

갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 제조 및 항산화 활성

유미희* · 이호선* · 조혜린 · 이승욱

계명대학교 식품가공학과

Enzymatic Preparation and Antioxidant Activities of Protein Hydrolysates from *Tenebrio molitor* Larvae (Mealworm)

Mi-Hee Yu*, Hyo-Seon Lee*, Hye-Rin Cho, and Syng-Ook Lee

Department of Food Science and Technology, Keimyung University

ABSTRACT The present study was carried out to evaluate the applicability of *Tenebrio molitor* larvae (mealworm) as a health functional food material in order to contribute to the development of the domestic insect industry and health functional food industry. Protein hydrolysates were prepared from mealworm powder by enzymatic hydrolysis using five different proteases (alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, and papain), and the hydrolysates were then tested for their antioxidant activities. Based on available amino group contents and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis analyses, mealworms treated with alcalase (4,781.39 µg/mL), flavourzyme (5,429.35 µg/mL), or neutrase (3,155.55 µg/mL) for 24 h showed high degree of hydrolysis (HD) value, whereas HD values of bromelain (1,800 µg/mL) and papain-treated (1,782.61 µg/mL) mealworms were much lower. Protein hydrolysates showing high HD values were further separated into > 3 kDa and ≤ 3 kDa fractions by a centrifugal filter system and then lyophilized, and the production yields of the low molecular weight protein hydrolysates (≤ 3 kDa) by alcalase, flavourzyme, and neutrase were 42.05%, 26.27%, and 30.01%, respectively. According to the RC₅₀ values of the protein hydrolysates (≤ 3 kDa) obtained from three different antioxidant analyses, all three hydrolysates showed similar antioxidant activities. Thus, alcalase hydrolysates showing the highest production yield of low molecular weight protein hydrolysates were further tested for their inhibitory effects on peroxidation of linoleic acid by measuring thiobarbituric acid values, and the results show that peroxidation of untreated linoleic acid increased dramatically during 6 days of incubation. However, pretreatment with the hydrolysates (100~800 µg/mL) significantly inhibited linoleic acid peroxidation in a dose-dependent manner over 6 days.

Key words: mealworm, protein hydrolysates, enzymatic hydrolysates, antioxidant activities

서 론

최근 식량부족 문제를 해결하기 위한 정책으로 국제식량 농업기구(FAO)에서는 미래 식량자원으로 식용곤충의 활성화 방안을 발표하여 전 세계적으로 이에 대한 관심이 증대되고 있으며(1), 이와 발맞추어 국내에서는 농림수산식품부가 “곤충산업육성 5개년 종합계획”을 발표하여 곤충산업에 대한 지원이 이루어지고 있다. 곤충은 약 100만 종 이상 보고되어 있고 100만 종 이상이 아직 보고되지 않은 상태로 남아 있다고 예측될 정도로 지구상에서 가장 크고 다양성이 풍부한 종으로 알려져 있다(2).

갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm)는 딱정벌레

목 거저리과의 곤충으로 “갈색쌀거저리”라고도 불리며 현재 한국을 비롯한 전 세계에 분포되어 있으며, 강한 적응력과 변태기간이 짧고 쉬운 사육기술로 연중 사육이 가능하여 산업화에 용이하다(3). 갈색거저리의 영양성분은 수분이 2~4%, 조단백질이 50~53%, 조지방 27~34%, 조회분 3~5%, 조섬유 4~5%이며, 단백질 함량이 매우 높은 고단백질 소재로 2016년 식용곤충 원료로 식품공전에 등록됨으로써 이의 활용에 대한 관심이 높아지고 있다(4). 갈색거저리 유충의 경우 대두보다 필수 아미노산을 많이 함유하고 있고, 육류보다 불포화지방산 함량이 높으며, 비타민 A와 철, 식이 섬유 등이 비교적 풍부한 편으로 영양적인 장점이 많다(1, 5). 또한, 가축사육과는 달리 곤충사육에 필요한 땅을 개선할 필요가 없고, 적은 사료만으로도 간편하게 많은 양의 곤충을 사육하여 보급할 수 있으므로 경제적 부담이 적은 장점이 있다.

예로부터 곤충은 약용으로 사용해 왔으며, 그중 누에, 메뚜기, 굼벵이, 지네 등은 당뇨(6-8), 염증성 질환(9), 간질환

Received 14 November 2016; Accepted 7 March 2017

Corresponding author: Syng-Ook Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea
E-mail: synglee@kmu.ac.kr, Phone: +82-53-580-5570

*These authors contributed equally to this work.

