한 후 3분 동안 반응시킨 다음 50% Folin-Ciocalteu reagent 100  $\mu$ 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[40]의 방법에 따라 colorimetric assay법으로 측정하였으며, quercetin (Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA)을 표준물질로 사용하였다.

추출물 1 ml에 증류수 4 ml를 첨가한 후 5분 동안 반응시킨 다음 5% sodium nitrate ( $\text{NaNO}_2$ ) 용액 0.3 ml과 10% aluminium nitrate ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) 용액 3 ml를 첨가하여 6분 동안 반응시켰다. 이 반응액에 1 M sodium hydroxide (NaOH) 용액 2 ml를 첨가한 다음 증류수로 반응액의 양을 10 ml로 정량하였다. 반응액의 흡광도는 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를 이용하여 510 nm에서 측정하였다.

#### DPPH 라디칼소거 활성

추출물의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois 등[4]의 방법에 따라 짙은 보라색을 띠는 안정한 라디칼인 DPPH가 항산화 물질의 전자공여능에 의해 수소 혹은 전자를 받아 탈색되는 원리를 이용하여 측정하는 다음 시료첨가구와 대조구의 흡광도 비로 확인하였으며, ascorbic acid (Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA)를 양성 대조구로 사용하였다.

추출물 50  $\mu$ l에 0.15 mM DPPH (Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA)를 200  $\mu$ l 첨가한 다음 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 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[29]의 방법에  $\text{Fe}^{3+}$ 이온을  $\text{Fe}^{2+}$ 로 환원시키는 능력을 측정하는 후 시료첨가구와 대조구의 흡광도 비로 확인하였다.

추출물 1 ml에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) 2.5 ml과 1% potassium ferricyanide 2.5 ml를 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 혼합하였고, 혼합액의 흡광도는 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를 이용하여 700 nm에서 측정하였다.

#### Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

추출물의 peroxy 라디칼 소거능을 나타내는 oxygen radical absorbance capacity (ORAC)는 Cao 등[5]의 방법에 따라 peroxy 라디칼의 생성과 소멸에 의한 fluorescent 감소율을 측정하여 확인하였으며, 표준물질은 trolox (Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA)를 사용하였다.

추출물 10  $\mu$ l에 300 mM 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH; Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA) 용액 20  $\mu$ l, 250 nM fluorescein (Sigma Aldrich Co., St. Louise, USA) 용액 2.7 ml를 첨가한 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 추출물의 세포독성

추출물의 세포독성은 세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase가 수용성인 tetrazolium salt WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulphonate; Biovision, USA)와 반응하여 붉은색의 formazan으로 변하는 원리를 이용하여 확인하였으며[12], 0.04% adenosine을 양성 대조구로 사용하였다.

추출물의 세포독성을 확인하기 위해 사용된 세포주는 RAW 264.7으로 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB 10092)에서 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, Rockville, MD, USA) 배지에서 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건으로 3일 동안 배양하였고, RAW 264.7 세포 배양액에 0-2.0 mg/ml 농도의 추출물을 처리한 다음 24시간 동안 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건으로 배양하였다. 추출물이 처리된 RAW 264.7 세포 배양액에 tetrazolium salt WST-1 용액을 첨가한 다음 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 분광광도계(Softmax M5, Molecular devices, USA)를

이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계처리

모든 실험은 5회 이상 반복실험을 수행하였으며, SAS (Statistical analysis system, USA) program을 이용하여 평균 값과 표준오차를 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 미생물 발효가 흰점박이꽃무지 유충 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량에 미치는 영향

폴리페놀 화합물은 수산기 (-OH)기를 가지고 있어서 자유라디칼과 결합하여 자유라디칼을 제거할 수 있기 때문에 항산화 활성을 확인하는 간접 지표로 활용되고 있으며, 항산화, 항암, 항균 등의 다양한 생리활성을 나타낸다 [31, 33]. 또한 곤충은 외표피층에 지질체에서 합성된 폴리페놀이 다량 함유된 다가 페놀층을 가지고 있어서 생물자원 중 항산화 활성이 높은 생물자원으로 알려져 있다[8]. 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 총 폴리페놀 함량은 각각 58.07±0.67 mg GAEs/extract g, 83.33±0.98 mg GAEs/extract g, 79.21±1.32 mg GAEs/extract g, 61.02±0.87 mg GAEs/extract g과 57.90±1.02 mg GAEs/extract g으로 PLE에 비해 미생물 발효산물인 BPLE와 LPLE의 폴리페놀 함량이 더 높게 나타났기 때문에(Fig. 1), 미생물 발효

