



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

흰점박이꽃무지유충  
단백 가수분해물의 이화학적 및  
유화 특성

濟州大學校 大學院

食品工學科

金 두 리

2022年 2月

# 흰점박이꽃무지유충 단백질 가수분해물의 이화학적 및 유화 특성

指導教授 千 智 蓮

金 두 리

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2021年 12月

金두리의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 高 榮 煥 

委 員 金 賢 貞 

委 員 千 智 蓮 

濟州大學校 大學院

2021年 12月



Physicochemical and Emulsifying Properties of  
*Protoetia brevitarsis* larvae Protein  
Hydrolysates

Duri Kim

(Supervised by professor Ji-Yeon Chun)

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

2021. 12

This thesis has been examined and approved by

Young Hwan Ko, Thesis director, 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. 2021

Department of Food Science and Engineering  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## CONTENTS

ABSTRACT	1
LIST OF FIGURES	2
LIST OF TABLES	4
<b>1. 서론</b>	<b>5</b>
1.1. 식용곤충	5
1.2. 단백질 가수분해	8
1.3. 유화제 및 에멀전	10
1.4. 연구목적	11
<b>2. 재료 및 방법</b>	<b>13</b>
<b>2.1. 흰점박이꽃무지유충 alcalase 가수분해물 제조 및 특성</b>	<b>13</b>
2.1.1. 가수분해 수율 및 단백질 추출률	16
2.1.2. 일반성분	16
2.1.3. 가수분해도 및 분자량 분포	16
2.1.4. 구성아미노산	17
2.1.5. pH	17
2.1.6. 단백질 용해도	17
2.1.7. 입자크기, 제타전위, 입도분포도	18
2.1.8. 표면장력	18
2.1.9. 표면소수성	18
2.1.10. 점착각	19
2.1.11. 유화력 및 유화 안정성	19
2.1.12. SEM(scanning electron microscopy)	20
<b>2.2. 분산매 농도에 따른 oil in water 에멀전 제조 및 특성</b>	<b>20</b>
2.2.1. 입자크기, 제타전위, 입도분포도	20
2.2.2. 표면장력, 계면흡착 단백질 농도 및 단백질 흡착률	20
2.2.3. 크리밍	21
2.2.4. 포집효율	21
<b>2.3. 통계 분석</b>	<b>22</b>
<b>3. 결과 및 고찰</b>	<b>23</b>

<b>3.1. 흰점박이꽃무지유충 alcalase 가수분해물의 특성</b> .....	<b>23</b>
3.1.1. Alcalase 가수분해 수율 및 단백질 추출률.....	23
3.1.2. 일반성분 .....	25
3.1.3. 가수분해도 및 분자량 분포.....	27
3.1.4. 구성아미노산.....	31
3.1.5. pH.....	33
3.1.6. 단백질 용해도.....	35
3.1.7. 입자크기, 제타전위, 입도분포도.....	38
3.1.8. 표면장력.....	41
3.1.9. 표면 소수성.....	42
3.1.10. 점축각.....	44
3.1.11. 유화력(EAI) 및 유화 안정성(ESI).....	46
3.1.12. SEM(scanning electron microscopy).....	49
<b>3.2. 분산매 농도에 따른 oil in water 에멀전 특성</b> .....	<b>51</b>
3.2.1. 에멀전 입자특성.....	51
3.2.2. 표면장력, 계면흡착 단백질 농도 및 단백질 흡착률.....	53
3.2.3. 에멀전 크리밍 지수(CI%).....	55
3.2.4. 포집효율.....	57
<b>4. 결론</b> .....	<b>59</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>60</b>

