

A Study of the Anti-inflammatory Effect of Protein Derived from *Tenebrio molitor* Larvae

Minchul Seo[†], Hwa Jeong Lee[†], Joon Ha Lee, Minhee Baek, In-Woo Kim, Sun Young Kim, Jae-Sam Hwang and Mi-Ae Kim*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju-gun, Jeonbuk 55365, Korea

Received July 9, 2019 / Revised August 12, 2019 / Accepted August 14, 2019

This study investigated the optimum pH conditions for efficient extraction of protein from defatted *Tenebrio molitor* (TM) larvae. We examined the anti-inflammatory effect of protein derived from defatted TM larvae obtained by an alkaline extraction method. Six extraction pH values (7, 8, 9, 10, 11, and 12) and three precipitation pH values (2, 4, and 6) were used. The protein content, browning degree, and recovery yield of the protein obtained under each pH condition were determined. For efficient extraction of protein from defatted TM larvae, a combination of an extraction pH of 9 and precipitation pH of 4 resulted in a 32.4% recovery yield based on the extraction value and degree of browning. To determine whether the protein ameliorated inflammation by inhibition of macrophage activation by lipopolysaccharides (LPS), we measured nitric oxide (NO), cyclooxygenase-2 (COX-2), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in LPS-stimulated raw 264.7 macrophage cells. The protein markedly inhibited the production of NO without cytotoxicity and reduced the expression level of COX-2 and iNOS protein through the regulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling. These results suggested that protein derived from TM larvae could have potential applications in anti-inflammatory therapeutic agents and protein supplements.

Key words : Anti-inflammatory activity, mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kappa B, *Tenebrio molitor*

서 론

곤충은 약 100만종 이상의 다양한 종을 가지고 있으며, 뛰어난 환경 적응력으로 전 세계에 널리 분포하고 있다. 또한 예로부터 동서양을 막론하고 식용으로 먹어 왔으며, 고서에는 다양한 곤충을 치료제로 사용하였다는 기록이 존재한다[12, 22]. 식용곤충은 종에 따라 영양성분 함량 차이가 있지만 단백질과 불포화 지방산등 영양학적 가치가 매우 높은 것으로 보고되었다[4, 29]. 이러한 특징으로 곤충은 유용한 생물자원으로 인식되고 있을 뿐만 아니라 국제식량농업기구(FAO)에서는 미래 식량난에 대비하기 위한 정책으로 식용곤충의 활성화 방안을 발표하였다[9]. 이에 전 세계적으로 곤충에 대한 관심이 증대되고 있으며, 식용곤충을 대상으로 생리활성 물질 발굴을 통

한 기능성 연구가 매우 활발한 실정이다[5, 15, 17, 23, 25].

단백질은 내장, 뼈, 피부를 형성 하는데 필요할 뿐만 아니라 다양한 호르몬, 체내효소 및 면역을 담당하는 면역 글로불린 등 신체를 구성하는 많은 것들이 단백질로 구성되어 있어 성장기 아이들뿐만 아니라 장년과 노년층에게도 매우 필수적이다. 특히 최근 소화기 질환이나 각종 암의 예방은 물론 치료와 회복에도 단백질 섭취의 중요성이 부각되고 있다. 현재 우리가 섭취하는 주요 단백질 공급원은 주로 동물성 단백질인데, 이를 생산하기 위해서는 비용적인 측면, 식량부족 측면 이외에도 탄소의 배출량, 온실가스 배출량, 수질오염 문제 등 수많은 문제를 야기하고 있어 앞으로 새로운 동물성 단백질 공급원이 필요한 실정이다.

식용곤충은 종에 따라 약간의 차이는 있으나 100 g 기준 단백질 함유량이 40~60 g으로 콩보다 월등히 높고 기존 육류와 비교해도 결코 적지 않은 양을 함유하고 있다. 또한 단백질 이외에 10~40%를 차지하는 불포화지방산, 탄수화물, 무기질, 비타민 등 다양한 영양소를 풍부하게 함유하고 있어 영양학적 가치가 매우 큰 것으로 보고되고 있다[2, 9]. 그 중에서 갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm)는 딱정벌레목 거저리과의 곤충으로 한국을 비롯한 전세계에 분포하며 최근에는 서양에서도 식용으로 많이 이용되고 있으며 캐나다 등지에서는 갈색

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-63-238-2977, Fax : +82-63-238-3833

E-mail : kimma@korea.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.