에 의해 항산화 물질인 폴리페놀이 증가한 것으로 판단되며, 효모나 진균류보다는 *Bacillus* 속 균주가 흰점박이꽃무지 유충 발효에 적합한 것으로 판단된다. Sim 등[34]도 곰팡이 추출물에 비해 발효 곰팡이 추출물의 폴리페놀 함량이 높게 나타났다고 보고하였고, Lee 등[25]도 흰점박이꽃무지 유충 열수 추출물에 비해 *L. brevis* SM61을 이용한 발효물의 폴리페놀 함량이 높게 나타났다고 보고하였다.

플라보노이드는 C6-C3-C6이 기본 골격인 식물유래 폴리페놀 화합물로 노란색을 띠는 특징을 가지고 있으며 항산화, 항노화, 항암 등 다양한 생리활성을 나타낸다[7, 17, 21, 27]. 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 플라보노이드 함량은 각각 17.35±1.57 mg QEs/extract g과 19.49±0.95 mg QEs/extract g, 16.90±1.57 mg QEs/extract g, 18.12±0.95 mg QEs/extract g, 16.99±0.95 mg QEs/extract g으로 시료간에 유의적 차이는 없었다(Fig. 2). 이는 본 연구에 사용된 흰점박이꽃무지 유충이 큰느타리버섯 수확후배지를 식이하여 사육한 유충이기 때문에 큰느타리버섯 수확후배지 식이에 의해 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE 모두에서 플라보노이드 함량이 증가했기 때문으로 판단된다. 이전 연구에서도 일반식이 흰점박이꽃무지 유충에 비해 큰느타리버섯 수확후배지 흰점박이꽃무지 유충의 플라보노이드 함량이 높게 나타났다. Sim 등[34]도 곰팡이 추출물(0.76 mg/100 g)에 비해 발효 곰팡이 추출물(4.19 mg/100 g)의 플라보노이드 함량이 높게 나타났다고

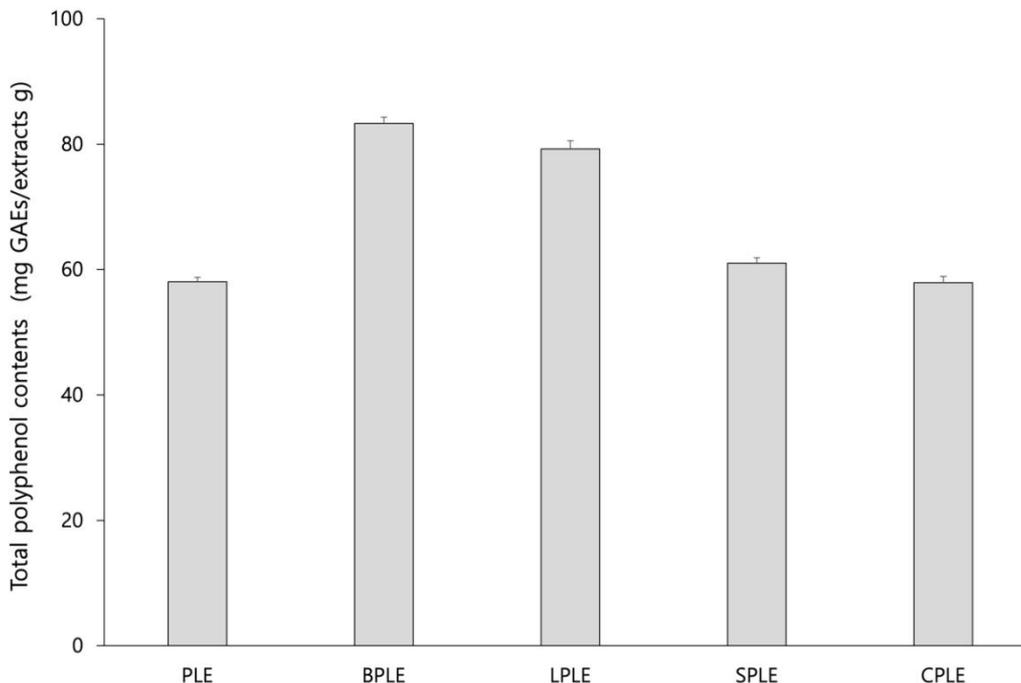


Fig. 1. Total polyphenolic contents of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *B. subtilis* (BPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *L. brevis* (LPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *S. cerevisiae* (SPLE) and *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *C. militaris* (CPLE).

