

## 식용곤충별 단백질수분해물의 항산화 활성 비교

장현영<sup>1,†</sup> · 박채은<sup>1,†</sup> · 이승욱<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 식품가공학과

### Comparison of antioxidant capacity of protein hydrolysates from 4 different edible insects

Hyun-Young Jang<sup>1,†</sup>, Chae-Eun Park<sup>1,†</sup>, and Syng-Ook Lee<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Keimyung University

**Abstract** The present study was conducted to compare antioxidant capacities of protein hydrolysates from four different edible insects (*Protaetia brevitarsis* larvae, *Allomyrina dichotoma* larvae, *Gryllus bimaculatus* imago, and *Tenebrio molitor* larvae) which have recently been registered as food varieties in Korea. Protein hydrolysates were prepared from each insect using enzymatic hydrolysis using alcalase, and were then separated into a fraction containing  $\leq 3$  kDa. According to  $RC_{50}$  values and trolox equivalent antioxidant capacity results obtained from five different antioxidant analyses, the *Gryllus bimaculatus* (GB) hydrolysate showed relatively high levels of antioxidant capacity and, in particular, the GB hydrolysate showed considerably strong antioxidant activities in 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and in ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The GB hydrolysate also showed the strongest inhibitory effect on peroxidation of linoleic acid, and its rate of inhibition at 100  $\mu\text{g/mL}$  on day 3 of treatment was 60.26%. These results suggest that protein hydrolysates from edible insects including GB represent potential sources of natural antioxidants.

**Keywords:** edible insects, protein hydrolysates, *Gryllus bimaculatus*, antioxidant, alcalase

## 서 론

활성산소는 생명유지에 필요한 에너지를 얻는 호흡과정을 통해서도 항상 생성되며, 과잉 발생하여 제거되지 못한 경우 산화적 스트레스를 야기하여 심장병, 파킨슨 병, 알츠하이머 병, 암 등 여러 질병을 유발하는 원인으로 작용할 수 있다(Berenbaum과 Eisner, 2008; Jang 등, 2010). 활성산소를 제거하는 항산화 물질은 주로 식물 추출물, 향료, 발효생산물 등에 포함된 flavonoid 또는 페놀계 화합물로 알려져 있으나, 일부 동물성 및 식물성 단백질을 효소 분해하여 얻어진 펩타이드에서도 항산화 활성이 나타난다고 보고된다(Kim 등, 2000).

흔히 사용되는 항산화제는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butylhydroquinone (TBHQ) 등이 있으며, 국내에서는 비타민 C와 비타민 E 외에 9종을 허용하고 있다. 합성 항산화제는 항산화 효과가 뛰어난 것에 반해 발암성과 부작용으로 문제시되고 있으며, 천연 항산화제는 부작용이 거의 없으나, 비싼 가격과 지용성이라는 이용 상의 제약으로

인해 새로운 천연 항산화제 개발에 대한 관심이 증가하고 있다(Zeng 등, 2011; Kim 등, 2000).

지구상에 존재하는 전체 동물계 중 가장 많은 종류를 가진 곤충은 예로부터 식품, 농업, 산업, 의학 등에 이용되어 왔으며, 사육 시 생산비용이 적고 환경조건에 따라 생장 및 번식 속도를 조절할 수 있고 배설물로 인한 오염이 적다는 장점이 있다. 이로 인해 최근 국제 식량 농업기구(FAO)에서 곤충을 미래 식량자원으로 발표하였고, 2019년 현재 식품의약품안전처에서는 메뚜기, 식용누에번데기, 백강잠, 갈색거저리 유충, 쌍별귀뚜라미, 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이 유충 총 7종의 곤충을 식품원료로 인정하고 있다(Yun과 Hwang, 2016). 식용곤충은 다량의 단백질을 함유하고 있으며, 그 외 불포화지방산 및 다량의 미네랄을 함유하는 고급 단백질원으로 알려져 있다(Park 등, 2006). 국내에서는 식용곤충의 항염증, 미백, 항산화, 항암 및 간 보호 효과 등 각각의 생리활성에 대한 연구가 보고되어 있으나(Sung 등, 2016; Lee 등, 2015; Lee 등, 2017), 4종의 식용곤충별 단백질수분해물의 항산화 활성에 대한 비교 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 4종의 식용곤충인 흰점박이꽃무지 유충(*Protaetia brevitarsis* larvae), 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma* larvae), 쌍별귀뚜라미 성충(*Gryllus bimaculatus* imago) 및 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor* larvae)으로부터 단백질수분해물을 제조하여 한외여과막을 이용해 3 kDa 이하로 정제하였다. 이후 다양한 활성산소종을 대상으로 소거 활성 측정과 FRAP (ferric reducing antioxidant power)법에 의한 환원력 및 linoleic acid에 대한 산화 억제 활성 측정을 통해 4종 식용곤충 단백질수분해물의 항산화 활성을 비교 분석하였다.