거저리를 이용한 소스 개발, 견과류 제조 등에 관한 레시피를 보고한 바 있다[6]. 또한 본 연구팀에서는 갈색거저리 식품원료화를 위한 분말 제조조건 확립 및 영양성분 및 유해물질 분석에 따른 영양적 가치를 보고하였으며[4, 29], 최근 갈색거저리 유충 추출물을 이용한 기능성 연구를 통하여 갈색거저리 유충이 식욕조절 및 지방세포분화 억제를 통한 항비만 효능뿐만 아니라 항염증 효능과 같은 다양한 기능성을 가지고 있는 것으로 확인 되었다[13, 23, 25, 31].

갈색거저리의 영양성분은 동결건조물을 기준으로 수분 2.9%, 조단백질 50.3%, 조지방 33.7%, 조회분 3.7%, 조섬유 4.8%, 탄수화물 9.3%로서 단백질 함량이 매우 높은 고단백질 소재로서 2016년 식용곤충 원료로 식품공전에 등록됨으로써 이의 활용에 대한 관심이 매우 높아지고 있다[2, 4]. 특히 갈색거저리 유충의 경우 대두보다 필수아미노산을 많이 함유하고 있어 양질의 단백질 급원 식품임이 밝혀져 있으나, 산업적으로 곤충 단백질의 추출법 및 생리활성에 대한 기능성 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 알칼리 추출법을 이용하여 영양적으로 우수한 갈색거저리 유충 단백질을 보다 효율적으로 분리할 수 있는 조건을 조사하였으며, 분리된 단백질의 항염증 효능에 대한 기능성 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

갈색거저리 단백질의 알칼리 추출

탈지된 갈색거저리는 압착 탈지방법을 통해 얻었으며 탈지된 갈색거저리를 분쇄기로 분쇄한 후 사용하였다. 알칼리 추출 갈색거저리 단백질은 Gnanasbandam 및 Shen 등[7, 26]의 방법을 변형하여 추출하였다. 단백질을 용출하기 위하여 탈지 갈색거저리 분말 20 g에 100 ml의 증류수를 넣고 NaOH를 이용하여 pH 9.0으로 조정하였다. 이 혼합물을 상온에서 2시간 동안 교반하여 단백질을 용출한 다음, 12,000 rpm에서 원심분리 하여 상등액을 취하였다.

알칼리추출 단백질의 등전점 침전

알칼리 조건에서 추출된 탈지 갈색거저리 단백질은 등전점 침전을 위하여 HCl을 이용하여 pH 4.0으로 조정하였으며, 30분 동안 상온에서 방치한 다음 12,000 rpm에서 원심분리하여 침전 단백질을 얻었다. 얻어진 침전 단백질은 중량대비 1:2 (w/v)의 증류수(pH 4.0)를 가하여 여러 차례 수세한 후, 다시 원심분리 하여 침전물을 얻었고 다시 증류수를 가하여 충분히 균질화 하였다. 균질화한 단백질 수용액의 pH를 7.0으로 중화시키고 단백질 함량을 측정하였으며, 동결건조 후 Protease inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail, ThermoFisher)가 1% (v/v) 첨가된 물에 녹여서 실험에 사용하였다.

용출 pH에 따른 갈변도 측정

용출 pH에 따른 갈색거저리 유충 단백질의 갈변도는 Song 등[27]의 방법에 따라 단백질 수용액의 흡광도를 분광광도계를 이용하여 420 nm에서 측정하였다. 각 시료에 단백질 응집을 인한 파장의 산란을 최소화하기 위해 16%(w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)를 첨가하였으며, 대조구는 증류수에 16% SDS를 첨가하여 사용하였다.

단백질 함량 측정

단백질 함량은 bicinchoninic acid (BCA) 법으로 측정하였다. 시료 20 ul에 BCA reagent (bicinchoninic acid solution : copper(II) sulfate pentahydrate 4% solution=50 : 1, v/v) 160 ul를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 단백질 함량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준시료로 작성한 검량곡선을 이용하여 산출하였다.

세포배양

한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 마우스 대식세포 세포주 Raw 264.7은 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 5% CO₂ 조건하에서 37°C로 유지되는 배양기에서 배양하여 사용하였다.

