

## 흰점박이꽃무지 유충 단백질 가수분해물의 제조 및 항산화 활성

이효선 · 류희정 · 송현지 · 이승욱

계명대학교 식품가공학과

### Enzymatic Preparation and Antioxidant Activities of Protein Hydrolysates from *Protaetia brevitarsis* Larvae

Hyo-Seon Lee, Hee-Jeong Ryu, Hyeon-Ji Song, and Syng-Ook Lee

Department of Food Science and Technology, Keimyung University

**ABSTRACT** *Protaetia brevitarsis* larvae (PBL) has recently been registered as a temporary food in Korea, and this study evaluated the application potential of PBL proteins as health functional food materials. Protein hydrolysates were prepared from PBL powder by enzymatic hydrolysis using five different proteases (alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, and papain), and based on the results from the peptide content and SDS-PAGE analyses, PBL treated with alcalase or flavourzyme showed a high degree of hydrolysis (HD) value, whereas the HD value of those treated with neutrase, bromelain, or papain was minimal. The protein hydrolysates showing a high HD value were separated further into the fractions of >3 kDa and <3 kDa by a centrifugal filter system and then lyophilized, and according to the  $RC_{50}$  values of the protein hydrolysates (<3 kDa) obtained from three different antioxidant analyses; the alcalase hydrolysates showed the highest antioxidant activity. Therefore, the alcalase hydrolysates were tested further for their inhibitory effects on the peroxidation of linoleic acid by measuring the thiobarbituric acid values. The results showed that the peroxidation of untreated linoleic acid increased dramatically during 6 days of incubation, but a pretreatment with the hydrolysates (100~800  $\mu\text{g/mL}$ ) significantly inhibited the linoleic acid peroxidation in a dose-dependent manner for 6 days. Our current studies are focused on the identification of active peptide sequences from alcalase hydrolysates.

**Key words:** *Protaetia brevitarsis* larvae, protein hydrolysates, enzymatic hydrolysates, antioxidant activities

## 서 론

최근 미래 식량난에 대비하기 위한 정책으로 국제식량 농업기구(FAO)에서는 미래 식량자원으로 식용 곤충의 활성화 방안을 발표하여 전 세계적으로 이에 대한 관심이 증대되고 있다(1). 이와 발맞추어 국내에서는 농림수산식품부가 “곤충산업육성 5개년 종합계획”을 발표하여 곤충 산업에 대한 지원이 이루어졌으며, 2014년부터 과학적 입증을 거쳐 갈색거저리 유충, 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이 유충 및 쌍별귀뚜라미를 새로운 식품 원료로 등록하였다. 현재 국내에서 합법적으로 식품으로 제조 및 판매가 가능한 곤충은 기존에 식품공전에 등재되어 있는 벼메뚜기, 누에 번데기, 백강잠까지 포함해서 총 7종이다(2).

흰점박이꽃무지(white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*)는 딱정벌레목 꽃무지과에 속하는 곤충으로 이것의 유충을 “굼벵이” 또는 제조(蟻螬)로 칭한다(3,4).

꽃무지의 영양성분은 유충 분말 100 g 중 조단백질 58%, 조지방 17%, 조회분 8%, 총 식이섬유소 함량은 5%로(5) 단백질, 불포화 지방산 및 미네랄이 다량 함유된 고급 단백질 공급원으로 알려져 곤충자원의 식·약용 소재화를 위한 연구들이 많이 이루어지고 있다(6).

우리나라에서 약용으로 가장 많이 활용되고 있는 흰점박이꽃무지 유충은 <동의보감>에 “간에서 비롯되는 질병, 즉 간암, 간경화, 간염, 누적된 피로의 해소 등을 포함하여 월경 불순, 시력감퇴, 백내장, 금창, 산후풍, 악성종기, 구내염, 파상풍, 중풍 등의 성인병을 치료하는 데 효과가 있다”고 기록되어 있으며, 특히 간 질환에 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 한방과 민간요법에 의해 이용되고 있다(7,8). 국내에서 이루어진 흰점박이꽃무지에 관한 연구로는 굼벵이의 섭취가 에탄올 투여 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향(7), 흰점박이 함유 음료의 *in vitro* 항산화 관련 생리활성 효능 및 안전성 검증(9), 사염화탄소로 유발된 랫드의 간 손상에 대한 흰점박이꽃무지 추출물의 예방 효과(10) 등 흰점박이꽃무지 추출물을 이용한 연구들이 보고되어 있지만 흰점박이꽃무지 유충의 생리활성 펩타이드에 대한 연구는 부족한 실정이다.