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Syng-Ook Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea  
Tel: +82-53-580-5570  
Fax: +82-53-580-5372  
E-mail: synglee@kmu.ac.kr

Received June 17, 2019; revised August 14, 2019;  
accepted August 19, 2019

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용한 주 시료인 열풍 건조된 흰점박이꽃무지 유충과 장수풍뎡이 유충은 (주)유니버살 팜스밀(Sunchang, Korea), 쌍별귀뚜라미는 (주)MG 내추럴(Damyang, Korea), 갈색거저리 유충은 영농조합법인 예천곤충나라(Yecheon, Korea)에서 구입하여 -20°C 동결고에 보관하여 사용하였다. Alcalase 단백질 분해 효소는 Novo사 제품을 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. Sodium phosphate monobasic dehydrate, sodium phosphate dibasic dehydrate, absolute alcohol, acetic acid, sodium bicarbonate, methyl alcohol (MeOH)와 hydrochloric acid (HCl)는 Duksan (Ansan, Korea), trichloroacetic acid (TCA)는 Samchun (Pyeongtaek, Korea), linoleic acid와 sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)는 G-Biosciences (St. Louis, MO, USA), 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ)는 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약들은 모두 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 식용곤충별 단백질 가수분해물 제조

열풍 건조된 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎡이 유충, 쌍별귀뚜라미 성충과 갈색거저리 유충 분말을 증류수에 현탁하여 4% (w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 90°C에서 20분간 중탕시켜 고유의 효소를 불활성화 시켰다. 기질용액에 기질 대비 1% (v/w)의 효소(alcalase)를 첨가하여 55°C, 100 rpm에서 8시간 동안 가수분해한 후 90°C에서 20분간 효소를 불활성화 시켰다. 방랭한 후 고형분 제거를 위해 단백질가수분해물을 13,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 상등액은 저분자 펩타이드로 분리하기 위해 cell strainer로 필터한 후 membrane filter (Amicon Ultra-15, EMD Millipore Co., Burlington, MA, USA)를 이용하여 5,000×g에서 2시간 동안 원심분리 함으로써 3 kDa 이하의 단백질가수분해물을 얻었다. 단백질가수분해물을 72시간 동안 동결 건조하였으며 -20°C의 동결고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### SDS-PAGE

식용곤충별 단백질의 가수분해 특성을 확인하기 위하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 가수분해물의 단백질 패턴을 측정하였다. SDS-PAGE는 15% gel을 사용하였으며, 각 가수분해물을 3,000×g, 4°C, 10분 원심분리하여 얻은 상등액 18 µL를 gel에 loading 하였다. 80 V에서 약 1시간 전기영동한 후 0.1% coomassie brilliant blue를 사용하여 염색하고 탈색액(acetic acid:methanol:water=10:30:60)으로 탈색하였다. 이때 molecular weight marker는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)의 제품을 이용하였다.

### 단백질의 가수분해도 측정

TNBS 방법을 이용하여 효소제 처리 시간에 따른 식용곤충별 단백질가수분해물의 가수분해도를 측정하였다(Rath 등, 2008). 각 가수분해물을 3,000×g, 4°C, 10분 원심분리하여 상등액만 취하여 이용하였다. 100 mM sodium bicarbonate (pH 8.5) 990 µL와 1% TNBS 10 µL를 혼합(v/v)하여 0.01% TNBS로 제조하고, TNBS 50 µL와 시간별로 취한 반응혼합액 100 µL를 섞어 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응정지를 위해 10% SDS 50 µL와 1 N HCl 25

µL를 첨가한 후 microplate spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 335 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### DPPH 라디칼 소거 활성 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Hatano 등 (1988)의 방법에 따라 DPPH에 대한 환원력을 측정하는 것으로 99% MeOH로 희석된 시료를 96 well plate에 160 µL씩 분주하였다. 시료가 분주된 well에 MeOH로 희석한 0.2 mM DPPH 용액 40 µL를 넣고 실온에서 30분간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 식용곤충별 단백질가수분해물의 라디칼 소거 활성은 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC<sub>50</sub>값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위한 양성대조군으로서 trolox를 사용하였으며, trolox를 이용하여 표준 곡선을 작성한 후 시료의 항산화력(trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)을 계산하여 µg TE/mg으로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%)=100-{(후기 흡광도-초기 흡광도)/control 흡광도\*100}

### ABTS 라디칼 소거 활성 측정

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 라디칼 소거 활성 실험은 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 최종 농도가 7 mM인 ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 각각 혼합한 후 실온인 암소에서 12~16시간 동안 방치하여 라디칼을 형성시킨 후 ABTS 용액의 농도는 사용하기 직전에 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 180 µL에 시료 20 µL를 가하여 1분 동안 30°C에 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 식용곤충별 단백질가수분해물의 라디칼 소거 활성은 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC<sub>50</sub>값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위한 양성대조군으로서 trolox를 사용하였으며, trolox를 이용하여 표준 곡선을 작성한 후 시료의 항산화력(TEAC)을 계산하여 µg TE/mg으로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거 활성(%)=100-(시료 흡광도/control 흡광도\*100)

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거 활성 측정

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 소거 활성 측정은 Müller (1985)의 방법에 따라 증류수에 농도별로 희석한 시료 20 µL, PBS 100 µL, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 µL를 96 well plate에 가한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 각 well에 1.25 mM ABTS 30 µL와 1 U/mL peroxidase 30 µL를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후, microplate spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Peroxidase는 PBS로 희석하여 control과 반응 후 흡광도 값을 1.0~1.3 사이가 되도록 맞춰준 후 사용하였다. 이때 활성비교를 위한 양성대조군으로서 trolox를 사용하였으며, trolox를 이용하여 표준 곡선을 작성한 후 시료의 항산화력(TEAC)을 계산하여 µg TE/mg으로 나타내었다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거 활성(%)=100-{(시료 흡광도-blank 흡광도)/control 흡광도\*100}