(10) 및 동맥경화(11) 등의 만성 질환 치료에 효과적이라는 연구 결과가 보고되고 있다. 한편 국내에서 이루어진 갈색거저리에 관한 연구로는 갈색거저리 유충 추출물의 간암세포에 대한 세포 독성 효능(12), 한국산 갈색거저리로부터 분리된 항진균 단백질의 항균 효과(13) 등 갈색거저리 추출물을 이용한 연구들이 보고되어 있지만 갈색거저리 유충의 생리활성 펩타이드에 대한 연구는 부족한 실정이다. 생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리적 활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의되는데(14), 보통 3~20개의 아미노산으로 구성되어 있고 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다(15). 또한, 크기가 작아 생체 내로 쉽게 흡수될 수 있으며, 다양한 기능적 특성을 갖는 장점이 있다(16). 지금까지 연구된 생리활성 펩타이드의 효과로는 우유단백질 가수분해물의 체내 항산화 기능 향상과 가공 식품에서의 산화반응 방지(17), 달걀흰자 가수분해물의 새로운 항균 펩타이드(18) 등이 알려져 있으며, 그 외에도 항고혈압(19), 항혈전(20), 면역조절(21) 등 생리활성 펩타이드의 기능성 연구가 활발하게 진행되고 있어 단백질이 풍부한 갈색거저리 유충 단백질의 효소적 가수분해를 통한 생리활성을 갖는 펩타이드의 생산이 주목받고 있다.

따라서 본 연구에서는 다양한 효소원을 이용하여 갈색거저리 유충으로부터 생리활성 펩타이드를 함유하는 단백질 가수분해물을 제조하였으며, 그중 가수분해도가 우수한 것을 선택하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 라디칼 및 hydrogen peroxide(H₂O₂) 소거 활성과 지질과산화 억제 활성을 측정하여 분리된 단백질 가수분해물의 항산화 활성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 주 시료는 2016년 3월 18일에 농업법인회사(주)MG내츄럴(전남 담양군 무정면)에서 생산, 판매된 것으로 동결 건조된 갈색거저리 유충을 구입하여 -20°C 동결고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다. Alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain 및 papain 단백질 분해효소는 Novo사 제품을 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 가수분해도 측정을 위해 사용된 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid picrylsulfonic acid(TNBS)는 G-Biosciences Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 특별한 언급이 없는 그 밖의 분석용 시약 및 유기용매는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

갈색거저리 유충 단백질 가수분해물 제조

동결 건조된 갈색거저리 유충 분말을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 4%(w/v)의 기질용

액으로 제조한 후, 90°C에서 20분 동안 항온수조 내에서 자가 효소를 불활성화하였다. 기질 대비 단백질 가수분해효소(alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain, papain)를 각각 1%(w/w)가 되도록 첨가하여 55°C, 100 rpm에서 0~24시간 동안 가수분해 하였고, 90°C에서 20분간 가열하여 효소를 불활성화하였다. 방랭한 후 가수분해물을 13,000×g에서 20분 동안 원심분리 하여 상등액을 얻었으며, 상등액은 저분자 펩타이드의 분리를 위해서 membrane filter(Amicon Ultra-15, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)를 이용하여 2시간 동안 원심분리(5,000×g) 함으로써 최종적으로 분자량 3 kDa 이하의 단백질 가수분해물을 얻었다. 단백질 가수분해물은 동결 건조한 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

각 효소별 갈색거저리 유충의 단백질 가수분해 특성을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 이용하여 가수분해물의 단백질 패턴을 측정하였다. SDS-PAGE는 15% gel을 사용하였으며, 각 가수분해물은 3,000×g, 4°C, 10분 원심분리 후 얻은 상등액 20 μL를 gel에 loading 하여 80 V에서 약 2시간 전기영동한 다음, coomassie brilliant blue를 사용하여 염색하고 10% acetic acid가 함유된 30% 메탄올을 이용하여 탈색시켰다. 단백질 패턴의 분석은 Gel Logic 2200 PRO Imaging System(Carestream Health Inc., Rochester, NY, USA)을 이용하여 polyacrylamide gel을 스캐닝한 후 이미지로 영상화시켰다. 이때 molecular weight marker는 Bio-Rad Laboratories(Carlsbad, CA, USA)의 제품을 이용하였다.

단백질의 가수분해도 측정

TNBS 방법(G-Biosciences Co.)을 이용하여 효소제 처리 시간에 따른 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 가수분해도를 측정하였다(22). 10 mM sodium bicarbonate(pH 8.5) 990 μL와 1% TNBS 10 μL를 혼합(v/v)하여 0.01% TNBS를 제조하고, TNBS 50 μL와 시간별로 취한 반응혼합액 100 μL를 섞어 37°C에서 2시간 반응시킨 후 반응을 정지시키기 위해 10% SDS와 1 N hydrogen chloride(1 N HCl)를 첨가시켰다. 그 후 microplate spectrophotometer(Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 335 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH free 라디칼 소거 활성은 Ham 등(23)의 방법에 따라 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로 99% 메탄올을 이용하여 시료를 0, 100, 250, 500, 1,000 μg/mL로 희석하고 희석된 시료를 96 well plate에 160 μL씩 분주하였다. 다음 메탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 40 μL를 시료가