생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리적 활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의되는데(11), 보통 3~20개의 아미노산으로 이루어져 있으며 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다(12). 또한, 크기가 작아 생체 내로 쉽게 흡수될 수 있으며, 다양한 기능적 특성을 갖는 장점이 있다(13). 지금까지 연구된 생리활성 펩타이드의 효과로는 우유단백질 가수분해물의 체내 항산화 기능 향상과 가공 식품에서의 산화반응 방지(14), 달걀흰자 가수분해물의 새로운 항균 펩타이드(15) 등 상당히 많은 연구 결과가 발표되었으며, 그 외에도 항혈전(16), 항고혈압(17), 면역조절(18) 등 생리활성 펩타이드에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있어 고단백질 소재인 흰점박이꽃무지의 효소적 가수분해를 통한 생리활성 펩타이드 생산이 주목받고 있다(2).

따라서 본 연구에서는 곤충의 식·약용 소재화 연구의 한 방안으로 단백질 분해 효소원을 이용하여 흰점박이꽃무지 유충으로부터 생리활성 펩타이드를 함유하는 단백질가수분해물을 제조하였으며, 그중 가수분해도가 우수한 단백질가수분해물을 선택하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 라디칼, hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 소거활성 및 지질과산화 억제 활성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용한 주 시료는 2016년 3월 18일에 농업법인회사 예천곤충나라(경북 예천군 지보면)에서 생산, 판매된 것으로 진공 건조된 흰점박이꽃무지 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(TNBS)는 G-Biosciences Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 특별한 언급이 없는 한 그 밖의 분석용 시약 및 유기용매는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 흰점박이꽃무지 유충 단백질 가수분해물 제조

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

며, 상등액은 저분자 펩타이드의 분리를 위해서 membrane filter(Amicon Ultra-15, EMD Milipore Corporation, Billerica, MA, USA)를 이용하여 2시간 동안 원심분리(5,000×g) 함으로써 최종적으로 분자량 3 kDa 이하의 단백질가수분해물을 얻었다. 단백질가수분해물은 동결건조한 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### SDS-PAGE

각 효소별 흰점박이꽃무지 유충의 단백질 가수분해 특성을 확인하기 위하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 가수분해물의 단백질 패턴을 측정하였다. SDS-PAGE는 15% gel을 사용하였으며, 각 가수분해물은 원심분리(3,000×g, 4°C, 10분) 후 얻은 상등액 20 μL를 gel에 loading 하여 80 V에서 약 2시간 전기영동한 후, coomassie brilliant blue를 사용하여 염색하고 10% acetic acid가 함유된 30% methanol을 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 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 가수분해도를 측정하였다(19). 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% sodium dodecylsulfate(10% SDS)와 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 소거활성 측정

DPPH free radical 소거활성은 Ham 등(20)의 방법에 따라 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로 99% 메탄올을 이용하여 시료를 0, 25, 50, 100, 150, 200 μg/mL로 희석하고 희석된 시료를 96-well plate에 160 μL씩 분주하였다. 다음 methanol에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 40 μL를 시료가 분주된 well에 분주하여 실온, 암소에서 30분간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도로 측정하였다. 각각의 효소별 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 RC<sub>50</sub>값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로서 Trolox(Sigma-Aldrich Co.)를 사용

하였다.

### ABTS 라디칼 소거활성 측정

ABTS 라디칼 소거활성 실험은 Re 등(21)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  $0.70 \pm 0.02$ 가 되도록 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 180  $\mu$ L에 시료 20  $\mu$ L를 가하여 1분 동안 실온에 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 효소별 흰점박이꽃무지 유충 단백질 가수분해물의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인  $RC_{50}$ 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로서 Trolox를 사용하였다.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거활성 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거활성 측정은 Yu 등(19)의 방법에 따라 증류수에 농도별로 희석한 시료 20  $\mu$ L, PBS 100  $\mu$ L, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20  $\mu$ L를 96-well plate에 가한 후 37°C incubator에서 5분간 반응시켰다. 이후 1.25 mM ABTS 30  $\mu$ L와 1 U/mL peroxidase 30  $\mu$ L를 가하고 실온에서 10분간 반응시킨 다음 microplate spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로서 Trolox를 사용하였다.