### FRAP법에 의한 환원력 측정

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)법은 Benzie와 Strain (1996)의 방법을 사용하였다. FRAP reagent는 300 mM sodium acetate와 300 mM acetic acid를 혼합하여 제조한 300 mM acetate buffer와 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ, 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 10:1:1 비율(v/v/v)로 혼합하여 사용하였다. 시료 40 µL와 증류수 40 µL, FRAP reagent 100 µL를 가하여 37°C의 incubator에서 4분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위해 양성대조군으로 trolox를 사용하였으며, trolox를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 시료의 항산화력(TEAC)을 계산하여 µg TE/mg으로 나타내었다.

### Linoleic acid에 대한 산화 억제 활성 측정

Linoleic acid에 대한 산화 억제 활성을 확인하기 위해 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 2 mL과 5% linoleic acid 1 mL, absolute alcohol 1 mL, 시료 1 mL을 혼합한 후 40°C에서 100 rpm으로 진탕하며 하루 간격으로 각 시료의 linoleic acid에 대한 산화 억제 활성을 측정하였다. 20% TCA (w/v) 100 µL, 0.8% thiobarbituric acid (TBA, w/v) 100 µL와 linoleic acid 반응 기질 용액 50 µL을 잘 혼합하여 95°C 이상에서 20분 반응시킨 후 20°C, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 180 µL의 상등액을 흡광도 532 nm에서 측정하였다. 이때 활성비교를 위한 양성대조군으로서 trolox를 사용하였다.

### 통계분석

모든 데이터는 최소 3번 반복하여 평균과 표준오차(mean±SE)로 나타내었으며, 통계 분석에는 SPSS Statistics 23 (Statistical Package for the Social Science, Version 24.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)가 사용되었다. 또한 그룹 간의 유의성 차이 검증에는 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 사용하였으며, Duncan's multiple range test 방법을 통한 사후 검증을 시행하였다. 또한 95% ( $p < 0.05$ )의 유의수준에서 각 구간의 유의적 차이를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 식용곤충별 단백질가수분해물 제조 특성

선행연구에서 다른 효소군보다 alcalase를 이용한 단백질가수분해물이 다량의 저분자 펩타이드를 함유하고, 가수분해도가 월등히 높은 것을 확인하였다. 또한 항산화 활성은 비슷하거나 보다 우수한 활성을 보였다(Yu 등, 2017; Lee 등, 2017; Ryu 등, 2019). 따라서, 단백질 분해 효소원으로서 alcalase를 선택하여 단백질가수분해물을 제조하였다.

효소 처리 전과 8시간 반응시킨 식용곤충별 단백질가수분해물의 특성을 확인하고자 SDS-PAGE를 실시하여 식용곤충별 단백질가수분해물의 SDS-PAGE 패턴을 Fig. 1에 나타냈다. 식용곤충별 단백질가수분해물을 비교한 결과, 8시간 반응시킨 모든 식용곤충 단백질가수분해물에서 10 kDa 이상의 단백질은 거의 나타나지 않았으며, 효소 처리 전보다 전체적인 단백질 밴드가 나타나지 않은 것을 통해 가수분해가 충분히 일어났음을 알 수 있었다. 또한, 효소 처리 전 4종의 식용곤충 단백질가수분해물 모두 10~15 kDa 사이의 밴드가 선명하여 저 분자량의 펩타이드를 많이 함유하고 있음을 확인하였다.

단백질이 가수분해되면 가수분해도에 비례하여 available amino group이 증가하여 펩타이드의 함량을 나타내는 지표가 될 수 있

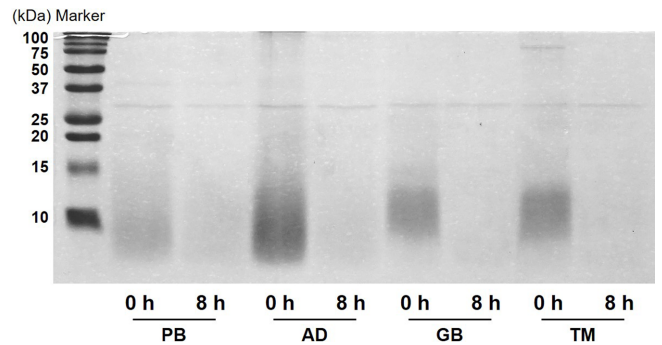


Fig. 1. Effect of alcalase on SDS-PAGE profile of four edible insects protein hydrolysates. SDS-PAGE patterns on 15% gel of four edible insects protein hydrolysates.