## ABSTRACT

This study was investigated the effect of alcalase-mediated hydrolysis time on *Protaetia brevitarsis* larvae protein. Physicochemical properties such as the hydrolysates yield, protein extraction yield, proximate composition, degree of hydrolysis, SDS-PAGE, pH, solubility, surface hydrophobicity, particle size, and zeta-potential, scanning electron microscopy and emulsifying properties like surface tension, contact angle, and emulsifying properties were evaluated. The initial hydrolysis rate also increased rapidly during 30 min, there was no significant difference after 30 min. Hydrolysates yield and protein extraction yield were increased. Solubility was above 80% solubility at all pH (2-10). SDS-page indicated the reduction in the molecular weight and protein bands having an MW<6.5 kDa. There was an obvious decrease in pH, particle size, zeta potential, and contact angle with the increase of hydrolysis time. All hydrolysates lowered the surface tension and higher interfacial activities than native non-hydrolyzed protein. However, ESI of HP6 was decreased. Excessive hydrolysis time increased hydrophilicity and reduced emulsion stability. Therefore, considering hydrolysis efficiency and emulsification characteristics, 0.5 hour was selected as the optimal hydrolysis time for emulsion preparation. The influences of protein concentration on emulsion stability and properties investigated in *P.brevitarsis* larvae hydrolysate-stabilized O/W emulsions. The results showed that the concentration increased, the particle size increased and the zeta-potential decreased. The higher the protein concentration, the slower the creaming proceeded, and there was no difference in the amount of protein adsorption involved in emulsification. Additionally, encapsulation efficiency was above 95% at all protein concentration. Therefore, this study suggested that *P.brevitarsis* larvae hydrolysate have the potential as an emulsifier in the food emulsion system and application for bioactive compound delivery systems.

## LIST OF FIGURES

Figure 1.	Domestic edible insects as food ingredients (MAFRA, 2021).....	7
Figure 2.	Overview of enzymatic hydrolysis of protein (Arno et al., 2016).....	9
Figure 3.	Process of emulsion preparation by protein as an emulsifier (Mun, 2020).....	12
Figure 4.	Preparation of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates.....	15
Figure 5.	Degree of hydrolysis of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5 HP1.5 HP3 HP6).....	29
Figure 6.	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (m: Molecular weight marker; 0-6 hour: P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).....	30
Figure 7.	Solubility of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6) at various pH conditions.....	37
Figure 8.	Surface tension and surface hydrophobicity of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).....	43



Figure 9.	Contact angle of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by different time of alcalase-mediated hydrolysis (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).....	45
Figure 10.	Emulsifying activity index (A) and emulsifying stability index (B) of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).....	48
Figure 11.	Images observed by Scanning electron microscope of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (A) Defatted <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae powder; (B) P0; (C) HP0.5; (D) HP1.5; (E) HP3; (F) HP6. Images with a 200 μm scale bar provided were taken at 200× magnification.....	50
Figure 12.	Changes in creaming index(%) of emulsions stabilized by various concentration of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates during storage.....	56
Figure 13.	Encapsulation efficiencies(%) of limonene by various concentration of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates during storage.....	58

## LIST OF TABLES

Table 1.	Conditions of ultrasonification processor.....	14
Table 2.	The hydrolysis yield and protein extraction yield of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour: P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).....	24
Table 3.	Proximate composition of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour: P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).....	26
Table 4.	Amino acid composition of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by different time of alcalase-mediated hydrolysis.....	32
Table 5.	pH of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour: P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).....	34
Table 6.	Particle size, zeta-potential and poly dispersity index analysis of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour: P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).....	40
Table 7.	Changes in particle diameter, zeta potential and polydispersity index of emulsions stabilized by various concentration of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates during storage.....	52
Table 8.	The surface tension (mN/m), protein adsorption ( $C_0-C_e$ ) and adsorbed protein percentage (AP%) of emulsions stabilized by various concentration of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae protein hydrolysates.....	54

