pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 5, pp. 369~374 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.5.369

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

*Lactobacillus brevis*를 활용한 흰점박이꽃무지 유충과 산양삼의 발효물에 대한 특성 연구

이영덕*
서원대학교 식품공학과

Properties of Aqueous Extract of *Protaetia Brevitarsis* Larva and Mountain Ginseng Fermented by *Lactobacillus Brevis*

Young-Duck Lee*
Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju 28674, Korea
(Received October 5, 2018/Revised October 12, 2018/Accepted October 15, 2018)

ABSTRACT - In this study, *Lactobacillus brevis* SM61 from traditional Kimchi was used for fermentation of aqueous extract of *P. brevitarsis* larva and mountain ginseng. As measured by MTT assay, aqueous extract of *P. brevitarsis* larva and fermented mixture of aqueous extract and mountain ginseng did not show specific cellular toxicity in RAW264.7 cells until a concentration of 5-1000 μg/mL. The polyphenol contents was highest in the fermented mixture of aqueous extract and mountain ginseng. DPPH radical scavenging activity was stronger in the fermented mixture of aqueous extract and mountain ginseng than the aqueous extract. Also, antibacterial activity was tested against *E. coli, L. monocytogenes* and *S. aureus*. The fermented mixture of aqueous extract and mountain ginseng showed antibacterial activity against the tested bacteria. Therefore, *L. brevis* SM61 as a starter might be used to improve functionality of *P. brevitarsis* larva.

Key words : *Protaetia brevitarsis* larva, *Lactobacillus brevis*, Fermentation, Antioxidant

최근 다양한 의료 서비스 제공, 웰빙을 위한 식생활, 여성 사회 진출 확대 및 인식 변화 등에 의한 출산율 감소, 평균 수명 증가 등으로 인해 우리나라도 고령화 시대에 도달해 있다. 이에 따라 고령인구에서 주로 발생하는 여러 만성 질환 및 퇴행성 질환 등이 점차 증가하고 있다[1]. 이러한 고령화에 의해 증가되는 다양한 질환을 예방 및 치료를 위해서는 단순히 약물에 의한 것보다는 일반 식품 또는 건강기능식품 등의 섭취를 선호하고 있으며, 이에 따라 점차 다양한 곤충, 동물, 식물, 해조류 및 미생물 등의 소재를 활용한 식품들에 대한 관심이 증대되고 있다. 현재 건강식품 또는 건강기능성식품 등의 개발을 위한 다양한 식품 소재들이 사용되고 있으며, 관련된 제품 군들도 다양하게 개발 및 판매되고 있다. 하지만, 곤충 관련된 소재를 활용한 식품은 아직까지 연구 및 개발이 매우 미비한 수준이며, 제품화 및 생산에 있어서도 매우 제한적으로 이루어져 있다. 현재 국외에서는 식용 곤충을 식량난 해결을 위한 해결책으로 제시되고 있으며[2], 새로운 식품 시장의 블루 오션으로 다수의 업체에서 사업을 진행 중에 있다. 또한, 환경 측면에서도 같은 단백질을 얻는다고 가정했을 때 온실가스 배출량은 식용곤충의 경우 축산업의 10분의 1에 불과하여, 저 이산화탄소 배출량으로 인해 각광을 받고 있다[3,4]. 세계 곤충시장의 규모는 2007년 기준 약 11조원이며, 2020년에는 약 38조원으로 증가할 것으로 예측하고 있으며[5,6], 국내 시장 역시 2011년에 약 1680억원에서 2020년에는 7000억원까지 정부 주도로 육성 목표를 제시하고 있다. 국내에서는 2014년에 갈색거저리, 흰점박이꽃무지 유충, 2015년에는 장수풍뎅이 애벌레, 귀뚜라미에 대해 식품의약품안전처로부터 한시적 식용원료로 허가되었다[7,8]. 이 중 흰점박이꽃무지는 딱정벌레목 꽃무지과로 분류되는 완전변태곤충으로 알려져 있으며, 유충은 미생물에 의해 발효된 참나무톱밥과 같은 부엽토 속에서 서식하여 10월 하순까지 3령 유충으로 변태 후 월동에 들어간다. 흰점박이꽃무지 유충은 굼벵이로 불리고 있으며, 한방 치료제로 민간에서 많이 활용되어 왔다[9]. 현재까지