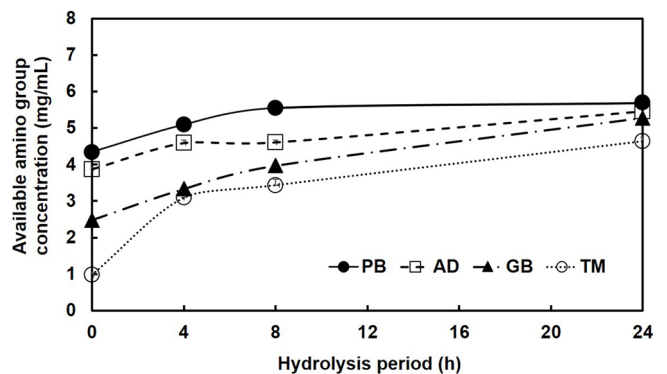


Fig. 2. Production of peptides from four edible insects by alcalase. Each insect was hydrolyzed by alcalase for 8 hours at 55°C. Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a-c) are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. PB=*Protaetia brevitarsis* larvae, AD=*Allomyrina dichotoma* larvae, GB=*Gryllus bimaculatus* imago, TM=*Tenebrio molitor* larvae.

다(Yu 등, 2017; Lee 등, 2017). 단백질의 가수분해도는 펩타이드 결합이 분해되는 비율을 말하며, 주로 TNBS법을 사용한다. TNBS법은 가수분해물의 1차 아민과 TNBS의 결합으로 형성된 chromophore를 흡광도로 측정하는 방법이다(Alder-Nissen, 1979). 식용곤충별 단백질가수분해물의 시간에 따른 가수분해도를 TNBS법을 이용해 0, 4, 8, 24시간 별로 측정하여 Fig. 2에 나타냈다. 8시간 가수분해하였을 때 실제 생산된 저분자 펩타이드 생산량을 tyrosine 함량으로 환산한 결과, 갈색거저리 유충 2.45 mg/mL, 쌍별귀뚜라미 성충 1.48 mg/mL, 흰집박이꽃무지 유충 1.20 mg/mL, 장수풍뎅이 유충 0.74 mg/mL 순으로 나타났다. 효소 무처리 시, 각 곤충별 펩타이드 생성량 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(data not shown). 따라서 alcalase를 처리하여 단백질가수분해물을 제조하였을 때 저분자 펩타이드 생산 효율은 갈색거저리 유충이 가장 우수했고, 장수풍뎅이 유충이 가장 낮음을 확인하였다. 또한, 단백질 분해효소를 이용한 가수분해는 8시간 이내에 충분히 이루어진다는 Yu 등(2017)과 Lee 등(2017)의 선행연구와 동일한 결과를 보였다. 최종적으로 8시간 가수분해하여 단백질가수분해물을 제조하였고, 저분자량 펩타이드가 체내로 쉽게 흡수되고 체내 이용률이 높다는 연구 결과에 따라 단백질가수분해물을 분자량 3 kDa 이하로 환의여과한 후 동결 건조하여 항산화 실험에 이용하였다.

**Table 1. DPPH radical scavenging activities of the alcalase hydrolysates from four edible insects**

Samples <sup>1)</sup>	RC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>2)</sup>	TEAC (µg TE/mg) <sup>3)</sup>
PB	87.60±1.12 <sup>b4)</sup>	22.58±0.16 <sup>b</sup>
AD	460.35±9.29 <sup>d</sup>	3.92±0.14 <sup>c</sup>
GB	34.44±0.34 <sup>a</sup>	59.14±0.59 <sup>a</sup>
TM	445.10±3.45 <sup>c</sup>	4.08±0.09 <sup>c</sup>
Trolox	1.96±0.03	-

<sup>1)</sup>PB=*Protaetia brevitarsis* larvae, AD=*Allomyrina dichotoma* larvae, GB=*Gryllus bimaculatus* imago, TM=*Tenebrio molitor* larvae.

<sup>2)</sup>Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction.

<sup>3)</sup>Trolox equivalent antioxidant capacity.

<sup>4)</sup>Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a-d) in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

**Table 2. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of the alcalase hydrolysates from four edible insects**

Samples <sup>1)</sup>	RC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>2)</sup>	TEAC (µg TE/mg) <sup>3)</sup>
PB	34.54±0.09 <sup>a4)</sup>	134.28±0.33 <sup>c</sup>
AD	32.26±0.30 <sup>c</sup>	138.46±1.52 <sup>c</sup>
GB	29.51±0.19 <sup>b</sup>	168.39±0.62 <sup>b</sup>
TM	28.15±0.47 <sup>a</sup>	169.09±2.24 <sup>a</sup>
Trolox	5.16±0.02	-

<sup>1)</sup>PB=*Protaetia brevitarsis* larvae, AD=*Allomyrina dichotoma* larvae, GB=*Gryllus bimaculatus* imago, TM=*Tenebrio molitor* larvae.

<sup>2)</sup>Concentration required for 50% reduction of ABTS<sup>+</sup> at 1 min after starting the reaction.

<sup>3)</sup>Trolox equivalent antioxidant capacity.