# 1. 서론

## 1.1. 식용곤충

곤충은 세계 여러 지역에서 오래전부터 소비됐으며, 국제연합식량농업기구(FAO)는 증가하는 세계 인구의 식량 수요를 따르기 위해서 2050년 이내에 70%까지 식량을 증가해야 한다고 밝혔다(Singh et al., 2020). 이를 해결할 육류 대체 식품으로 식용곤충, 배양육, 식물성 단백질 활용이 제안되고 있다. 이 중 식용곤충 활용에 관한 관심이 지속해서 증가하고 있는데 오늘날까지 2,100종 이상의 곤충이 식용 가능하다고 알려져 있으며, 현재 130개국에서 30억 명의 사람들이 소비하고 있다(Jongema 2015; Costa-Neto et al., 2016; Zielińska et al., 2018). 식용곤충은 종의 수가 다양하므로 영양가도 다양하게 나타나며, 먹이와 변태 단계에 따라 다르게 나타난다(Finke and Oonincx, 2014). 일반적으로 식용곤충의 단백질 함량은 건조물 기준 40-70%이며 필수아미노산의 함량이 총 아미노산량의 46-96%로 유용한 아미노산 조성과 높은 소화율을 갖고 있어 영양적 가치가 높다. 또한, 철분, 아연과 같은 미네랄, 비타민B 및 오메가-3와 같은 불포화 지방산의 좋은 공급원이다(Sathe et al., 1982; Xiaoming et al., 2010; Yun and Hwang, 2016; Zielińska et al., 2018). 생산효율이 높아 동일한 양을 생산할 시 필요한 사료가 기존의 가축에 비해 적어 경제적이며 특히 귀뚜라미는 사료 전환율이 닭의 2배, 돼지의 4배, 소의 12배 더 높다고 보고된 바 있다(Lange and Nakamura, 2021). 지구 전체 온실가스 양의 18% 이상을 배출하는 가축에 비해 식용곤충은 온실가스 및 암모니아 배출량이 적어 환경에 미치는 영향이 적다고 알려져 있다(Rumpold et al., 2013; Sun-Waterhouse et al., 2016). 이러한 점에서 식용곤충은 영양적, 환경적, 경제적으로 고부가가치를 지닌 식품으로 활용 가치가 높다.

식용곤충 시장 규모는 전 세계적으로 증가하고 있으며, 글로벌 마켓 인사이트(global market insight)에 따르면 2019년 기준 1억 1,200만 달러에서 2024년 7억 1,000만 달러에 이를 것이라고 예상했다(Ahuja and Mamtani, 2015). 식용곤충 시장 육성을 위한 지원 정책은 국내에서도 활성화되고 있다. 농림축산식품부는 2005년부터 2020년까지 제1-2차 곤충산업 육성 종합 계획을 주도하여 제도 개선,

산업기반 구축, 유통 활성화, 연구개발 분야 등 곤충 자원 활용을 위한 노력을 해왔다. 이로 인해 곤충산업 참여 농가·업체가 2020년 기준 2,873개소로 2015년 980개소 대비 193% 증가하였고 곤충 판매액은 2020년 414억 원으로 2015년 162억 원 대비 155% 증가한 것으로 나타났다. 2021년부터 2025년까지 제3차 곤충·양잠산업 육성 종합 계획을 수립하여 곤충 분야를 첨단 생명 소재 산업으로 육성하는 것을 목표로 하고 있다(MAFRA, 2021).

곤충은 축산법에 따른 가축으로 인정받았으며 곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률 시행령 제6조 1항에 따르면 2021년 9월 기준, 국내에서 식품 원료로 사용 가능한 식용곤충은 총 10종이다. 우선 전래적 식용근거로 인정받은 메뚜기(*Oxya japonica* Thunberg), 번데기(*Bombyx mori* L.), 백강잠 3종이 식품원료로 등록되었다. 그 후 영양성, 유전독성, 일반 독성 분석 결과 식품으로써 이용이 안정하다는 것을 과학적인 입증을 통해 2014년에 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor* L.), 흰점박이꽃무지유충(*Protaetia brevitarsis*)이 식품원료로 인정 받았다. 2015년에는 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 장수풍뎅이 유충(*Allomyrina dichotoma*)이 한시적 인정원료로 인정 받았고 현재는 일반원료로 전환되어 식품 공전에 등록되었다. 2020년 아메리카왕거저리 유충(*Zophobas atratus*)과 수벌번데기(*Apis mellifera* L.)가 한시적 인정원료로 인정받았으며, 2021년에는 풀무치(*Locusta migratoria*)가 한시적 인정원료로 인정받았다 (Fig. 1).