MTS assay

갈색거저리 단백질이 Raw 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향은 Chao 등[3]의 방법을 응용하여 확인하였다. Raw 264.7 세포에 대한 갈색거저리 단백질의 세포독성 및 세포증식을 확인하기 위하여 Raw 264.7 세포를 96 well-plate에 6.0×10⁴ cells/well로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 10% FBS가 들어있는 배지에서 약 24시간 동안 배양하였다. 그 후 갈색거저리 단백질을 100, 500, 1,000 그리고 2,000 ug/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 추가 배양한 후 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) reagent를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

Nitric oxide (NO) assay

Raw 264.7 세포로부터 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 생성되는 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로써 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포는 DMEM 배지를 이용하여 8×10⁴ cells/well로 조절한 후 96 well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세포에 갈색거저리 단백질을 0.1, 0.5, 1 그리고 2 mg/ml의 농도로 1시간 처리한 후에 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 24시간 추가 배양 후 배양액 100 ul을 취하

여 Griess 시약과 반응 시킨 후 multi detector (Beckman, DTX 8800, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Nitrite 표준곡선을 이용하여 NO 생성량을 측정하였다.

Western blot analysis

Raw 264.7 세포를 1.2×10⁶ cells/well의 농도로 6 well-plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 갈색거저리 단백질을 1시간 동안 농도별로 전처리 한 후 LPS를 이용하여 염증 반응을 유도하였다. 염증반응이 유도된 Raw 264.7 세포를 PBS로 세척한 뒤 protease와 phosphatase inhibitor가 함유된 RIPA buffer를 사용하여 세포를 lysis하였고 12,000 rpm에서 원심 분리 후 상등액을 얻었다. 분리한 단백질은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량 하였으며, 동일 양의 단백질을 SDS-PAGE gel 전기영동을 수행하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transfer 한 후 비특이적 단백질에 대한 반응을 차단 시키기 위해 membrane을 5% skim milk 용액으로 1시간 blocking 한 후 COX-2, iNOS, phospho-ERK1/2, phospho-p38 MAPK, phospho-JNK, phospho-Akt antibody (1:1,000; Cell Signaling Technology, Denver, MA, USA), β-Actin, IκB antibody (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 항체를 4℃에서 overnight으로 배양하였고, 그 후 각 항체에 대한 2차 항체 (1:10,000; Promega, Maddison, WI, USA)를 반응 시킨 후 ECL kit를 이용하여 단백질 발현 변화를 확인 하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 3회 반복하여 측정하였고, 그 결과는 평균과 표준편차(mean ± SD)로 나타냈다. 실험군 간의 유의성 검정은 Student's t-test를 이용하였으며, p<0.05일 때 군 간의 차이가 유의적인 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

갈색거저리 유충 단백질 추출

갈색거저리 유충의 단백질 추출은 알칼리 추출법을 사용하였으며[7, 26] 추출시 pH 변화에 의한 단백질 특성 및 단백질 추출 함량의 변화를 확인하기 위해 각 시료를 pH 7, 8, 9, 10, 11 및 12로 나누어 용출하고 단백질을 정량 하였다. 그 결과 용출 pH가 증가할수록 단백질의 용출량이 증가 하였으나 용출 pH가 증가할 수록 갈변도 또한 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 pH 10 이후부터는 용출된 단백질의 갈변도가 급격히 증가하기 시작하였다(Fig. 1A). 용출 단백질의 갈변은 알칼리 조건에서 포도당과 필수아미노산인 lysine과의 glycosylamine 반응에 의한 것이며, 특히 lysine은 glycolysine으로 변형되어 체내 단백질 흡수량을 감소시키는 것으로 보고되어 있다[1]. 또한 높은 알칼리 용출 조건은 lysinoalanine과 같은

잠재독소물질을 생성 시킬 수 있으며, 섬유질과 같은 다른 성분들도 함께 용출되어 단백질의 품질을 떨어트리는 것으로 보고되고 있다[27]. 따라서 갈색거저리 유충 단백질의 알칼리 용출 pH는 갈변도가 본격적으로 증가하기 이전 구간인 pH 9가 적절한 것으로 보인다.

추출단백질의 회수를 위하여 용출단백질의 갈변도가 적은 pH 조건(pH 8-10)에서 용출시킨 각각의 시료를 분획당 세가지로 나누어 pH 2, 4 및 6에서 등전점 침전으로 단백질을 회수하였다(Fig. 1B). 그 결과 다양한 알칼리 조건에서 용출한 단백질을 pH 4로 침전시켰을 때 가장 많은 단백질이 침전되었음을 확인할 수 있었으나 회수한 단백질의 10-30%는 여전히 상등액에 남아 있었다. 비록 pH 10에서 용출한 단백질을 pH 4에서 침전시킬 경우 가장 높은 회수율을 나타내었지만 pH 10에서의 갈변도를 고려하여 알칼리를 이용한 갈색거저리 유충 단백질의 최적 추출조건은 용출 pH 9와 침전 pH 4로 결정하였다.