<sup>4)</sup>Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a-d) in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

**식용곤충별 단백질수분해물의 활성산소종 소거 활성**

DPPH는 자유 라디칼이며 실온에서 안정하고 수용성 용매가 아닌 유기 용매에만 용해되며, 항산화 물질이 존재할 때 보라색이 노란색으로 얼어진다. DPPH 라디칼 소거 활성 측정법은 천연소재의 항산화 활성 측정에 적합하고 간단하며, 재현성이 좋아 항산화 활성 측정에 가장 많이 이용되는 방법 중 하나이다(Abdalla 과 Roozen, 1999). DPPH 라디칼 소거 활성은 trolox를 기준 물질로 하여 각 시료의 항산화력을 TEAC값으로 환산한 결과를 Table 1에 나타냈다. TEAC값은 쌍별귀뚜라미 성충, 흰점박이꽃무지 유충, 갈색거저리 유충과 장수풍뎅이 유충 순으로 각각 59.14, 22.58, 4.08, 3.92 µg TE/mg으로 나타났다. 쌍별귀뚜라미 성충과 흰점박이꽃무지 유충은 유의적 차이를 보였으나, 장수풍뎅이 유충과 갈색거저리 유충은 유의적 차이가 보이지 않았다. 쌍별귀뚜라미 성충과 장수풍뎅이 유충의 활성 차이는 약 15배 정도로, 쌍별귀뚜라미 성충이 가장 우수한 활성을 나타나는 것을 확인하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성은 ABTS와 potassium persulfate가 암소에서 반응하여 생성된 짙은 청록색의 ABTS 라디칼이 시료 속에 함유된 항산화 물질에 의해 소거되어 청록색이 무색으로 탈색되는 것을 흡광도로 측정한 방법이다(Yu 등, 2017; Lee 등, 2017). ABTS는 친수성 용매와 유기 용매에 용해되어 친수성, 친유성 물질 모두의 항산화 활성 측정이 가능하여 널리 이용되는 방법이다(Yi 등, 2016). ABTS 라디칼 소거 활성은 trolox를 기준 물질로 하여 시료의 항산화력을 TEAC값으로 환산한 결과를 Table 2에 나타냈다. TEAC값은 갈색거저리 유충, 쌍별귀뚜라미 성충,

**Table 3. Hydrogen peroxide scavenging activities of the alcalase hydrolysates from four edible insects**

Samples <sup>1)</sup>	RC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>2)</sup>	TEAC (µg TE/mg) <sup>3)</sup>
PB	40.24±0.79 <sup>a4)</sup>	208.03±7.74 <sup>NS</sup>
AD	35.68±0.82 <sup>a</sup>	215.12±3.42
GB	38.92±1.15 <sup>bc</sup>	214.65±4.71
TM	36.46±0.08 <sup>ab</sup>	213.21±3.58
Trolox	9.61±0.10	-

<sup>1)</sup>PB=*Protaetia brevitarsis* larvae, AD=*Allomyrina dichotoma* larvae, GB=*Gryllus bimaculatus* imago, TM=*Tenebrio molitor* larvae.

<sup>2)</sup>Concentration required for 50% reduction of ABTS<sup>+</sup> at 10 min after starting the reaction.

<sup>3)</sup>Trolox equivalent antioxidant capacity.

<sup>4)</sup>Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a-c, NS: No significance) in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

**Table 4. Ferric reducing antioxidant power of the alcalase hydrolysates from four edible insects**

Samples <sup>1)</sup>	FRAP (µM FeSO <sub>4</sub> /mg) <sup>2)</sup>	TEAC (µg TE/mg) <sup>3)</sup>
PB	84.00±1.14 <sup>b4)</sup>	12.97±0.14 <sup>b</sup>
AD	30.17±0.74 <sup>c</sup>	5.43±0.12 <sup>c</sup>
GB	144.98±4.64 <sup>a</sup>	21.14±0.64 <sup>a</sup>
TM	15.95±0.07 <sup>d</sup>	3.54±0.03 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>PB=*Protaetia brevitarsis* larvae, AD=*Allomyrina dichotoma* larvae, GB=*Gryllus bimaculatus* imago, TM=*Tenebrio molitor* larvae.

<sup>2)</sup>Ferric reducing antioxidant power.

<sup>3)</sup>Trolox equivalent antioxidant capacity.

<sup>4)</sup>Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a-d) in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

장수풍뎅이 유충과 흰점박이꽃무지 유충 순으로 각각 169.09, 168.39, 138.46, 134.28 µg TE/mg으로 나타났다. 따라서, 쌍별귀뚜라미 성충과 갈색거저리 유충의 활성이 상대적으로 우수한 것을 확인하였고 흰점박이꽃무지 유충과 장수풍뎅이 유충 간의 유의적 차이가 없었다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 활성산소 중의 하나로 라디칼이 아니며, 다양한 외부요소나 superoxide dismutase와 같은 여러 산화효소에 의해 정상세포의 mitochondria나 peroxisome에서 생성된다. DNA 및 단백질 손상을 유발하는 등(Yu 등, 2017; Lee 등, 2017; Gülçın 등, 2003) 생체 내에 매우 독성이 있어 빠르게 제거되어야 하고 UV에 노출되거나 hydroxyl radical (OH)로 전환되면 위험성이 커진다고 알려져 있다(Halliwell 등, 2000). 본 연구에서는 식용곤충별 단백질수분해물의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거 활성을 측정하고자 peroxidase의 기질인 ABTS를 이용하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거 활성은 trolox를 기준 물질로 하여 시료의 항산화력을 TEAC값으로 환산한 결과를 Table 3에 나타냈다. TEAC값은 장수풍뎅이 유충, 쌍별귀뚜라미 성충, 갈색거저리 유충과 흰점박이꽃무지 유충 순으로 각각 215.12, 214.65, 213.21, 208.03 µg TE/mg으로 나타나 식용곤충별로 유의적인 차이를 보이지 않았다.