흰점박이꽃무지유충(*Protaetia brevitarsis*)은 딱정벌레목 꽃무지과에 속하는 곤충으로 전체 길이는 17-24 mm 정도이다. 또한, 알, 유충, 번데기, 성충 시기를 거치는 완전변태를 하며 예전에는 굼벵이로 불려왔다(Kim et al., 2019). 우수한 항혈전 활성을 갖고 있어 전통 의학으로 사용되었으며, 주로 간장병, 아구창, 파상풍, 이노작용에 효능이 있다고 알려져 있다(Chung et al., 2013). 식품원료로 인정받은 흰점박이꽃무지유충은 현재 다양한 식품으로 이용되고 있으며 곤충에 대한 혐오감을 줄이기 위해 주로 쿠키나 에너지 바에 첨가되거나 엑기스, 환, 젤리 형태로 판매되고 있다.



메뚜기

(*Oxya japonica Thunberg*)



백강잠

(*Bombyx mori L.*)



식용누에유충·번데기

(*Bombyx mori L.*)



갈색거저리유충

(*Tenebrio molitor L.*)



흰점박이꽃무지유충

(*Protaetia brevitarsis*)



쌍별귀뚜라미

(*Gryllus bimaculatus*)



아메리카왕거저리유충

(*Zophobas atratus*)



장수풍뎅이유충

(*Allomyrina dichotoma*)



수벌번데기

(*Apismellifera L.*)



플무치

(*Locusta migratoria*)

Fig. 1. Domestic edible insects as food ingredients (MAFRA, 2021).

## 1.2. 단백질 가수분해

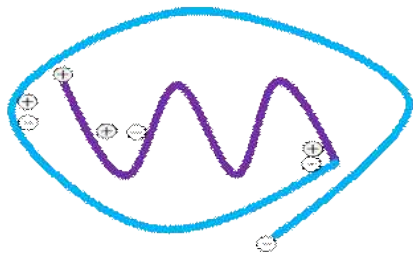
단백질은 육류, 생선, 우유, 달걀과 같은 동물 단백질 혹은 콩, 옥수수, 감자 등 식물 단백질에서 유래된 주요 성분 중 하나이다(Toldrá et al., 2018). 단백질의 특성으로 용해성, 겔화 및 표면 활동과 같은 기능적 특성과 생체 활성, 건강 관련 영양적 특성이 있으며, 이는 최종제품의 품질 특성에 영향을 미친다(Kinsella and Melachouris, 1976).

식품 산업에서는 단백질의 활용성을 높이기 위해 물리 화학적 특성을 변화하고자 하는 연구가 진행되어왔다. 단백질의 특성을 변화시키는 방법으로 화학적, 생물학적 방법이 있으며 화학적 방법은 산, 알칼리를 이용해 가수분해하는 방법으로 비용이 저렴하고 간단하지만, 비특이적 반응으로 생체 활성을 갖는 바이오펙타이드 생산 수율이 낮고 유해물질이 함께 생성된다. 생물학적 방법에는 효소가수분해가 있으며 단백질 분해효소와 단백질이 반응하여 단백질 사슬에서 펩티드 결합을 절단하여 단쇄 펩타이드를 생성한다(Fathi et al., 2021).