### Linoleic acid에 대한 산화 방지 효과

Linoleic acid에 대한 산화 억제 효과를 확인하기 위해 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 2 mL와 5% 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  $\mu$ L, 0.8% thiobabitaric acid(TBA, w/v) 100  $\mu$ L와 linoleic acid 반응기질 용액 50  $\mu$ L를 잘 혼합하여 95°C 이상에서 20분 반응시킨 후, 실온에서 5분간 냉각시키고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 180  $\mu$ L의 상등액을 흡광도 532 nm에서 측정하였다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로서 Trolox를 사용하였다.

### 통계분석

모든 데이터는 최소 3번 반복하여 평균과 표준오차(mean $\pm$ SE)로 나타내었으며, 통계분석에는 SPSS Statistics 23(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)이 사용되었다. 또한, 그룹 간의 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 판단

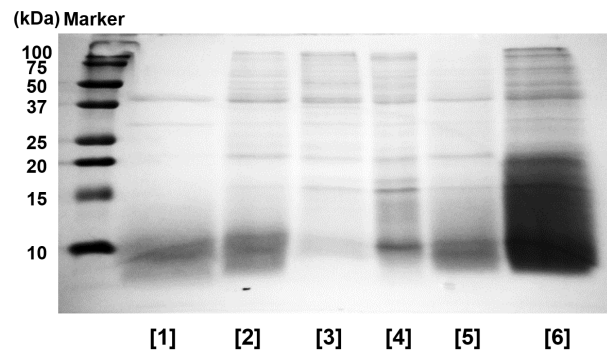
하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소별 흰점박이꽃무지 유충의 단백질 가수분해물 제조 특성

생리활성을 가지는 펩타이드는 일반적으로 효소에 의한 단백질의 가수분해를 통하여 생산되는데(22), 가장 일반적으로 사용되는 상업적 단백질 가수분해효소인 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, papain을 이용하여 흰점박이꽃무지 유충 단백질 가수분해물을 제조하여 그 특성을 조사하였다. 각 효소별로 24시간 반응시킨 흰점박이꽃무지 유충 단백질 가수분해물의 특성을 확인하고자 SDS-PAGE를 실시하여 단백질 가수분해물의 SDS-PAGE 패턴을 Fig. 1에 나타내었다. 효소별 단백질 가수분해물을 비효소군과 비교한 결과, 모든 효소에서 10~20 kDa 사이의 주요 밴드가 사라져 가수분해가 활발하게 일어났음을 확인할 수 있었다. 특히 alcalase를 첨가한 가수분해물에서 10 kDa 이상의 단백질이 거의 분해되어 가장 우수한 가수분해가 이루어진 것을 알 수 있고, flavourzyme 효소를 첨가한 가수분해물은 10 kDa 이하의 단백질을 모두 분해하여 10 kDa 이하의 펩타이드를 더 많이 생산했을 것으로 판단된다.

단백질이 가수분해되면 가수분해도에 비례하여 available amino group이 증가하므로 펩타이드의 함량을 나타내는 지표가 될 수 있다(23). 각 효소의 흰점박이꽃무지 단백질 가수분해물의 시간에 따른 가수분해도를 알아보기 위해 TNBS assay를 통해 available amino group 농도를 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24시간별로 측정하였다(Fig. 2). 효소별 단백질 가수분해물을 이용하여 시간에 따른 가수분해도를 tyrosine 함량으로 환산한 결과, 24시간 반응 후 available amino group 농도는 flavourzyme 9.99 mg/mL, alcalase 9.35 mg/mL, neutrase 7.60 mg/mL, papain 6.65 mg/mL, bromelain 6.40 mg/mL 순으로 flavourzyme 단백질 가수분해물이 avail-



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

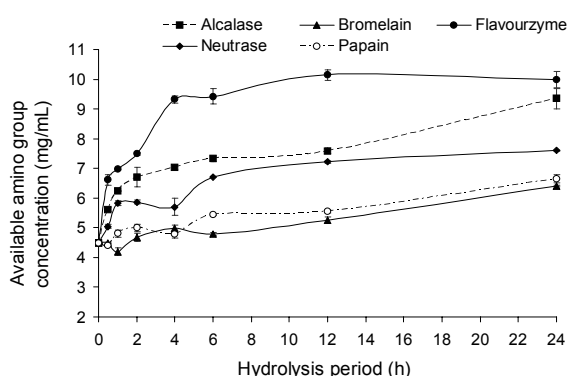


Fig. 2. Degree of hydrolysis of *P. brevitarsis* larvae by five different proteases at 55°C. Each value is mean±SE (n≥3).

