



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

흰점박이꽃무지 유충의 건조 및
단백 가수분해물의 특성

濟州大學校 大學院

食品工學科

金 荷 榮

2021年 2月

흰점박이꽃무지 유충의 건조 및 단백 가수분해물의 특성

指導教授 千 智 連

金 荷 榮

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2020年 12月

金荷榮의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 任 尚 彬

委 員 金 賢 貞

委 員 千 智 連



濟州大學校 大學院

2020年 12月

Characterization of *Protaetia brevitarsis* larva powder
and enzymatic protein hydrolysates

Ha- young Kim
(Supervised by professor Ji-Yeon Chun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Engineering

2020. 12

This thesis has been examined and approved.

Sang-Bin Lim, Prof. of Food Science and Engineering Dept.
Hyun Jung Kim, Prof. of Food Science and Engineering Dept.
Ji-Yeon Chun, Prof. of Food Science and Engineering Dept.

Dec. 2020

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

CONTENTS

ABSTRACT	1
LIST OF FIGURES	2
LIST OF TABLES	3
1. 서론	5
2. 재료 및 방법	
2.1. 흰점박이꽃무지 유충 분말 제조.....	8
2.2. 초음파 전처리 유무에 따른 효소 가수분해물 제조.....	10
2.3. 분석방법.....	12
2.3.1. 외관 및 색도.....	12
2.3.2. 수율.....	12
2.3.3. pH.....	12
2.3.4. 일반성분.....	12
2.3.5. 휘발성 염기 질소 화합물.....	12
2.3.6. 가수분해도.....	13
2.3.7. 용해도.....	13
2.3.8. 전기영동.....	14
2.3.9. 구성아미노산.....	14
2.3.10. 총 폴리페놀 함량.....	14
2.3.11. DPPH radical scavenging activity.....	14
2.3.12. ABTS radical scavenging activity.....	15
2.3.13. Hydrogen Peroxide scavenging activity.....	15
2.3.14. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	15
2.3.15. 통계처리.....	16
3. 결과 및 고찰	
3.1. 전처리와 건조법에 따른 흰점박이꽃무지 유충 제조	
3.1.1. 외관.....	17
3.1.2. 탈지수율.....	19
3.1.3. pH와 색도.....	21

3.1.4. 휘발성 염기 질소 화합물·····	25
3.1.5. 총 폴리페놀 함량·····	26
3.1.6. DPPH radical scavenging activity·····	27
3.1.7. 일반성분·····	30
3.2. 초음파 전처리 유무에 따른 흰점박이꽃무지 유충 분말 효소가 수분해물 제조	
3.2.1. 외관·····	33
3.2.2. 수율·····	36
3.2.3. pH·····	38
3.2.4. 가수분해도·····	40
3.2.5. 용해도·····	42
3.2.6. DPPH radical scavenging activity·····	44
3.2.7. ABTS radical scavenging activity·····	46
3.2.8. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)·····	48
3.2.9. Hydrogen Peroxide scavenging activity·····	50
3.2.10. 전기영동·····	52
3.2.11. 구성아미노산·····	54
4. 결론·····	56
국문요약·····	57
REFERENCES·····	59

ABSTRACT

This study was conducted to prepare a powder and protein hydrolysate from live *Protaetia brevitarsis* larva. In order to prepare the *Protaetia brevitarsis* larva powder, the manufacturing condition was variously designed with sacrifice method (blanching or freezing at -80°C), defatting process (defat, non-defat), storage temperature (-20°C , -80°C) and drying method (hot-air drying, freeze drying). And then we evaluated the appearance, yield, moisture contents, pH, color, proximate analysis, volatile basic nitrogen, DPPH free radical scavenging activity and total phenol contents of *Protaetia brevitarsis* larva powder. The optimal condition was the combination of blanching, defatting and -20°C storage temperature and hot-air drying processes. When blanching the *Protaetia brevitarsis* larva, water contents and volatile basic nitrogen of them were low. When defatting, the lightness and total phenol contents increased. When hot air dried, the crude fat contents were lower than that of freeze drying. It was suggested that in a large scale industries, the optimal condition combination (blanching, defatting, hot-air drying) to make a powder is more cost-effective and maintaining the quality of *Protaetia brevitarsis* larva powder. To produce *Protaetia brevitarsis* larva hydrolysate, the *Protaetia brevitarsis* larva powder manufactured by optimal processing was hydrolyzed using ultrasound treatment and enzymes (alcalase and neutrase). The appearance, yield, pH, degree of hydrolysis, solubility, SDS-PAGE, antioxidant activity (DPPH free radical scavenging activity, FRAP assay, ABTS radical scavenging, Hydrogen peroxide scavenging) of the hydrolysates were evaluated. Ultrasound treatment was effective to increase antioxidant activity and solubility of hydrolysate at two type enzymatic hydrolysis. In the alcalase hydrolysis, the initial hydrolysis rate also increased rapidly, and hydrolysate by alcalase were higher antioxidant activity than neutrase. During alcalase hydrolysis, it was observed that a low molecular weight peptide was produced according to the hydrolysis time. In this study, it was observed that bioactive peptides can be produced effectively by alcalase enzymatic hydrolysis and it was better utility when ultrasound assisted.

LIST OF FIGURES

Figure 1.	Optimizing process for producing <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder	9
Figure 2.	Production of protein hydrolysates from <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder by enzymatic hydrolysis	11
Figure 3.	Appearances of substrate before (A) and after (B) ultrasound treatment	34
Figure 4.	Degree of hydrolysis of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder hydrolysates produced with different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment	41
Figure 5.	DPPH radical scavenging (%) of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder hydrolysates by using different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment	45
Figure 6.	ABTS radical scavenging activity of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder hydrolysates by using different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment	47
Figure 7.	FRAP of different enzyme and ultrasound treatment on the hydrolysate of <i>P.brevitarsis</i>	49
Figure 8.	Hydrogen Peroxidase radical scavenging activity of different enzyme and ultrasound treatment on the hydrolysate of <i>P.brevitarsis</i>	51
Figure 9.	SDS-PAGE electrophoretic profiles at (A) broad molecular weight range (5-245 kDa) or (B) low molecular range (1-29 kDa) of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder hydrolysates during enzymatic hydrolysis by Alcalase	53

LIST OF TABLES

Table 1.	Appearance of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva prepared by different processing conditions (sacrifice method, storage temp., drying method)	18
Table 2.	Defatting yield of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder prepared by different processing conditions	20
Table 3-1.	pH and color of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder with different sacrifice method, storage temperature and defatting	23
Table 3-2.	pH and color of defatted <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder with different drying method	24
Table 4-1.	VBN, DPPH radical scavenging and Total phenolic contents of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder with different sacrifice methods, storage temperatures and defatting	28
Table 4-2.	VBN, DPPH radical scavenging and Total phenolic contents of of defatted <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder with different drying method	29
Table 5-1.	Proximate analysis of defatted <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder with different sacrifice method and storage temperature	31
Table 5-2.	Proximate analysis of defatted <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder with different drying method	32
Table 6.	Appearance of hydrolysate after Alcalase and Nuetrase enzymatic hydrolysis depending on ultrasound treatment and filtration	35
Table 7.	Effect of ultrasound treatment on yield (%) of different enzymatic hydrolysis of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder at each process step	37
Table 8.	Effect of ultrasound treatment on pH of different enzymatic hydrolysis of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder	39
Table 9.	Solubility of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva powder hydrolysates produced with different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment at various pH level	43
Table 10.	Amino acid composition of <i>Protaetia brevitarsis</i> larva	

powder hydrolysates during enzymatic hydrolysis by
alcalase..... 55

1. 서론

국제연합식량농업기구(FAO)는 2050년에 인구가 90 억 명으로 증가할 것으로 예상하면서 식량 및 사료 생산량이 늘어남에 따라 환경오염에 압력을 가할 것으로 예측하였다(FAO, 2014). 식용곤충은 생산과정에서 배출되는 이산화탄소(CO₂), 메테인(CH₄), 이산화질소(NO₂)와 같은 온실가스량이 다른 가축에 비해 적으며 번식력이 높아 환경오염의 문제가 적은 친환경적인 장점을 가지고 있다(Park, 2020). 이와 동시에 식용곤충의 단백질함량은 31~65%로 콩(23.5%), 렌틸콩(26.7%), 대두(41.1%)보다 풍부해 '작은 가축'으로서 미래를 위한 단백질 대체 식품으로 주목받고 있다(Gould & Wolf, 2018). 또한 곤충은 냉혈동물로서 사료 섭취시 단백질 전환률이 매우 높고, 사육시 자본과 기술이 크게 필요하지 않아 경제적이라는 장점을 가지고 있다. 현재 국내에서 식품원료로 인정받은 식용곤충은 전래적 식용곤충으로 인정받은 백강잠, 식용누에(유충, 번데기), 메뚜기가 있으며, 2016년 한시인정원료에서 일반원료로 전환된 갈색거저리유충(*Tenebrio molitor* L.), 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 흰점박이꽃무지 유충(*Protaetia brevitarsis* S.), 장수풍뎡이유충(*Allomyrina dichotom*), 2020년 한시인정원료로 인정된 아메리카왕거저리유충(*Zophobas morio*), 수벌 번데기(*Apis mellifera*)으로 총 9종이 있다.

식용곤충 9종 중 흰점박이꽃무지는 딱정벌레목 꽃무지과에 속하며 알, 유충, 번데기 및 성충의 시기를 거치는 완전변태곤충으로 한국, 일본, 대만, 중국, 유럽에 분포한다. 성충의 크기는 17~24 mm로 7월 상순부터 8월 상순까지 출현빈도가 가장 높다(Chung 등, 2013; Kim 등, 2019). 영양성분으로는 탄수화물 17%, 단백질 58%, 지방 18%으로 불포화지방산이 총 지방산 중 77%를 차지하며 이 중 올레산은 100g당 약 8g~14g을 포함하고 있다. 또한 단백질 함유량이 육류와 비슷하며 무기질이 다량 함유되어 있을 뿐 아니라 간질환에 효능이 인정되어 있어 약용 및 식품으로서 영양적 가치가 풍부하다(Kwon 등, 2013). 특히 흰점박이꽃무지는 고단백질 소재로서 가수분해물을 제조했을 때 유리라디칼 및 Hydrogen peroxide 소거 활성 등 항산화 활성이 우수하다고 알려져 있다(Lee 등, 2017).

하지만 식용곤충이 식품으로서 이용되기에는 아직까진 보완되어야 할 문제점들을 가지고 있다. 대표적으로 곤충은 토양을 기반으로 사육되기 때문에 미생물적인 오염이 발생할 수 있으며, 높은 수분함량으로 저장성에 취약하는 단점을 가지고 있다. 또한 곤충을 먹는다는 인식에서 발생하는 역겨움과 같은 혐오감은 식품소재로서 해결되어야 하는 문제점이다. 식용곤충은 높은 단백질과 지질함량으로 저장하는 동안 산패가 쉽게 일어나기 때문에 전처리 방법이 중요하다. 벨기에 연방식품안전청(FASFC)은 식용곤충의 미생물 수를 줄이기 위해 데치기와 같은 열처리가 필요하다고 하였다(Vandeweyer 등, 2017). 식용곤충을 전처리 및 보존하는 방법에는

Rosting, Frying, Blanching, Steaming, Dipping, Smoking, Baking, 등이 있으며 산업체 및 가정에서 식용곤충을 전처리하는 방법으로 데치기법이 가장 선호되고 있다. 데치기법은 끓는 물에 침지하는 방법으로 식용곤충을 희생하는 과정에 적용하면 뜨거운 물이 곤충내로 침투하여 단시간에 희생시켜 변질을 억제할 수 있으며 미생물 감소 및 이물 제거에 적절한 방법이다(Rumpold 등, 2014; Son 등, 2016; Dagostin 등, 2017).

식품의 건조는 미생물이나 효소에 의한 부패, 변질을 방지하고 제품의 저장성과 수송성을 향상시켜 다양하게 이용되고 있다(Jung 등, 2017). 식품 건조에 이용되는 방법으로 천일건조, 열풍건조, 동결건조, 진공건조 등 여러 가지 방법으로 이용되고 있으며 이중 열풍건조는 건조시간이 빠르고 식품이 균일하게 건조되어 경제적이며 가정에서 주로 사용하는 방법이다. 동결건조는 건조 중 발생하는 여러 영양소나 구조의 파괴를 최소화 하고 건조 후 원형을 유지할 수 있는 건조법이다(Kim 등, 2002). 아직까지 국내에서는 흰점박이꽃무지 유충을 가공하거나 이에 따른 다양한 품질을 분석한 연구는 다른 식용곤충에 비해 미비한 실정이다.

곤충의 외관에서 발생하는 혐오감을 감소시키기 위해서는 보이지 않도록 건조 후 분쇄하여 분말형태로 가공하는 방법이 가장 많이 이용되어지고 있다. 현재로서 단백질 강화 밀가루 및 스낵, 면류의 가공식품에 분말로서 많이 첨가되어지고 있다. 하지만 분말제형으로서는 여전히 유관으로 관찰이 가능하다는 점과 다양한 식품군에 적용하기에는 한계점이 존재한다. 이를 해결하기 위해서는 분말상에 존재하는 단백질을 가수분해하는 공정이 필요하다.

단백질은 영양소의 기능과 소화과정 중 펩타이드 결합이 끊어지면서 소단위체의 아미노산으로 분해되어 본래의 기능과는 다른 생리활성기능을 가지게 된다. 분해되는 과정 중 생산되는 유리아미노산, 올리고 펩타이드 및 저분자 단백질이 대표적인 생리 활성 기능을 띄는 소재이며(Hwang 등, 2001), 일부 단백질 및 펩타이드는 체내 항산화기능 향상, 항염증 및 항균 등에 관한 연구결과들이 보고되고 있다(He 등, 2013). 생리활성기능을 띄는 펩타이드의 생산은 일반적으로 효소에 의한 가수분해를 통해 이루어지는데(Korhonen & Pihlanto, 2003), 이는 목적에 따라 효소 선택이 가능하며 제조 후 아미노산 이외의 부산물이 발생되지 않는다는 장점을 가지고 있기 때문이다(Kim, 2011). 하지만 효소를 이용하여 가수분해할 때 단백질의 구조에 따라 펩타이드의 생산이 제한될 수 있다는 단점을 가지고 있다(Kim & Imm, 2018). 이를 해결하기 위해서는 가열, 물리적인 힘, pH, 이온 등으로 가수분해 전 단백질의 변성을 일으키는 작업이 필요하다. 최근 식품산업에서 열을 가하지 않는 물리적인 기술로 초음파 처리 기술이 적용되고 있다. 이는 비열처리기술로 본래의 품질과 영양성분을 유지할 수 있으며, 단백질의 물리화학적 변화를 일으킬 수 있다는 장점

을 가지고 있다(Alizadeh & Aliakbarlu, 2020).

따라서 본 연구에서는 품질변화를 최소화 하는 건조법을 찾기 위해 전처리 조합과 건조방법, 탈지의 유무를 달리하여 흰점박이꽃무지 유충분말의 품질특성을 비교하였다. 이후 최적의 분말제조방법을 택하여 만들어진 분말을 이용하여 효소와 전처리를 달리하여 제조된 가수분해물의 특성을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 흰점박이꽃무지 유충 분말 제조

흰점박이꽃무지의 유충(*Protaetia brevitarsis* larva) 분말 제조는 희생법, 탈지공정유무, 건조방법을 다르게 처리하였으며 가수분해 공정효율에 적합한 품질특성을 나타내는 조건을 최종 선택하였다(Figure 1). 흰점박이꽃무지의 유충은 제주특별자치도 조천읍에 위치한 제주곤충보감영농조합법인에서 구매하여 사용하였다. 농장에서 5일 동안, 구매 후 하루 동안 절식시켰다.