이중 효소가수분해는(Fig. 2) 단백질의 영양적 특성 파괴가 적고 원하는 최종 생성물을 쉽게 얻을 수 있어 화학적 가수분해보다 선호된다. 효소 처리는 단백질의 소화율 증가와 더불어 알레르기 유발을 감소시킬 수 있으며(Mahmoud et al., 1992; Salvatore, 2016) 단백질 구조를 변화시킴으로써 용해도, 점도, 겔화, 지방유화, 거품 특성과 같은 기능적 특성을 식품 산업에 응용할 수 있어 주로 사용되는 방법이다(Foegeding et al., 2011; Arno et al., 2016). 또한, 단백질 가수분해를 통해 에멀전의 형성과 안정성에 영향을 미치는 단백질의 전하, 용해도 증가, 분자량 감소, 소수성 그룹 노출과 같은 변화가 일어나며 가수분해 정도(Degree of hydrolysis)에 따라 생성된 가수분해물의 기능적 특성이 달라진다(Nielsen, 1997; Akharume et al., 2021).

효소가수분해 시 사용되는 효소 유형은 가수분해의 중요한 요소로 이는 펩타이드가 생성되는 아미노산 염기서열에 영향을 미친다. 본 연구에서 사용한 Alcalase는 endo-protease로 exo-protease보다 더 큰 펩타이드를 얻을 수 있으며 산화방지제, 향응고제, 향고혈압제 및 칼슘 결합 특성을 나타내는 펩타이드를 생성하는 효소로 알려져 있다(Choonpicharn et al., 2014; Nasri et al., 2012; Weng et al., 2014).

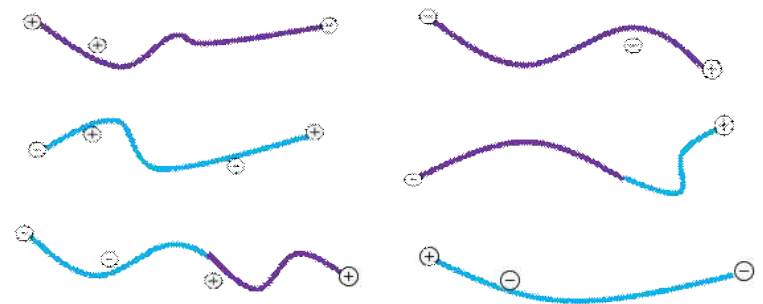
Protein



Enzymatic hydrolysis



Peptide







-  Native nonhydrolyzed protein
-  More hydrophobic peptide
-  More hydrophilic peptide
-  Electrostatic charges

Fig. 2. Overview of enzymatic hydrolysis of protein (Arno et al., 2016).

### 1.3. 유화제 및 에멀전

에멀전(emulsion)이란 서로 섞이지 않는 두 종류 이상의 액체를 물리·화학적 힘을 이용해 한쪽의 액체를 다른 쪽 액체에 안정한 상태로 분산시킨 것을 말하며, 일반적으로 친유성, 친수성 정도에 따라 oil in water 에멀전(수중유적형)과 water in oil 에멀전(유중수적형)으로 분류할 수 있다. 에멀전은 주로 화장품, 의약품뿐만 아니라 마요네즈, 버터, 음료, 샐러드드레싱, 우유 등과 같이 다양한 식품에 활용되며 캡슐화, 기능성 성분 전달을 위한 보호 및 방출 시스템으로 활용이 증가하고 있다(McClements 2015; Krstonošić 2020). 열역학적으로 불안정하여 크리밍, 응집, 오스트발트 숙성, 상 분리와 같은 현상이 발생하기 때문에 에멀전의 안정성은 에멀전을 기반으로 하는 제품의 품질에 영향을 미치는 요인이다(Taha et al, 2018). 따라서 외부환경에 안정적이고 저장수명이 긴 에멀전을 제조하기 위해서는 적절한 유화제를 선택하는 것이 필요하다.