갈색거저리 단백질의 NO 생성 억제 및 세포생존율 분석

대식세포는 염증반응을 통하여 NO, PGE₂ 및 각종 cytokine 등의 염증 매개물을 생산하고 분비한다. 이러한 물질들의 생성 조절이 적절히 이루어지는 상태에서는 선천성 및 후천성

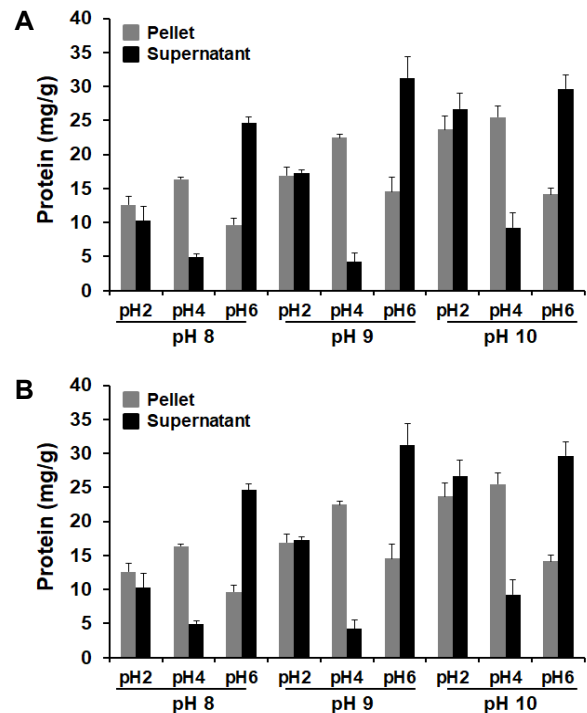


Fig. 1. Optimal condition of protein extraction on defatted *Tenebrio molitor* larvae by alkaline method. (A) Protein content and browning degree of the extracts obtained at different extraction pH values. (B) Comparison of the protein contents of the pellet and the supernatant obtained at different extraction pH and precipitation pH values. Results are shown as mean ± SD (n=3).

면역을 조절하는데 중요한 역할을 하지만, 과잉 생산 되었을 때에는 만성염증 및 자가면역질환 등을 유발하기도 한다 [8, 10]. 알칼리 추출법을 이용하여 분리한 갈색거저리 유충 단백질이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 대식세포에서 nitric oxide (NO) 생산과 세포 성장에 미치는 영향을 관찰 하였다. 그 결과 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에 0.1, 0.5, 1 그리고 2 mg/ml의 갈색거저리 단백질을 각각 처리한 결과, 농도의존적으로 NO의 생성이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 이러한 NO의 감소가 갈색거저리 단백질에 의한 세포생존을 변화 때문인지 확인 하기 위하여 Raw 264.7 세포를 96-well plate에 분주하고 24시간 배양 후 갈색거저리 단백질을 농도별로 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인 하였다(Fig. 2B). 그 결과, 갈색거저리 유충 단백질은 2 mg/ml의 농도에서도 독성을 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다. 따라서 갈색거저리 단백질의 항염증 효능 실험들에서 사용한 최고농도는 세포독성을 나타내지 않는 2,000 µg/ml 이하의 농도로 결정하였다.

갈색거저리 단백질에 의한 염증 단백질의 발현 감소

대식세포의 염증반응에서 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증반응을 심화시키는 것으로 알려져 있는 nitric oxide (NO)는 세포내 iNOS 단백질에 의해 생산 된다[16, 24, 30]. iNOS 단백질은 일반적인 상황에서 세포내에 존재하지 않으나 염증반응 조건에서 NF-κB 활성화로 발현이 유도되며 장시간 동안 다량의 NO를 생성하는 것으로 보고되어 있다. 이는 대식세포에서 LPS나 cytokine에 의해 염증성 매개물들이 과잉 생산되는 중요한 메커니즘이다[11]. COX는 arachidonic acid를 PGE2