희생법으로는 95℃에서 1분간 데치는 방법과 -80℃에서 급속냉동하는 방법을 이용하였다. 이후 필름접착기(V4880-071, Simatech Industrial Co.,Ltd, Seoul, Korea)로 진공포장하여 -80℃, -20℃ 동결고에 각각 저장하였다.

탈지는 n-hexane (Daejung chemicals & Metals Co., Ltd., Siheung, Korea)을 이용하여 진탕배양기(SI-600R, JEIO TECH, Daejeon, Korea)로 6시간 교반하였다. 위 과정을 잔사를 이용하여 총 3번 반복한 후 남은 n-hexane을 휘발시켜 탈지분말로 이용하였다.

건조방법으로는 열풍건조와 동결건조를 실행하였다. 열풍건조는 순환식 전기건조기(PS-100C, Shiniltech, Gimhae, Korea)를 이용하여 60±5℃에서 12시간 동안 열풍 건조하였다. 동결건조는 동결건조기(LP-20, ILShinBioBase, Dongducheon, Korea)를 이용하여 72시간 동안 건조하였다. 이후 분석을 위해 후드믹서(SHMF-3500G, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄한 뒤 40 mesh 체로 걸러 사용하였다.



Figure 1. Optimizing process for producing *Protaetia brevitarsis* larva powder.

2.2. 초음파 전처리 유무에 따른 효소가수분해물 제조

열풍건조 후 탈지한 흰점박이꽃무지 유충 분말을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 4%(w/v)의 기질용액으로 제조하였다. 이후 150 rpm으로 10 분간 교반하였다.

초음파 전처리는 20 kHz \pm 50 Hz(75%)의 주파수로 최대 출력 750 watt인 초음파 기기(VCX750, SONIC & MATERIALS, INC., Newtown, CT, USA)를 이용하였다. 프로브는 titanium 도금 처리된 standard probe(13 mm, 630-0219)를 사용하였으며, 초음파의 진동자는 Horn 방식을 채택하였고, 조사시간은 총 15분(15초 작동, 10초 중지)으로 처리하였다. 300 mL의 비커를 사용하였으며, 시료용액의 부피는 200 mL로 설정하였다. 초음파 처리시 발생하는 열로 인한 작동중지 및 단백질 열변성을 방지하기 위해 냉각장치로서 시료는 얼음으로 둘러싼 형태로 실험에 임하였다.

효소 가수분해는 Alcalase 2.4 L (Daejong, Seoul, Korea)와 Neutrase (Novoenzymes, Copenhagen, Denmark)을 사용하였다. 90°C에서 20분 동안 항온수조(DWB-22, Material Scientific Co., Seoul, Korea)내에서 자가 효소를 불활성화하여 기질용액 대비 단백질 가수분해 효소를 각각 1%(w/w)가 되도록 첨가하였다. 진탕배양기(SI-600R, JEIO TECH, Daejeon, Korea)에서 55°C, 150 rpm에서 0~24시간동안 가수분해를 한 후, 90°C에서 20분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 이후 실온에서 방랭한 후 원심분리기(LaboGene 1248R, GYROZEN, Daejeon, Korea)를 이용하여 20°C에서 4000 rpm, 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 저분자 펩타이드의 분리를 위해 membrane filter (Amicon Ultra-15, EMD Milipore Corporation, Billerica, MA, USA)를 이용하여 초고속원심분리기(KR/HA-50, Hanil Industrial Co., Seoul, Korea)를 이용하여 8000 rpm에서 1시간동안 분리함으로써 최종적으로 분자량 3 kDa 이하의 단백가수분해물을 얻었다. 단백가수분해물은 동결건조한 후 -80°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

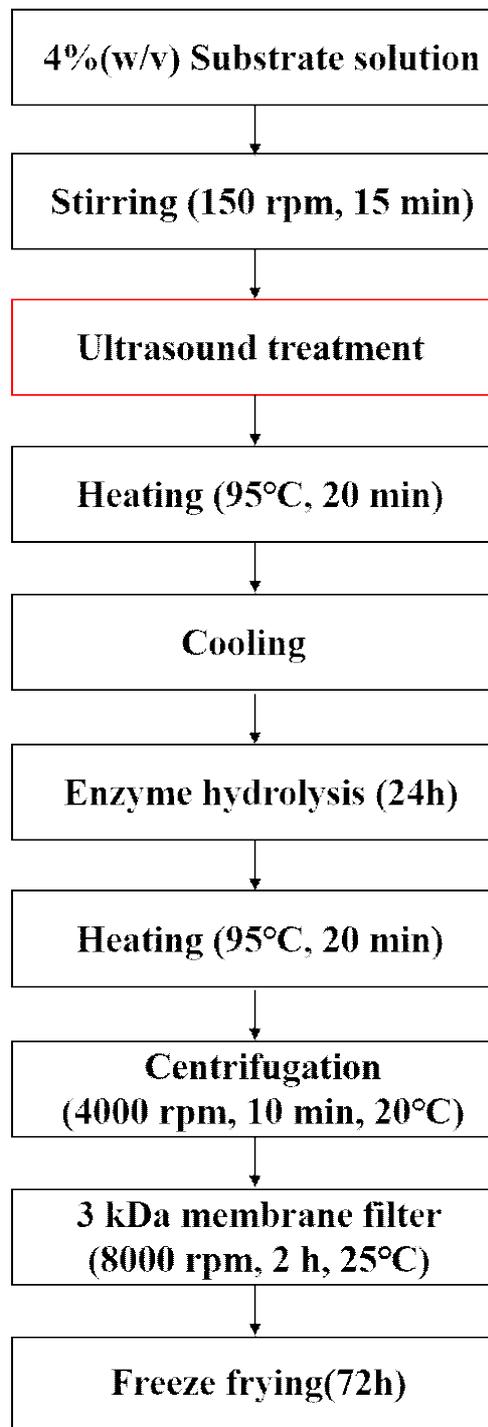


Figure 2. Production of protein hydrolysates from *Protetia brevitarsis* larva powder by enzymatic hydrolysis.

2.3. 분석방법

2.3.1 외관 및 색도

건조된 유층의 전체적인 모습과 분쇄하여 페트리디쉬(35 mm × 10 mm)에 시료를 취하여 외관을 관찰하였으며, Colorimeter (PCR-TCR 200, PCE Americas Inc., Jupiter, FL, USA)를 사용하여 페트리디쉬 중앙의 명도(CIE L^* : lightness), 적색도(CIE a^* : redness), 그리고 황색도(CIE b^* : yellowness)를 3회 반복하여 평균값을 취하였다. 표준백색판의 색은 L^* value 92.91, a^* value 4.15, b^* value -15.24으로 표준화하여 측정하였다.

2.3.2. 수율

공정별 무게를 측정하여 아래의 식에 대입하여 수율을 산출하였다.

$$\text{수율}(\%) = \left(\frac{\text{공정별 시료의 중량}(g)}{\text{초기 시료의 중량}(g)} \right) \times 100$$

2.3.3. pH

건조 및 탈지 후의 시료의 경우 증류수와 10배희석(1:10, w/w)하여 3분간 교반하여 pH-meter (S470 SevenExcellence™, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)를 사용하여 3회 반복하여 평균값을 취하였다. 단백질수분해물의 경우 희석하지 않고 시료 자체의 값을 측정하였다.

2.3.4. 일반성분

건조 및 탈지 분말의 일반성분은 AOAC (2005)와 식품공전(MFDS 2018)에 준하여 분석하였다. 수분은 105℃ 상압가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 조회분은 550℃ 직접회화법으로 분석하였다. 탄수화물 함량은 수분, 회분, 조단백, 조지방을 합한 값을 100에서 뺀 값으로 하였다.

2.3.5. 휘발성 염기 질소 화합물

휘발성 염기질소는 식품공전(MFDS 2018)의 미량확산(Conway)법으로 측정하였다. 시료 10 g에 증류수 50 mL를 넣고 30분간 교반 후 여과하여 사용하였다. 여과한 용액을 5% 황산용액을 이용하여 약산성으로 중화시킨 뒤 증류수와 1:1(v/v)로 희석하여 시료로 이용하였다. Conway unit 의실에 상기 시험용액 1 mL와 탄산칼

를 포화용액 1 mL를 넣고, 내실에 0.01 N 황산용액 1 mL를 내실에 넣고 뚜껑을 닫아 인큐베이터(IB-25G, JEIO TECH, Daejeon, Korea)를 이용해 25℃에서 1시간 반응하였다. 반응 후 내실에 브린스위크시약(methl red:methylene blue=1:1) 10 μL를 넣고 0.01N 수산화나트륨 용액으로 적정하여 소모되는 양을 측정하여 산출하였다. 공시험은 증류수를 사용하였다.

$$\text{휘발성염기질소 (VBN, mg/\%)} = 0.14 \times \frac{(b-a) \times f}{W} \times 100 \times d$$

a : 검체에 대한 평균 0.01N NaOH 소비량(mL)

b : 공시험에 대한 0.01N NaOH 소비량(mL)

d : 검체의 희석배수(mL)

f : 0.01N NaOH의 역가

W : 검체채취량(g)

2.3.6. 가수분해도

단백질의 가수분해도는 Hoyle & Merritt (1994)의 방법을 변형하여 분석하였다. 시간대별 시료를 5 mL씩 채취하여 원심분리기를 이용하여 20℃에서 4000 rpm, 10분간 원심분리하여 상등액을 사용하였다. 채취한 상등액 1 mL와 20% trichloroacetic acid (TCA) 1 mL를 1분간 교반 후 20℃에서 4000 rpm, 10분간 원심분리하여 상등액을 BCA™ assay kit을 이용하여 질소 함량을 분석하였다. 측정된 질소함량을 아래의 식에 대입하여 가수분해도를 산출하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{\text{시료의 10\% TCA 용해성 질소}}{\text{시료의 총 질소}} \times 100$$

2.3.7. 용해도

가수분해물의 용해도는 Maryia 등(2019)의 방법을 인용하여 분석하였다. 가수분해 동결건조물 0.2 g에 증류수 10 mL에 분산시키고 1M NaOH 또는 1M HCl을 첨가하여 pH를 3에서 9로 조정하였다. 분산액을 진탕배양기를 이용하여 40℃에서 1시간 동안 교반하였다. 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액에 BCA™ assay kit을 이용하여 질소 함량을 분석하였다. 단백질 용해도는 총 질소 함량에 대한 상등액의 질소함량의 비율로 계산하였다.

2.3.8. 전기영동

펩타이드 조성을 측정하기 위하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였으며, 전기영동기기(WSE-1150 PageRun Ace, ATTO, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 전기영동은 21 mA에서 0.1% SDS를 함유하는 Tris-Glycine buffer와 Tris-Tricine buffer를 사용하였으며, 12.5%와 16.5%의 gradient polyacrylamide gel (ATTO, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 5-245 kDa의 단백질 표준물질(EZ-Perfect Marker Plus, DOGEN, Seoul, Korea)과 1-29 kDa의 단백질 표준물질(EzStandard LMW, ATTO, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 시료는 각 가수분해물을 20°C에서 4000 rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 사용하였으며, 시료용액에 2% SDS를 첨가하여 6X loading dye와 혼합 후 95°C에서 5분간 가열하여 이용하였다. 전기영동 후 겔은 실온에서 30분동안 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하였으며, 증류수를 이용하여 24시간동안 탈색하였다.

2.3.9. 구성아미노산

흰점박이꽃무지 유충 시료는 초음파 처리 후 효소 가수분해하여 시간에 따라 채취하였으며, 20°C에서 4000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액을 이용하였다. 구성아미노산 분석은 식품공전(MFDS 2018)의 아미노산 분석방법에 의하여 측정하였으며, 아미노산 분석기(L-8900, HITACHI, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

2.3.10. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Singleton & Rossi (1965)의 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 사용하였다. 각 시험용액 200 µL에 증류수 900 µL를 혼합하여 2 M Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 가하였다. 상온 암소에 5분간 반응 후 2% 탄산나트륨 용액 300 µL와 증류수 500 µL를 혼합하였다. 이를 1시간동안 상온 암소반응을 진행하고 microplate reader (Epoch™, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)를 이용하여 파장 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 Gallic acid를 이용하여 작성하였으며, 시료의 총 폴리페놀 함량은 mg GAE (gallic acid equivalents)/g으로 나타내었다.

2.3.11. DPPH radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity는 Mensor 등(2001)의 방법을 변형하여 사용하였다. 에탄올에 녹인 0.3 mM DPPH Solution 0.8 mL에 시험용액 2 mL를 혼합하였

다. 이후 30 min 동안 상온 암소에서 반응하여 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid를 이용하여 분석하였다. 각 시료는 100 mg/mL의 농도로 희석한 후 실험에 이용하였다.

$$DPPH \text{ radical scavenging } (\%) = \frac{1 - (Absorbance_{sample} - Absorbance_{blank})}{Absorbance_{control}} \times 100$$

2.3.12. ABTS radical scavenging activity

ABTS radical scavenging activity는 Nicoletta 등(1999)의 방법을 변형하여 사용하였다. 7 mM ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt]와 140 mM potassium persulfate를 혼합 후 24시간 동안 실온에서 암소방치하여 ABTS 양이온을 형성하였다. 734 nm에서 흡광도가 0.7±0.02이 되도록 absolute ethanol과 희석하여 사용하였다. 시료 50 µL와 ABTS solution 1 mL를 첨가한 후 교반하여 암소에서 2.5분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식으로 환산하여 활성을 산출하였다. 각 시료는 100 mg/mL의 농도로 희석한 후 실험에 이용하였으며, 양성대조군으로는 Trolox를 사용하였다.

$$ABTS \text{ radical scavenging } (\%) = \frac{1 - (A_{sample} - A_{blank})}{A_{control}} \times 100$$

2.3.13. Hydrogen Peroxide scavenging activity

Hydrogen Peroxide scavenging activity는 Yu 등(2017)의 방법을 이용하였다. 96 well plate에 시료 20 µL, PBS용액(pH 7.4) 100 µL, 1 mM H₂O₂ 20 µL를 혼합 후 인큐베이터(IB-25G, JEIO TECH, Daejeon, Korea)를 사용하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1.25 mM ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] 30 µL와 1 U/ml peroxidase 30 µL를 첨가하였다. 이후 37°C에서 10분간 다시 반응한 후 microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료는 100 mg/mL의 농도로 희석한 후 실험에 이용하였으며, 양성대조군으로는 Trolox를 사용하였다.

2.3.14. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power

FRAP 측정 방법은 Benzed & Strain의 방법(1996)을 변형하여 측정하였다. FRAP reagent는 300 mM acetate buffer 100 mL를 40 mM HCl에 용해한 10 mM

TPTZ [2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-s-triazine]의 10 mL와 20 mM FeCl₃ 10 mL를 가하여 제조하였다. 제조된 FRAP reagent 3 mL에 증류수 300 µL와 시료용액 100 µL를 혼합하여 항온수조 37°C에서 4분간 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. Iron (II) sulfate heptahydrate를 0.025-0.5 mM의 농도로 작성한 검량선에 대입하여 환산하였다. 각 시료는 100 mg/mL의 농도로 희석한 후 실험에 이용하였다.

2.3.15. 통계처리

통계분석은 Minitab ver. 18 (Minitab 18 Inc., State College, Pennsylvania, USA)를 이용하여 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시하였고, mean±SD로 나타내었으며 각 측정 평균값 간의 유의검정은 $P < 0.05$ 수준으로 Tukey's multiple range test를 통하여 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 흰점박이꽃무지 유충 분말 제조

Table 1 에서 나타냈듯이 흰점박이꽃무지 유충 분말 제조 공정 최적화를 위해 1 단계로 희생법 및 탈지공정 유무를 결정하고, 2단계로 건조법을 결정하였다. 조건의 결정 기준은 다양한 품질특성 분석을 통해 가공공정 효율 및 품질특성이 우수하며 흰점박이꽃무지 유충의 효소가수분해를 위해 가공적성에 적합한 것으로 선택하였다.