일반적으로 유화제는 전기적 성질 및 합성, 천연물 유래에 따라 분류할 수 있으며, 천연유화제로 단백질, 다당류 등이 사용된다(Kralova and Sjöblom, 2009; Choi et al., 2018). 최근에는 건강지향적이고 천연 제품에 대한 소비자들의 요구가 증가하면서 합성 물질을 천연 물질로 대체하는 추세이다(McClements et al., 2017). 단백질은 천연 공급원이며 무독성, 생체 적합성, 생분해성을 갖고 있을 뿐 아니라, 양친매성과 상대적으로 큰 전하를 갖고 있어 거품형성능력, 우수한 표면활성, 에멀전 안정화 능력을 갖춘 천연 유화제이다(Mun, 2020; Zhang et al., 2020). 단백질의 유화 메커니즘은(Fig. 3) 단백질 분자가 물과 기름의 계면에 접근하면 분자 내 비극성 부분은 기름층에 극성 부분은 물 층에 위치하여 일부가 계면에 흡착하면서, 오일 입자 주변에 점탄성 막을 형성해 안정된 에멀전이 형성된다(Miñones et al, 2007; Lam et al, 2013). 단백질 구조는 외부환경에 매우 민감하기 때문에 이러한 환경 변화에 따라 특성이 달라진다. 예를 들어 단백질의 등전점보다 높거나 낮은 pH에서는 에멀전이 안정적이지만 순전하가 없는 등전점 부근에서는 응집, 크리밍 현상이 쉽게 일어난다. 따라서 단백질을 유화제로 사용할 때 외부환경에 따른 특성 변화를 파악하는 것이 중요하다. 단백질 유화제로 카세인소듐(sodium caseinate), 유청단백질(whey protein), 대두단백질(soy protein) 등이 주로 이용되며 기능적 특성에 관한 연구가 많이 진행됐지만, 유화



제로 곤충 단백질을 사용하여 에멀전을 제조한 후 특성을 관찰하는 연구는 초기 단계이다. 일부 연구에서는 갈색거저리유충(*Tenebrio molitor* L.) 단백질을 이용해 커큐민을 캡슐화하여 전달 매개체로서 곤충 단백질의 특성을 관찰하였다(Fernández et al., 2021). 또한, Gould and Wolf (2018) 연구에 따르면 갈색거저리유충 단백질의 유화능력을 유청단백질의 특성과 비교하여 단백질 기반 유화제로서 곤충단백질의 가능성을 나타냈다(Gould and Wolf, 2018). 따라서, 수입에 의존하는 단백질을 일부 대체할 수 있는 새로운 식품소재로 식용곤충 단백질을 연구하는 것이 필요하다고 생각한다.

#### 1.4. 연구목적

본 연구에서는 흰점박이꽃무지유충 유래 단백질을 이용해 천연유화제로써 활용방안을 제시하기 위하여 흰점박이꽃무지 유충을 다양한 시간으로 alcalase 가수분해하여 단백질을 추출하고, 추출된 단백질의 유화력을 검증하여, 유화 안정성이 높은 단백질 특성을 지닌 가수분해물을 제조하는 데 목적을 두었다.