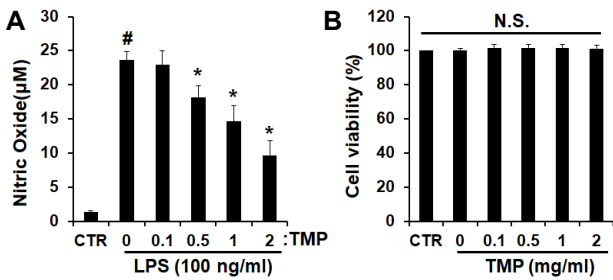


Fig. 2. *Tenebrio molitor* larvae protein (TMP) on the cell viability and NO production in Raw 264.7 macrophage cells. (A) Raw 264.7 macrophage cells (8×10^4 cells/well in a 96-well plate) were pretreated with TMP for 1 hr prior to incubation with LPS (100 ng/ml) for 24 hr. The nitrite in the culture media was measured with the Griess reagent. (B) Raw 264.7 macrophage cells (6×10^4 cells/well in a 96-well plate) were incubated with TMP (mg/ml) for 24 hr, and cell viability was assessed using MTS assay. Results are shown as mean \pm SD (n=3). [#]p<0.05 in comparison with control group. ^{*}p<0.05 in comparison with LPS group. CTR, control; LPS, lipopolysaccharides; N.S., no significant.

로 전환시키는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판을 형성, 위벽보호, 신장 기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하지만 COX-2는 염증과 같은 외부 스트레스가 주어질 경우 그 발현이 증가하는 것으로 보고되어 있다[20].

갈색거저리 유충 단백질이 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 대식세포로부터 생성되는 NO의 합성효소인 iNOS 단백질과 PGE2의 합성효소인 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 western blot을 통하여 확인하였다(Fig. 3). Raw 264.7 세포에 LPS를 단독으로 처리하여 염증반응을 유도 시켰을 때 대조군에 비해 각각 약 4-5배 이상 증가하였으며, 갈색거저리 유충 단백질을 농도별(0.1~2 mg/ml)로 함께 처리한 경우 단백질의 처리농도에 의존적으로 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 현저히 억제됨을 확인 할 수 있었다.

갈색거저리 유충 단백질에 의한 MAPKs 신호전달 감소

MAP kinases (JNK, ERK, p38)는 세포질에서 인산화되지 않은 상태로 존재하다가 LPS 등에 의해 자극이 가해지면 인산화되어 염증반응을 조절하는 중요한 인자이며 iNOS와 COX-2 발현이 조절되는 과정에서도 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되어 있다[19]. 따라서 갈색거저리 유충 단백질이 LPS에 의해 유도되는 염증반응에서 MAPKs의 활성화에 미치는 영

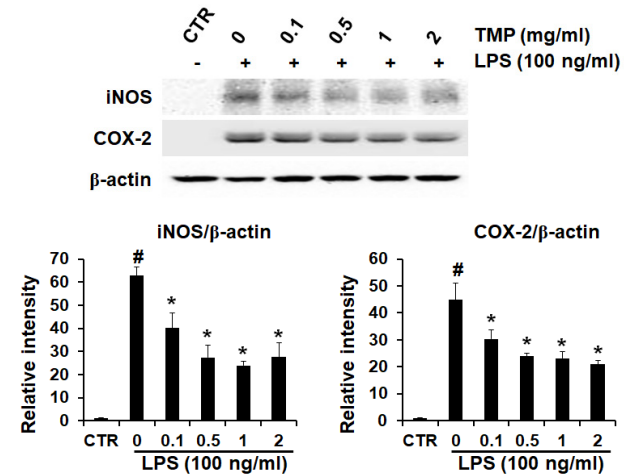


Fig. 3. Inhibitory effect of TMP on iNOS and COX-2 expression in LPS stimulated Raw 264.7 macrophage cells. Raw 264.7 cells (1.2×10^6 cells/well in a 6-well plate) were incubated for 24 hr, and the cells were treated with TMP (mg/ml) for 1 hr prior to incubation with LPS (100 ng/ml) for 24 hr. The expression level of iNOS and COX-2 were determined by Western blot. The data were normalized to β-actin. Results of densitometric analysis of Western blot are also shown (lower). CTR: control (non-treated sample). TMP: *Tenebrio molitor* larvae protein. Level of significance was identified statistically using Student's test. [#]p<0.05 in comparison with control group. ^{*}p<0.05, compared with the LPS group.