available amino group의 농도가 가장 높은 것으로 측정되었다. 또한, alcalase, flavourzyme, neutrase 단백질 가수분해물은 시간이 경과함에 따라 available amino group 농도가 0~6 시간 동안 급격히 증가하며 그 이후부터 그 증가폭이 감소하는 것을 알 수 있다. 하지만 bromelain, papain 단백질 가수분해물은 12시간까지 완만하게 증가하여 alcalase, flavourzyme, neutrase에 비해 available amino group의 함량이 현저히 낮음을 알 수 있다. SDS-PAGE와 TNBS assay 결과를 통해 alcalase, flavourzyme, neutrase를 이용한 흰점박이꽃무지 유충의 단백질 가수분해는 12시간까지 가수분해가 충분히 이루어지며, 펩타이드 chain의 N-terminal을 분해하는 exo-peptidase인 flavourzyme을 처리했을 때 가장 많은 available amino group을 생성하여 분자량이 작은 펩타이드를 생산하는 것을 확인하였다. 이는 단백질 분해효소를 이용한 가수분해는 6~12시간 이내에 가수분해가 충분히 이루어진다는 선행 연구와 동일한 결과이며 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 경향과 비슷한 결과를 제시하였음을 알 수 있다(19,24).

단백질 가수분해물의 경우 저분자량 펩타이드가 체내로 쉽게 흡수되고 체내 이용률도 높다는 연구 결과(25)에 따라 가수분해가 활발히 일어났던 alcalase, flavourzyme, neutrase 가수분해물을 분자량 3 kDa 이하로 한외여과 한 후 동결 건조하여 실험에 이용하였다. 각 단백질 가수분해물의 저분자 펩타이드 생산 효율을 알아보기 위해 전체 기질의 고형분 함량에 대하여 3 kDa 이하로 분리한 고형분의 무게를 측정하여 수율을 나타냈고 그 결과를 비교하였다(Table 1). Alcalase 단백질 가수분해물의 3 kDa 이하 고형분 함량 수율은 52.91%로 가장 높았으며, flavourzyme 39.35%, neutrase 35.29%, 효소를 처리하지 않았을 때는 21.54%로 나타나 흰점박이꽃무지 유충 단백질 가수분해물이 효소를 처리하지 않은 대조구에 비해 유의적으로 3 kDa 이하의 수율이 높은 것을 알 수 있고 그중에서도 alcalase의 수율이 가장 높은 것을 알 수 있다(P<0.05). 앞선 결과를 종합해 볼 때 3 kDa 이하의 펩타이드 생산에는 alcalase 효소가 적합할 것으로 예상하며, 더 작은 분자량의 펩타이드 생산에는 fla-

Table 1. Yields of protein hydrolysates (<3 kDa) prepared from vacuum dried *P. brevitarsis* larvae using different proteases

Enzymes	Yields of protein hydrolysates (%) <sup>1)</sup>
Alcalase	52.91±3.46 <sup>a2)</sup>
Flavourzyme	39.35±2.33 <sup>b</sup>
Neutrase	35.29±2.17 <sup>b</sup>
No enzyme	21.54±0.80 <sup>c</sup>

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

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

ourzyme 효소가 더 효율적일 것으로 예상된다. 이는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물과 유사한 경향이며 alcalase 단백질 가수분해물의 3 kDa 이하의 고형분 함량 수율을 비교해 봤을 때 갈색거저리 유충은 42.05%, 흰점박이꽃무지 유충은 52.91%로 나타나 흰점박이꽃무지 유충의 단백질 가수분해물의 수율이 더 높은 것을 알 수 있다(19).

### 흰점박이꽃무지 유충 단백질 가수분해물의 활성산소종 소거 활성

항산화 물질이 수소원자나 전자를 공여할 수 있는 능력을 평가할 때 이용되는 DPPH 라디칼은 수소 혹은 전자를 받음으로써 안정한 형태의 화합물로 전환되어 라디칼 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변한다(20). 이를 이용하여 각 효소별로 24시간 동안 효소 처리를 통해 생산한 3 kDa 이하 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정해 Table 2에 나타내었다. 50%의 DPPH 라디칼을 저해하는 농도를 RC<sub>50</sub> 값으로 나타냈을 때 alcalase 단백질 가수분해물은 151.99 µg/mL, flavourzyme 149.28 µg/mL, neutrase 131.43 µg/mL로 나타나 neutrase 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 높았다.