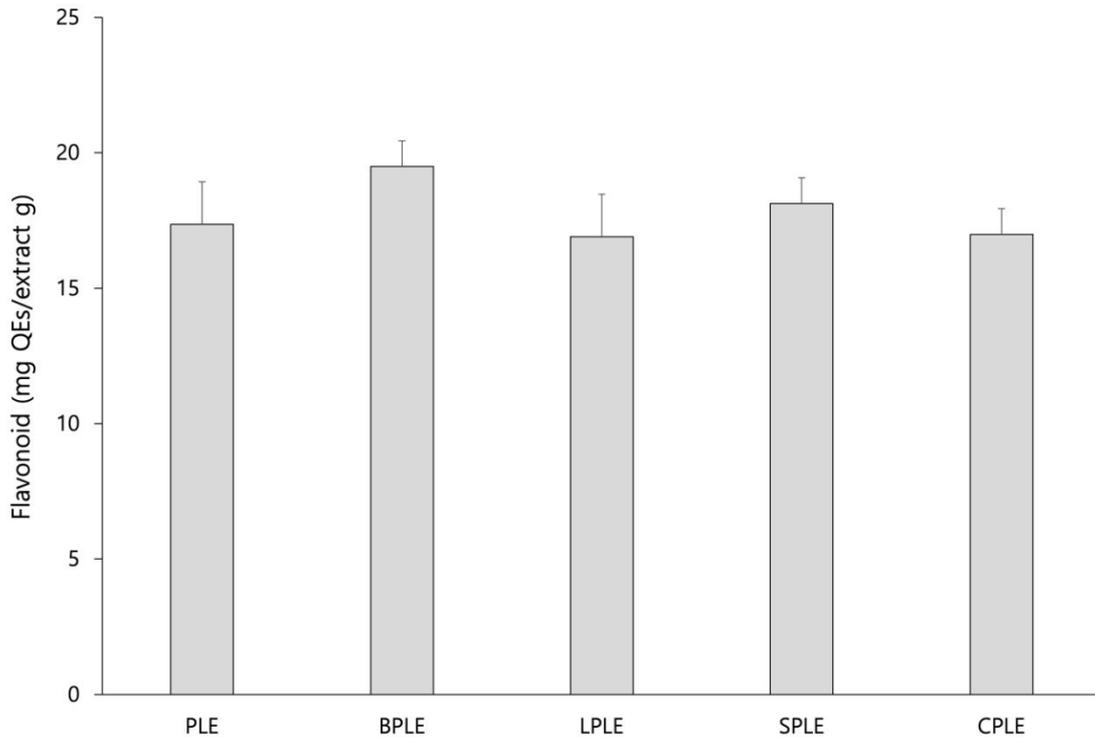


Fig. 2. Total flavonoid contents of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *B. subtilis* (BPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *L. brevis* (LPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *S. cerevisiae* (SPLE) and *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *C. militaris* (CPLE).

보고하였다. 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 Sim 등[37]의 연구결과보다 높게 나타난 이유는 본 연구에 사용된 흰점박이꽃무지 유충은 큰노타리버섯 수확후배지를 식이하여 사육한 유충이기 때문에 먹이원에 따른 영향으로 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높게 나타난 것으로 판단된다. Kim 등[20]과 Noh 등[28]도 흰점박이꽃무지 유충의 가공 전 먹이류 종류에 따라 페놀 함량에 유의적 차이가 있다고 보고하였다.