향을 알아보기 위해, LPS에 의해 증가하는 MAPKs의 인산화 변화를 Western blot을 통하여 확인하였다(Fig. 4). 그 결과 LPS의 처리에 의해서 증가한 MAPKs의 인산화가 갈색거저리 유충 단백질의 처리에 의해 농도의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 갈색거저리 유충 단백질이 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 MAPKs의 활성 경로 억제를 통해 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

갈색거저리 유충 단백질에 의한 AKT/NF-κB 신호전달 감소

대식세포의 염증반응에서 LPS에 의해 유도되는 AKT 인산화는 IκB kinase (IKK)의 활성을 증가시켜 최종적으로 NF-κB의 활성화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[14]. 일반적으로 NF-κB는 IκB와 결합하여 세포질에 존재하지만 염증 자극에 의하여 AKT/IKK가 활성화 되어 IκB에 인산화가 진행되면 IκB는 NF-κB로부터 분리되고 proteosome에 의해서 분해된다. 이때 자유로워진 NF-κB는 핵 내로의 이동이 촉진되어 전사조절 인자로 작용하면서 다양한 염증반응 매개 유전자의 발현을

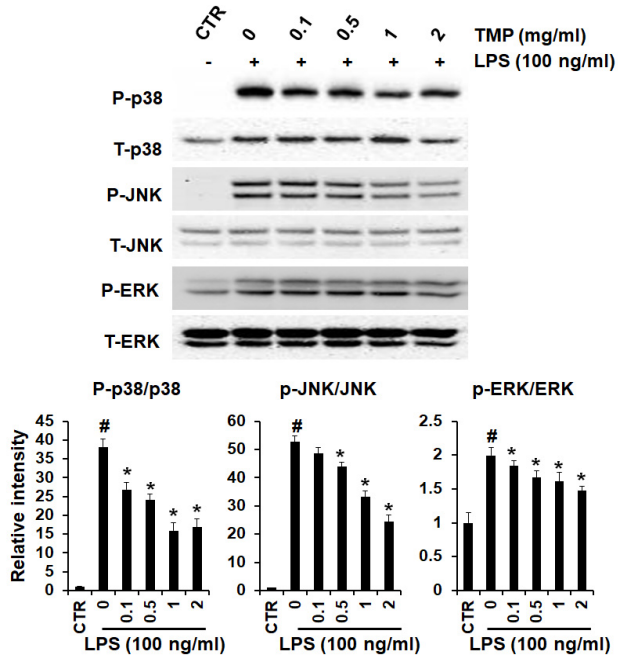


Fig. 4. Inhibitory effect of TMP on MAPKs signaling pathways. Raw 264.7 macrophage cells (1.2×10^6 cells/well in a 6-well plate) were incubated with the indicated concentration of TMP (mg/ml). Protein was then isolated at 30 min after LPS treatment, and phosphorylation of ERK, p38, and JNK was detected using Western blot. The data were normalized to total protein, respectively. Results of densitometric analysis of the Western blot are also shown (lower). CTR: control (non-treated sample). TMP: *Tenebrio molitor* larva protein. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$ in comparison with control group. * $p < 0.05$, compared with the LPS group.

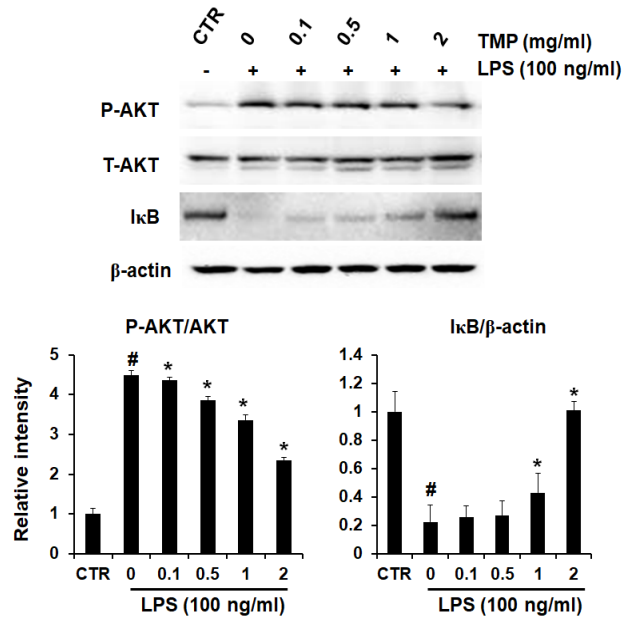


Fig. 5. Inhibitory effect of TMP on AKT/NF-κB signaling pathways. Raw 264.7 macrophage cells (1.2×10^6 cells/well in a 6-well plate) were incubated with the indicated concentration of TMP (mg/ml). Protein was then isolated at 30 min after LPS treatment, and phosphorylation of AKT and degradation of IκB was detected using Western blot. The data were normalized to total protein or β-actin, respectively. Results of densitometric analysis of the Western blot are also shown (lower). CTR: control (non-treated sample). TMP: *Tenebrio molitor* larva protein. Level of significance was identified statistically using Student's test. # $p < 0.05$ in comparison with control group. * $p < 0.05$, compared with the LPS group.