FRAP법은 Benzie와 Strain에 의해 고안된 방법으로 자유 라디칼을 직접 소거하는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성법과 달리, 산화 및 환원 반응에 의한 활성을 측정하는 것이다(DeGraft-Johnson 등, 2007). 즉, 환원력을 측정하는 것으로 낮은 pH에서 ferric-tripyridyltriazine (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ)가 환원제에 의해 ferrous tripyridyltriazine (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ)로 환원되어 파란색으로 발색되는 원리를 이용한 방법이며, 간단하면서도 재현성이 높다는 장점이 있다(Benzie

와 Strain, 1996; Heo 등, 2008). FRAP법에 의한 시료의 항산화력은 기준 물질인 trolox로 환산하여 TEAC값으로 Table 4에 나타났다. TEAC값은 쌍별귀뚜라미 성충, 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이 유충과 갈색거저리 유충 순으로 각각 21.14, 12.97, 5.43, 3.54  $\mu\text{g TE/mg}$ 으로 나타났다. 쌍별귀뚜라미의 활성이 가장 우수했으며, 이는 가장 낮은 활성을 띄는 갈색거저리 유충보다 5.97 배 높았다.

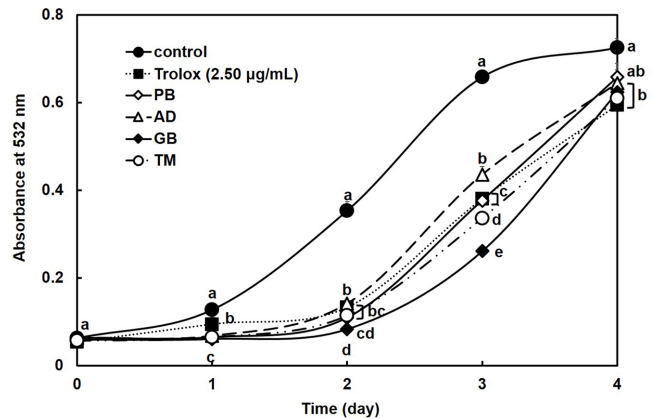
따라서, DPPH법과 FRAP법에서는 쌍별귀뚜라미 성충, ABTS 라디칼 소거 활성은 갈색거저리 유충이 우수한 활성을 보였으나,  $\text{H}_2\text{O}_2$  소거 활성에서는 식용곤충 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 위 네 가지 항산화 측정법에서 모두 같은 경향이 나타나지는 않았으며, 가장 우수한 펩타이드 생산량을 보인 갈색거저리 유충은 ABTS법에서만 우수한 활성을 보여, 펩타이드 생산량과 항산화 활성 간의 상관관계가 낮은 것을 알 수 있었다. 쌍별귀뚜라미 성충은 DPPH법과 FRAP법에서 월등히 우수한 항산화 활성을 보였고 이 두 가지 측정법은 electron transfer 방법인 반면, ABTS법과  $\text{H}_2\text{O}_2$  소거 활성은 hydrogen atom transfer 방법으로 작용 기전이 달라 활성의 차이가 나타난 것으로 보인다(Badarinath 등, 2010). 또한, 가수분해 시 생산된 아미노산의 종류 및 배열 등에 의해 항산화 활성이 달라질 수 있으므로(Baek 등, 2019) 펩타이드 생산량보다 생산된 아미노산의 배열이 활성에 미치는 영향이 큰 것으로 판단된다. 따라서 월등히 우수한 활성을 보인 쌍별귀뚜라미 성충 단백질가수분해물이 항산화 활성을 띄는 아미노산 및 펩타이드를 다량 함유하고 있는 것으로 사료된다.

#### Linoleic acid에 대한 산화 억제 활성

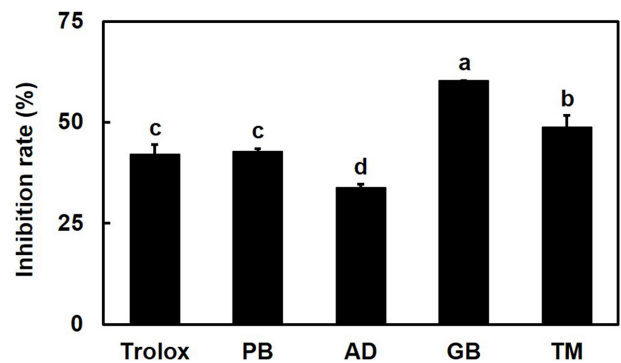
지질의 산화는 식품의 품질저하의 중요한 화학적 요인 중 하나로 불포화지방산을 다량함유하고 있는 식품에서 쉽게 산화해 과산화물을 형성하고 산화분해, 중합반응에 의해 산패취와 독성을 유발한다. 지질 산화 초기에 발생하는 과산화물은 ferrous chloride ( $\text{Fe}^{2+}$ )를 ferric chloride ( $\text{Fe}^{3+}$ )로 산화시켜 적갈색을 띄게 하고, 지질 산화가 진행될수록 carbonyl 화합물 중 malonaldehyde와 같은 저분자 활성화합물이 TBA와 결합하여 적색 화합물을 형성하게 된다(Cho와 Park, 2000; Yu 등, 2017).