**미생물 발효가 흰점박이꽃무지 유충추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성에 미치는 영향**

추출물의 항산화 활성은 DPPH에 의한 라디칼소거 활성을 측정하여 확인하였다(Fig. 3). DPPH 라디칼은 온도, pH 등에 민감하다는 단점이 있지만, 항산화 활성을 빠르게 평가할 수 있다는 장점이 있어서 항산화 물질의 수소 원자나 전자 공여능을 평가할 때 사용되고 있다[6]. 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 0.2mg/ml의 농도에서는 시료 간에 유의적 차이가 나타나지 않았지만, 0.4 mg/ml 이상의 농도에서는 PLE에 비해 미생물 발효산물인 BPLE, LPLE의 DPPH 라디칼 소거 활성이 높게 나타났으며, SPLE와 CPLE에 비해 BPLE와 LPLE의 DPPH 라디칼 소거 활성이 높게 나타났(Fig. 3). 따라서, PLE에 비해 폴리페놀, 플

라보노이드 함량뿐만 아니라 항산화 활성 평가지표인 DPPH 라디칼 소거 활성도 세균 발효산물인 BPLE와 LPLE에서 높게 나타났기 때문에 세균 발효에 의해 항산화 활성이 증가된 것으로 판단되며, 흰점박이꽃무지 유충 발효에는 *Bacillus* 속 균주가 효과적인 것으로 판단된다. Sim 등[34]도 곰팡이 추출물에 비해 발효 곰팡이 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 높게 나타났다고 보고하였다.

**미생물 발효가 흰점박이꽃무지 유충 추출물의 환원력에 미치는 영향**

환원력은 활성 산소종에 전하를 공여하는 능력을 흡광도 값으로 나타낸 것으로 추출물의 환원력은 Fig. 4와 같다[9]. 추출물의 환원력은 추출물의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었고, PLE에 비해 미생물 발효산물인 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 환원력이 우수하였으며 0.8 mg/ml 이상의 농도에서는 PLE에 비해 BPLE와 LPLE의 환원력이 2배 이상 높게 나타났(Fig. 4). 따라서, PLE에 비해 폴리페놀, 플라보노이드 함량뿐만 아니라 항산화 활성 평가지표인 DPPH 라디칼 소거 활성과 환원력도 발효산물인 BPLE와 LPLE에서 높게 나타났기 때문에 미생물 발효에 의해 항산화 활성이 증가된 것으로 판단되며, 흰점박이꽃무지 유충 발효에는 *Bacillus* 속 균주가 효과적인 것으로 판단된다.