ABTS 라디칼 소거활성법은 표준물질인 Trolox의 값과 비교하여 나타낼 수 있으며, *in vivo*에서의 항산화능 측정뿐만 아니라 *in vitro*에서도 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있다(21). ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방지하면 생성되는 ABTS 라디칼은 시료 속

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

Enzymes	RC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>1)</sup>	TEAC (µg TE/mg) <sup>2)</sup>
Alcalase	151.99±2.11 <sup>a3)</sup>	12.03±0.39 <sup>a</sup>
Flavourzyme	149.28±4.55 <sup>a</sup>	12.03±0.63 <sup>a</sup>
Neutrase	131.43±6.25 <sup>b</sup>	13.75±0.85 <sup>a</sup>
Trolox	2.09±0.01	-

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

<sup>2)</sup>Trolox equivalent antioxidant capacity.

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

**Table 3.** ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging activities of the hydrolysates from *P. brevitarsis* larvae with different proteases

Enzymes	RC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>1)</sup>	TEAC (μg TE/mg) <sup>2)</sup>
Alcalase	34.59±0.05 <sup>c3)</sup>	117.22±2.28 <sup>a</sup>
Flavourzyme	44.34±0.83 <sup>a</sup>	109.90±1.52 <sup>b</sup>
Neutrase	42.49±0.27 <sup>b</sup>	108.22±1.56 <sup>b</sup>
Trolox	6.35±0.03	—

<sup>1)</sup>Concentration required for 50% reduction of ABTS<sup>+</sup> at 1 min after starting the reaction.

<sup>2)</sup>Trolox equivalent antioxidant capacity.

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

항산화 물질로 인해 라디칼이 소거되면서 짙은 청록색의 ABTS 라디칼이 탈색되는데 이를 흡광도로 측정하는 방법이다. DPPH와 같은 라디칼 소거법에 의한 항산화 활성 측정법이라는 점에서 유사하나 화학반응을 거쳐 free 라디칼을 유발시킨 용액에 시료를 넣어 항산화 활성을 측정한다는 점에서 다르며 free 라디칼을 유발시키는 데 시간이 소요되지만 측정 시에는 빠르게 측정할 수 있으며 pH 변화에 다소 민감하지 않다는 장점이 있다(26). ABTS 라디칼을 50% 저해하는 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 농도를 RC<sub>50</sub>값으로 환산한 결과를 Table 3에 나타냈다. 흰점박이꽃무지 유충 alcalase 단백질가수분해물의 RC<sub>50</sub>값은 34.59 μg/mL, flavourzyme 44.34 μg/mL, neutrase 42.49 μg/mL로 alcalase 단백질가수분해물의 ABTS 라디칼 소거활성이 가장 높음을 알 수 있다(P<0.05).

Hydrogen peroxide는 다양한 외부요소나 정상세포의 mitochondria와 peroxisome에서 생성되는 산소의 환원 대사물질로서 DNA 및 단백질 손상을 유발하고 불포화지방산과 같은 생체막을 공격하여 과산화지질을 생성함으로써 생체기능 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(27,28). 본 연구에서는 peroxidase의 기질인 ABTS를 이용하여 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거활성을 측정하였다(Table 4). 각 효소별 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물을 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거능의 RC<sub>50</sub>값을 비교한 결과, alcalase 46.31 μg/mL, flavourzyme 59.30 μg/mL, neutrase 58.16 μg/mL로 alcalase의 소거활성이 가장 높았으며 flavourzyme과 neutrase는 유의적인 차이가 없었다.

이상의 결과에서 DPPH 라디칼 소거능은 neutrase 단백질가수분해물이 RC<sub>50</sub> 131.43 μg/mL로 가장 효과가 좋았으며 (P<0.05), ABTS 라디칼 저해 활성과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거활성은 각각 RC<sub>50</sub> 34.59 μg/mL, 46.31 μg/mL로 alcalase 가수분해물이 가장 효과가 좋았다(P<0.05). 이는 효소별 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 저해활성, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거활성의 상관관계가 없다는 것을 의미하며, Pihlanto(14)의 보고처럼 단백질 가수분해 펩타이드의 항산화 활성은 항산화 활성 측정법에 따라 차이가

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

Enzymes	RC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>1)</sup>	TEAC (μg TE/mg) <sup>2)</sup>
Alcalase	46.31±0.78 <sup>b3)</sup>	163.19±4.60 <sup>a</sup>
Flavourzyme	59.30±1.29 <sup>a</sup>	136.98±4.39 <sup>b</sup>
Neutrase	58.16±0.88 <sup>a</sup>	151.51±7.53 <sup>ab</sup>
Trolox	2.60±0.08	—

<sup>1)</sup>Concentration required for 50% reduction of ABTS<sup>+</sup> at 10 min after starting the reaction.