분주된 well에 분주하여 실온에 30분간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도로 측정하였다. 각각의 효소별 갈색거저리 유충 단백질가수분해물의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 Trolox를 사용하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거 활성 실험은 Re 등(24)의 방법을 변형하여 측정하였다. 최종 농도가 7 mM인 ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 각각 혼합한 후 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성시킨 다음, ABTS 용액의 농도는 사용하기 직전에 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 180 μ L에 시료 20 μ L를 가하여 1분 동안 30°C에 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 효소별 갈색거저리 유충 단백질가수분해물의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 Trolox를 사용하였다.

Hydrogen peroxide 소거 활성 측정

Hydrogen peroxide 소거 활성 측정은 Müller(25)의 방법에 따라 증류수에 농도별로 희석한 시료 20 μ L, PBS 100 μ L, 1 mM H_2O_2 20 μ L를 96-well plate에 가한 후 37°C incubator에서 5분간 반응시켰다. 이후 1.25 mM ABTS 30 μ L와 1 U/mL peroxidase 30 μ L를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 Trolox를 사용하였다.

Linoleic acid에 대한 산화방지 효과

Linoleic acid에 대한 산화 억제 효과를 확인하기 위해 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 2 mL와 2.52% linoleic acid 1 mL, absolute alcohol 1 mL, 시료 1 mL를 혼합한 후 40°C에서 100 rpm으로 진탕하며 하루 간격으로 각 시료의 linoleic acid에 대한 산화 억제 효과를 측정하였다. 20% trichloroacetic acid(TCA, w/v) 100 μ L, 0.8% thiobarbituric acid(TBA, w/v) 100 μ L와 linoleic acid 반응기질 용액 50 μ L를 잘 혼합하여 95°C 이상에서 20분 반응시킨 후, 실온에서 10분간 냉각시키고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 180 μ L의 상등액을 흡광도 532 nm에서 측정하였다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 Trolox를 사용하였다.

통계분석

모든 데이터는 최소 3번 반복하여 평균과 표준오차(mean \pm SE)로 나타내었으며, 통계분석에는 SPSS Statistics 23

(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용되었다. 또한, 그룹간의 유의성 차이 검증에는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였으며, Duncan's multiple range test 방법을 통한 사후 검증을 시행하였다. 유의확률(P -value)이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

효소별 갈색거저리 유충의 단백질 가수분해물 제조 특성

Alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain 및 papain 효소별로 갈색거저리 유충 단백질가수분해물을 제조하여 그 특성을 조사하였다. 24시간 반응시킨 각 효소별 갈색거저리 유충 단백질가수분해물의 특성을 확인하고자 SDS-PAGE를 실시하여 alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain 및 papain 효소에 대한 단백질가수분해물의 SDS-PAGE 패턴을 Fig. 1에 나타내었다. 효소별 단백질가수분해물을 비효소군과 비교한 결과, 비효소군보다 alcalase 단백질가수분해물이 10 kDa 이하로 모두 분해되어 10 kDa 이상의 단백질은 거의 나타나지 않았으며, 저분자 펩타이드가 많고 가수분해도가 우수함을 확인하였다. Neutrase와 flavourzyme 단백질가수분해물은 alcalase 단백질가수분해물보다 10 kDa 이상의 큰 분자량의 단백질가수분해물이 다수 관찰되었다. 반면, bromelain, papain 단백질가수분해물에서는 10~25 kDa 사이의 단백질 띠가 선명하여 이 분자량 크기의 펩타이드를 많이 함유한 것을 확인하였다.

TNBS assay를 이용해 각 단백질가수분해물의 가수분해도를 그 지표로 사용되는 available amino group의 농도로 측정하였다. 단백질이 가수분해되면 가수분해도에 비례하여 available amino group이 증가하므로 이는 펩타이드의 함량을 나타내는 지표가 될 수 있다. 각 효소를 이용하여