3.1.1. 외관

흰점박이꽃무지 유충의 희생법은 열수로 데치기 하거나, -80°C 의 급속냉동을 시행한 후 각각 -20°C 혹은 -80°C 에 저장하였다. 실험에 이용한 흰점박이꽃무지 유충의 성장상태는 3령 상태의 유충을 이용하였다. 일반적으로 흰점박이꽃무지 유충은 근육과 털을 이용하여 기어 다니기 때문에 각 마디마다 털이 있는 것을 확인할 수 있었다. 흰점박이꽃무지 유충의 외관은 각 공정 이후 흡후드 안에서 백색판을 두고 관찰하였다(Table 1).

데치기 처리를 진행한 유충의 색은 데치기 처리를 하지 않은 유충에 비해 누런 반투명색에서 불투명 흰색을 띄는 것을 발견할 수 있었는데, 이는 데치기 열로 인한 단백질 변성에 따른 결과인 것으로 판단된다. 데치기법은 유충에 고열을 가하여 단시간에 희생시키는 것이 가능한 반면에, 급속냉동은 희생시키는 동안 곤충의 신선 대사로 인해 열이 발생하고 저온으로 인한 내부조직의 얼음결정 형성으로 완전히 희생시키는 시간까지 데치기법에 비해 오랜 시간이 소요된다(JE 등, 1984). 또한 급속냉동과 같은 비가열 희생법은 유충의 효소나 미생물이 불활성화되지 않아 최종 제품에서의 색이 더 어둡다는 Son (2017)의 보고와 유사하였다. 본 연구에서도 급속냉동으로 인해 효소의 불활성화가 되지 않은 것으로 보인다. 데치기 후 저장 온도 -20°C 에서 보관한 유충보다 -80°C 에서 보관한 유충이 더 검고 어두운 것으로 보이는데, 이는 -80°C 의 극저온 저장으로 인한 냉해(freeze burn)가 발생하여 외관에서 더 어두운 색상을 나타내는 것으로 사료된다.

데치거나 급속동결을 통해 희생된 유충을 열풍건조 하였는데 본래의 외관을 유지하지 못하고 빠르게 수분이 빠져나가 변형된 모습을 나타내었다. 같은 방법으로 희생된 흰점박이꽃무지 유충을 동결건조한 경우 동결건조 원리에 따라 수분이 그대로 승화되어 원래의 형태를 유지하고 있는 것으로 확인하였다.

Table 1. Appearance of *Protaetia brevitarsis* larva prepared by different processing conditions (sacrifice method, storage temp., drying method)

Sacrifice method	Blanching		Freezing
Storage temperature (°C)	-20	-80	-80
Before drying			
After hot-air drying			
¹⁾ After freeze-drying			

¹⁾ *Protaetia brevitarsis* larva was freeze dried using optimal pre-treatment method to compare with hot-air drying.

3.1.2. 탈지수율

Table 2에는 다양한 조건(희생법, 저장온도, 건조법)으로 가공된 흰점박이꽃무지 유충 분말의 탈지수율을 나타내었다. 희생법과 저장온도를 각각 다르게 처리하고 열풍건조 한 탈지분말의 수율은 유의적 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 이후 동일한 방법으로 전처리하고 건조법을 달리한 시료의 탈지수율에서는 열풍건조가 동결 건조보다 유의적으로 높은 수율을 나타냈다($P<0.05$).

탈지는 지방 함유량이 높은 단백질 식품인 경우 탈지공정이 최종 제품의 단백질 회수율과 순도에 직접적인 영향을 끼칠 수 있다. 또한 지질의 소수성으로 인해 단백질과 지질 사이의 상호작용은 단백질의 용해도를 저하시킨다고 알려져 있다 (Azagoh 등, 2016; Lam 등, 2016). 흰점박이꽃무지 유충의 경우 지질의 함유량이 높아서 탈지 공정을 거치지 않으면 분말의 응집성이 강해져 수율이 떨어질 뿐만 아니라 함유된 지방 중 고함량의 불포화 지방산으로 저장 중 지방 산화를 일으킬 수 있다. 그러므로 탈지공정은 흰점박이꽃무지 유충분말의 저장안정성과 단백질가수분해 공정시 가공적성을 증진시키는 것으로 판단된다.

Table 2. Yield of *Protaetia brevitarsis* larva powder prepared by different processing conditions

Sacrifice method		Blanching		Freezing
Storage temperature (°C)		-20	-80	-80
Drying method	Hot-air drying	26.80±7.61 ^{a1)A2)}	29.14±7.44 ^a	31.09±7.58 ^a
	³⁾ Freeze drying	17.93±2.44 ^B	-	-

All values are mean±SD.

¹⁾ Different superscripts within rows of the sacrifice method and storage temperature represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

²⁾ Different superscripts within column of the drying method represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

³⁾ *Protaetia brevitarsis* larva was freeze dried using optimal pre-treatment method to compare with hot-air drying.

3.1.3. pH와 색도

동물성 식품의 pH는 저장 중 품질 변화에 중요한 지표이며, 색은 단백질 변성을 나타내는 주요 지표 중 하나이다. 1단계에서 최적 희생법 및 탈지공정 유무를 결정하기 위해 처리된 흰점박이꽃무지 유충의 pH와 색도는 Table 3-1에 나타내었고, 1단계에서 선택된 조건으로 처리한 흰점박이꽃무지 유충의 건조법에 따른 pH와 색도는 Table 3-2에 나타내었다.

일반적인 곤충 단백질의 등전점으로는 pH 4~5사이이며, 희생법 종류와 탈지유무를 달리한 분말의 pH는 6.51~7.32인 것으로 나타났다. 이 중 급속동결법으로 희생한 시료의 탈지 전 pH가 다른 시료들에 비해 유의적 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 급속동결법으로 희생된 시료 중 탈지 후 시료의 pH가 탈지 전 시료보다 높게 나타났는데, 이는 Kim 등(2019)의 결과에서 아메리카왕거저리 유충의 탈지 후가 탈지 전 유충에 비해 칼륨(K), 인(P), 마그네슘(Mg)과 같은 무기질 함량이 높아졌다는 것과 상관관계가 있는 것으로 생각되며, 이는 높은 무기질 함량으로 인해 pH가 높아진다는 Nam 등(2000)의 결과와도 유사하다.

색도 결과는 다음과 같다. 탈지 전 유충에 비해 탈지 후 유충의 명도값이 높게 나타났는데($P < 0.05$), Son & Hwang (2017)의 갈색거저리 분말을 n-hexane으로 탈지한 시료의 명도값이 가장 높은 결과와 동일하였다. 따라서 곤충의 지질함량이 명도에 영향을 주는 것으로 판단된다. Kan 등(2008)은 절지동물에서 생성되는 색소는 페놀산화효소(phenol oxidase)가 퀴논(quinone)의 생성을 촉진하여 멜라닌 색소를 형성할 수 있다고 하였다. 이를 통하여 n-hexane을 이용한 탈지방법이 곤충의 색소를 용출시키는 것으로 생각된다. 희생법 종류와 탈지유무에 따른 적색도는 유의적 차이가 나타나지 않았으며($P > 0.05$), 황색도는 일정한 경향이 확인되지 않았다.

건조방법을 달리한 탈지분말에서는 열풍건조법과 동결건조법 모두 7.78~7.95로 등전점 이상의 높은 pH 값이 측정되었다(Table 3-2). 건조방법이 메뚜기의 영양소에 미치는 영향을 연구한 Fombong 등(2017)과에 따르면 열풍건조법보다 동결건조법에서 더 높은 무기질 함량이 측정되었다. Kim & Lee (2004)에 따르면 칼륨과 나트륨의 경우 건조방법에 따른 함량 차이가 나타나지 않았지만, 칼슘과 마그네슘 및 망간의 함량은 동결건조시 가장 잘 유지되었다고 보고하였다. 또한 Ko & Kang (2002)에 따르면 동결건조시 휘발성유기산의 일부가 손실되었기 때문에 pH가 증가한 것으로 보고하였다. 따라서 동결건조시 흰점박이꽃무지 유충의 무기질 함량이 증가하여 pH가 높아진 것으로 생각된다. 건조방법을 달리한 탈지분말의 색도는 유의적 차이를 나타내지 않았다($P > 0.05$).

따라서 희생법에 따라 pH에 영향을 미칠 수 있지만, 이는 탈지 후 무기질의 증가로 인해 희생법에 따른 차이는 나타나지 않는다. 색도에서는 탈지 후 명도값의 증가로 인하여 기호적인 측면에서 긍정적이라 생각된다. 건조법에 따라서는 pH값에서 유의적인 차이를 나타내지만, 이는 두가지 건조법 모두 등전점 이상의 범위를 나타

내고 있기에 흰점박이꽃무지 유충의 탈지분말에서는 큰 영향을 미치지 않는 것이라 판단된다.

Table 3-1. pH and color of *Protaetia brevitarsis* larva powder with different sacrifice method, storage temperature and defatting

Sacrifice method		Blanching				Freezing	
Storage temperature(°C)		-20		-80		-80	
Defatting		before	after	before	after	before	after
pH		7.17±0.04 ^{a2)}	7.12±0.05 ^a	7.31±0.15 ^a	7.32±0.14 ^a	6.51±0.08 ^b	7.09±0.45 ^a
<i>L</i> ¹⁾		44.31±1.61 ^b	60.05±5.81 ^a	44.64±0.42 ^b	60.75±2.30 ^a	41.67±0.33 ^b	59.45±0.93 ^a
Hunter's color value	<i>a</i>	1.10±0.21 ^a	2.06±0.79 ^a	2.22±1.02 ^a	2.64±1.14 ^a	1.30±1.28 ^a	2.21±1.55 ^a
	<i>b</i>	1.81±1.09 ^c	4.51±0.91 ^{ab}	4.00±1.32 ^{abc}	5.80±1.86 ^a	3.02±1.34 ^{bc}	2.51±2.33 ^{ab}

All values are mean±SD.

¹⁾L: Lightness, a: redness, b: yellowness.

²⁾Different superscripts within rows of the sacrifice method and storage temperature represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

Table 3-2. pH and color of defatted *Protaetia brevitarsis* larva powder with different drying method

Drying method		Hot-air drying	³⁾ Freeze drying
pH		7.78±0.03 ^{b2)}	7.95±0.10 ^a
<i>L</i> ¹⁾		52.89±2.73 ^a	53.83±1.07 ^a
Hunter's color value	<i>a</i>	2.96±0.29 ^a	2.71±0.48 ^a
	<i>b</i>	5.04±1.08 ^a	5.07±0.83 ^a

All values are mean±SD.

¹⁾L: Lightness, a: redness, b: yellowness.

²⁾Different superscripts within rows of the drying method represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

³⁾ *Protaetia brevitarsis* larva was freeze dried using optimal pre-treatment method to compare with hot-air drying.

3.1.4. 휘발성 염기 질소 화합물

휘발성염기질소(volatile basic nitrogen, VBN)는 암모니아질소와 트리메틸아민 등의 휘발성 아민의 총칭으로 식육류와 어패류의 신선도를 나타내는 지표이다(Lee 등, 2015). 이에 희생법 종류와 탈지공정 유무에 따른 분말의 휘발성염기질소를 측정하였으며 그 결과를 Table 4-1에 나타내었다. 흰점박이꽃무지 유충의 경우 높은 단백질 함량으로 단백질의 변패가 품질특성에 영향을 미칠 수 있다.

식품공전(MFDS, 2020)에 따르면 곤충가공식품의 경우 동물성가공식품류에 속하여 휘발성 염기질소 20 mg/%이하를 기준으로 표기되어 있다. 이를 기준으로 희생법 종류와 탈지유무를 달리한 분말 모두 기준치 이하인 것을 확인하였다. Son 등(2016)은 블랜칭법으로 흰점박이 꽃무지 유충을 희생하여 냉장저장기간에 따라 VBN함량을 살펴본바 높은 변패도를 보였던 결과와 달리 본 실험에서 낮은 단백질 변패도를 나타낸 것으로 보아 희생법보다는 저장온도가 단백질 변패도에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. 건조방법에 따른 단백질 변패도는 14.16~16.72 mg/%로 기준치 이하의 VBN함량을 나타냈다. 따라서 본 연구에서 실행한 다양한 제조공정(데치기, 저온저장, 탈지, 건조)은 식용 가능 기준치의 이하의 VBN함량을 지닌 분말로 제조함으로써 본 공정이 흰점박이꽃무지 유충을 식품용 단백질 자원으로 가공하는데 유용할 것으로 보인다.

3.1.5. 총 폴리페놀 함량

총 페놀함량 측정은 항산화 연구에 널리 이용되는 방법으로, 페놀 화합물은 식물계에 존재하는 2차 대사산물로 항산화 활성의 간접적 지표로 활용될 수 있다. 이를 이용해 희생법 종류와 탈지유무를 달리한 분말의 총 페놀함량을 측정된 결과를 Table 4-1에 나타내었다. 데치기법으로 희생한 시료보다 -80°C 에서 급냉법으로 희생한 시료의 총 페놀함량이 유의적으로 높았다($P < 0.05$). 이는 가열을 통한 폴리페놀 성분의 파괴가 이루어진 것으로 생각된다. 또한 희생법의 종류와 관계없이 탈지한 분말이 탈지하지 않은 분말보다 높은 페놀함량이 나타났다. 이는 단백질과 폴리페놀은 가역적 또는 비가역적으로 상호작용이 가능하며, 비특이적으로 결합하기 쉽기 때문이다(Kim, 2009). 탈지를 하지 않은 시료보다 탈지한 시료에서 단백질 함량이 증가하였으며, 단백질과 지질이 결합하고 있던 부위에 폴리페놀의 결합을 이루어 단백질과 폴리페놀과의 접근성이 상승하여 높은 값을 나타내는 것으로 판단된다(Ozdamar 등, 2013).

따라서 총 페놀함량은 데치기법으로 희생한 유충보다 -80°C 에서 급냉한 유충에서 더 높은 함량을 나타냈으며, 탈지 후 분말에서 단백질 함량이 증가함에 따라 총 페놀 함량 또한 함께 증가함을 확인하였다. 이후 건조방법에 따른 총 페놀함량을 측정된 결과는 Table 4-2에 나타내었는데, 건조방법에 따른 총 페놀함량은 유의적 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$).

3.1.6. DPPH radical scavenging activity

DPPH 라디칼 소거능 활성은 수소 원자나 전자를 공여 할 수 있는 능력을 평가하는 것으로 DPPH가 안정한 자유라디칼로 환원되면서 라디칼 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변하는 원리이며 항산화 활성을 측정할 때 주로 이용된다(Ham 등, 2015). 이를 이용해 희생법 종류와 탈지유무를 달리한 유충분말의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과를 Table 4-1 에 나타내었는데, 49.59~54.55%로 유의적 차이가 나타나지 않았다($P>0.05$). 건조방법에 따른 라디칼 소거능 또한 48.94~49.12%로 유의적 차이가 나타나지 않았다($P>0.05$). 이는 데치기법과 -20°C 의 온도에서 냉동법으로 희생시킨 후 열풍건조한 귀뚜라미의 DPPH 라디칼 소거능은 각각 60.4%와 59.6%로 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 보고한 Singh (2020)의 유사한 연구결과였다. 따라서 희생법의 종류, 탈지유무, 건조법은 DPPH 라디칼 소거능에 영향을 끼치지 않는 것으로 확인되었다.