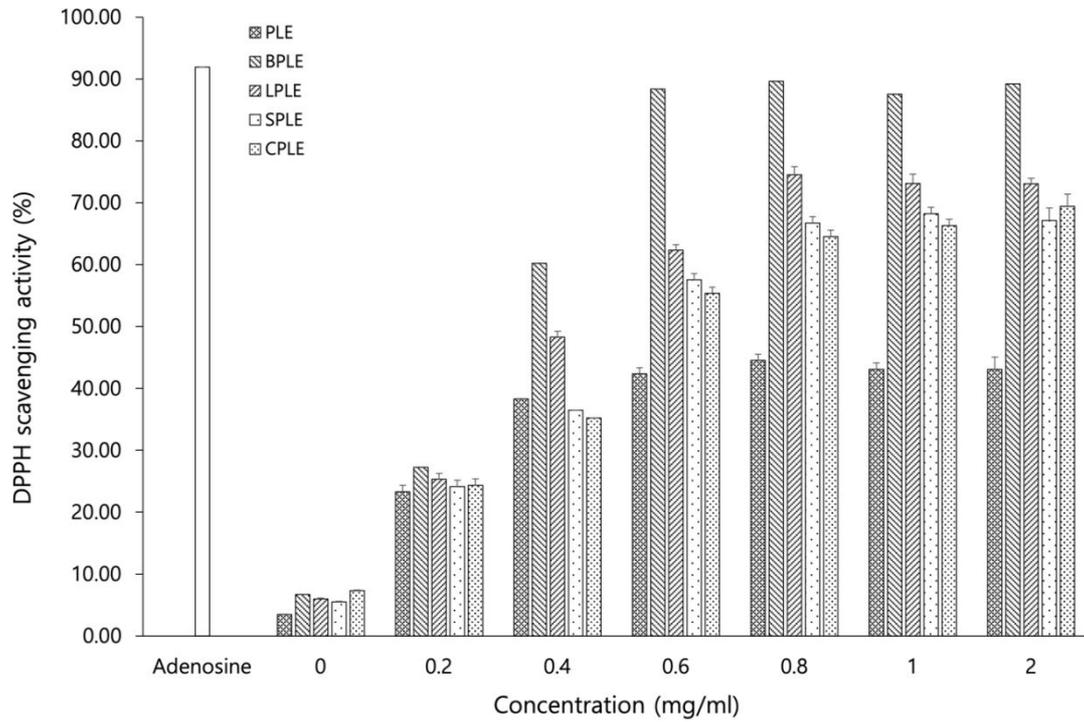


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *B. subtilis* (BPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *L. brevis* (LPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *S. cerevisiae* (SPLE) and *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *C. militaris* (CPLE).

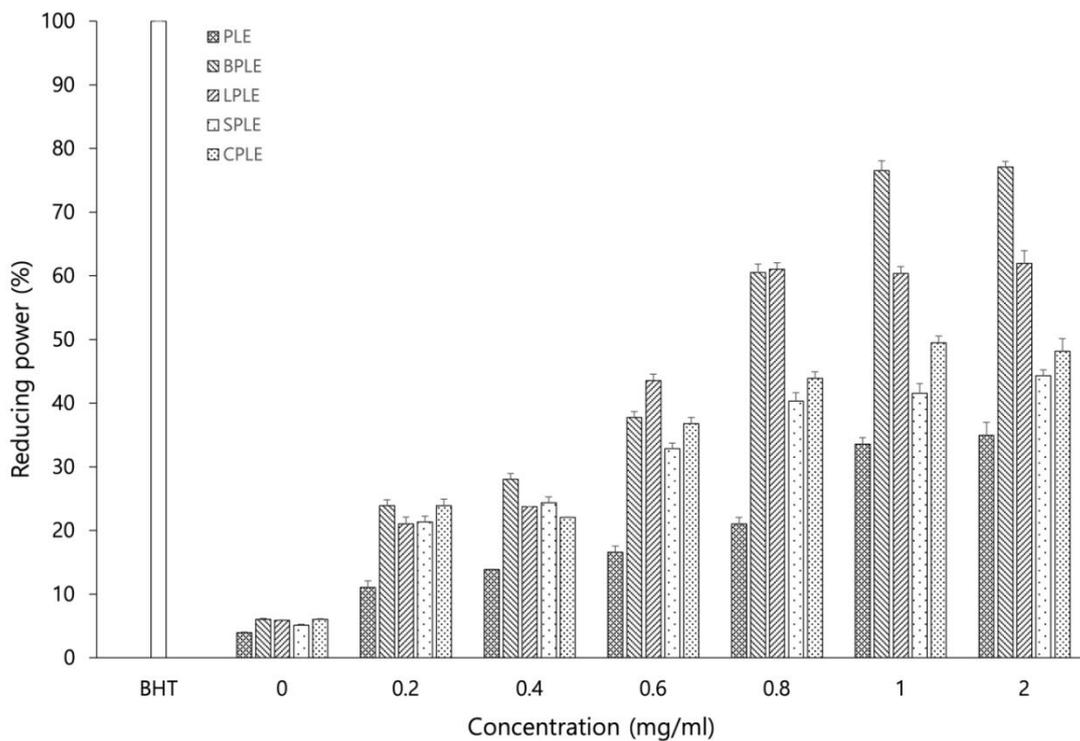


Fig. 4. Reducing power of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *B. subtilis* (BPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *L. brevis* (LPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *S. cerevisiae* (SPLE) and *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *C. militaris* (CPLE).