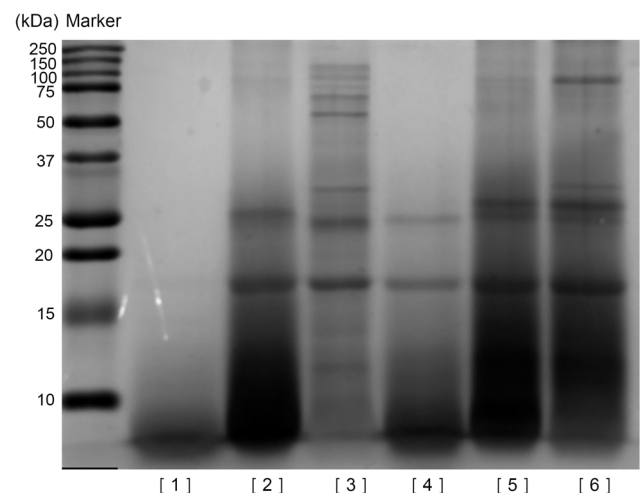


Fig. 1. Effect of five different proteases on SDS-PAGE profile of *Tenebrio molitor* larvae protein hydrolysates. SDS-PAGE patterns on 15% gel of *Tenebrio molitor* larvae hydrolysate. Lane [1], alcalase; Lane [2], bromelain; Lane [3], flavourzyme; Lane [4], neutrase; Lane [5], papain; Lane [6], no enzyme.

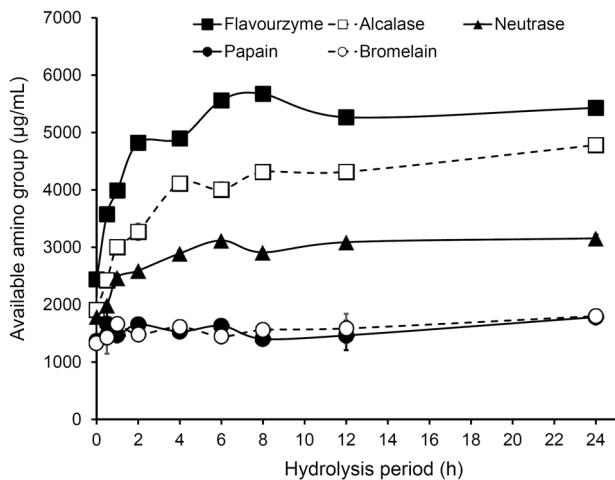


Fig. 2. Degree of hydrolysis of *Tenebrio molitor* larvae by five different proteases at 55°C. Each value is mean±SE (n≥3).

시간에 따른 단백가수분해도를 알아보기 위해 효소별 단백가수분해물의 펩타이드 함량을 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간별로 측정하였다(Fig. 2). 효소별 단백가수분해물을 이용하여 시간에 따른 분해능을 tyrosine의 함량으로 환산한 결과, 24시간 반응 후 available amino group 농도는 alcalase, flavourzyme, neutrased가 각각 4,781.38 µg/mL, 5,429.35 µg/mL, 3,155.55 µg/mL로 측정되었다. Alcalase, flavourzyme, neutrased 단백가수분해물의 경우 가수분해 시간이 경과함에 따라 available amino group 농도가 0~6시간 동안 급격히 증가하며 6시간 이후부터는 그 증가폭이 현저히 감소하였다. 하지만 bromelain, papain 단백가수분해물은 SDS-PAGE 결과와 유사하게 24시간 처리에도 불구하고 유의한 available amino group 함량의 증가를 보이지 않았다. 이를 종합해 볼 때 alcalase, flavourzyme 및 neutrased에 대한 갈색거저리 유충의 단백질 가수분해는 6~8시간이 경과하면서 가수분해가 충분히 이루어지며, 펩타이드 chain의 N-terminal을 분해하는 exo-peptidase인 flavourzyme을 처리했을 때 가장 많은 available amino group이 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

단백질 가수분해물의 경우 저분자량 펩타이드가 쉽게 체내로 흡수되고 체내 이용률도 높다는 보고(22)에 따라 가수분해가 활발히 일어났던 alcalase, flavourzyme, neutrased 가수분해물을 분자량 3 kDa 이하로 한외여과 한 후 동결 건조하여 실험에 이용하였다. 각 단백가수분해물의 저분자 펩타이드 생산 효율을 비교하기 위해 전체 기질의 고형분 함량에 대하여 3 kDa 이하로 분리한 후의 펩타이드의 무게를 측정하였으며 그 수율을 비교하였다(Table 1). Alcalase를 첨가한 단백가수분해물의 수율이 42.05%로 가장 높았으며, neutrased 30.01%, flavourzyme 26.27% 순으로 나타났다. 이상의 결과는 alcalase를 처리한 단백가수분해물이 3 kDa 이하의 저분자 펩타이드를 가장 많이 함유하고 있는 것을 의미하며, neutrased와 flavourzyme을 처리한 가수

Table 1. Yields of protein hydrolysates (≤ 3 kDa) prepared from vacuum dried *Tenebrio molitor* larvae using different proteases

Enzymes	Yields ¹⁾ of protein hydrolysates (%)
Alcalase	42.05±2.66 ^{a2)}
Flavourzyme	26.27±3.10 ^b
Neutrased	30.01±4.32 ^b

¹⁾Yields (%)=[total solid content of protein hydrolysate - total solid content of blank (without substrate)]/total substrate content × 100.