Table 4-1. VBN, DPPH radical scavenging and total phenolic contents of *Protaetia brevitarsis* larva powder with different sacrifice methods, storage temperatures and defatting

Sacrifice method	Blanching				Freezing	
	-20		-80		-80	
Storage temperature (°C)						
Defatting	before	after	before	after	before	after
VBN (mg/%)	2.72±0.33 ^{a1)}	1.26±1.03 ^b	2.83±0.31 ^a	2.91±0.62 ^a	3.27±0.65 ^a	3.54±1.24 ^a
DPPH radical scavenging (%)	54.55±3.13 ^a	50.95±3.76 ^a	49.59±6.49 ^a	52.13±8.20 ^a	50.10±7.02 ^a	51.22±6.21 ^a
Total phenolic contents (mg GAE/g)	4.42±0.28 ^{cd}	5.04±0.36 ^b	4.20±0.12 ^d	5.15±0.13 ^b	4.78±0.18 ^{bc}	5.58±0.26 ^a

All values are mean±SD.

¹⁾Different superscripts within rows of the sacrifice method and storage temperature represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

Table 4-2. VBN, DPPH radical scavenging and total phenolic contents of defatted *Protaetia brevitarsis* larva powder with different drying method

Drying method	Hot-air drying	²⁾ Freeze drying
VBN (mg/%)	16.72±4.47 ^{a1)}	14.16±2.87 ^a
DPPH free radical scavenging (%)	48.94±2.65 ^a	49.12±3.14 ^a
Total phenolic contents (mg GAE/g)	3.29±0.23 ^a	3.28±0.35 ^a

All values are mean±SD.

¹⁾Different superscripts within rows of the drying method significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

²⁾ *Protaetia brevitarsis* larva was freeze dried using optimal pre-treatment method to compare with hot-air drying.

3.1.7. 일반성분

일반성분 경우 탈지공정 처리한 시료에 한해서 분석하였으며, 희생법을 달리한 흰점박이꽃무지 유충 탈지분말의 일반성분 분석결과는 Table 5-1 과 같다. 급냉 희생법을 사용한 유충에서는 12시간동안 건조가 완료되지 않아 15시간으로 건조시간을 증가시켜 분석에 이용하였다. 급속냉동법보다 데치기법으로 희생한 시료에서 더 낮은 수분함량을 나타내었으며($P < 0.05$) 수분을 제외한 일반성분을 비교한 결과 모든 시료간의 유의적 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$). 데치기법으로 희생한 유충의 건조 효율이 증가하였는데, 이는 단백질 또는 구성 물질이 열에 의해 분해 또는 구조적 변형이 발생하여 수분 보유력이 낮아졌기 때문이다(Hegarty & Allen, 1975; Bowers 등, 1987). 유충 탈지분말 100 g (dry weight basis) 중에는 조단백질 함량이 54.61~56.81%로 높은 값을 나타냈다. 일반적인 식품의 단백질 함량인 난류 8.5~14.4%, 육류 15.2~34.7%, 어류 10.4~47.7% 와 비교하여도 높은 수치로서 흰점박이꽃무지 유충은 고단백질 식품소재로 활용가치가 높을 것으로 생각된다.

동일한 희생법으로 처리 후 건조방법을 달리한 탈지분말의 일반성분을 비교한 결과 (Table 4-2) 수분함량, 조단백, 조회분 함량은 유의적 차이가 나타나지 않았다 ($P > 0.05$). 조지방 함량은 열풍건조한 흰점박이 꽃무지 유충 0.29%, 동결건조 한 흰점박이꽃무지 유충 1.35%로 열풍건조 했을 때 더 낮은 함량을 나타내었다. 갈색거저리 유충의 열풍 건조 조지방 함량이 동결건조 조지방 함량보다 더 낮았다고 보고한 Son (2017)의 연구에 의하면 열풍건조의 열처리로 인하여 수분증발과 함께 표면에 있는 지질도 함께 증발하여 손실이 발생된 것으로 사료된다(Chukwu, 2009).

Table 5-1. Proximate analysis of defatted *Protaetia brevitarsis* larva powder with different sacrifice method and storage temperature

Sacrifice method Storage temperature (°C)	Blanching		Freezing
	-20	-80	-80
Moisture (%)	8.59±1.41 ^{b1)}	11.80±1.61 ^{ab}	15.34±1.07 ^a
Crude protein (%)	56.81±4.12 ^a	56.74±1.51 ^a	54.61±2.75 ^a
Crude fat (%)	1.04±0.04 ^a	0.82±0.62 ^a	0.92±0.13 ^a
Crude ash (%)	6.34±0.69 ^a	5.65±0.13 ^a	6.09±0.86 ^a
Crude carbohydrate ²⁾ (%)	27.23±4.89 ^a	25.00±3.61 ^a	23.05±3.10 ^a

All values are mean±SD.

¹⁾Different superscripts within rows of the sacrifice method and storage temperature represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

²⁾Crude carbohydrate = 100-(moisture + crude protein + crude fat + crude ash)

Table 5-2. Proximate analysis of defatted *Protaetia brevitarsis* larva powder with different drying method

Drying method	Hot-air drying	³⁾ Freeze drying
Moisture (%)	10.02±1.17 ^{a1)}	9.72±2.32 ^a
Crude protein (%)	43.34±2.24 ^a	43.50±0.90 ^a
Crude fat (%)	0.29±0.06 ^a	1.35±0.71 ^b
Crude ash (%)	6.46±0.56 ^a	6.62±0.94 ^a
Crude carbohydrate ²⁾ (%)	39.98±3.65 ^a	38.81±2.38 ^a

All values are mean±SD

¹⁾Different superscripts within rows of the drying method represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

²⁾Crude carbohydrate = 100-(moisture + crude protein + crude fat + crude ash)

³⁾ *Protaetia brevitarsis* larva was freeze dried using optimal pre-treatment method to compare with hot-air drying.

3.2. 초음파 전처리 유무에 따른 흰점박이꽃무지 유충 분말 효소가수분해물 제조

본 연구는 3.1.의 결과를 바탕으로 선정된 최적의 흰점박이꽃무지 유충 분말 제조 공정으로 제조된 탈지분말을 사용하였다. 흰점박이꽃무지 유충 분말 제조 최적 공정을 Figure 1에 Optimal process condition과 같다.

3.2.1. 외관

가수분해 하기 전 초음파 처리 유무에 따른 외관은 Figure 3 에 나타내었다. 초음파 처리 전 교반만 적용한 기질의 외관에서는 용해된 분말로 인해 기질의 색이 어두워졌으며, 용매와 용해되지 않은 분말상의 경계면이 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 반면 초음파 처리 후 기질의 외관에서는 용매 자체의 색이 전보다 탁해졌으며, 불용성 단백질과 경계면 부분이 흐릿해져 분산도가 향상된 것을 확인하였다. 초음파 기술은 고형화 된 불용성 물질의 용해도를 향상시키며 화학적 반응을 촉진시키며 분산, 계면활성 및 반응 등에 대해 효과적이라고 알려져 있다 (Patist & Bates, 2007). 또한 초음파의 파장은 미세부분의 조직까지 침투하여 추출 효과를 향상시켜 수율을 증대시킬 수 있다(Lee & Um, 2008). 불용성 분말에 대한 파장으로 인한 물리적인 힘에 의해 용해도가 증가되어 이와 같은 외관이 나온 것으로 생각된다.

효소 가수분해가 완료된 후 외관과 3 kDa membrane filter 후 외관은 Table 6 에 나타내었다. 전반적인 가수분해물의 색상은 어두운 색을 띄고 있었다. 이는 곤충 분말의 자체 색상이 가수분해물의 색상에 영향을 미친 것으로 생각된다. 또한 3 kDa membrane filter 후 투명도가 증가하고, 색상이 밝아진 것을 확인할 수 있었다. 하지만 Alcalase와 Neutrase를 이용하였을 때 색상이 달랐는데, 이는 효소자체의 색상이 가수분해물에 영향을 미친 것으로 사료된다(Jeon 등, 2016).

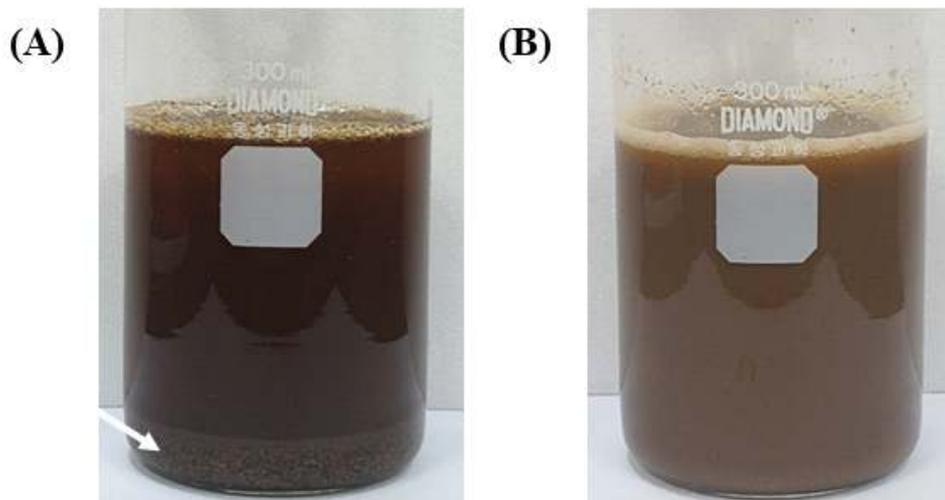


Figure 3. Appearances of substrate before (A) and after (B) ultrasound treatment.

Table 6. Appearance of hydrolysate after Alcalase and Nuetrase enzymatic hydrolysis depending on ultrasound treatment and filtration

	Non-ultrasound treatment			Ultrasound treatment		
	Non-filtration	3 kDa membrane Filtration		Non-filtration	3 kDa membrane Filtration	
		Liquid form	Freeze-dried form		Liquid form	Freeze-dried form
Alcalase						
Neutrased						

3.2.2. 수율

공정에 따른 가수분해물의 수율을 측정한 결과는 Table 7 에 나타내었다. 가수분해 이후 89.19~91.25%로 나타났는데, 이는 곤충분말 상의 불용성 단백질을 제거하였기에 나타난 수치인 것으로 판단된다. 3 kDa 이하의 저분자 펩타이드 분획이후 수율은 66.35~77.68%로 가수분해 수율에 비하여 줄어든 것을 확인하였다. 가수분해물에 존재하는 고분자 펩타이드가 filter를 통과하지 못하여 수율이 줄어든 것으로 확인된다. 최종 가수분해물의 수율은 2.38~2.84%로 동결건조로 인하여 수분이 제거된 수율을 확인할 수 있었다.

Table 7. Effect of ultrasound treatment on yield (%) of different enzymatic hydrolysis of *Protaetia brevitarsis* larva powder at each process step

	Hydrolysis	3 kDa membran filter	Freeze drying
Alcalase	91.25±0.24 ^{a2)}	75.90±0.20 ^a	2.47±0.01 ^b
Neutralse	90.64±0.06 ^a	68.39±3.42 ^b	2.38±0.12 ^b
US ¹⁾ +Alcalase	91.12±0.57 ^a	66.35±0.42 ^b	2.50±0.02 ^b
US+Neutralse	89.19±0.14 ^b	77.68±0.12 ^a	2.84±0.00 ^a

All values are mean±SD.

¹⁾ US: Ultrasound treatment

²⁾ Different superscripts within column represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

3.2.3. pH

흰점박이꽃무지 유충의 단백가수분해물의 pH는 가수분해 후 급격히 감소한 것을 확인할 수 있었다(Table 8). 가수분해 전 pH 7.30~7.37로 시료간의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 하지만 가수분해 후 pH 4.18~4.76으로 가수분해 전 시료들에 비해 낮은 값을 나타냈다. 이는 단백질의 가수분해 후 펩타이드 단위로 분해가 진행되면서 중성이었던 단백질에서 alkaline group과 acid group이 분리되면서 카복실기(COOH-)의 노출이 증가하여 용액의 pH가 감소하였다는 보고들과 유사하였다(Hsu 등, 1977; Jang 등, 2008; Gu 등, 2006; Franco & Filho, 2011). 또한 곤충이 탄수화물을 저장하는 형태인 글리코겐(glycogen)이 가수분해가 진행됨에 따라 해당작용을 거치면서 젖산(lactic acid)를 생산했기 때문이라 생각된다(Park 등, 1995). 가수분해 이후 alcalase보다 neutrase를 이용하였을 때 더 낮은 pH가 나타났는데, 이는 Chung 등(2006)의 결과와 유사하였다.

Table 8. Effect of ultrasound treatment on pH of *Protaetia brevitarsis* larva powder hydrolysates by different enzymatic hydrolysis

	Alcalase	Neutrase	US ¹⁾ +Alcalase	US+Neutrase
pH	4.76±0.25 ^a	4.40±0.43 ^{ab}	4.70±0.16 ^a	4.18±0.21 ^b

All values are mean±SD

¹⁾ US: Ultrasound treatment

²⁾ Different superscripts within rows represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

3.2.4. 가수분해도

가수분해도는 일반적으로 단백질 가수분해에서 모니터링의 지표로 적용되며 다양한 단백질을 비교하는 지표로서 광범위하게 활용된다. 상업적으로 많이 사용되고 있으며, 이전 연구에서 높은 가수분해도와 항산화능을 나타냈던 alcalase와 neutrase를 이용하여 가수분해물을 제조 후 특성을 관찰하였다(Lee 등, 2017). 가수분해 정도를 확인하기 위해 전처리와 효소를 달리한 가수분해물의 시간에 따른 가수분해도를 알아보기 위해 시간에 따라 시료를 채취하여 Figure 4에 나타내었다.

각각의 가수분해도는 0~0.5 시간동안 급격히 증가하였으며, 8 시간까지의 증가폭은 완만하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이후 반응종료 시간까지의 가수분해도는 유의적 차이가 나타나지 않았다. 이는 곤충 단백질 가수분해물에서 초반에 급격한 상승폭을 나타내다가 이후 완만하게 상승하는 이전 연구결과들과 유사하였다(Lee 등, 2017; Cho 등, 2019; Jang 등 2019). 또한 가수분해가 이루어지면서 pH가 낮아지고 이로 인해 단백질 화합물인 효소의 분자 구조가 변형되었기 때문이라고 판단된다(Komoda & Matsunaga, 2015). Kim 등(2010)에 따르면 펩타이드 결합 중 반응초기에는 반응성이 강한 결합이 먼저 분해되고, 반응성이 약한 결합은 천천히 분해되기 때문이라고 보고하였다.

Alcalase를 이용한 가수분해물에서는 0.5 시간부터, neutrases를 이용한 가수분해물에서는 8 시간부터 반응종료시간까지 가수분해도의 유의적 차이가 나타나지 않았다($P>0.05$). 이것은 neutrase를 이용하였을 때, 산업적으로 적용하였을 때 효율성이 떨어진다고 볼 수 있다(Suh 등, 2017). 또한 alcalase의 활성은 2.4 AU/g인데 반해 neutrase의 활성은 0.8 AU/g이기 때문에 각 효소의 활성정도가 다르기 때문에 나타난 결과라고 볼 수 있다(Novozyme, 2016). 또한 효소종류에 따라서도 단백질의 구조적인 민감성과 특이 기질에 대한 반응성 차이에 의해 같은 기질에서도 가수분해도 차이가 발생할 수 있으며(Kim, 2010), alcalase는 방향족 알코올을 연결하는 특정 에스테르 결합의 절단하는데 반해, Neutrase는 아연(Zn) 의존성 효소이기 때문에 작용하는 기전에 따른 차이가 가수분해도에 영향을 준 것으로 사료된다(Novozyme, 2016).