촉진시킨다[18, 21]. 그러므로 본 연구에서는 갈색거저리 유충 단백질이 LPS에 의해 유도되는 AKT 인산화와 IκB degradation에 미치는 영향을 western blot을 통하여 확인하였다(Fig. 5). AKT 인산화는 LPS 단독 처리군에서 증가 하였으나 갈색거저리 유충 단백질을 함께 처리한 경우 단백질 농도에 의존적으로 인산화가 감소하였으며, 이와 동반하여 LPS에 의해 유도된 IκB 단백질의 degradation이 갈색거저리 유충 단백질의 농도에 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 갈색거저리 유충 단백질이 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 AKT 인산화를 억제함으로써 IκB degradation을 조절한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ013110)의 지원에 의해 수행된 연구 결과물이며, 이에 감사 드립니다.

References

1. Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Ore, F. D., Benajiba, A. and Puigserver, A. 2001. Effects of pH on carmelization and maillard reaction kinetics in fructose lysine model system. *J. Food Sci.* **66**, 926-931.
2. Baek, M., Hwang, J. S., Kim, M. A., Kim, S. H., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2017. Comparative analysis of nutritional components of edible insects registered as novel foods. *J. Life Sci.* **27**, 334-338.
3. Chao, D., Bahl, P., Houllbrook, S., Hoy, L., Harris, A. and Austyn, J. M. 1999. Human cultured dendritic cells show differential sensitivity to chemotherapy agents as assessed by the MTS assay. *Br. J. Cancer* **81**, 1280-1284.
4. Chung, M. Y., Kwon, E. Y., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2013. Pretreatment conditions on the power of *Tenebrio molitor* for using as a novel food ingredient. *J. Seric. Entomol. Sci.* **51**, 9-14.
5. Chung, M. Y., Yoon, Y. I., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2014. Anti-obesity effect of *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae ethanol extract on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Entomol. Res.* **44**, 9-16.
6. Ghaly, A. E. 2009. The use of insects as human food in Zambia. *OnLine J. Biol. Sci.* **9**, 93-104.
7. Gnanasambandam, R. and Hettiarachchy, N. S. 1995. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: Preparation and properties. *J. Food Sci.* **60**, 1066-1069.
8. Hilliquin, P., Borderie, D., Hervann, A., Menkes, C. J. and Ekindjian, O. G. 1997. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **40**, 1512-1517.
9. Huis, A., Vanlterbeeck, J., Metens, E., Halloran, A. and Muir, G. 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. P67-80.
10. Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K. H., Kantarci, A. and VanDyke, T. E. 2004. Role for moesin in lipopolysaccharide stimulated signal transduction. *Infect. Immun.* **72**, 2312-2320.
11. Jew, S. S., Bae, O. N. and Chung, J. H. 2003. Anti-inflammatory effects of asiaticoside on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Raw-264.7 cell line. *J. Toxicol. Pub. Health* **19**, 33-37.
12. 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 rat. *Appl. Microscopy* **31**, 9-18.
13. Kang, M.A., Kim, M. J., Han, J. S. and Kim, A. J. 2017. Fatty acid composition and anti-inflammatory effects of the freeze dried *Tenebrio molitor* Larva. *Kor. J. Food. Nutr.* **30**, 251-256.
14. Kim, D. and Chung, J. 2002. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 106-115.
15. Kim, M., Youn, K., Yun, E. Y., Hwang, J. S., Ahn, M. R. and Jeong, W. S. 2014. Effects of solvent fractions of *Allomyrina dichotoma* larvae through the inhibition of in vitro BACE1 and β -amyloid (25-35)-induced toxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Entomol. Res.* **44**, 23-30.
16. Kole, L., Giri, B., Manna, S. K., Pal, B. and Ghosh, S. 2011. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38 MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NF κ B nuclear translocation. *Eur. J. Pharmacol.* **653**, 8-15.
17. Lee, J. E., Jo, D. E., Lee, A. J., Park, H. K., Youn, K. and Yun, E. Y. 2015. Hepatoprotective and anticancer activities of *Allomyrina dichotoma* larvae. *J. Life Sci.* **25**, 307-316.
18. Liden, J., Rafter, I., Truss, M., Gustafsson, J. A. and Okret, S. 2000. Glucocorticoid effects on NF-kappaB binding in the transcription of the ICAM-1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 1008-1014.
19. Marina, L., Kamal, R. M., Andrew, F., Gary, B., Jeremy, S., and Andrew, R. C. 2000. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4265-4278.
20. Nørregaard, R., Kwon, T. H. and Frøkiær, J. 2015. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Res. Clin. Pract.* **34**, 194-200.
21. Pruetz, S. B., Fan, R. and Zheng, Q. 2003. Characterization of glucocorticoid receptor translocation, cytoplasmic I κ B, nuclear NF κ B, and activation of NF κ B in T lymphocytes exposed to stress-inducible concentrations of corticosterone *in vivo*. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 1-16.
22. Ryu, H. J., Song, H. J. and Lee, S. O. 2019. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Allomyrina dichotoma* larvae. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **48**, 410-417.
23. Seo, M., Kim, J., Moon, S. S., Hwang, J. S. and Kim, M. A. 2017. Intraventricular administration of *Tenebrio molitor* larvae extract regulates food intake and body weight in mice with high-fat diet-induced obesity. *Nutr. Res.* **44**, 18-26.
24. Schmidt, H. and Walter, U. 1994. NO at work. *Cell* **78**, 919-925.
25. Seo, M., Goo, T. W., Chung, M. Y., Baek, M., Hwang, J. S., Kim, M. A. and Yun, E. Y. 2017. *Tenebrio molitor* larvae inhibit adipogenesis through AMPK and MAPKs signaling in 3T3-L1 adipocytes and obesity high-fat diet-induced obese mice. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 518.
26. Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y. and Chen, J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chem.* **107**, 929-938.
27. Song, P. S., Chichester, C. O. and Standtman, F. H. 1996. Kinetic behavior and mechanism of inhibition in the Maillard reaction. I. Kinetic behavior of the reaction between D-glucose and glycine. *J. Food Sci.* **31**, 906-913.
28. Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Oi, M., Burks, W. and Siebenmorgen, T. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 411-416.
29. Yoo, J. M., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2013. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 249-254.
30. Yoon, S. B., Lee, Y. J., Park, S. K., Kim, H. C., Bae, H., Kim H. M., Ko, S. G., Choi, H. Y., Oh, M. S. and Park, W. 2009.

Antiinflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **125**, 286-290.

Kwon, O. J., Cho, Y. J. and An, B. J. 2016. Antioxidant capacity and Raw 264.7 macrophage anti-inflammatory effect of the *Tenebrio Molitor*. *Kor. J. Food Preserv.* **23**, 890-898.

31. Yu, J. M., Jang, J. Y., Kim, H. J., Cho, U. H., Kim, D. I.,

초록 : 알칼리 법으로 추출한 갈색거저리 유충 단백질의 항염증 효능

서민철[†] · 이화정[†] · 이준하 · 백민희 · 김인우 · 김선영 · 황재삼 · 김미애*
(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

본 연구에서는 탈지된 갈색거저리 유충으로부터 효율적인 단백질 추출법 확립을 위한 최적 pH 조건을 조사하였다. 단백질 추출 pH 조건은 7부터 12까지 사용하였으며, 단백질 침전 pH는 2, 4, 그리고 6을 사용하였다. 이러한 조건에서 추출한 단백질의 함량, 갈변도 및 회수율을 분석한 결과 갈색거저리 유충 단백질의 최적 추출 조건은 단백질의 갈변도를 최소화 할 수 있으며 32.4%의 회수율을 나타내는 용출 pH 9.0와 침전 pH 4.0로 결정하였다. 다음으로 알칼리 추출법으로 추출한 갈색거저리 유충 단백질의 항염증 효능을 검토하였다. 갈색거저리 유충 단백질이 LPS에 의해 활성화 되는 대식세포의 염증반응 개선효과를 확인하기 위하여 염증매개 인자인 nitric oxide (NO)의 생성 및 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량을 측정하였다. 그 결과 갈색거저리 유충 단백질은 세포독성 없이 NO의 생성을 억제 하였으며, MAPK 와 NF-κB 신호전달 억제를 통하여 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량을 감소시켰다. 이러한 연구결과는 갈색거저리 유충 단백질이 항염증 치료제 및 단백질 보충제 개발을 위한 잠재적 가능성을 가지고 있는 것으로 사료된다.