*Correspondence to: Young-Duck Lee, Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju 28674, Korea
Tel: 82-43-299-8472, Fax: 82-43-299-8470
E-mail: ydlee@seowon.ac.kr

국내에서 연구된 흰점박이꽃무지 유충에 대한 연구는 주로 유충의 산란 또는 생육에 대한 연구와 흰점박이꽃무지 유충 자체가 갖는 항암 효과 및 세포 손상 등에 대한 연구가 주를 이루고 있다[10]. 일부 식품 소재화를 위한 연구도 진행되고 있으나 활발하게 진행되고 있지는 못하고 있다. 특히, 국내 시장은 식용 곤충을 활용한 식품의 종류가 매우 적으며, 아직까지 초기 단계이기 때문에 식용 곤충 식품 또는 소재로 활용하여 다양한 기능성을 보유하는 건강식품을 개발한다면 국내에서도 신사업으로 접근이 좋을 것으로 판단된다. 이에 따라 흰점박이꽃무지 유충 등을 활용하여 식용 곤충에 대한 식품 소재화 및 기능성 강화에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 특히, 건강 식품으로 개발을 위해 유산균 등을 이용한 발효를 통해 기능성 강화는 기존 국내외에서 연구와 제품화가 미비한 상황이다. 유산균은 과거부터 현재까지 오랜 시간 동안 식품 발효에 사용되어 왔으며, 발효 동안 생산되는 다양한 영양물질, 향기 성분, 항균 물질 등 식품의 풍미와 제품 수명에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[11,12]. 그리고 probiotics로서 사람의 장내에 서식하면서 장내 균총 개선, 면역 조절 작용, 콜레스테롤 저하, 병원성 세균들의 생육 억제, 유당 불내증 개선 등의 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[13,14]. 따라서, 본 연구에서는 흰점박이꽃무지 유충의 열수 추출물에 대해 신규 유산균을 이용하여 산양삼 분말과 혼합하여 발효물을 제조하고, 이에 대한 항산화능, 항균 활성 및 세포 독성에 대한 특성을 분석하고자 하였다.

Materials and Methods

흰점박이꽃무지 열수 추출물 제조

흰점박이꽃무지 유충을 6일 동안 절식시킨 이후 건조한 시료 100 g을 homogenizer로 마쇄한 다음 추출 용매로 물을 사용하여 1000 mL 첨가하여, 상온에서 2시간 동안 교반, 침출시켜 추출한 후 여과하였다. 그리고, 추출된 여액을 회전증발농축기(N-1001V-WD, EYELA, Tokyo, Japan)로 60°C 수욕 상에서 감압 농축하고 농축액을 동결 건조하여 열수 추출물로 이용하였다. 또한, 산양삼 분말(농업회사법인 (주)우리두, 강원)은 시판중인 제품을 구매하여 사용하였다.

유산균 분리 및 염기서열 분석을 통한 동정

유산균의 배양은 유산균 분리를 위해 김치 시료 25 g을 225 mL의 0.1% peptone water에 혼합 하고, stomacher를 이용하여 균질화한 후 10진 희석을 하여 0.05% L-cystein (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 만든 Lactobacilli MRS broth 또는 MRS agar (Difco Laboratory, Detroit, MI, US)에서 37°C, 24~48 시간 혐기적으로 배양하였다. 그리고 배양된 집락들 중 형태학적으로 상이한 것을 선택하여 MRS agar에 평판 획선하여 배양하여 순수 분리하였다. 분리된 균주들을 대상으로 β-glucosidase 활성을 확인하기 위해 esculin agar에 각각 접종하고 esculin을 가수분해하여 배지를 흑갈색으로 변색시키는 세균을 β-glucosidase 생성 균주를 분리하였다.