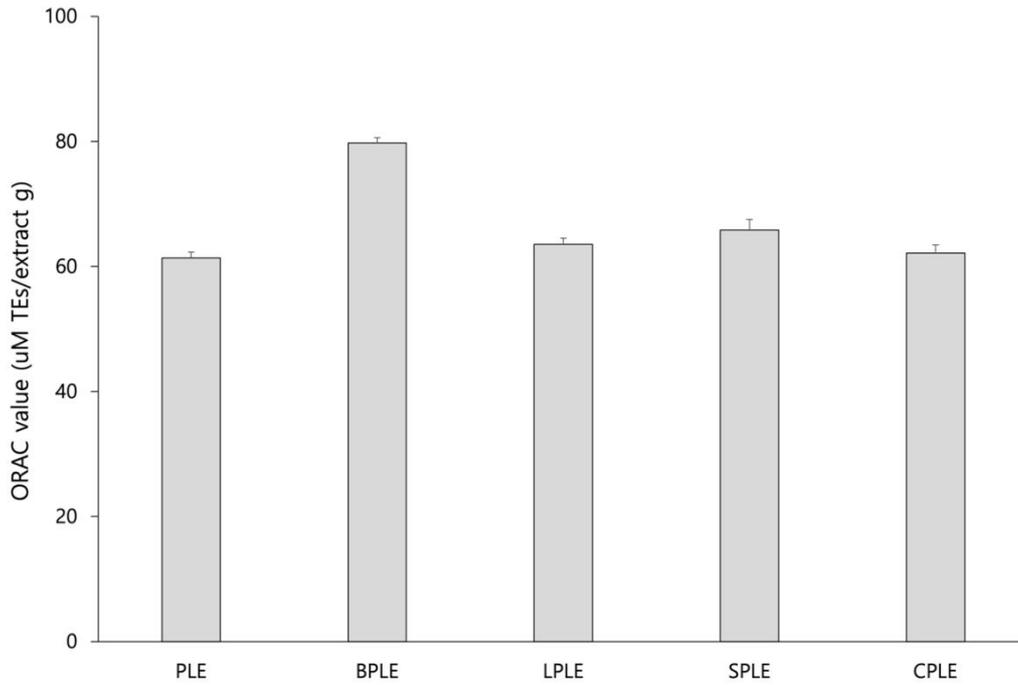


Fig. 5. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *B. subtilis* (BPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *L. brevis* (LPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *S. cerevisiae* (SPLE) and *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *C. militaris* (CPLE).

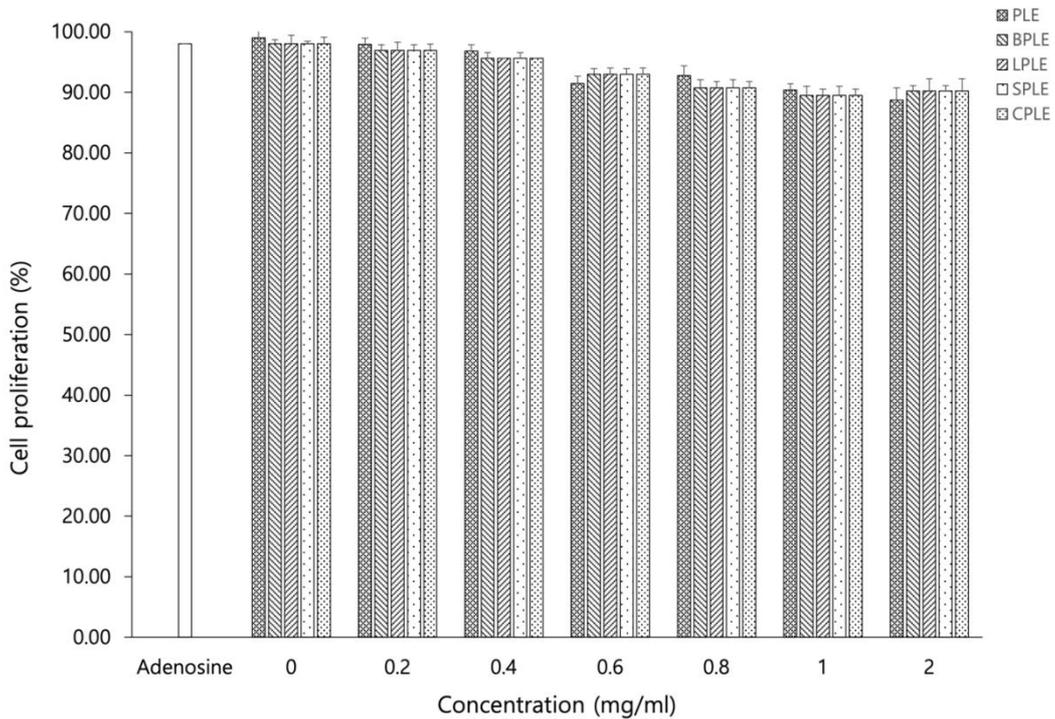


Fig. 6. Effects of *P. brevitarsis* larvae extracts (PLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *B. subtilis* (BPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *L. brevis* (LPLE), *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *S. cerevisiae* (SPLE) and *P. brevitarsis* larvae extracts fermented by *C. militaris* (CPLE) 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 extracts. The cell proliferation was determined using WST-1 assay.