²⁾Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a,b) in the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

분해물이 alcalase 가수분해물보다 저분자 펩타이드 생산 효율이 상대적으로 떨어지는 것을 알 수 있다.

갈색거저리 유충 단백가수분해물의 활성산소종 소거 활성

DPPH 라디칼은 항산화 물질이 수소원자나 전자를 공여할 수 있는 능력을 평가할 때 사용되는 물질로서 수소 혹은 전자를 받음으로써 안정한 형태의 화합물로 전환되어 라디칼 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변한다(23). 이를 이용하여 각 효소별 단백가수분해물의 DPPH 라디칼에 대한 소거능을 측정해 Table 2에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거 활성에 대한 갈색거저리 유충 단백가수분해물의 영향을 50% 라디칼 저해율을 나타내는 RC₅₀값으로 나타낸 결과 alcalase 단백가수분해물의 RC₅₀값은 339.34 µg/mL, flavourzyme 379.35 µg/mL, neutrased 398.93 µg/mL로 나타나 alcalase 단백가수분해물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 높았다(Table 2).

ABTS 라디칼 소거 활성법은 표준물질인 Trolox의 값과 비교하여 나타낼 수 있으며, *in vivo*에서의 항산화능 측정뿐만 아니라 *in vitro*에서도 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있다(24). ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방지하면 생성되는 ABTS 라디칼은 시료 속 항산화 물질로 인해 라디칼이 소거되면 짙은 청록색의 ABTS 라디칼이 탈색되는데 이를 흡광도로 측정하는 방법이다. ABTS 라디칼 소거 활성에 대한 갈색거저리 유충 단백가수분해물의 영향을 RC₅₀값으로 나타내었다(Table 3).

Table 2. DPPH free radical scavenging activities of the hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae with different proteases

Enzymes	RC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	TEAC (mg TE/g) ²⁾
Alcalase	339.34±11.27 ^{b3)}	7.81±0.09 ^a
Flavourzyme	379.35±12.88 ^a	6.94±0.20 ^b
Neutrased	398.93±6.88 ^a	6.58±0.06 ^b
Trolox	2.65±0.34	-

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH· at 30 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a,b) in the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3. ABTS⁺ free radical scavenging activities of the hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae with different proteases

Enzymes	RC ₅₀ (μg/mL) ¹⁾	TEAC (mg TE/g) ²⁾
Alcalase	36.90±0.83 ^{b3)}	108.90±1.21 ^b
Flavourzyme	56.03±0.78 ^a	85.28±0.98 ^a
Neutrase	29.84±0.33 ^c	141.86±2.34 ^c
Trolox	5.03±0.06	—

¹⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS⁺ at 3 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a-c) in the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

Neutrase 처리를 통해 얻은 단백질 가수분해물의 RC₅₀값은 29.84 μg/mL였고, alcalase, flavourzyme 단백질 가수분해물의 ABTS 라디칼에 대한 RC₅₀값은 각각 36.90 μg/mL, 56.03 μg/mL로 나타나 neutrase 단백질 가수분해물의 ABTS 라디칼 소거 활성이 가장 높음을 확인할 수 있었다.

산소의 환원 대사물질인 hydrogen peroxide는 다양한 외부요소나 정상세포의 mitochondria와 peroxisome에서 형성되는데 DNA 및 단백질 손상을 유발하거나 불포화지방산과 같은 생체막의 구성성분을 공격하여 과산화지질을 생성함으로써 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(26,27). 본 연구에서는 peroxidase의 기질인 ABTS를 이용하여 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 H₂O₂ 소거 활성을 RC₅₀값으로 나타낸 결과를 Table 4에 나타내었다. 효소별 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물에 따른 H₂O₂ 소거능을 측정할 결과, alcalase 단백질 가수분해물의 RC₅₀값은 65.97 μg/mL였으며, flavourzyme 121.67 μg/mL 및 neutrase 70.38 μg/mL로 나타났다. 이상의 결과에서 alcalase 가수분해물은 DPPH 라디칼 소거능에서 RC₅₀값이 339.34 μg/mL로 가장 효과가 좋았으며(P<0.05), neutrase 가수분해물은 ABTS 라디칼 저해 활성에서 RC₅₀값이 29.84 μg/mL로 가장 효과가 좋았다(P<0.05). 이는 효소별 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 저해 활성은 저분자 펩타이드

Table 4. Hydrogen peroxide radical scavenging activities of the hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae with different proteases

Enzymes	RC ₅₀ (μg/mL) ¹⁾	TEAC (mg TE/g) ²⁾
Alcalase	65.97±1.51 ^{b3)}	78.43±1.90 ^c
Flavourzyme	121.67±3.30 ^a	46.87±1.62 ^a
Neutrase	70.38±1.74 ^b	68.26±1.08 ^b
Trolox	17.32±0.07	—

¹⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS⁺ at 5 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a-c) in the same column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

의 농도와 상관관계가 없다는 것을 의미하며, Yu 등(28)의 보고처럼 단백질의 가수분해 펩타이드의 항산화 활성은 항산화 활성 측정법에 따라 차이가 있고, 가수분해 효소의 기질 특이성에 따라 생성되는 아미노산 배열 및 아미노산 조성의 영향을 받는 것으로 판단된다.