선별된 균주를 대상으로 16s rRNA 서열분석을 수행하였다. 서열 분석을 위해 분리된 젖산균을 MRS broth에 배양하고 배양액 1 mL를 취해 원심 분리한 후 0.8% 멸균생리식염수로 수세하였다. 그리고 genomic DNA kit (Bioneer, Daejon, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하여 PCR을 위한 template DNA로 이용하였으며, 세균의 16s rRNA에 대한 universal primer인 785F (GGATTAGATACCCTGGTA)와 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT)을 사용하였다. PCR 수행 후 전기영동을 통해 증폭산물을 확인하고 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였다. 염기서열은 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Biosystems, Carlsbad, CA, USA)와 ABI 3700 sequencer (Biosystems, Carlsbad, CA, USA)에 의해 수행하였다. 그리고 계통학적 분석은 NCBI에서 제공하는 유산균 표준 균주의 16s rRNA 염기서열과 비교하여 염기서열간의 유전적 거리를 EMBL-EBI에서 제공하는 Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)를 사용하여 phylogenetic tree를 확인하였다.

분리된 유산균을 이용한 발효

흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 산양삼의 혼합 분말을 이용하여 분리된 유산균을 사용하여 발효를 수행하였다. 5%의 흰점박이꽃무지 유충의 열수 추출물과 1%의 산양삼 분말을 혼합한 후 0.2 μm syringe filter (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하여 제균하였고, 전배양된 유산균 5%를 혼합액에 접종한 후 48시간 동안 발효를 수행한 후 발효 산물을 8000 g에서 10분 동안 원심분리하고 상등액을 syringe filter를 이용하여 제균하여 발효물을 제조하였다.

세포 독성 측정

실험에 이용된 세포주로는 RAW 264.7 cell를 사용하였으며, 세포배양에 필요한 배지로 Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, NY, USA)을 사용하였고 그 밖의 세포배양에 필요한 시약으로 inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco), 1% penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA (Gibco)를 사용하였다. 실험에 사용한 배지는 DMEM 배지에 FBS 10% 첨가하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였다. 시료의 세포독성을 평가하기 위해 3-(4,5-dimethythiazo-2-ly)-2,5-diphenyl-tetra-zolium-bromide (MTT, Sigma-aldrich)를 사용하여 세포생존율을

측정하였다. RAW 264.7 cell 1×10^4 cells/well를 96 well plate에 접종하고 20시간 배양 후, 10 μg/mL의 LPS와 샘플을 농도 별로 첨가하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 2 mg/mL 농도의 MTT 시약을 첨가하여 2시간 재 배양하고 상층액을 제거한 다음 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 UV spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

폴리페놀 함량과 항산화 효과

폴리페놀 화합물의 측정은 Folin-Denis의 방법에 의거하여 측정하였다[15]. 추출시료 1 mL를 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 0.5 mL 1N folin-ciocalteu reagent (Sigma-aldrich)를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, Na_2CO_3 1 mL를 가한 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tannic acid를 적정 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 폴리페놀 함량을 측정하였다. 항산화 효과는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 라디칼 소거활성은 Blois법을 준하여 측정하였다[16]. 각 시료 0.5 mL에 60 μM DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, DPPH 표준 곡선을 위한 시료는 ascorbic acid (Sigma-aldrich)를 사용하였고 표준 곡선으로부터 항산화능을 분석하였다.

항균 활성

흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 분리된 유산균을 활용한 발효물을 *E. coli, L. monocytogenes, S. aureus*에 대한 항균 활성을 well diffusion 법을 통해 확인하였다. 각각의 세균을 도말된 배지 위에 멸균된 듀람관을 사용하여 구멍을 뚫었다. 그리고, 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 발효물을 각각 25 μL 씩 분주한 후 억제환을 확인하여 생육 저해효과를 확인하였다[17].

통계 분석

모든 실험은 3반복으로 측정하여 측정치를 평균값 ± 표준편차로 나타내었으며 실험 결과의 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다[18].