<sup>2)</sup>Trolox equivalent antioxidant capacity.

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

있고, 가수분해효소의 기질 특이성에 따라 생성되는 아미노산 배열 및 아미노산 조성의 영향을 받는다는 결과와 유사한 결과를 제시하였다.

선행 연구에서 발표한 여러 가지 시료들의 DPPH 라디칼 소거활성 결과를 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물과 비교해 보았을 때 Kim 등(29)의 보고에 따르면 제주산 마(한라마) 효소분해물의 3 kDa 이하 펩타이드는 20 mg/mL의 농도에서 0.14 mM TE에 해당하는 효과를 나타냈다고 보고하였는데, 흰점박이꽃무지 유충의 alcalase, flavourzyme, neutrase 단백질가수분해물 20 mg/mL에서는 각각 0.93 mM, 0.92 mM, 1.07 mM의 Trolox equivalent에 해당하는 효과를 나타내 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물이 우수한 것을 알 수 있다(data not shown). Yoon 등(30)의 연구에 따르면 청동풍뎡이 유충의 에탄올 추출물의 RC<sub>50</sub>값이 483.39 μg/mL로 나타나 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성이 상대적으로 우수한 것을 알 수 있다. 또한, Yu 등(31)의 연구에 따르면 누에 번데기에 alcalase, neutrase, trypsin 및 pepsin을 처리하여 제조한 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성을 알아본 결과 alcalase 단백질가수분해물의 RC<sub>50</sub>값이 396.09 μg/mL, neutrase 단백질가수분해물이 352.75 μg/mL, trypsin 677.44 μg/mL, pepsin 626.09 μg/mL로 나타났다. 흰점박이꽃무지 유충의 alcalase, flavourzyme, neutrase 단백질가수분해물의 RC<sub>50</sub>값은 151.99 μg/mL, 149.28 μg/mL, 131.43 μg/mL로 누에번데기 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성보다 더 우수한 것을 확인하였다.

해바라기씨박의 alcalase 단백질가수분해물을 제조하여 1 kDa 이하로 한외여과한 펩타이드의 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 연구 결과(32)는 0.46 μM TE/mg protein으로 보고하였다. 흰점박이꽃무지 유충 alcalase 단백질가수분해물을 3 kDa 이하로 한외여과한 펩타이드를 Ambigaipalan 등(32)의 방법과 동일하게 단백질을 정량했을 때 10 mg/mL 시료에는 3.51 mg/mL BSA(bovine serum albumin)에 해당하는 단백질이 함유되어 있었고, 이를 이용하여 TE값으로 환산하여 나타내서 비교해본 결과 1.31 mM TE/mg protein으로 흰점박이꽃무지 유충의 단백질가수분해물의 항

산화 활성이 훨씬 우수한 ABTS 소거활성을 나타냄을 알 수 있다(data not shown). 갈색거저리 유충의 단백질가수분해물(3 kDa 이하) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거활성 결과를 비교해본 결과(19) 갈색거저리 유충 alcalase 단백질가수분해물(3 kDa 이하)은 78.43 µg TE/mg, 흰점박이꽃무지 유충의 alcalase 단백질가수분해물은 163.19 µg TE/mg으로 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물 펩타이드의 효과가 더 우수함을 알 수 있다.

**Linoleic acid의 산화 억제 활성**

지질 산화 초기에 발생하는 과산화물은 ferrous chloride와 반응하여 빨간색에 가까운 ferric chloride 색소를 생성하며, 지질 산화가 계속되면 malonaldehyde와 같은 저분자의 화합물이 생기는데 이것은 TBA와 결합하여 빨간색의 화합물을 형성한다(33). 따라서 본 실험에서는 불포화지방산인 linoleic acid를 기질로 하여 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 산화 방지 효과를 알아보았다.