초음파 처리구에서는 0~0.5 시간동안 증가도가 초음파를 처리하지 않은 가수분해물에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 액중에 초음파를 처리하면 용매안에서 작은 기포들이 생성되고, 발생한 기포들이 터질 때 생성되는 공동화 현상으로 인해 단백질에 물리적인 힘이 전달되어 수소결합 및 정전기적 인력 등이 파괴되며 단백질 풀림현상이 발생한 것으로 사료된다(Lee & Um, 2008; Pino 등, 2020; Marciniak 등, 2018). Globular, α -helix와 같은 나선형 구조의 단백질이 coil, β -sheet 형태로 변형되어 기질에 대한 효소의 접근성이 증가하여 초기 가수분해도가 급증한 것이라 생각된다(Alizadeh & Aliakbarlu, 2020; Garcia 등, 2016). 또한 초음파를 이용하면 세포벽과 세포막의 구조와 배열을 파괴하여 고효율, 단시간, 고순도 추출을 용이하다(Umego 등, 2021). 이는 효소가수분해 전처리를 통해 시간적인 경제성을 향상시킬 수 있음을 의미한다.

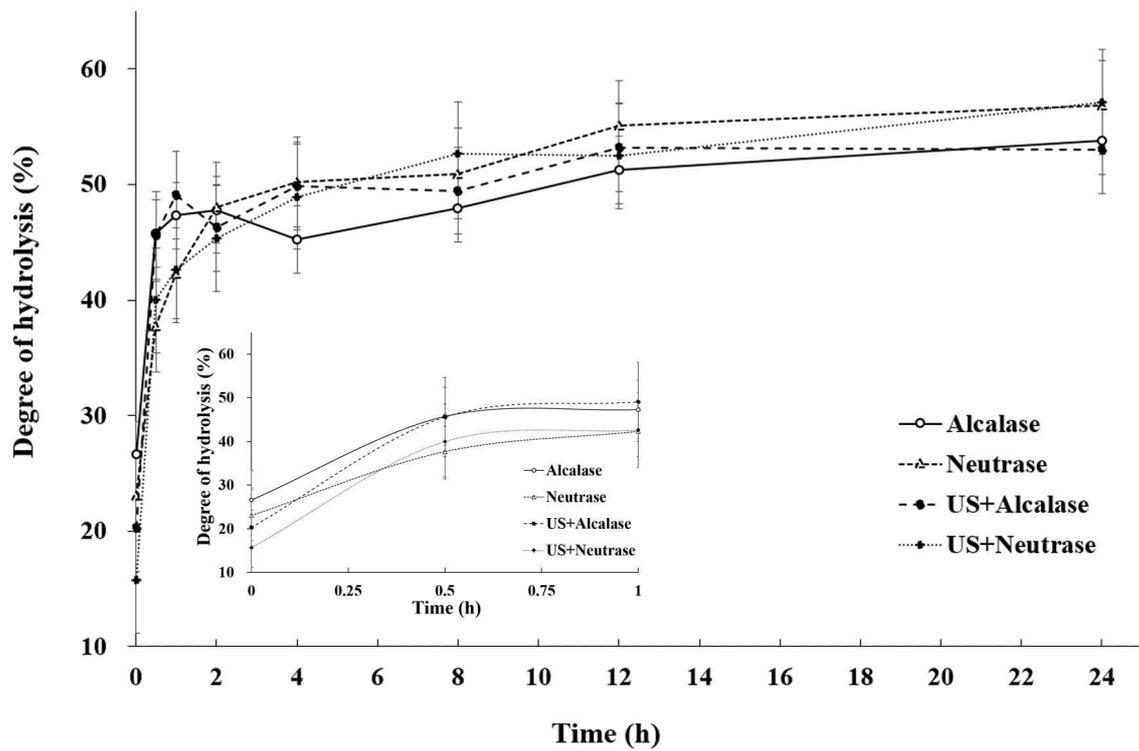


Figure 4. Degree of hydrolysis of *Protactia brevitarsis* larva powder hydrolysates produced with different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment.

3.2.5. 용해도

단백질의 용해도는 유화 및 겔화와 같은 기능적 특성과 연결되는 항목이기에 중요한 특성 중 하나이며, 단백질-단백질, 단백질-물, 단백질-이온 및 이온-물의 상호작용에 의해 결정된다(Trevino 등, 2008).

pH에 따른 가수분해물의 용해도는 Table. 10 에 나타내었다. 일반적인 곤충 단백질의 등전점은 pH 4~6.5로 알려져있다(Birgit 등, 2016; Foo 등, 2006). 하지만 실험에 이용된 각 가수분해물들은 등전점을 포함하는 모든 pH 구간에서 86.63~91.60%로 높은 용해도를 보였다. 가수분해 후 단백질이 저분자 펩타이드로 분해되며, 이는 Figure 4와 Figure 9의 결과와 상관성을 가지고 있는 것으로 확인된다. 또한 가수분해가 완료된 후 3 kDa으로 저분자 펩타이드를 분리하였기에 높은 용해도를 보이는 것으로 사료된다. 대표적인 식물성 단백질인 콩단백질을 효소 가수분해한 Zhang & Romeo (2020)의 결과에 따르면, 가수분해도가 높아질수록 용해도 또한 함께 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

Neutrase보다 alcalase로 가수분해 하였을 때 더 높은 용해도 수치 값을 보였는데, 이는 효소 단백질가수분해물에서 다른 효소들에 비해 alcalase가 더 높은 분해도와 용해도를 보인 연구들의 결과와 유사하였으며(Lee 등, 2017; Zhang & Romeo, 2020; Ahmadifard 등, 2016), 앞서 설명했던 효소 활성도가 영향을 미친 것으로 사료된다. Zhang 등(2019)에 따르면 alcalase는 강한 비특이적인 exo-peptidase로서 유리아미노산을 많이 만들어내면서, 큰 가수분해 활성으로 저분자 펩타이드를 많이 생성하여 다음과 같은 결과가 나타난 것으로 사료된다.

Table 9. Solubility of *Protaetia brevitarsis* larva powder hydrolysates produced with different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment at various pH level

Samples \ pH	3	4	5	6	7	8	9
Control	56.73±2.18 ^{C3)ab4)}	67.28±1.64 ^{Bab}	96.32±2.01 ^{Ans2)}	94.96±0.62 ^{Ans}	96.74±0.40 ^{Ans}	98.83±4.27 ^{Ans}	96.44±0.72 ^{Ans}
US ¹⁾	54.13±3.01 ^{Bb}	58.02±6.07 ^{Bb}	74.65±4.29 ^{AB}	85.00±6.78 ^A	89.67±6.78 ^A	85.54±7.80 ^A	83.91±7.70 ^A
Alcalase	88.07±7.19 ^{NSa}	87.64±6.84 ^a	89.56±7.04	88.80±7.02	89.09±7.14	88.24±9.55	88.54±6.89
Neutrase	86.63±1.94 ^{ABa}	88.28±1.17 ^{ABa}	88.04±0.87 ^{AB}	88.38±0.72 ^A	87.62±0.06 ^{AB}	85.73±0.44 ^{AB}	84.36±0.49 ^B
US+Alcalase	90.80±7.27 ^{NSa}	90.61±8.08 ^a	90.90±8.46	91.60±8.77	91.22±6.96	90.20±7.54	90.97±6.63
US+Neutrase	88.86±7.96 ^{NSa}	89.63±8.53 ^a	89.19±8.30	89.28±8.75	88.41±8.08	87.12±7.50	85.42±7.31

All values are mean±SD.

¹⁾ US: Ultrasound treatment

¹⁾ NS: Not statistically significant

³⁾ Different superscripts within rows represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

⁴⁾ Different superscripts within column represent significantly different at $P<0.05$ by Turkey's multiple range test.

3.2.6. DPPH radical scavenging activity

3 kDa membrane filter를 통과한 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하여 Figure 5 에 나타내었다. 양성대조군으로 Ascorbic acid 0.01 mg/mL의 농도와 비교하였다.

대조구와 비교하여 초음파 처리구의 DPPH 라디칼 소거능이 42.19%에서 46.15%로 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). 각 효소가수분해물에서도 Alcalase 가수분해물은 50.47%에서 50.73%로, Neutrase 가수분해물은 47.97%에서 48.40%로 모두 양성대조군 활성 이상의 소거능을 나타냈다. 대개 단백질에 대해 열처리 또는 이온강도를 달리하는 등의 처리를 가하였을 때 항산화 활성이 증가하였는데(Fu 등, 2017; Serpen 등, 2012), 이는 각 처리에 대해 단백질의 수소결합이 파괴되고 이로 인해 수소 공여체를 생성하게 되면서 항산화 능력이 증가 된다고 알려져 있다(Zhang 등, 2020). 또한 Pino 등(2020)에 따르면 초음파 처리후 소수성 잔기 노출도가 증가하였는데, 이는 초음파 처리가 단백질 폴립 현상을 일으켜 입체구조의 중심부에 있던 소수성 잔기의 노출 정도가 증가하였기 때문이다. 소수성 잔기는 자유 라디칼에 대한 접근성이 높아 항산화 활성 증가에 영향을 미친 것으로 사료된다.

Lee 등(2017)의 연구에서 3 kDa 이하의 흰점박이꽃무지 효소가수분해물에서 Neutrase (13.75 $\mu\text{g TE/mg}$)가 Alcalase (12.03 $\mu\text{g TE/mg}$)의 DPPH 라디칼 활성이 높게 측정되었다. 이는 Alcalase를 이용한 가수분해물의 활성이 더 높았던 본 실험 결과와 상이한 결과로 유충의 성장정도와 생산지에 따른 차이인 것으로 판단된다. Kim 등(2013)의 연구에서 제주마 사골 가수분해물의 농도를 20 mg/mL의 농도로 고정된 후 DPPH 라디칼 활성을 관찰한 결과 각 효소가수분해물에서 추출물과 3 kDa이상의 펩타이드보다 3 kDa이하의 펩타이드에서 0.14 mM trolox equivalent에 해당하는 활성을 보였다. Kim 등(2013)은 저분자 돼지껍질 추출물의 농도를 50 mg/mL의 농도로 DPPH 라디칼 활성을 측정한 결과 91.97%의 억제율로 1 mg/mL의 비타민C와 동일한 항산화 효과로 3 kDa이상의 분획물 보다 높은 활성을 보고하였다. 따라서 식용곤충을 포함하는 동물성 단백질 가수분해물의 경우 저분자 펩타이드에서 보다 높은 DPPH 활성을 띄는 것으로 판단된다.

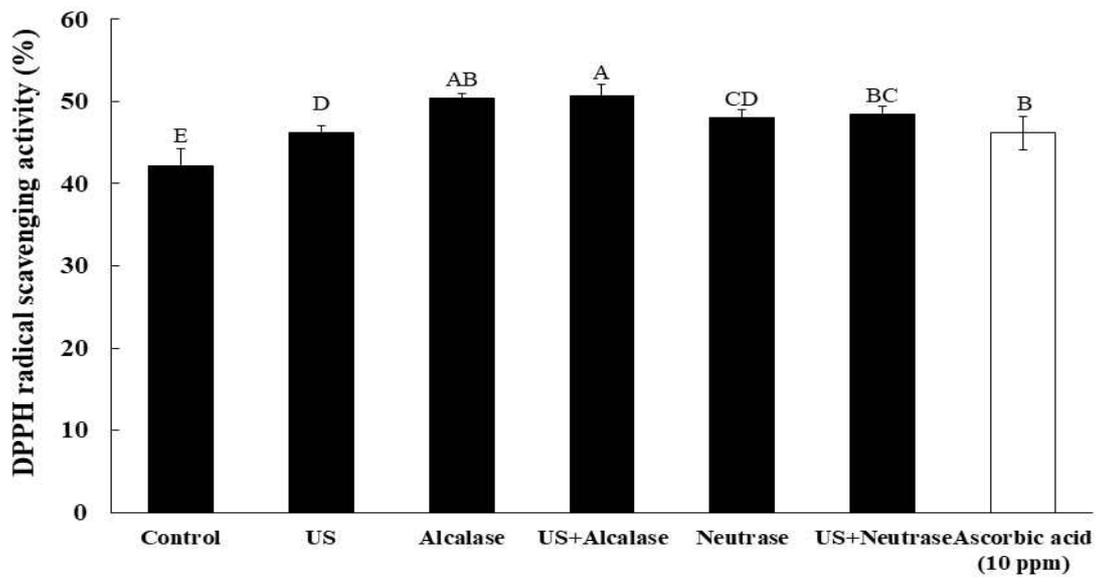


Figure 5. DPPH radical scavenging (%) of *Protactia brevitarsis* larva powder hydrolysates by using different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment.

3.2.7. ABTS radical scavenging activity

ABTS 라디칼은 Potassium persulfate와의 반응으로 생성되어 이는 시료의 항산화능에 의해 소거되면서 청록색의 ABTS 라디칼이 탈색되는 정도를 흡광도로 측정하는 방법이다(Lee 등, 2017). DPPH 라디칼 소거법과 같은 항산화 활성 측정법이나 라디칼을 화학적인 방법으로 유발하여 활성을 측정하며, 라디칼 생성시 시간이 소요되는 단점이 있지만 측정이 빠르고 pH 변화에 다소 민감하지 않다는 장점이 있다(Yoo 등, 2007).

흰점박이꽃무지 유충의 효소가수분해물에 대한 ABTS 라디칼 소거활성은 Figure 6 에 나타내었다. 양성대조군으로 Trolox 0.02 mg/mL의 농도와 비교하였다. 모든 효소가수분해물은 대조구와 가수분해 전 초음파 처리구에 비해 약 4배 이상 활성이 유의적으로 증가하였으며($P < 0.05$), 양성대조구보다 유의적으로 높은 활성을 보였다($P < 0.05$). 대조구와 초음파 처리구는 각각 22.53%와 25.64%로 유의적 차이는 나타나지 않았으며($P > 0.05$), 마찬가지로 같은 효소가수분해물인 경우 초음파 처리에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다($P > 0.05$). 이는 초음파 처리로 인한 단백질 구조변형이 ABTS 라디칼 소거능에 관여하지 않는 것으로 판단된다.

각 효소 가수분해물은 양성대조군의 활성 74.82%와 비교하여 더 높은 활성을 나타내었다. 또한 가수분해 전과 비교하여 활성이 급증한 것으로 보아 가수분해도와 상관성이 있는 것으로 보인다. 가수분해도의 증가는 항산화 활성과 상관관계가 있다는 연구 결과는 Kumar 등(2016)에 의해 보고된 바 있다. 이는 가수분해 시 생산되는 아미노산의 종류 또는 배열 등에 의하여 항산화 활성이 달라질 수 있으며, 항산화 활성을 나타내는 아미노산 및 펩타이드의 노출정도가 ABTS 라디칼 소거능에 영향을 미친 것으로 생각된다(Jang 등, 2019).

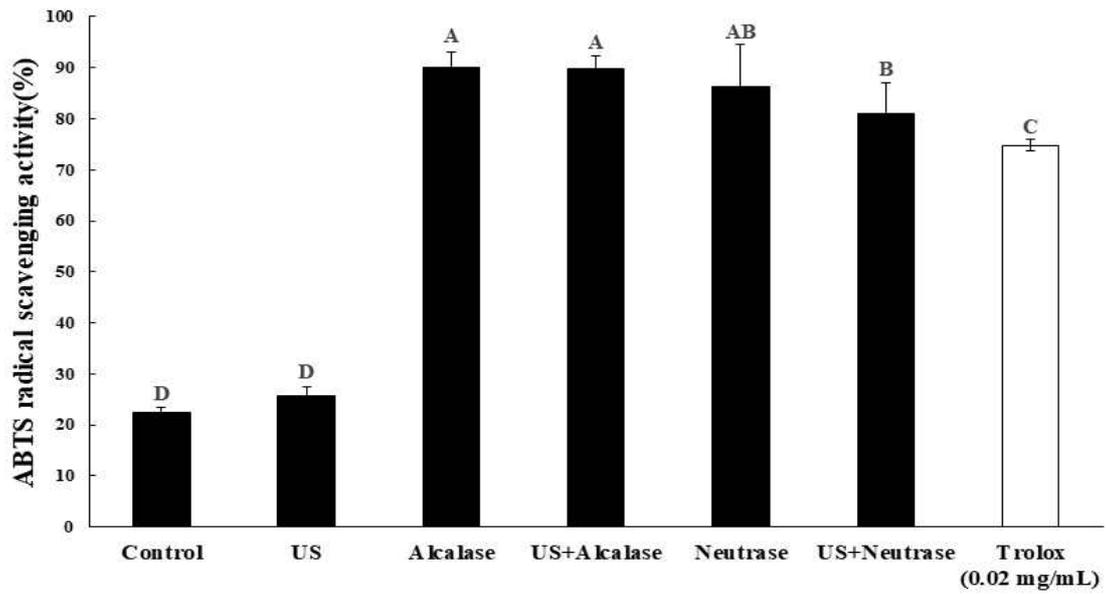


Figure 6. ABTS radical scavenging activity of *Protactia brevitarsis* larva powder hydrolysates by using different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment.