Results and Discussions

유산균 분리와 16s rRNA 염기서열 분석을 통한 동정

국내 다양한 발효 식품으로부터 유산균을 분리하기 위해 발효 식품 시료를 10진 희석하여 MRS agar에 도말하고 37°C에서 배양한 뒤 형성된 집락들을 대상으로 형태학적으로 다른 특성을 나타내는 집락을 1차 선별하였다. 그리고, 순수 분리된 집락에 대해 β-glucosidase 활성능을 확인하기 위해 esculin agar에 tooth-picking 한 후 24시간 동안 37°C에서 배양한 후 집락 주변에 검은색 환을 확인하여 β-glucosidase 생성능이 있는 균주를 2차적으로 분리하였다. 분리된 유산균들에 대해 1차적으로 생화학적인 특성 분석을 통해 동정을 하였으며, 유산균 동정을 위해 효소활성과 특성이 우수한 유산균을 대상으로 분자생물학적 방법 중에 하나인 16s rRNA 염기서열 분석을 수행하였다.

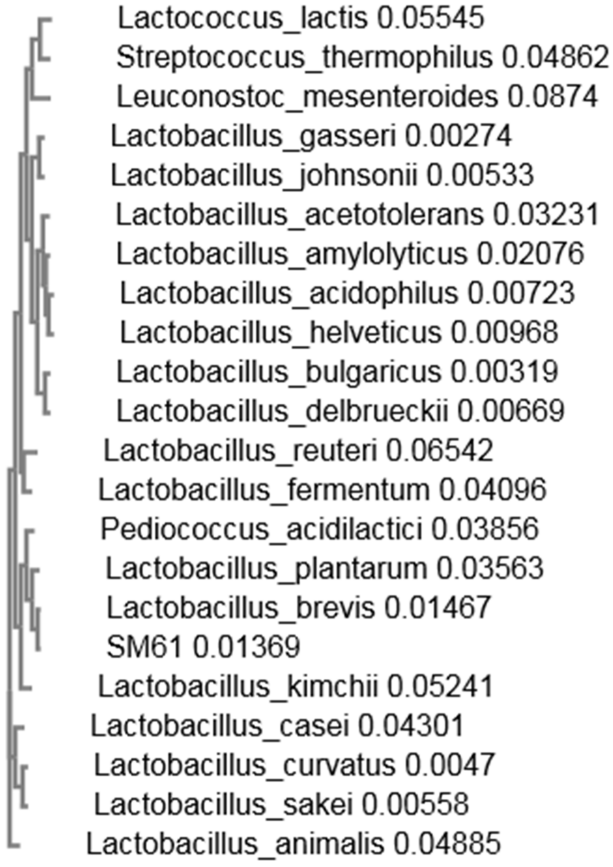

Fig. 1. Phylogenetic relation between *L. brevis* SM61 and other LAB based on 16s rRNA sequence.

16S rRNA sequence의 homologous의 분석은 European Molecular Biology Laboratory (https://www.embl.org/)의 European Nucleotide Archive의 DNA database 이용하여 비교하였다. 분리된 유산균에 대해 16s rRNA에 대한 염기서열의 유사성을 확인한 결과, *L. brevis*와 homology가 가장 높은 것으로 확인되었다. 그리고, 유산균들과의 phylogenetic tree 분석을 수행한 결과 *L. brevis*와 계통학적으로 가장 유사한 것으로 나타났다(Fig. 1). *L. brevis*는 이형 젖산발효 유산균(heterofermentative lactic acid bacteria)으로 육탄당 뿐 아니라 오탄당을 대사하여 acetate와 lactate를 생산할 수 있는 능력을 가지는 것으로 보고 되었다[19]. 식품의약품안전처가 제정한 식품 첨가물 규격에 따르면 유산균들 중 *L. brevis*는 GRAS 균주로 알려져 있으며[20], 본