식용곤충별 단백질가수분해물이 지질의 산화에 관여하는지 확인하고자 linoleic acid에 대한 산화 억제 활성을 TBA법으로 알아 보았다. 식용곤충별 단백질가수분해물의 지질 산화 억제 활성을 시간에 따라 농도별로 측정하였으나, 농도에 따른 활성이 유사하게 나타났다(data not shown). 이에 따라 낮은 농도인  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 식용곤충별 단백질가수분해물의 지질 산화 억제 활성을 4일 동안 측정하여 Fig. 3에 나타났다. 시간에 따라 음성대조군의 지질 과산화물이 증가하였으며, 그 중 3일째 지질 산화 억제 활성이 식용곤충별로 유의적인 차이를 보였다. 따라서 3일째 음성대조군 대비 양성대조군과 식용곤충별 지질의 산화 억제 활성을 Fig. 4에 표시하였다. 쌍별귀뚜라미 성충, 갈색거저리 유충, 흰점박이꽃무지 유충과 장수풍뎅이 유충 순으로 각각 60.26, 48.86, 42.73, 33.76%의 지질 산화 억제 활성을 보였다. 쌍별귀뚜라미 성충은 양성대조군인 trolox ( $2.50 \mu\text{g/mL}$ )의 42.17%보다 더 높은 저해율인 60.26%를 나타냈고, 갈색거저리 유충과 흰점박이꽃무지 유충의 경우 양성대조군과 비슷한 저해율을 보였다. DPPH 라디칼 소거 활성과 FRAP법에 의한 환원력의 결과와 동일하게 쌍별귀뚜라미 성충의 지질 산화 억제 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

종합적으로 4종의 식용곤충 단백질가수분해물의 항산화 활성을 비교하였을 때, 실험 방법에 따라 조금의 차이는 있었으나 쌍별귀뚜라미 성충의 항산화 활성이 상대적으로 우수한 것으로 판단



**Fig. 3. Inhibitory effects of trolox and the alcalase hydrolysates ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) from four edible insects on linoleic acid peroxidation.** Each value is mean $\pm$ SE ( $n \geq 3$ ) and different superscripts (a-e) at the same day are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. PB=*Protaetia brevitarsis* larvae, AD=*Allomyrina dichotoma* larvae, GB=*Gryllus bimaculatus* imago, TM=*Tenebrio molitor* larvae.



**Fig. 4. Inhibition rate of trolox ( $2.50 \mu\text{g/mL}$ ) and the alcalase hydrolysates ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) from four edible insects on linoleic acid peroxidation on day 3.** Each value is mean $\pm$ SE ( $n \geq 3$ ) and different superscripts (a-d) are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. PB=*Protaetia brevitarsis* larvae, AD=*Allomyrina dichotoma* larvae, GB=*Gryllus bimaculatus* imago, TM=*Tenebrio molitor* larvae.

된다. 특히 DPPH 라디칼 소거 활성과 FRAP법에 의한 항산화력은 다른 식용곤충에 비해 쌍별귀뚜라미 성충 단백질가수분해물의 TEAC값이 1.615배 높아 월등히 우수한 활성을 나타내었다. 따라서, 현재 다양한 단백질 분해효소들을 이용한 쌍별귀뚜라미 성충 단백질가수분해물 제조와 효소별 단백질가수분해물의 항산화 활성 비교 연구를 진행 중에 있으며, 향후 선발될 단백질가수분해물의 생리활성 펩타이드 분석 연구를 추가적으로 진행할 계획이다.

## 요 약

열풍 건조된 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이 유충, 쌍별귀뚜라미 성충 및 갈색거저리 유충의 분말을 4% (w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 단백질 분해효소인 alcalase를 기질 대비 1% (w/v) 첨가하여 8시간 가수분해 시킨 단백질가수분해물을 제조하였다. 각 식용곤충별 단백질가수분해물의 특성과 실제 생산된 펩타이드의 양을 알아보기 위해 SDS-PAGE와 TNBS법을 실시하였다. 그 결과,