3.2.8. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP assay)

FRAP법은 자유 라디칼을 소거하는 DPPH 와 ABTS 라디칼 소거법과 달리 철 환원점박이꽃무지 유충의 효소가수분해물에 대한 FRAP은 Figure 7 에 나타내었이온의 산화 및 환원 반응에 의한 활성을 측정하는 방법이다(Johnson 등, 2007). 이는 시료안의 환원제에 의해 환원되어 파란색으로 발색되는 원리를 이용한 비색법으로, 방법이 간단하고 재현성이 높다는 장점이 있다(Benzie & Strain, 1996).

대조구와 초음파 처리구는 각각 10.6 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 과 14.4 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 로 낮은 환원력을 띄었으며, 초음파 처리에 따른 유의적 차이가 나타나지 않았으며 ($P>0.05$), 이는 각 효소 가수분해물에서도 초음파 처리에 따른 환원력 증가가 나타나지 않았다. 다른 항산화 활성 결과와는 달리 Neutralse 가수분해물의 환원력이 46.4 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 로 alcalase 가수분해물의 환원력인 35.9 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 보다 높았다($P<0.05$). 이는 항산화 활성 측정 방법에 따라 차이가 발생할 수 있으며, 효소의 기질 특이성에 따라 생성되는 아미노산 배열 또는 조성이 다르기 때문이라 판단된다(Pihlanto, 2016).

식용곤충별 항산화능을 비교한 Jang 등(2019)에 따르면 Alcalase 가수분해물을 3 kDa으로 분획한 흰점박이꽃무지 유충의 활성인 84 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 으로 본 연구의 흰점박이꽃무지 유충의 활성인 35.9 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 와 비교하였을 때, 더 높은 활성을 나타내었다. 또한 장수풍뎅이 유충 30.17 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 와 갈색거저리 유충 15.95 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 보다는 높은 활성을 나타내었다. 이는 같은 3 kDa 이하의 펩타이드를 사용하였지만 유충의 종류, 생산지, 전처리 공정 등의 차이가 각각 다른 환원력을 나타내는 것으로 판단된다.

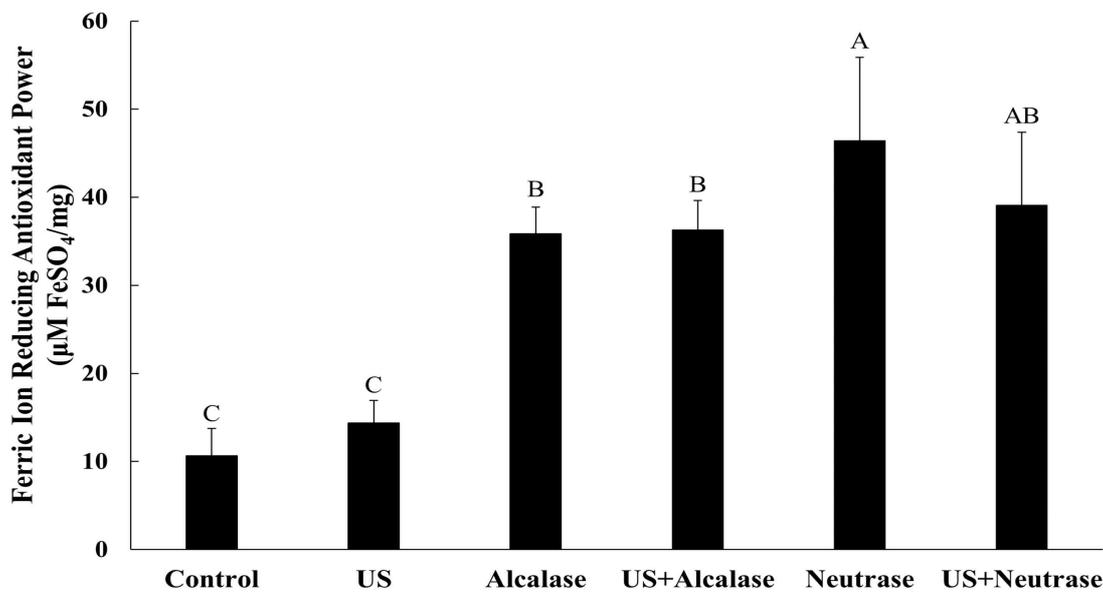


Figure 7. FRAP of *Protactia brevitarsis* larva powder hydrolysate by different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment.

3.2.9. Hydrogen Peroxide scavenging activity

활성산소종의 일종인 Hydrogen peroxide는 반응성이 매우 강하여 단백질과 지질에 손상을 발생시켜 생체기능 저하 또는 성인병 유발 및 노화를 유발하는 것으로 알려져 있다(Martindale & Holbrook, 2002).

흰점박이꽃무지 유충 효소가수분해물의 H_2O_2 소거능을 측정한 결과는 Figure 8에 나타내었다. 가수분해 전인 대조구(2.08 mg TE/g)와 비교하여 초음파 처리구(2.56 mg TE/g)에서 유의적으로 활성이 증가하였다($P < 0.05$). 초음파 처리 하지 않은 효소 가수분해물은 초음파 처리한 효소가수분해물에 비해 다소 높은 소거능을 보였지만 유의적 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). 초음파 처리한 효소가수분해물의 경우 alcalase 효소 가수분해물은 2.87 mg TE/g, Neutrase 효소 가수분해물은 2.99 mg TE/g으로 나타나 가수분해 하기 전에 비해 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). 즉, 초음파처리한 흰점박이꽃무지 유충 효소가수분해물의 H_2O_2 소거능을 증가 시키는데 유효한 공정으로 판단된다.

Chandrapala (2012)의 연구에 의하면 유청 단백질에 대한 초음파 처리 이후 반응성 sulfhydryl group의 함량이 증가하였는데, 이는 물리적인 충격으로 단백질의 구조적 변형을 일으켜 thiol group의 노출이 증가하였기 때문이다. 일반적으로 시스테인과 같은 thiol group을 포함하는 단백질은 H_2O_2 을 소거하며 세포의 산화 환원의 균형을 조절한다고 알려져 있다(Lkinnula 등, 2004; Netto 등, 1996; Je 등, 2009). 또한 sulfhydryl group은 아미노산의 조효소로서 소수성을 띠고 있어 자유 라디칼에 대한 반응성이 높아 산화적 환경에서 H_2O_2 소거능이 뛰어나다(Gracia 등, 2016).

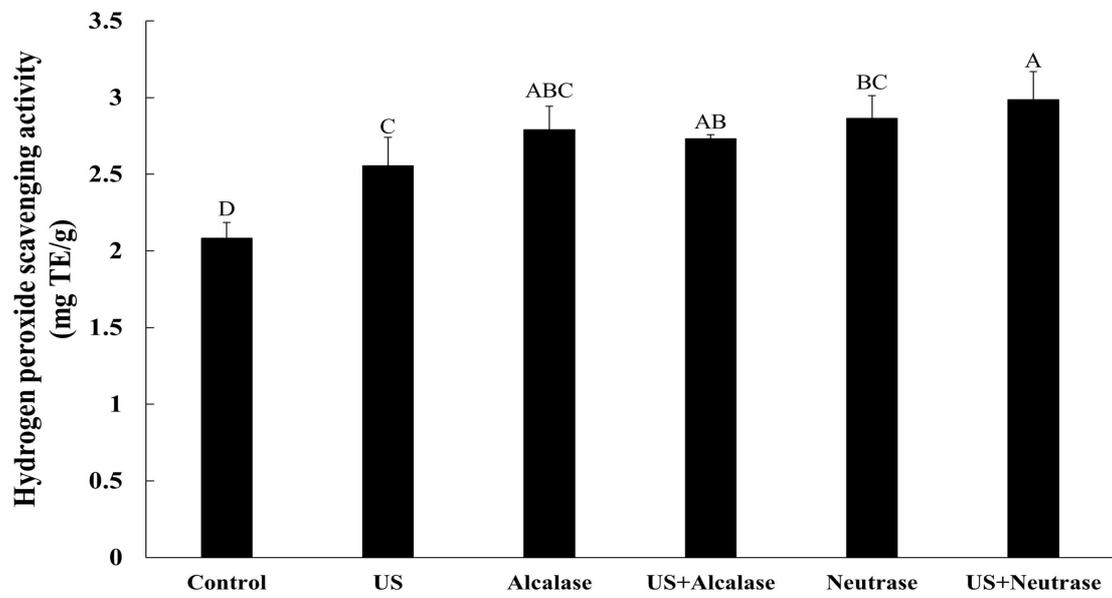


Figure 8. Hydrogen Peroxidase radical scavenging activity of *Protaetia brevitarsis* larva powder hydrolysate by different enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment.

3.2.10. 전기영동

공정과 시간에 따른 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 특성을 파악하고자 앞선 결과를 바탕으로 선발된 최적의 가수분해물인 초음파 처리 후 Alcalase를 이용하여 SDS-PAGE를 실행하였다(Figure 9).

초음파 처리 전 기질용액의 밴드에서 100~140 kDa와 35~60 kDa, 20 kDa, 10 kDa 범위의 밴드가 염색되는 것을 확인하였다. 14~35 kDa 범위의 밴드가 나타나는 것은 곤충의 큐티클 단백질에서 유래할 수 있다(Anderson 등, 1995). 35 kDa 이상의 범위의 밴드는 효소 및 기타 단백질로 인한 것으로 사료된다. 여기에는 멜라닌 억제 단백질(43 kDa), β -glucosidase(59 kDa), tyrosin 유사 단백질(59 kDa), 멜라닌 관련 단백질(85 kDa)과 같은 단백질이 존재하는 것으로 사료되며(Chao 등, 1999; Prabhakar 등, 2007; Zhao 등, 2005; Ferreira 등, 2001), 100~140 kDa 범위의 밴드는 유충의 지방조직에서 합성되는 인지질 단백질인 Vitellogenin 유사 단백질(160 kDa)이 존재하는 것으로 사료된다(Lee 등, 2000). Son (2017)은 탈지한 갈색 거저리 분말에서의 60~100 kDa 범위의 고분자 단백질은 대체로 극성 용매보다 비극성 용매에서 높은 친화도를 나타낸다고 보고하였다. 이를 통해 가수분해 시간이 증가할수록 친수성 용매에 대한 용해도가 증가함을 확인하였다.

효소 가수분해물의 전기영동에서 5~10 kDa의 밴드 범위가 염색된 것을 바탕으로 저분자 펩타이드의 존재를 확인하기 위하여 acrylamide gel 농도를 높혀실험하였다. 가수분해 시간이 증가할수록 3.5~14.3 kDa 범위의 밴드의 염색부위가 줄어드는 것을 확인하였다.

초음파 처리구에서는 밴드 전체가 진하게 염색되었으며, 245 kDa 이상의 밴드가 나타나고 well 부근이 진하게 염색되었다. 이는 가수분해 전 초음파 및 열처리, 마이크로웨이브 등의 전처리 후 상승된 용해도에 의해 밴드가 진해졌다는 이전 연구들의 결과와 유사하였으며(Hall & Liceaga, 2020; Zielinska 등, 2017; Ahmadifard 등, 2016), 초음파 처리 전 기질용액의 밴드와 비교하여 고분자 펩타이드의 용해도와 관련된 결과인 것으로 생각된다. 효소가 투입된 시점부터 가수분해도가 진행됨에 따라 밴드가 연해지는 결과는 이전 연구들의 결과와 유사하였다(Jang 등, 2019; Kan 등, 2020; Jin 등, 2020). 수용성 단백질 추출물에 대해 SDS-PAGE를 수행한 Yi 등(2013)의 결과에서 <95 kDa 인 단백질만 나타난 것으로 보아, 효소 가수분해가 수용성 단백질을 생성에 도움을 주는 것으로 사료된다.

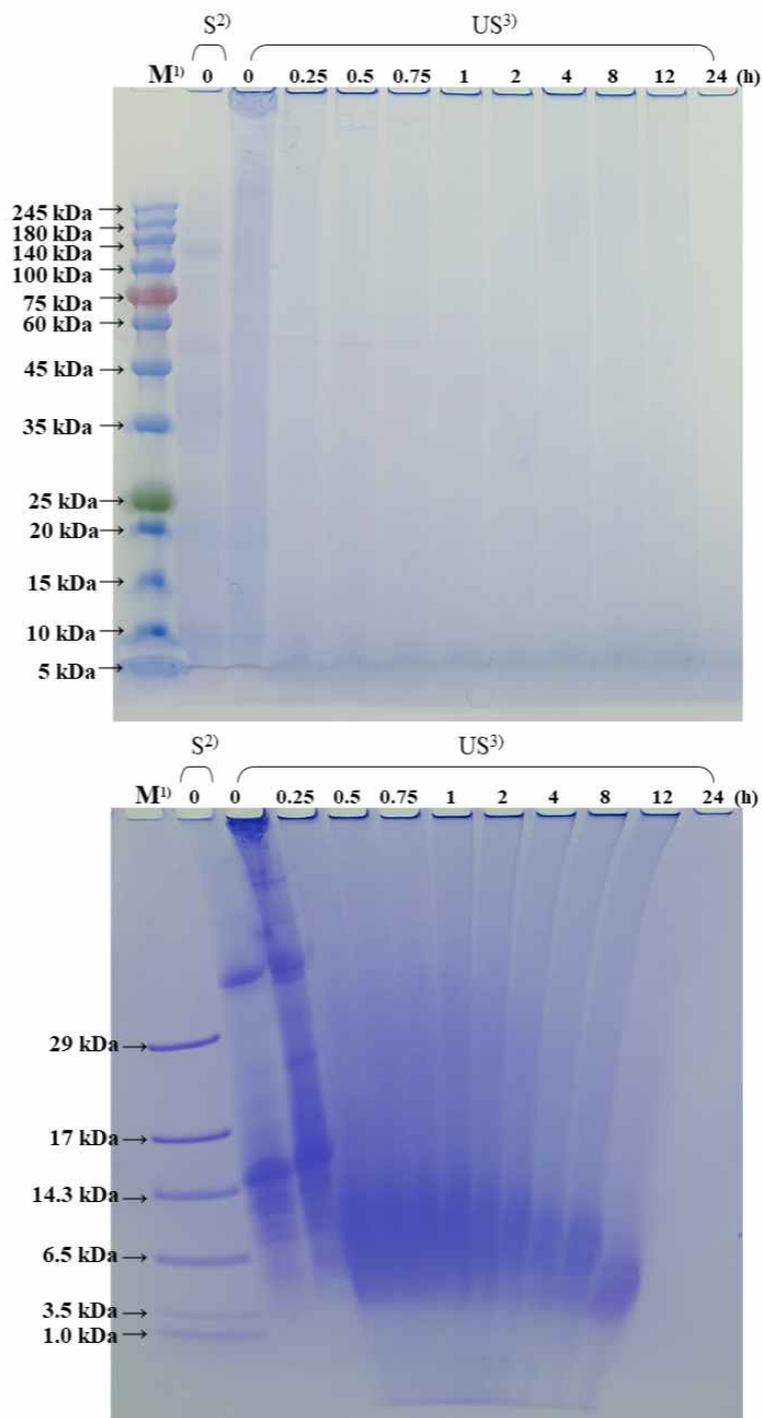


Figure 9. SDS-PAGE electrophoretic profiles at (A) broad molecular weight range (5-245 kDa) or (B) low molecular range (1-29 kDa) of *Protactia brevitarsis* larva powder hydrolysates during enzymatic hydrolysis by Alcalase.