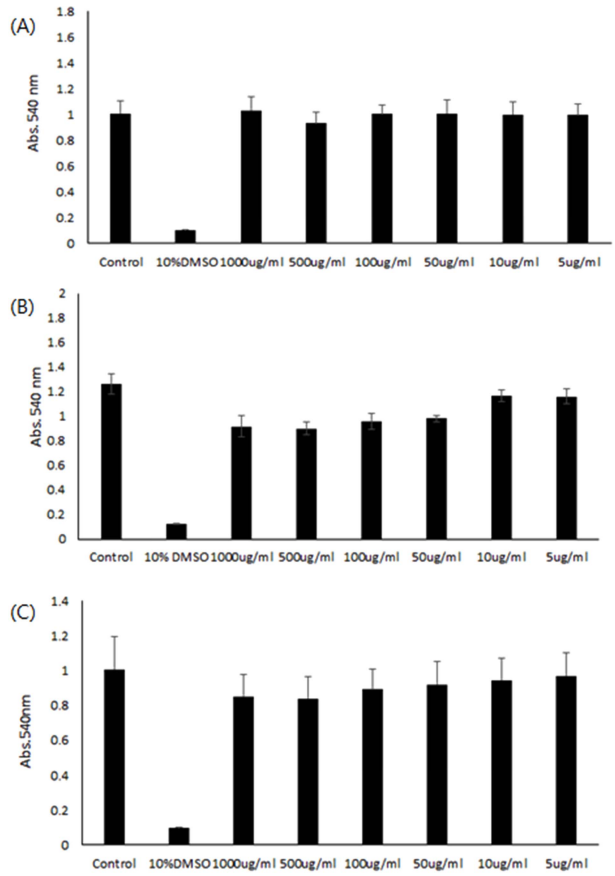

Fig. 2. Cellular toxicity by MTT assay. (A), Aqueous extract of *P. brevitarsis* larva; (B), Mountain ginseng; (C), Fermented mixture of aqueous extract and mountain ginseng.

연구에서는 신규 분리된 *L. brevis* SM61을 이용하여 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물에 대한 발효 스타터로 사용하고자 하였다.

세포독성

흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 *L. brevis* SM61을 활용한 발효물이 Raw264.7 cell에서 세포독성을 보이는지 확인하기 위하여, 5-1000 μg/mL 농도별로 세포에 처리하여 MTT assay를 수행하였다. Raw264.7 cell에 대하여 추출물의 농도 변화에 따른 세포의 생존율을 확인한 결과, 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물의 경우 농도에 따라 약 93-103%의 세포 생존율을 나타냈으며, 산양삼은 약 92-100%로 확인되었다. 그리고, *L. brevis* SM61을 활용한 발효물은 81-103% 수준으로 나타났다(Fig. 2). 일반적으로 세포 독성은 약 80% 이상에 세포 생존율을 나타낼 경우에는 독성이 없는 것으로 알려져 있다[21]. 본 실험을 통해 확인된 세포 독성에 영향을 미치지 않는 것으로 사료되며, 기존 흰점박이꽃무지 유충의 세포 독성에 영향이 없다는 결과와 유사한 것으로 확인되었다. 따라서, 추후 흰점박이

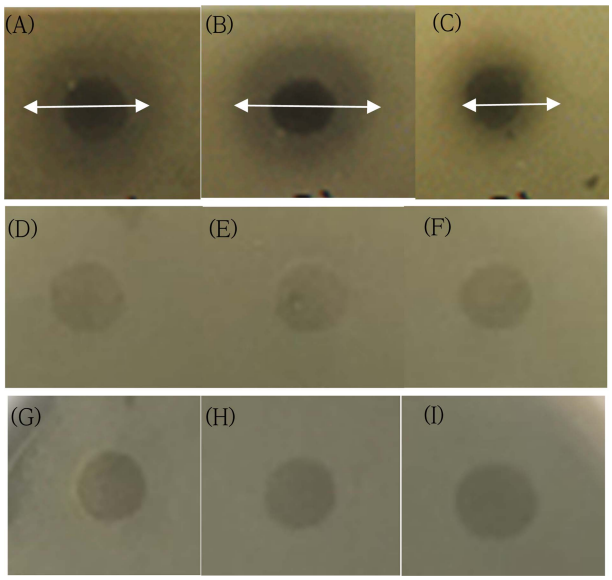

Fig. 3. Antibacterial activity by well diffusion assay. (A)-(C), Fermented mixture of aqueous extract and mountain ginseng; (D)-(F), Aqueous extract of *P. brevitarsis* larva; (H)-(I), Mountain ginseng. (A), (D), and (G), *E. coli* JM109; (B), (E), and (H), *L. monocytogenes* KCTC 3569; (C), (F), and (I), *S. aureus* KCTC3881.

꽃무지 유충 열수추출물의 식품의 소재화에 적용이 가능할 것으로 판단된다.