### 미생물 발효가 흰점박이꽃무지 유충 추출물의 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)에 미치는 영향

ORAC 지수는 수소전자의 전달이론을 바탕으로 제안된 항산화 활성 평가 방법으로 친수성 및 소수성 성분 모두에 반응하기 때문에 응용범위가 넓다는 장점을 가지고 있다[21]. 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 ORAC 지수는 각각  $61.34 \pm 0.97$   $\mu\text{M TEs/extract g}$ 과  $79.77 \pm 0.82$   $\mu\text{M TEs/extract g}$ ,  $63.52 \pm 0.99$   $\mu\text{M TEs/extract g}$ ,  $65.82 \pm 1.72$   $\mu\text{M TEs/extract g}$ ,  $62.13 \pm 1.32$   $\mu\text{M TEs/extract g}$ 으로 PLE에 비해 발효산물인 BPLE의 ORAC 지수가 높게 나타났다(Fig. 5). Kim 등[20]의 연구에서도 큰느타리버섯 수확 후배지를 식이한 흰점박이꽃무지 추출물의 ORAC 지수가 참나무톱밥을 식이한 흰점박이꽃무지보다 높았다고 보고하였다. 이상의 결과를 종합하면, PLE에 비해 발효산물인 BPLE와 LPLE의 폴리페놀 함량 및 항산화 활성 평가 지표인 DPPH 라디칼 소거 활성과 환원력, ORAC 지수가 모두 높게 나타났기 때문에 흰점박이꽃무지 유충의 항산화 활성은 미생물 발효에 의해 증가된 것으로 판단되며, 흰점박이꽃무지 유충 발효에는 *Bacillus* 속 균주가 효과적 인 것으로 판단된다.

### RAW 264.7 세포에 대한 흰점박이꽃무지 유충추출물의 세포독성

RAW 264.7 세포에 대한 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 세포 독성은 RAW 264.7 세포에 추출물을 0.2-2 mg/ml의 농도로 처리한 다음 WST-1 assay로 확인하였다. 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE을 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, RAW 264.7 세포는 90% 이상의 생존율을 나타내었으므로 RAW 264.7 세포에 대해 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE는 모두 독성을 나타내지 않는 것으로 판단된다(Fig. 6). Lee 등[25]과 Kim 등[20]의 연구에서도 흰점박이꽃무지 유충 추출물은 93-100% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 이상의 결과를 종합해보면, 큰느타리버섯 수확후배지를 식이한 흰점박이꽃무지 유충을 미생물로 발효시키면 추출물의 항산화 물질 및 항산화 활성이 증가되기 때문에 세균을 이용한 발효법은 흰점박이꽃무지 유충의 식의약품 소재화에 필요한 전처리 과정이라고 생각되며, *Bacillus* 속 균주가 흰점박이꽃무지 유충 발효에 적합한 균주로 판단된다.

### The Conflict of Interest Statement

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

### References

- Ahn, H. Y., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2012. Biological activity and chemical characteristics of fermented *Acanthopanax senticosus* by mold. *J. Life Sci.* **22**, 1704-1711.
- Aitken, R. J., Buckingham, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 com-