¹⁾ M-standard marker

²⁾ S-stirring

³⁾ US-ultrasound treatment

3.2.11. 구성아미노산

흰점박이꽃무지 유충을 초음파 처리 후 alcalase를 이용하여 제조한 단백가수분해 물의 아미노산 조성을 Table 10에 나타내었다. 가수분해 시간에 따라 아미노산 분석을 시행한 결과 모든 아미노산이 가수분해 시간이 증가할수록 증가하는 것을 확인하였다($P < 0.05$). 단백질의 질을 나타내는 필수아미노산에 해당되는 라이신, 로이신, 발린, 이소루신, 트레오닌, 페닐알라닌, 히스티딘의 함량으로 평가될 수 있는데 가수분해 이후 필수아미노산 함량이 증가하며 가수분해 공정이 단백질의 영양적인 측면에서 긍정적인 효과를 발생시킬 수 있는 것을 알 수 있었다(Kim & Ahn, 2014).

그중 근 단백질에 존재하며 골격근에서 산화되어 근육의 에너지 생산에 기여하며 (Wagenmakers 등, 1990), 운동 또는 식이에 의한 체중 감량 시 근육량의 손실을 방지한다고 알려진 분지쇄 아미노산(BCAA)인 루신, 이소루신, 발린은 가수분해 전과 비교하여 증가하였으며(Churchward-Venne 등, 2013), 가수분해 0.5시간에서 반응 종료시간과 유의적이 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$).

또한 친수성 잔기에 해당되는 세린, 글루타민산, 아스파라진 및 트레오닌의 함량이 가수분해 이후 증가하는 것으로 보아, 가수분해 공정이 단백질 용해도에 유리하게 작용하는 것을 나타낸다(Trevino 등, 2008). 앞서 가수분해하기 전과 비교하여 가수분해 후 항산화능이 증가한 것을 확인하였는데, 이는 초음파 처리와 가수분해 공정으로 인해 라디칼 소거능에 기여하는 소수성 아미노산이 증가하였기 때문으로 사료된다 (Benjamin 등, 2019).

Table 10. Amino acid composition of *Protaetia brevitarsis* larva powder hydrolysates during enzymatic hydrolysis by alcalase.

Amino acid (mg/100g)	Time(h)				
	0	0.5	1	8	24
Tyrosine	25.07±0.62 ^d	109.55±3.35 ^c	121.19±1.24 ^{bc}	111.06±0.17 ^{ab}	119.25±3.56 ^a
Glycine	36.71±0.25 ^c	94.21±0.78 ^b	95.71±0.02 ^{ab}	96.47±0.40 ^{ab}	97.35±1.20 ^a
Serin	32.74±0.30 ^d	103.48±0.30 ^c	107.33±0.25 ^b	107.34±0.90 ^a	88.22±0.93 ^a
Alanine	40.02±0.14 ^b	93.19±0.48 ^a	92.49±0.31 ^a	94.18±0.48 ^a	94.87±1.48 ^a
Glutamic acid	87.16±1.50 ^b	212.73±0.50 ^a	217.32±0.42 ^a	216.25±0.58 ^a	216.44±3.30 ^a
Lysine	29.92±1.48 ^b	90.93±0.14 ^a	93.42±0.13 ^a	95.56±0.89 ^a	95.94±2.28 ^a
Leucine	26.86±2.34 ^b	91.94±2.05 ^a	95.29±0.54 ^a	94.24±0.47 ^a	94.96±0.85 ^a
Methionine	5.78±0.14 ^b	21.90±0.76 ^a	23.75±1.80 ^a	21.44±1.38 ^a	23.07±1.64 ^a
Valine	22.68±0.05 ^b	73.94±1.96 ^a	76.64±0.26 ^a	75.91±2.38 ^a	79.14±0.52 ^a
Arginine	30.36±1.18 ^b	73.20±0.43 ^a	76.73±0.76 ^a	75.17±1.17 ^a	71.79±2.04 ^a
Asparagine	46.39±2.18 ^b	138.72±0.17 ^a	141.50±0.21 ^a	142.19±0.45 ^a	42.27±2.43 ^a
Isoleucine	18.36±1.51 ^b	53.41±2.41 ^a	56.25±1.09 ^a	55.88±2.60 ^a	58.92±0.07 ^a
Threonine	22.97±0.93 ^b	70.46±0.44 ^a	71.90±0.18 ^a	72.78±0.79 ^a	72.07±1.05 ^a
Phenylalanine	21.66±1.76 ^c	63.21±0.82 ^b	65.72±0.28 ^{ab}	67.24±0.59 ^{ab}	67.45±0.99 ^a
Proline	79.11±0.86 ^b	135.82±5.52 ^a	133.03±0.77 ^a	138.32±1.15 ^a	141.13±3.30 ^a
Histidine	22.92±1.56 ^b	45.93±0.96 ^a	48.37±0.45 ^a	47.20±0.06 ^a	46.79±0.26 ^a
EAA ¹⁾	165.34±9.52 ^b	489.81±8.50 ^a	507.57±2.38 ^a	508.80±7.66 ^a	515.27±6.02 ^a
BCAA ²⁾	67.89±3.80 ^b	219.28±6.42 ^a	228.17±1.90 ^a	226.02±5.44 ^a	233.02±1.44 ^a
HAA ³⁾	245.38±6.02 ^c	605.70±2.02 ^b	615.11±1.18 ^{ab}	622.23±8.06 ^{ab}	633.81±8.41 ^a

¹⁾EAA(Essential amino acid) - Lysine, Leucine, Valine, Isoleucine, Threonine, Phenylalanine, Histidine

²⁾BCAA(Branched-chain amino acid) - Leucine, Valine, Isoleucine,

³⁾HAA(Hydrophobic acid) - Glycine, Alanine, Leucine, Valine, Isoleucine, Phenylalanine, Proline

^{a-b}The mean in each row followed by the letter are not significantly by Tukey's multiple range test at $P<0.05$.

4. 결론

흰점박이꽃무지 유충의 분말 제조 공정 최적화를 위해 희생법 종류와 탈지 유무에 따른 이화학적 품질을 비교하였다. 데치기법으로 희생하였을 때 수분함량이 낮아 건조식품으로서 더 적합하였으며, 단백질 식품으로서 단백질 변패도가 더 낮았다. 저장안정성과 가공적성 증진을 위해 탈지를 시행하였으며, 이는 분말상의 명도(L^*)값과 총 페놀 함량을 증가시키는 것을 확인하였다. 이후 건조법 설정을 위해 열풍건조와 동결건조를 비교하였을 때, 두가지 건조법 모두 등전점 이상의 pH였으며, 열풍건조한 분말의 조지방 함량이 더 낮아 저장기간동안의 지방산패의 위험을 줄일 수 있을 것이라 판단되어 최적 건조방법으로 택하였다.

위 결과를 바탕으로 단백질의 활용도를 증가를 위해 초음파 처리 후 Alcalase와 Neutrase를 이용하여 효소 가수분해하였다. 각 효소 가수분해물은 공통적으로 pH가 감소하였으며, 용해도가 증가하였다. 초음파 처리를 통해 0시간에서 0.5 시간 사이의 초음파 처리하지 않은 효소가수분해물 보다 가수분해도가 급증하였으며, DPPH 라디칼 소거능과 H_2O_2 소거능이 유의적으로 증가함을 확인하였다. Alcalase를 사용하여 가수분해했을 때 가수분해도가 0.5 시간만에 반응종료시간과 같은 유의결과를 나타냈으며, DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능에서 유의적으로 높은 활성을 나타냈다. 따라서 물리화학적인 측면을 고려하였을 때 초음파 처리 후 alcalase를 이용하여 가수분해하는 것이 적합한 효소가수분해 및 전처리라고 판단하였다. 이를 이용하여 전기영동한 결과 가수분해 시간에 따라 저분자 펩타이드를 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 가수분해를 통해 필수 아미노산 및 분지쇄 아미노산, 친수성 아미노산 함량이 증가하는 것을 확인하였다.

국문 요약

흰점박이꽃무지 유충분말을 제조하기 위해 희생법, 저장온도, 탈지유무, 건조법을 달리하였다.

1단계로 희생법과 탈지공정 유무를 달리하고 동일한 건조법으로 제조했을 때 희생방법과 탈지 유무에 따른 수율은 유의적 차이를 보이지 않았으며, 건조시간과 수분함량을 관찰하였을 때 데치기 희생법을 사용한 유충이 더 짧은 시간에 낮은 수분함량을 나타내었다. 저장온도에 따른 각 항목의 실험값은 유의적인 차이를 나타내지는 않았지만, -80°C 급냉 희생한 유충과 데치기 후 -80°C 에서 보관한 유충은 건조 후 외관에서 냉동변형으로 더 어두운 외관을 나타냈다. 흰점박이꽃무지 유충은 높은 지방함량으로 인해 지방산패의 위험과 단백질의 순도와 용해도에 영향을 미칠 수 있기 때문에 탈지의 유무를 달리하여 품질 특성을 관찰하였다. 탈지 분말은 비탈지 분말보다 희생법과 저장온도에 관계없이 탈지과정 중 곤충의 색이 용출되어 색도의 명도값(L^*)이 증가하였고, 총 폐놀 함량이 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 희생법과 저장온도를 달리한 탈지분말에 한하여 일반성분을 분석한 결과 56.61~56.81%의 높은 조단백질을 함유하고 있었다.

2단계로 최적 건조법을 찾기 위해 열풍건조와 동결건조를 비교하며 품질특성을 관찰하였다. 동결건조에서 유충의 외관이 더욱 잘 보존되는 것을 확인하였으며, pH와 조지방 함량이 유의적으로 높았다. pH의 경우 열풍건조와 동결건조 모두 7.78~7.95로 등전점 이상의 값이 측정되었으며, 조지방은 동결건조가 1.35%로 열풍건조의 조지방 함량인 0.29%보다 높았다. 이외 항목에서는 유의적 차이가 나타나지 않아 열풍건조를 이용하였을 때 분말의 품질 특성에 영향을 끼치지 않으면서 지방 함유율을 낮추고 공정비를 절약할 수 있어 산업적으로 유리하다고 판단된다. 흰점박이꽃무지 유충분말 생산을 위한 최적 가공법은 유충을 데치기하여 희생하여 -20°C 에서 저장하며, 열풍건조법을 건조된 분말을 탈지 하는 것으로 확립되었다.

흰점박이꽃무지 유충을 단백질 식품으로서의 활용도를 높이기 위해 초음파 처리 유무에 따른 효소 가수분해를 실시하였다. 효소는 alcalase와 neutrase를 이용하였으며, 각 효소 가수분해물은 모두 3 kDa membrane filter를 이용하여 분획 후 실험에 이용하였다. 가수분해도는 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내다가 alcalase 효소 가수분해물은 0.5시간부터, neutrase 효소 가수분해물은 8시간부터 반응 종료시간의 가수분해도와 유의적 차이가 나타나지 않았다. 또한 초음파 가수분해물에서 0~0.5시간의 가수분해도가 처리하지 않은 가수분해물과 비교하여 급증하였다. 가수분해 완료 후 pH는 7.30~7.37에서 pH 4.18~4.76로 감소하였다. 효소 가수분해를 통해 흰점박이꽃무지 유충의 단백질 등전점의 용해도가 상승하였다.

항산화 활성은 가수분해 하기 전과 비교하여 가수분해 후 모두 유의적으로 증가

함을 확인하였다. DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능은 alcalase 효소 가수분해물에서 유의적으로 높은 활성을 나타냈다. H_2O_2 소거능은 사용한 효소와 관계없이 같은 활성을 나타냈다. FRAP활성은 neutrase 효소 가수분해물이 더 높은 환원력을 가지고 있는 것을 확인하였다. 이는 두가지 효소 모두 exo-peptidase이지만, alcalase가 더 강한 비특이적 결합으로 항산화 활성이 높은 펩타이드를 생성하는 것으로 사료된다. 또한 초음파 처리한 효소 가수분해물에서 DPPH 라디칼 소거능과 H_2O_2 소거능이 유의적으로 향상되었다. 따라서 초음파 처리가 일부 항산화 활성 증가에 유효한 공정이라고 판단된다.

이화학적 특성과 항산화 활성을 고려하여 초음파 처리 후 Alcalase를 이용하여 가수분해 하는 것이 최적의 가수분해법이라 판단하여 이를 이용하여 전기영동을 시행하였다. 초음파 이후 눈에 띄게 밴드가 전 범위에서 진하게 나타나 단백질의 용해도가 상승한 것을 확인하였다. 효소 가수분해 시간에 따라 고분자 펩타이드의 밴드가 줄어들면서 특히 3.5~14.3 kDa 범위의 밴드의 염색부위가 줄어드는 것을 확인하였다. 이로 통해 효소 가수분해로 인하여 저분자 펩타이드를 생성하는 것을 확인하였다. 또한 가수분해 시간이 지남에 따라 필수 아미노산과 분지쇄 아미노산, 친수성 아미노산의 함량이 증가하였으며, 가수분해 0.5시간에서 대부분의 아미노산 함량이 반응 종료시간과 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 가수분해를 통해 영양학적으로 더 높고, 다양한 식품에 적용이 용이하도록 용해도가 될 수 있으며, 이는 가수분해 시간을 24시간보다 단축시킬 수 있음을 의미한다.

REFERENCES

- Ahmadifard N, Murueta JH, Kenari AA, Motamedzadegan A, Jamali H. (2016). Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two substrates (rice bran protein concentrate and soy-been protein) with SDS-PAGE. *Journal of Food Science and Technology*. 53:1279-1284.
- Alizadeh O and Aliakbarlu J. (2020). Effects of ultrasound and ohmic heating pretreatments on hydrolysis, antioxidant and antibacterial activities of whey protein concentrate and its fractions. *Food Science and Technology*. 131:109913.
- Anderson SO, Ragn K, Thomas NK, Peter H, Peter R. (1995). Comparison of larval and pupal cuticular proteins in *Tenebrio molitor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25:177-187.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis. 18th ed. Association of official analytical chemists, Washington D.C., U.S.A.
- Azagoh C, Ducept F, Garcia R, Rakotozafy L, Cuvelier ME, Keller S, Lewadowski R, Mezdour S. (2016). Extraction and physicochemical characterization of *Tenebrio molitor* proteins. *Food Research International*. 88:24-31.
- Benjamin KM, Ronghai H, Mokhtar D, Jiahui X, Akwasi AA, Haile M (2019). Techno-functinal attribute and antioxidative capacity of edible insect protein preparations and hydrolysates thereof: Effect of multiple mode sonochemical action. *Ultrasonics Sonochemistry*. 58: 104676.
- Benzie FF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76.
- Birgit SB, Rumpold A, Jander E, Rawel HM, Schluter OK. (2016). Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon*. 2:e00218.
- Bowers JA, Craig JA, Kropf DH, Tucker JT. (1987). Flavor, color, and other characteristics of beef longissimus muscle heated to seven internal temperatures

between 55°C and 85°C. *Journal of Food Science*. 52:533–536.

Chandrapala J, Zisu B, Kentish S, Ashokkumar M. (2012). The effects of high-intensity ultrasound on the structural and functional properties of α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin and their mixtures. *Food Research International*. 48:940–943.