폴리페놀 함량 및 항산화 효과

폴리페놀은 다양한 식물체에 존재하는 생리활성물질로 알려져 있으며 항산화 및 항암등의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다[22]. 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물에 대한 폴리페놀 분석한 결과 약 2.79 ± 0.05 μg/mL으로 확인되었다. 그리고, 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 산양삼 혼합물을 *L. brevis* SM61을 이용하여 발효를 수행한 뒤 폴리페놀 함량을 확인한 결과, 발효 초기에는 약 1.49 ± 0.10 μg/mL, 24시간 이후에는 3.98 ± 0.08 μg/mL, 48시간 이후에는 5.09 ± 0.13 μg/mL 수준으로 발효가 진행됨에 따라 폴리페놀 함량이 증가되는 것으로 나타났다. 폴리페놀 함량은 일반적으로 항산화 연구에 폭넓게 이용되는 방법으로, 천연에 존재하는 주요한 폴리페놀 화합물들은 radical 소거능과 강력한 항산화능을 포함한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다[20]. 본 연구에서 폴리페놀 함량을 분석한 결과 *L. brevis* SM61을 이용한 발효물의 폴리페놀 함량이 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물에 비해 높아지는 것으로 확인되어, 발효물의 항산화능이 높을 것으로 예측되었다. 또한, 각각의 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 발효물의 항산화 효과 평가하기 위해 DPPH radical에 대한 전자공여능을 ascorbic acid를 표준 물질로 하여 흡광도 값을 측정하여 확인한 결과, 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물은 약 60 ± 0.10% 수준이었으며, *L. brevis* SM61

을 이용한 발효물의 경우는 약 98 ± 0.08% 수준으로 증가되는 것으로 나타났다. Park 등[10]은 흰점박이꽃무지 함유 음료에 대해 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과 67.1-90.0% 수준으로 보고하였으며, Sung 등[23]은 에탄올 추출물이 약 80.0%의 DPPH radical 소거능이 있음을 확인하였다. 또한, Sim 등[24]은 *L. plantarum*과 *L. gasseri*를 이용하여 흰점박이꽃무지 유충을 발효한 것이 분말 보다 항산화능이 높아지는 것으로 보고하여 본 연구 결과와 유사한 것으로 확인되었다.

항균 활성

흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 *L. brevis* SM61을 활용한 발효물에 대한 *E. coli, L. monocytogenes, S. aureus* 에 대한 항균 효과를 well diffusion 법을 통해 분석한 결과, 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 산양삼 분말에서는 모두 억제환이 형성되지 않아 항균 효과가 없는 것으로 나타났다. 그러나, *L. brevis* SM61을 이용한 발효물에서는 억제환이 각각 확인되어 저해 효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 현재 흰점박이꽃무지 유충에 대한 항균 활성에 대한 연구가 미비하며, 기작 또한 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 산양삼 단독으로는 항균 효과가 나타나지 않았으나, 혼합물에 대한 유산균 발효를 통해 다양한 물질들이 분해 및 생성 되면서 새로운 항균 활성 물질이 생성된 것으로 판단된다.

국문요약

본 연구에서는 김치로부터 분리된 *L. brevis* SM61을 생화학적 특성과 16s rRNA 염기서열 분석을 통해 분리 및 동정하였으며, 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 산양삼 분말을 *L. brevis* SM61을 이용하여 48시간동안 발효를 수행하여 발효물을 제조하였다. 그리고, 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 *L. brevis* SM61을 사용한 발효물에 대해 농도에 따른 세포 독성은 없는 것으로 판단되었다. 그리고, 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물과 *L. brevis* SM61을 사용한 발효물에 대해 발효 시간에 따른 폴리페놀 함량을 분석한 결과 발효 초기에는 약 1.49 μg/mL 비해 48시간 이후 약 5.09 μg/mL 수준으로 증가하였다. 또한, 항산화능은 흰점박이꽃무지 유충 열수추출물이 약 60%였으나, *L. brevis* SM61을 이용한 발효물이 약 98%로 높아졌다. 항균 활성의 경우 *L. brevis* SM61을 이용한 발효물에서만 항균 효과가 확인되었다. 따라서, 본 연구를 통해 분리된 신규 *L. brevis* SM61을 이용한 흰점박이꽃무지 유충의 열수추출물에 대한 발효물은 식용 곤충의 기능성을 강화시킬 수 있을 것으로 판단되며, 해당 유산균을 활용하여 다양한 식용 곤충에도 적용이 가능할 것으로 사료된다.