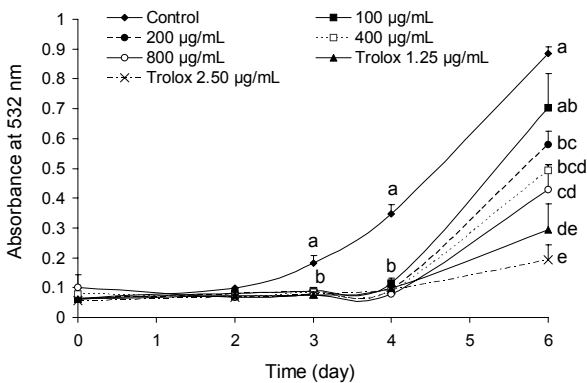
상기 3 kDa 이하의 저분자 펩타이드 생산 수율 결과와 3가지 항산화 실험 결과를 종합해 보았을 때 수율이 52.91%로 가장 높고, ABTS와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거활성 효과가 가장 우수했던 alcalase 단백질가수분해물을 이용하여 100~800 µg/mL의 농도로 지질과산화물의 산화 억제 활성을 시간대별로 측정하여 Fig. 3에 나타냈다. 시간이 지날수록 음성대조구의 지질과산화물은 증가하였으며, 음성대조구의 6일째 흡광도 값을 100%로 봤을 때 alcalase 단백질가수분해물은 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL의 농도에서 농도가 높아짐에 따라 지질과산화물이 각각 21%, 34%, 44%, 52%로 산화가 억제됨을 확인하였다. 대구의 고니 단백질을 효소별로 처리하여 얻은 펩타이드의 linoleic acid에 대한 항산화 활성 결과에 따르면 alcalase 단백질가수분해물이 지질과산화 억제효과가 우수하다고 하였다(24). 본 연구에 이용한 Trolox와 달리 α-tocopherol을 양성대조군으로 이용하였기 때문에 두 연구 결과의 지질 산화 억제에 대한 직접적인 비교는 어려웠으나 그 효과는 α-tocopherol보다 약

5% 정도 활성이 높게 나타난 것이라고 하였다(24).

본 연구에서는 저분자 펩타이드 생산을 목적으로 3 kDa 이하의 저분자 펩타이드 생산 수율이 52.91%인 alcalase 단백질가수분해물의 펩타이드를 이용하여 지질 산화 방지 효과를 알아보았지만 항산화 활성 평가 결과에 따라 flavourzyme 및 neutrase 단백질가수분해물도 새로운 기능성 식품 및 소재 개발 등에 활용될 수 있을 것이라 예상된다. 또한, 흰점박이꽃무지 유충 유래의 항산화 펩타이드의 구조에 대한 분석과 구성 아미노산의 종류 및 길이와 항산화 활성과의 상관관계에 대한 추가 연구가 이루어진다면 활용도가 더욱 높아질 것이라 예상된다.

**요 약**

흰점박이꽃무지 유충 분말을 4%(w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 기질 대비 단백질 가수분해효소(alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase, bromelain, papain)를 각각 1%(w/w) 첨가하여 24시간 가수분해시킨 단백질가수분해물을 제조하였으며, 각 효소별 가수분해물의 특성과 가수분해도를 알아보기 위해 24시간째의 가수분해물을 이용하여 SPS-PAGE를 진행하였고, 시간에 따른 가수분해도를 알아보기 위해 TNBS assay를 실시하였다. SDS-PAGE 결과 alcalase 단백질 가수분해물이 10 kDa 이상의 대부분의 단백질을 분해시켰으며, flavourzyme 효소는 10 kDa 이하의 펩타이드를 분해시켜 available amino group 함량이 9.99 mg/mL로 가장 높게 나타났다. Available amino group의 농도가 높게 나타난 alcalase(9.35 mg/mL), flavourzyme(9.99 mg/mL), neutrase(7.60 mg/mL) 단백질가수분해물을 한외여과막을 통해 분자량이 3 kDa 이하로 분리한 후 동결 건조하였으며, 동결 건조물을 이용하여 항산화 실험을 수행하였다. 각 효소별 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성 RC<sub>50</sub>값은 neutrase 131.43 µg/mL, flavourzyme 149.28 µg/mL, alcalase 151.99 µg/mL로 neutrase 단백질가수분해물의 항산화 활성이 가장 우수하였으며(P<0.05), ABTS 라디칼 소거활성은 alcalase 34.59 µg/mL, neutrase 42.49 µg/mL, flavourzyme 44.34 µg/mL 순으로 alcalase가 우수한 항산화 활성을 나타냈다(P<0.05). Hydrogen peroxide 소거활성은 alcalase 단백질가수분해물의 RC<sub>50</sub>값이 46.31 µg/mL, neutrase 58.16 µg/mL, flavourzyme 59.30 µg/mL로 alcalase 가수분해물이 우수한 항산화 활성을 나타냈다(P<0.05). 상기 3가지 항산화 실험에서 우수한 항산화 활성을 보였으며 저분자 펩타이드 생산 효율이 52.91%로 가장 높았던 alcalase 단백질가수분해물(3 kDa 이하)을 이용해 linoleic acid에 대한 지질과산화 억제 활성을 측정한 결과, 6일 동안 100~800 µg/mL의 농도에서 처리 농도에 의존적으로 유의적인 항산화능을 보였다. 최종적으로 본 연구에서는 고단백질 소재인 흰점박이꽃무지 유충을 이용하여 단백질가수분해물의 제조 특성 및 우수한 항산화 활성을