Kim 등(29)의 보고에 따르면 굴 가수분해물의 1~3 kDa의 분획물이 DPPH 라디칼 소거능에서 IC₅₀값이 6.4 mg/mL, ABTS 라디칼 저해 활성에서 IC₅₀값이 4.2 mg/mL로 나타나, 이와 비교할 때 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물이 우수한 것을 알 수 있다. Yoon 등(30)의 연구에 따르면 청동풍뎡이 유충의 에탄올 추출물의 RC₅₀값이 483.39 μg/mL로 나타나 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 상대적으로 우수한 것을 알 수 있었다. Yu 등(28)이 누에번데기에 neutrase, alcalase, trypsin 및 pepsin을 처리하여 제조한 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인한 결과, alcalase 단백질 가수분해물의 RC₅₀값이 396.09 μg/mL였고, neutrase 단백질 가수분해물이 352.75 μg/mL, trypsin 677.44 μg/mL, pepsin 626.09 μg/mL로 나타났다. Alcalase 및 neutrase 처리 누에번데기 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물과 유사한 경향을 보였으나, trypsin, pepsin의 경우 소거 활성이 다소 낮은 경향을 보였다.

폴리페놀 성분이 함유되어 있는 식물성 시료에서 ABTS 라디칼 및 H₂O₂ 소거능을 측정한 Lee 등(31)의 연구 결과에 따르면 80% 메탄올 아보카도의 과육 추출물은 200 μg/mL에서 38.4%로 나타났고, 본 연구에서 사용한 갈색거저리 유충 alcalase 단백질 가수분해물은 50 μg/mL에서 69.80%, flavourzyme은 49.38% 및 neutrase는 71.41%로 ABTS 라디칼 소거 활성능이 우수한 것으로 나타났다(data not shown). Hwang과 Nhuan(32)은 아로니아 추출물의 H₂O₂ 소거능을 RC₅₀값으로 나타낸 결과 172.05 μg/mL로 확인되어 천연물인 아로니아 추출물보다 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 H₂O₂ 소거능이 우수한 것으로 나타났다.

Linoleic acid의 산화 억제 활성

지질산화 초기에 발생하는 과산화물은 ferrous chloride와 반응하여 빨간색에 가까운 ferric chloride 색소를 생성하게 되며, 지질산화가 계속 진행되면 malonaldehyde와 같은 저분자의 화합물이 생성되는데 이것은 TBA와 결합하여 빨간색의 화합물을 형성한다(33). 따라서 본 실험에서는 불포화지방산인 linoleic acid를 기질로 하여 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 산화방지 효과를 평가하였다.

상기 3가지 항산화 실험과 3 kDa 이하의 저분자 펩타이드의 생산 수율 결과를 종합해 보았을 때 3종의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물 중 항산화 활성이 상대적으로 높았으며, 3 kDa 이하 저분자 펩타이드의 생산이 42.05%로 가장 높았던 alcalase 단백질 가수분해물을 이용하여 100~800 μg/mL의 농도로 지질과산화물의 산화 억제 활성을 시간별로

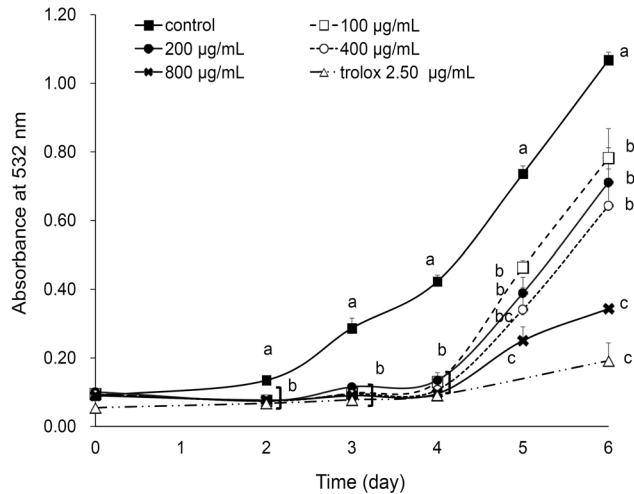


Fig. 3. Inhibitory effects of the alcalase hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae on linoleic acid peroxidation. Each value is mean \pm SE ($n \geq 3$) and different superscripts (a-c) at the same day are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