References

1. Ahn Y.S. and Shin D.H.: Antimicrobial effects of organic acids and ethanol on several foodborne microorganism. *Korean J. Food Sci. Technol*. **31**, 1315-1323 (1999).
2. Bukkens. S.G.F.: The nutritional value of edible insects. *Ecol. Food Nutr*. **36**, 287-319 (1996).
3. Jongema, Y.: List of Edible Insects of the World. http://www.ent.wur.nl (2012).
4. Srivastava, S.K., Badu, N., Pandey, H.: Traditional insect bioprospecting-As human food and medicine. *Indian J. Traditional Knowledge.* **8**, 485-494 (2009).
5. Nakagaki, B.J. and Defoliart, G.R.: Comparison of diets for mass-rearing *Acheta domesticus* (Orthoptera, Gryllidae) as a novelty food, and comparison of food conversion efficiency with values reported for livestock. *J. Economic Entomol.* **84**, 891-896 (1991).
6. Oonincx, D.G., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M.J.W., van den Brand, H., van Loon, J.J.A., van Huis, A.: An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS One* **5**, 1-7 (2010).
7. Ministry of Food and Drug Safety.: Food Sanitation Act, revised notice (2016-18) (2016).
8. Song M.H., Han M.H. Lee S.H., Kim E.S., Park K.H., Kim W.T., Choi J.Y.: A field survey on edible insect farms in Korea. *J. Life Sci*. **27**, 702-707 (2017).
9. Kim H.G. and Kang K.H.: Bionomical characteristic of *Protaetia brevitarsis*. *Korean J. Appl. Entomol*. **44**, 139-144 (2005).
10. Park J.H., Kim S.Y., Kang M.G., Yoon M.S, Lee Y.I., Park E.J.: Antioxidant activity and safety evaluation of juice containing *Protaetia brevitarsis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 41-48 (2012).
11. Leroy, F. and De Vuyst, L.: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol*. **15**, 67-78 (2004).
12. Vyas, U. and Ranganathan, N.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol. Res. Pract*. **2012**, 1-16 (2012).
13. Jeppsson, B., Mangell, P., Thorlacius, H.: Use of probiotics as prophylaxis for postoperative infections. *Nutri*. **3**, 604-612 (2011).
14. Wallace, T.C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M.D., Gibson, G., Hentges, E., Sanders, M.E.: Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr. Rev.* **69**, 392-403 (2011).
15. Swain, T. and Hillis, W.E.: The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric*. **10**, 63-68 (1959).
16. Blois, M.S.: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**, 1199-1200 (1958).
17. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K.: Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **6**, 71-79 (2016).

18. Zimmerman, D.W.: A Note on Interpretation of the Paired-Samples t Test. *J. Educ. Behav. Stat*. **22**, 349-360 (1997).
19. de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A.: Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agri. Food Chem.* **47**, 4003-4008 (1999).
20. Heo J., Ryu M.S., Jeon S.B., Oh H.H., Kim Y.S., Jeong D.Y., Uhm T.B.: Characterization of *Lactobacillus brevis* JBE 30 as a Starter for the Brewing of Traditional Liquor. *Korean J. Microbiol.* **50**, 233-238 (2014).
21. Kim Y.J. and Son D.Y.: Inflammatory mediator regulation of the *Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated Raw264.7 mouse machrophage. *Korean J. Food Preserv.* **21**, 114-120 (2012).
22. Kim T.K., Shin H.D., Lee Y.H.: Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J. Food Sci. Technol*. **35**, 266-271 (2003).
23. Sung G.A., Kim M.H., Park S.N.: Anti-inflammatory and whitening effects of *Protaetia brevitarsis seulensis* extracts by oriental conversion methods. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*. **42**, 421-432 (2016).
24. Sim S.Y., Ahn H.Y., Seo K.I. Cho Y.S.: Physicochemical properties and biological activities of *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae fermented by several kinds of microorganisms. *J. Life Sci*. **28**, 827-834 (2018).