**Fig. 3.** Inhibitory effects of the alcalase hydrolysates from *P. brevitarsis* larvae on linoleic acid peroxidation. Each value is mean±SE (n≥3) and different letters (a-e) at the same day are significantly different at P<0.05 by Duncan’s multiple range test.

확인하였으며, 이 결과들은 향후 식용곤충을 활용한 새로운 기능성 식품 및 소재 개발 등에 활용될 수 있을 것이라 예상된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ0122840 12017)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

- van Huis A, Van Itterbeek 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.
- Yun EY, Hwang JS. 2016. Status and prospect for development of insect foods. *Food Science and Industry* 49(4): 31-39.
- Kim HG, Kang KH. 2005. Bionomical characteristic of *Protaetia brevitarsis*. *Korean J Appl Entomol* 44: 139-144.
- Kwon EY, Yoo J, Yoon YI, Hwang JS, Goo TW, Kim MA, Choi YC, Yun EY. 2013. Pre-treatment of the white-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis*) as an ingredient for novel foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 397-402.
- Chung MY, Hwang JS, Goo TW, Yun EY. 2013. Analysis of general composition and harmful material of *Protaetia brevitarsis*. *J Life Sci* 23: 664-668.
- Bukkens SGF. 1997. The nutritional value of edible insects. *Ecol Food Nutr* 36: 287-319.
- Kang IJ, Kim HK, Chung CK, Kim SJ, Oh D. 2000. Effects of *Protaetia Orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 6: 479-484.
- Kwon EY, Yoo J, Yoon YI, Hwang JS, Goo TW, Kim MA, Choi YC, Yun EY. 2013. Pre-treatment of the white-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis*) as an ingredient for novel foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 397-402.
- Park JH, Kim SY, Kang M, Yoon M, Lee Y, Park E. 2012. Antioxidant activity and safety evaluation of juice containing *Protaetia brevitarsis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 41-48.
- 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 Oriental Physiol Pathol* 19: 1337-1343.
- 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.
- Pihlanto-Leppälä A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol* 11: 347-356.
- 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.
- Pihlanto A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int Dairy J* 16: 1306-1314.
- 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.
- Chabance B, Jollès P, Izquierdo C, Mazoyer E, Francoual C, Drouet L, Fiat AM. 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from  $\alpha$ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br J Nutr* 73: 583-590.
- 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.
- Pan D, Lu H, Zeng X. 2013. A newly isolated Ca binding peptide from whey protein. *Int J Food Prop* 16: 1127-1134.
- Yu MH, Lee HS, Cho HR, Lee SO. 2017. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae (mealworm). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46: 435-441.
- 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.
- 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 Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2003. Food-derived bioactive peptides: Opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* 9: 1297-1308.
- Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. 2011. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chem* 129: 485-490.
- 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.
- Choi DW, Kim NH, Son KB. 2013. Isolation of iron-binding peptides from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed protein hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1162-1166.
- Yoo KM, Kim DO, Lee CY. 2007. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci Biotechnol* 16: 177-182.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192: 1-15.
- Kim D, Pak JI, Chae HS, Kim YB, Jang A. 2013. Antioxidation effect of leg bone extracts and enzyme hydrolysates from Jeju crossbred horses (Jeju native horse  $\times$  thoroughbred). *J Life Sci* 23: 1147-1154.
- Yoon WJ, Lee JA, Kim JY, Kim SB, Park SY. 2007. Antioxidant activity and physiological function of the *Anomala bipilosa* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 670-677.
- 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.
- Ambigaipalan P, Al-Khalifa AS, Shahidi F. 2015. Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using alcalase, flavourzyme and thermolysin. *J Funct Foods* 18: 1125-1137.
- 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.