모든 식용곤충 가수분해물의 가수분해가 우수하게 진행되었음을 확인하였으며, 8시간 가수분해 시 펩타이드 생산량은 갈색거저리 유충이 2.45 mg/mL로 가장 높았고, 쌍별귀뚜라미 성충 1.48 mg/mL, 흰점박이꽃무지 유충 1.20 mg/mL, 장수풍뎅이 유충 0.74 mg/mL 순으로 나타났다. 각 식용곤충별 단백질 가수분해물(≤3 kDa)의 DPPH 라디칼 소거 활성은 쌍별귀뚜라미 성충, 흰점박이꽃무지 유충, 갈색거저리 유충, 장수풍뎅이 유충 순으로 나타나 쌍별귀뚜라미 성충 단백질 가수분해물의 항산화 활성이 가장 우수하였다 ( $p < 0.05$ ). ABTS 라디칼 소거 활성은 갈색거저리 유충, 쌍별귀뚜라미 성충, 장수풍뎅이 유충, 흰점박이꽃무지 유충 순으로 나타났으며 ( $p < 0.05$ ),  $H_2O_2$  소거 활성은 네 가지 식용곤충 모두 유사한 활성을 보였다. FRAP법에 의한 환원력을 TEAC값으로 나타낸 결과, 쌍별귀뚜라미 성충이 다른 식용곤충들에 비해 월등히 우수한 환원력을 보였다 ( $p < 0.05$ ). Linoleic acid에 대한 산화 억제 활성 100 µg/mL의 농도에서 비교 측정된 결과, 3일 째 음성대조군 대비 쌍별귀뚜라미 성충이 60.26%의 저해율을 보여 가장 우수한 항산화력을 보였다 ( $p < 0.05$ ). 최종적으로 본 연구에서는 식용곤충 간의 항산화 활성을 비교하기 위해 다양한 활성산소종을 대상으로 한 항산화 활성 측정 및 지질 산화 억제 활성 측정을 통해 종합적인 항산화 활성을 비교하였다. 그 결과, 쌍별귀뚜라미 성충 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거 활성, FRAP법에 의한 환원력 및 linoleic acid에 대한 산화 억제 활성 실험에서 항산화 활성이 월등히 우수함을 확인하였으며, 추후 쌍별귀뚜라미 성충 유래 항산화 펩타이드 분리 및 분석에 대한 연구를 통해 새로운 기능성 식품 및 소재 개발에 기여할 수 있을 것이라 예상된다.

### 감사의 글

본 연구는 연구재단(과제번호: NRF-2016R1D1A1B03933985) 및 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ012284012018)의 지원에 의해 이루어진 것임.

### References

Abdalla AE, Roozen JP. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower and emulsion. *Food Chem.* 64:323-329 (1999)

Alder-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzene sulfonic acid. *J. Agr. Food Chem.* 27:1256-1262 (1979)

Badarinath AV, Rao KM, Chetty CMS, Ramkanth STVSR, Rajan TVS, Gnanaprakash K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int. J. Pharmtech. Res.* 2:1276-1285 (2010)

Baek DH, Kim IY, Jeong YH. Antioxidant and ACE inhibitory activities of japanese spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) hydrolysates. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 48:56-63 (2019)

Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76 (1996)

Berenbaum MR, Eisner T. Bugs' bugs. *Science.* 322:52-53 (2008)

Cho HS, Park BH. Effect of onion and garlic juice on the lipid oxidation and quality characteristics during the storage of conger eel (*Astroconger myriaster*). *Korean J. Food Cook Sci.* 16:135-142

(2000)

DeGrafi-Johnson J, Kolodziejczyk K, Krol M, Nowak P, Krol B, Nowak D. Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: Implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic Clin. Pharmacol Toxicol.* 100:345-352 (2007)

Gülçın I, Oktay M, Kireççi E, Kufrevioğlu Ö.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem.* 83:371-382 (2003)

Halliwel B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486:10-13 (2000)

Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 36:2090-2097 (1988)

Heo JC, Lee DY, Son MS, Yun CY, Hwan JS, Kang SW, Kim TH, Lee SH. Effects of mole crickets (*Gryllotalpa orientalis*) extracts on anti-oxidant and anti-inflammatory activities. *J. Life Sci.* 18:509-514 (2008)

Jang JB, Park OR, Yun TE. Review : Free radicals, physical performance, aging and antioxidants. *Korean J. Ideal Body&Meridian pathways.* 2:19-27 (2010)

Kim SK, Choi YR, Park PJ, Choi JH, Moon SH. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* 33:198-204 (2000)

Lee JE, Lee AJ, Jo DE, Cho JH, Youn K, Yun EY, Hwang JS, Jun MR, Kang BH. Cytotoxic effects of *Tenebrio molitor* larval extracts against hepatocellular carcinoma. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44:200-207 (2015)

Lee HS, Ryu HJ, Song HJ, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Protaetia brevitarsis* larvae. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46:1164-1170 (2017)

Müller HE. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 259:151-154 (1985)

Park JY, Heo JC, Woo SU, Yun CY, Kang SW, Hwang JS, Lee SH. Anti-inflammatory and cellular protective effects on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of grasshopper extracts. *Korean J. Food Preserv.* 13:796-802 (2006)

Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:1760-1765 (2008)

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26:1231-1237 (1999)

Ryu HJ, Song HJ, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Allomyrina dichotoma* larvae. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 48:410-417 (2019)

Sung GA, Kim MH, Park SN. Anti-inflammatory and whitening effects of *Protaetia brevitarsis* *Seulensis* extracts by oriental conversion methods. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.* 42:421-432 (2016)

Yi MR, Jeon AL, Kang CH, Bu HJ. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of essential oil from *Erigeron annuus* L. flower. *J. Korean Oil Chem. Soc.* 33:717-725 (2016)

Yu MH, Lee HS, Cho HR, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae (mealworm). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46:435-4415 (2017)

Yun EY, Hwang JS. Status and prospect for development of insect foods. *Food Sci. Ind.* 49:31-39 (2016)

Zeng LB, Zhang ZR, Luo ZH, Zhu JX. Antioxidant activity and chemical constituents of essential oil and extracts of *Rhizoma Homalomenae*. *Food Chem.* 125:456-463 (2011)