Cho HR, Lee YJ, Hong JE, Lee SO. (2019). Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Gryllus bimaculatus*. *The Korean Society of Food Science and Technology*. 51:473–479.

Choa MY, Choia HW, Moon GY, Kim MH, Kwon TH, Homma KI, Natori SJ, Lee BL. (1999). An 86 kDa diapause protein 1-like protein is a component of early-staged encapsulation-relating proteins in coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *FEBS letters*. 452:303–307.

Churchward-Venne TA, Murphy CH, Longland TM, Phillips SM (2013). Role of protein and amino acids in promoting lean mass accretion with resistance exercise and attenuating lean mass loss during energy deficit in humans. *Amino Acids*. 45: 231–240.

Chukwu O. (2009). Influences of drying methods on nutritional properties of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Sciences Research*. 5:600–603.

Chung IK, Kim HS, Kang KT, Choi YJ, Choi JD, Kim JS, Heu MS. (2006). Preparation and functional properties of enzymatic oyster hydrolysates. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 35:919–925.

Chung MY, Hwan JS, Goo TW, Yu EY. (2013). Analysis of general composition and harmful material of *Protaetia brevitarsis*. *Jornal of Life Science*. 23:664–668.

Dagostin JLA. (2016). Use of blanching to reduce antinutrients, pesticides, and microorganisms. Springer International Publishing AG. *New Perspectives on Food Blanching*. 61–94.

Fellegrini N, Ke R, Yang M, Evans CR. (1999). Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying

2,2'-azin-bis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*. 299:379-389.

Ferreira AHP, Marana SR, Terra WR., Ferreira C. (2001). Purification, molecular cloning, and properties of a β -glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31:1065-1076.

Foo CWP, Bini E, Hensman J, Knight DP, Lewis RV, Kaplan DI. (2006). Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders. *Applied Physics A Materials Science & Processing*. 82:223-233.

Franco LFM and Filho PDAP. (2011). On the solubility of proteins as a function of pH: mathematical development and application. *Fluid Phase Equilibria*. 306:242-250.

Fu Y, Young JF, Therkildsen M. (2017). Bioactive peptides in beef: Endogenous generation through postmortem aging. *Meat Science*. 123:134-142.

Garcia LA, Tostado EC, Ozimek L, Gomez SR, Ozuna C, Silvia LAL. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 37:84-90.

Gould B, Wolf B. (2018). Interfacial and emulsifying properties of mealworm protein at the oil/water interface. *Food Hydrocolloids*. 77:57-65.

Gu YA, Jang SY, Park NY, Mun CR, Kim OM, Jeong YJ. (2006). Property changes of mung bean depending on conditions of hydrolysis. *Korea Journal of Food Preservation*. 14:301-307.

Hall F and Liceaga A. (2020). Effect of microwave-assisted enzymatic hydrolysis of cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein on ACE and DPP-IV inhibition and tropomyosin-IgG binding. *Journal of Functional Foods*. 64:103634.

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. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 44:1660-1665.

He S, Franco C, Zhang W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research*

International. 50:289-297.

Hegarty PVJ, Allen CE. 1975. Thermal effects on the length of sarcomeres in muscles held at different tension. *Journal of Food Science*. 40:67-74.

Hoyle NT and Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring(*Clupea harengus*). *Journal of food Science*. 59:76-79.

Hsu HW, Vavak DL, Sattelle LD, Miller A. (1977). A multi enzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*. 42:1269-1272.

Huis AV. (2016). Edible insects are the future. *Proceedings of the nutrition society*. 75:294-305.

Hwang EH, Kand BG, Kim BY, Lee HJ. (2001). Protein quality evaluation and effect of plasma lipid contents of acid hydrolysates of cocoon inn rats fed by high cholesterol, high triglyceride and high sucrose diet. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 30:1004-1009.

Jang HY, Park CE, Lee SO. (2019). Comparison of antioxidant capacity of protein hydrolysates from 4 different edible insects. *The Korean Society of Food Science and Technology*. 51:480-485.

Jang SY, Sin KA, Park NY, Kim DH, Kim MJ, Kim JH, Jeong YJ. (2008). Changes of quality characteristics of low-molecular soymilk according to hydrolysis time. *Journal of the Korean society of Food Science and Nutrition*. 37:1287-1293.

JE C, Ewbank R, Rosenberg ME. 1984. Euthanasia of tortoises. *Veterinary Record*. 114:635.

Je JY, Lee KH, Lee MH, Ahn CB. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42:1266-1272.

Jeon KH, Hwang YS, Kim YB, Choi YS, Kim BM, Kim DW, Jang A, Choi JY. (2016). Quality characteristics of pork skin collagen with enzyme treatments. *The Korean Journal of Food and Nutrition*. 29:760-766.

Jin F, Wang Y, Tang HK, Regenstein J.M, Wang FJ. (2020). Limited

hydrolysis of dehulled walnut (*Juglans regia* L.) proteins using trypsin: Functional properties and structural characteristics. *Food Science and Technology*. 133:110035.

Johnson JD, Kolodziejczyk K, Krol M, Nowak P, Krol B, Nowak D. (2007). 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 & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 100:345-352.

Kan H, Kim CH, Kwon HM, Park JW, Roh KB, Lee H, Park BJ, Zhang R, Zhang J, Söderhäll K, Ha NC, Lee BL. (2008). Molecular control of phenoxidase-induced melanin synthesis in an insect. *Journal of Biological Chemistry*. 283: 25316-25323.

Kan WH, He K, Sun F, Mu L, Liao S, Li Q, Yi J, Liu Z, Wu X. (2020). Effect of heat, enzymatic hydrolysis and acid-alkali treatment on the allergenicity of silkworm pupa protein extract. *Food chemistry*. 24:128461.

Kang JH, Ko YT. (2002). Effects of freeze-drying time on quality of freeze-dried kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 34:91-95.

Kim CW. (2011). Derivatization of rice byproducts using commercial proteases and characterization of their hydrolysates. *Kyunghee Univ. Seoul, Korea*.

Kim DW, Kim KM, Ha G, Jung JR, Chang O, Ham JS, Jeong SG, Park BY, Song J, Jang A. (2013). Anti-oxidative and neuroprotective activities of pig skin gelatin hydrolysates. *Food Science of Animal Resources*. 33:258-267.

Kim DW, Park JI, Chae HS, Kim YB, Jang A. (2013). Antioxidation effect of leg bone extracts and enzyme hydrolysates from Jeju crossbred horses (Jeju native horse×Thoroughbred). *Journal of Life Science*. 23:1147-1154.

Kim HR, Ahn JB (2014). Analysis of free amino acids and polyphenol compounds from lycopene variety of cherry tomatoes. *The Korean Journal of Culinary Research*. 20: 37-49.

Kim JA and Lee JM. (2004). The change of biologically functional compounds and antioxidant activities in *hizikia fusiformis* with drying methods. *Journal of*

the Korean Society of Food Culture. 19:200–208.

Kim MH. (2019). Effect of herbal medicine by-products on the growth of white-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis seulensis*). MS Thesis. Gyeongsang National University, Gyeongsang, Korea.

Kim MR. (2010). Bitterness and solubility of soy protein, casein, gluten, and gelatin hydrolysates treated with various enzymes. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 39:587–594.

Kim SK, Choi YR, Park PJ, Choi JH, Moon SH. (2000). Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 33:198–204.

Kim SY and Lmm JY. (2018). Anti-diabetic peptides derived from milk proteins. *Food Science and Industry*. 51:302–312.

Kim YJ. (2009). Evaluation of antioxidant activity and thermal stability of plant polyphenols. *Biomaterials Research*. 13:30–36.

Komoda T, Matsunaga T. (2015). Constituents of the human body. *Biochemistry for Medical Professionals*. Chapter 3, 7–24.

Korhonen H and Pihlanto A. (2003). Food-derived bioactive peptides: Opportunities for designing future foods. *Current pharmaceutical design*. 9:1297–1308.

Kumar D, Chatli MK, Singh R, Mehta N, Kumar P. (2016). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science & Technology*. 96:391–404.

Kwon EY, Yoo Jm, Yoon YI, Hwang JS, Goo TW, Ki MA. (2013). Pre-treatment of the white-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis*) as an Ingredient for novel foods. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 42:397–402.

Lam ACY, Can Karaca A, Tyler RT, Nickerson MT. (2016). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*. 34:126–147.

Lee HS, Ryu HJ, Song HJ, Lee SO. (2017). Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *protaetia brevitarsis* larvae. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 46:1164-1170.

Lee KJ and Um BH. (2008). Extraction of useful component from natural plants using ultrasound system. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 23:101-108.

Lee KM, Lee KY, Choi HW, Cho MY, Kwon TH, Kawabata SI, Lee BL. (2000). Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitellogenin-like protein in the presence of dopamine. *European Journal of Biochemistry*. 267:3695-3703.

Lkinnula V, Paakko P, Soini Y. (2004). Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS letters*. 569:1-6.

Marciniak A, Suwal S, Naderi N, Pouliot Y, Doyen A. (2018). Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science & Technology*. 80:187-198.

Martindale JL and Holbrook NJ. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*. 192:1-15.

Maryia M, Martine JJI, Chen J, Benjamin O. (2019). Extraction, characterization and functional properties of soluble proteins from edible grasshopper (*Schistocerca gregaria*) and honey bee (*Apis mellifera*). *Food Research International*. 116:697-706.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safty). 2018. Food and Nutrient Database. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_01.jsp on January 30, 2018.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safty). 2020. Food and Nutrient Database. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_01.jsp on October 16, 2020.

Netto L.E.S., Chae HZ, Kang SW, Rhee SG, Stadtman ER. (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *The Journal of Biological Chemistry*. 26:15315-15321.

- Novozyme (2016). Proteases for biocatalysis. No. 2014-12715-04.
- Ozdam T, Capanoglu E, Altay F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*. 51:954-970.
- Park YH, Chang DS, Kim SB. (1995). Processing and Utilization of Seafood. Hyungsul. Seoul, Korea. 347-361.
- Patist A and Bates D. (2007). Ultrasonics in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9:147-154.
- Pihlanto A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16:1306-1314.
- Pino FR, Carpio JE, Galvez RG, Guadix EM. (2020). Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides. *Food and Bioprocess Technology*. 13:217-224.
- Prabhakar S, Chen MS, Elpina EN, Vinokurov KS, Smith CM, Marshall J, Oppert B. (2007). Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Insect Molecular Biology*. 16:455-468.
- Rumpold BA, Fröhling A, Antje Fröhling, Reineke K, Knorr D, Boguslawski S. (2014). Comparison of volumetric and surface decontamination techniques for innovative processing of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 26:232-241.
- Serpen A, Gokmen V, Fogliano V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*. 90:60-65.
- Singh Y, Cullere M, Kovitvadhii A, Chundang P, Dalle Zotte A. (2020). Effect of different killing methods on physicochemical traits, nutritional characteristics, in vitro human digestibility and oxidative stability during storage of the house cricket (*Acheta domesticus* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 65:102444.

Sinleton VL and Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.

Son YJ, Ahn W, Kim SH, Park HN, Choi SY, Lee DG. (2016). Study on the oxidative and microbial stabilities of four edible insects during cold storage after sacrificing with blanching methods. *The Korean Journal of Food and Nutrition*. 29:849-859.

Son YJ. (2017). Physicochemical characteristics of mealworm (*Tenebrio molitor* larvae) and preparation of powders for food material. MS Thesis. Seoul Univ. Seoul, Korea.

Suh HJ, Shin JC, Kim JH, Jang JH, Han SH. (2017). Optimal enzyme selection for organic whey protein hydrolysis. *The Korean Journal of Food and Nutrition*. 30:1359-1363.

Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. (2011). Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 129:485-490.

Trevino SR, Scholtz JM, Pacea CN. (2008). Measuring and Increasing Protein Solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 97:4155-4166.

Umego EC, He R, Ren W, Xu H, Ma H. (2021). Ultrasonic-assisted enzymolysis: principle and applications. *Process Biochemistry*. 100:59-68.

Vandeweyer D, Lenaerts S, Callens A, Campenhout LV. (2017). Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control*. 71:311-314.

Wagenmakers AJM, Coakley JH, Edwards RHT (1990). Metabolism of branched-chain amino acids and ammonia during exercise clues from McArdle's disease. *International Journal of Sports Medicine*. 11: 103-113.

Yi L, Lakemond CMM, Sagis LMC, Schadler VE, Huis AV, Boekel MAJS. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry*. 141:3341-3348.

Yoo KM, Kim DO, Lee CY. (2007). Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Science and Biotechnology*. 16:177-182.

Yoon YC, An SI, Jeng AR, Han SE, Kim MH, Lee CK. (2010). Characteristics of whey protein (WPC-30) hydrolysate from cheese whey. *Journal of Animal Science and Technology*. 52:435-440.

Yu MH, Lee HS, Cho HR, Lee SO. (2017). Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae (mealworm). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 46:435-441.

Zhang Q, Chen QH, He GQ. (2020). Effect of ultrasonic-ionic liquid pretreatment on the hydrolysis degree and antigenicity of enzymatic hydrolysates from whey protein. *Ultrasonics Sonochemistry*. 63:104926.

Zhang Y and Romero HM. (2020). Exploring the structure-function relationship of Great Northern and navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: A study on the effect of enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 162:1516-1525.

Zhao M, Soderha I, Park JW, Ma YG, Osaki T, Ha NC, Wu FC, Soderha K, Lee BL. (2005). A novel 43-kDa protein as a negative regulatory component of phenoxidase-induced melanin synthesis. *The journal of Biological Chemistry*. 280:24744-24751.

Zielinska E, Baraniak B, Kara M. (2017). antioxidant and anti inflammatory activities of hydrolysates and peptid fractions obtained by enzymatic hydrolysis of selected heat treated edible insects. *Nutrients*. 9:970.

감사의 글

지금까지 저의 도전을 항상 응원해주시고 지도해주신 천지연 교수님께 감사의 인사 드립니다. 여러번의 시행착오를 겪을때마다 항상 지켜봐주시고 조언해주셨기에 무사히 석사과정을 마칠 수 있었습니다. 또한 수업을 통해 저에게 아끼지 않고 조언해주시며 도움을 주셨던 임상빈 교수님, 고영환 교수님, 김현정 교수님, 박은진 교수님께 모두 감사의 인사 드립니다.

학업에 힘들고 지칠 때 항상 옆에서 조언과 가르침을 주셨던 효진 언니, 효석 오빠, 지은 언니, 하정 언니, 란이 언니에게 감사드립니다. 덕분에 많은 추억들을 만들 수 있었으며 올바른 방향으로 학교 생활을 마무리 할 수 있었습니다.

학부와 석사 생활을 하면서 저와 가장 많은 시간을 보내면서 다툼과 화해를 반복했던 식품 가공학 실험실이 있었기에 많은 가르침을 받고 졸업을 하게되었습니다. 가장 가까이에서 묵묵히 곁을 지켜주면서 응원을 아끼지 않았던 두리에게 감사드립니다. 또한 즐거운 생활을 만들어 준 동생 혜윤이, 한별 언니, 은성 오빠, 정현 오빠, 지용이 에게도 감사의 인사드립니다. 앞으로도 서로 많이 공부하고 격려하며 다투고 화해하며 즐거운 추억들과 함께 발전하길 응원합니다.

더불어 유일한 동기이며 함께 생활하며 공감해주며 학업적인 논의를 해주었던 서경이에게 감사드립니다. 덕분에 외롭지 않게 공부하며 힘을 얻었던 것 같습니다. 항상 밝은 인사와 장난으로 저를 반겨주셨던 유리 언니, 화영 언니, 재완 오빠와 함께 했기에 즐거운 시간 보낼 수 있었습니다.

저의 성장에 함께해주신 많은 분들의 감사함을 항상 기억하며 더 성장할 수 있는 사람이 되도록 노력하겠습니다. 감사합니다.