- pounds and antioxidant activities of the 70% ethanol extracts from brown and milled rice by cultivar. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 467-473.
18. Kim, H. G. and Kang, K. H. 2005. Bionomical characteristic of *Protaetia brevitarsis*. *Kor. J. Appl. Entomol.* **44**, 139-144.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Kim, S. C., Kwon, H. S., Kim, C. H., Kim, H. S., Lee, C. Y. and Cho, S. J. 2016. Comparison of antioxidant activities of pileus and stipe from white beech mushrooms (*Hypsizygus marmoreus*). *J. Life Sci.* **26**, 928-935.
  22. Kim, T. K., Yong, H. I., Lee, J. H., Cha, J. Y., Kang, M. C. and Jung, S. 2021. Development of new technology for functional materials for edoible insects as alternative food. **5**, 31-43
  23. 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.
  24. 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.
  25. 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.
  26. 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.
  27. Middleton, E. and Kandaswami, C. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.* **48**, 115-119.
  28. 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.
  29. 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.
  30. Park, J. Y., Koo, B., Kim, Y. S. and Park, K. 2023. Antioxidant effects of *Hermetia illucens* larvae extracts using different extraction temperatures and solvents. *J. Env. Sci. Inter.* **32**, 221-232.
  31. Park, M. J. and Cho, S. J. 2022. Antioxidant activities of *Protaetia brevitarsis* larvae fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Life Sci.* **32**, 890-898.
  32. Park, J. W., Lee, C. H. Jeong, C. Y., Kang, S. K., Ju, W. T., Kim, S. W., Kim, N. S., Kweon, H. Y. and Kim, K. Y. 2021. Comparison of antioxidant activity according to silkworm cultivars. *J. Life Sci.* **31**, 1010-1018.
  33. Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends plant Sci.* **2**, 152-159.
  34. 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.
  35. Singleton, V. L. 1981. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.* **27**, 149-242.
  36. Srivastava, S. K., Badu, N. and Pandey, H. 2009. Traditional insect bioprospecting-as human food and medicine. *Indian J. Tradit. Knowl.* **8**, 485-494.
  37. 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.
  38. Vyas, U. and Ranganathan, N. 2012. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res. Pract.* **1012**, 872716.
  39. 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.
  40. 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 : 미생물 발효가 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 유충의 항산화 활성에 미치는 영향

김한비 · 김혜수 · 조수정\*

(경상국립대학교 제약공학과)

본 연구에서는 미생물 발효가 큰느타리버섯 수확후배지를 식이한 흰점박이꽃무지 유충의 항산화 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 흰점박이꽃무지 유충을 *B. subtilis*, *L. brevis*, *S. cerevisiae*, *C. militaris* 으로 발효한 다음 흰점박이꽃무지 유충 추출물(PLE)과 발효 흰점박이꽃무지 유충 추출물(BPLE, LPLE, SPLE, CPLE)의 항산화 활성을 비교하였다. 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 총 폴리페놀 함량은 각각  $58.07 \pm 0.67$  mg GAEs/extract g,  $83.33 \pm 0.98$  mg GAEs/extract g,  $79.21 \pm 1.32$  mg GAEs/extract g,  $61.02 \pm 0.87$  mg GAEs/extract g과  $57.90 \pm 1.02$  mg GAEs/extract g이었고, 플라보노이드 함량은 각각  $17.35 \pm 1.57$  mg QEs/extract g과  $19.49 \pm 0.95$  mg QEs/extract g,  $16.90 \pm 1.57$  mg QEs/extract g,  $18.12 \pm 0.95$  mg QEs/extract g,  $16.99 \pm 0.95$  mg QEs/extract g이었다. 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 DPPH에 의한 라디칼소거 활성은 0.2 mg/ml의 농도에서는 시료 간에 유의적 차이를 나타나지 않았지만, 0.4 mg/ml 이상의 농도에서는 추출물 PLE에 비해 BPLE와 LPLE의 DPPH 라디칼 소거능이 우수하였다. 추출물 환원력도 추출물 PLE에 비해 BPLE와 LPLE이 우수하였으며 0.8 mg/ml 이상의 농도에서는 PLE에 비해 BPLE와 LPLE의 환원력이 2배 이상 높게 나타났다. 추출물 PLE와 BPLE, LPLE, SPLE, CPLE의 ORAC 지수는 각각  $61.34 \pm 0.97$  uM TEs/extract g과  $79.77 \pm 0.82$  uM TEs/extract g,  $63.52 \pm 0.99$  uM TEs/extract g,  $65.82 \pm 1.72$  uM TEs/extract g,  $62.13 \pm 1.32$  uM TEs/extract g로 추출물 PLE에 비해 BPLE의 ORAC 지수가 높게 나타났고, RAW 264.7 세포에 대한 추출물의 세포독성을 확인한 결과 추출물 모두 90% 이상의 세포 생존율을 나타내므로 세포 독성을 나타내지 않는 것으로 판단된다.