측정하여 Fig. 3에 표시하였다. 시간이 지날수록 음성대조구의 지질과산화물이 증가하였으며, 음성 대조구의 3일째 흡광도 값을 100%로 봤을 때 alcalase 단백질가수분해물은 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 농도가 높아짐에 따라 지질과산화물이 각각 27, 33, 40, 68%로 유의적으로 산화가 억제됨을 확인하였다. Kim 등(34)의 연구에 의하면 대구의 고니 단백질을 각 효소별로 처리하여 얻은 가수분해물의 linoleic acid에 대한 항산화 활성을 살펴보면 alcalase 처리 가수분해물에서 지질과산화 억제 활성이 가장 높게 나타났으며, 이는 시판 천연항산화제인 α -tocopherol보다 약 5% 정도 활성이 높게 나타난 것이라 보고하였다. 그러나 pronase E와 papain 처리 가수분해물에서는 천연항산화제보다 아주 낮은 활성을 보였으며, 이러한 결과는 N말단 및 C말단에 위치하는 아미노산의 종류가 달라지므로 항산화 활성이 다르게 나타나는 것으로 보고하였다.

이상의 결과들을 토대로 alcalase, flavourzyme 및 neutrase 효소를 처리한 갈색거저리 유충 단백질가수분해물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능에서는 alcalase 단백질가수분해물이 가장 높았으며 ABTS 라디칼 소거능은 neutrase 단백질가수분해물이 가장 높게 나타나 상대적으로 우수한 항산화 활성을 가지는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 저분자 펩타이드 생산을 목적으로 3 kDa 이하의 저분자 펩타이드의 수율이 42.05%로 가장 높았던 alcalase 가수분해물을 이용하였으나 항산화 활성 평가 결과에 따라 flavourzyme 및 neutrase 단백질가수분해물도 새로운 기능성 식품 및 소재 개발 등에 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 특히 성공적인 기능성 소재 개발을 위해서는 갈색거저리 유충 단백질가수분해물로부터 항산화 펩타이드의 구조 규명과 더불어 구성 아미노산의 종류 및 길이와 항산화 활성과의 상관성에 대한 규명이 추가되어야 할 것이다.

요 약

갈색거저리 유충 분말을 4%(w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 기질대비 단백질 가수분해 효소(alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain, papain)를 각 1%(w/w) 첨가하여 갈색거저리 유충 단백질가수분해물을 제조하였다. 24시간 반응시킨 각 효소별 가수분해물의 특성을 SDS-PAGE로 확인한 결과 alcalase 단백질가수분해물의 가수분해가 우수함을 확인하였으며, available amino group의 농도는 flavourzyme, alcalase, neutrase 단백질가수분해물 각각 5,429.35 $\mu\text{g/mL}$, 4,781.39 $\mu\text{g/mL}$, 3,155.55 $\mu\text{g/mL}$ 의 값을 나타내 상대적으로 높은 가수분해도를 보였고, bromelain(1,800 $\mu\text{g/mL}$)과 papain(1,782.61 $\mu\text{g/mL}$)의 경우 상당히 낮은 값을 보였다. 가수분해도가 높게 나타난 3종의 단백질가수분해물을 한외여과막을 통해 분자량이 3 kDa 이하로 분리한 후 동결 건조하였으며, 이 동결건조물을 이용하여 항산화 실험을 수행하였다. 갈색거저리 유충 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 alcalase 단백질가수분해물의 RC_{50} 값이 339.34 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났고, flavourzyme 가수분해물 379.35 $\mu\text{g/mL}$, neutrase 가수분해물 398.93 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, ABTS 라디칼 소거 활성은 neutrase 단백질가수분해물의 RC_{50} 값이 29.84 $\mu\text{g/mL}$ 였고, alcalase 36.90 $\mu\text{g/mL}$ 및 flavourzyme 56.03 $\mu\text{g/mL}$ 순으로 나타났다. Hydrogen peroxide 소거 활성은 alcalase 단백질가수분해물의 RC_{50} 값이 65.97 $\mu\text{g/mL}$ 였고, flavourzyme 121.67 $\mu\text{g/mL}$ 및 neutrase 70.38 $\mu\text{g/mL}$ 의 값을 보였다. 상기 3가지 항산화 실험에서 우수한 항산화 활성을 보이며, 저분자 펩타이드 생산 효율이 가장 높았던(42.05%) alcalase 단백질가수분해물을 이용해 linoleic acid에 대한 지질과산화 억제 활성을 측정된 결과, 6일 동안 100~800 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 처리 농도에 의존적으로 유의적인 항산화능을 보였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ012284 012016)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. 2013. *Edible insects: future prospects for food and feed security*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Berenbaum MR, Eisner T. 2008. Ecology. Bugs' bugs. *Science* 322: 52-53.
- Chung MY, Kwon EY, Hwang JS, Goo TW, Yun EY. 2013. Pre-treatment conditions on the powder of *Tenebrio molitor* for using as a novel food ingredient. *J Seric Entomol Sci* 51: 9-14.
- Yoo J, Hwang JS, Goo TW, Yun EY. 2013. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean

- and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 249-254.
5. Yi L, Lakemond CMM, Sagis LMC, Eisner-Schadler V, van Huis A, van Boekel MAJS. 2013. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chem* 141: 3341-3348.
 6. Cho MR, Choue R, Chung SH, Ryu JW. 1998. Effects of silkworm powder on blood glucose and lipid levels in NIDDM (Type II) patients. *Korean J Nutr* 31: 1139-1150.
 7. Choi JH, Kim DI, Park SH, Baek SJ, Kim NJ, Ryu KS. 2003. Development of anti-diabetes drink using with silkworm (*Bombyx mori* L.) extract. *Korean J Seric Sci* 45: 96-102.
 8. Kim HS, Seong JH, Lee YG, Xie CL, Shin JM, Yoon HD. 2010. Improvements caused by silk sericin extract derived from silkworm in blood glucose and lipid concentration in diabetic rats. *Korean J Food Nutr* 23: 392-398.
 9. Park JY, Heo JC, Woo SU, Yun CY, Kang SW, Hwang JS, Lee SH. 2006. Anti-inflammatory and cellular protective effects on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of grasshopper extracts. *Korean J Food Preserv* 13: 796-802.
 10. Hwang SY, Kim YB, Lee SH, Yun CY. 2005. Preventive effect of a chafer, *Protaetia brevitarsis* extract on carbon tetrachloride-induced liver injuries in rats. *Korean J Orient Physiol Pathol* 19: 1337-1343.
 11. Park DS, Yoon MA, Xu MZ, Yu H, Kim JR, Jeong TS, Park HY. 2004. Screening of anti-atherogenic substances from insect resources. *Korean J Pharmacogn* 35: 233-238.
 12. Lee JE, Lee AJ, Jo DE, Cho JH, Youn K, Yun EY, Hwang JS, Jun M, Kang BH. 2015. Cytotoxic effects of *Tenebrio molitor* Larval extracts against hepatocellular carcinoma. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 200-207.
 13. Chung SJ, Lee YH, Chung JH, Lee BR, Ham DM. 1995. Antifungal effect and activity spectrum of crude antifungal proteins from hemolymph of larvae of *Tenebrio molitor* in Korea. *Korean J Mycol* 23: 232-237.
 14. Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des* 9: 1309-1323.
 15. Pihlanto-Leppälä A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol* 11: 347-356.
 16. Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S, Itoh M. 2001. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci* 57: 319-324.
 17. Pihlanto A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int Dairy J* 16: 1306-1314.
 18. Mine Y, Ma F, Lauriau S. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem* 52: 1088-1094.
 19. Lee SH, Song KB. 2003. Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from irradiated bovine blood plasma protein hydrolysates. *J Food Sci* 68: 2469-2472.
 20. Chabance B, Jollès P, Izquierdo C, Mazoyer E, Francoual C, Drouet L, Fiat AM. 1995. Characterization of an anti-thrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br J Nutr* 73: 583-590.
 21. Pan D, Lu H, Zeng X. 2013. A newly isolated Ca binding peptide from whey protein. *Int J Food Prop* 16: 1127-1134.
 22. Choi DW, Kim NH, Song KB. 2013. Isolation of iron-binding peptides from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed protein hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1162-1166.
 23. Ham H, Woo KS, Lee B, Park JY, Sim EY, Kim BJ, Lee C, Kim SJ, Kim WH, Lee J, Lee YY. 2015. Antioxidant compounds and activities of methanolic extracts from oat cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1660-1665.
 24. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals Biol Med* 26: 1231-1237.
 25. Müller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 259: 151-154.
 26. Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
 27. Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192: 1-15.
 28. Yu JS, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Kang TS, Jeong HS. 2008. ACE inhibitory and antioxidative activities of silkworm larvae (*Bombyx mori*) hydrolysate. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 136-140.
 29. Kim HA, Park SH, Lee SS, Choi YJ. 2015. Anti-wrinkle effects of enzymatic oyster hydrolysate and its fractions on human fibroblasts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1645-1652.
 30. 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.
 31. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. 2008. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 269-275.
 32. Hwang ES, Nhuan DT. 2014. Antioxidant contents and antioxidant activities of hot-water extracts of aronia (*Aronia melanocarpa*) with different drying methods. *Korean J Food Sci Technol* 46: 303-308.
 33. Lee SH, Lee SO. 2016. Polyphenol contents and antioxidant activities of lentil extracts from different cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 973-979.
 34. Kim SK, Choi YR, Park PJ, Choi JH, Moon SH. 2000. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. *J Korean Fish Soc* 33: 198-204.