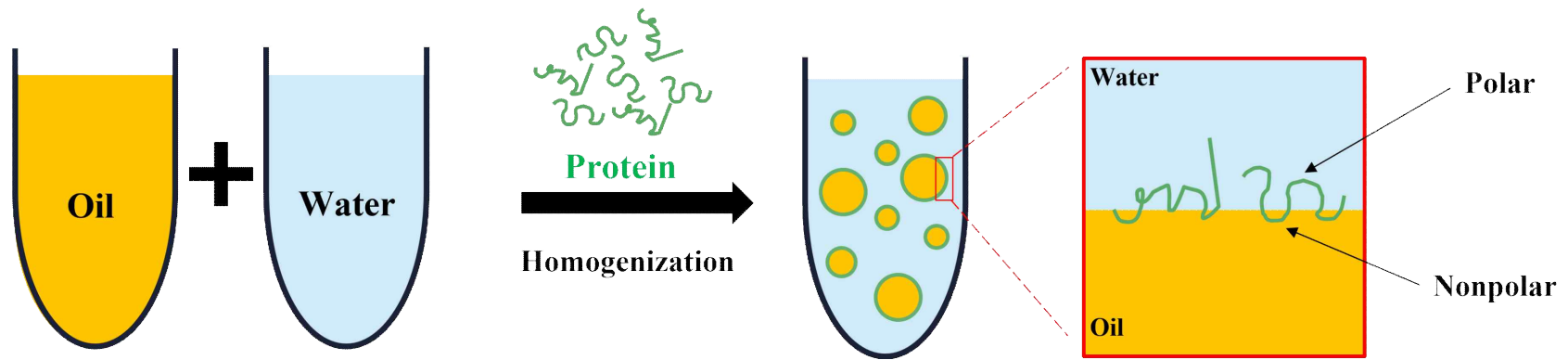


Fig. 3. Process of emulsion preparation by protein as an emulsifier (Mun, 2020).

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 흰점박이꽃무지유충 분말 및 alcalase 가수분해물 제조 및 특성

본 실험에서 흰점박이꽃무지유충은 제주시에 위치한 제주곤충보감 영농조합법인에서 사육한 냉동된 상태의 흰점박이꽃무지유충을 구입하여 사용하였다. 흰점박이꽃무지유충을 상온에서 해동한 후 순환식 전기건조기(PS-100C, Shiniltech, Gimhae, Korea)를 이용하여  $60\pm 5^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 열풍건조한 후 후드믹서(SHMF-3500G, Hanil, Seoul, Korea)을 이용해 400 mesh 이하로 분쇄하였다. 그 후 지방을 제거하기 위해 1:5(w/v) 비율로 *n*-hexane (Daejung chemicals & Metals Co., Ltd., Siheung, Korea)을 첨가해 진탕배양기(SI-600R, JEIO TECH, Daejeon, Korea)를 이용하여 170 rpm에서 6시간 동안 교반하였다. 잔사를 이용하여 동일한 방법으로 2번 반복한 후 후드에서 남은 *n*-hexane을 휘발시켜 탈지 분말로 이용하였다.

단백가수분해물을 제조하기 위해 흰점박이꽃무지유충 탈지 분말을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁하여 4%(w/v)의 기질용액을 제조하였다. 준비된 기질용액은 초음파 기기(VCX750, SONIC & MATERIALS, INC., Newtown, CT, USA)를 이용해 Table 1의 조건에서 처리했으며 초음파 처리시 얼음을 이용해  $37^\circ\text{C}$  아래의 온도를 유지하였다. 그 후  $95^\circ\text{C}$ 에서 20분간 가열시켜 자가효소를 불활성화하였다. 그 후 단백질 가수분해 효소로 Alcalase (EC 3.4.21.62, Daejong, Seoul, Korea)를 기질용액 대비 1% 첨가하여  $55^\circ\text{C}$ , 150 rpm에서 0.5시간, 1.5시간, 3시간, 6시간 동안 가수분해를 진행한 후  $95^\circ\text{C}$ 에서 20분간 가열시켜 효소를 불활성화하였다. 실온에서 방냉한 후 단백질가수분해물을  $20^\circ\text{C}$ 에서  $3,134\times$ g, 10분간 원심분리(Labo-Gene 1248R, GYROZEN Co., Ltd., Daejeon, Korea)하여 상등액을 얻은 후 동결건조하여  $-20^\circ\text{C}$  냉동고(IBK-500F, Infobiotech, Daejeon, Korea)에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 가수분해하지 않은 시료는 P0, 가수분해 시간별 시료는 0.5시간 한 경우 HP0.5로 표시하여 HP0.5, HP1.5, HP3, HP6로 나타내었다.

**Table 1. Conditions of ultrasonification processor**

Items	Conditions
Frequency	20 kHz±50 Hz
Amplitude	75%
Pulse on/off	15 s(on), 10 s(off)
Time	15 min
Power	750 W

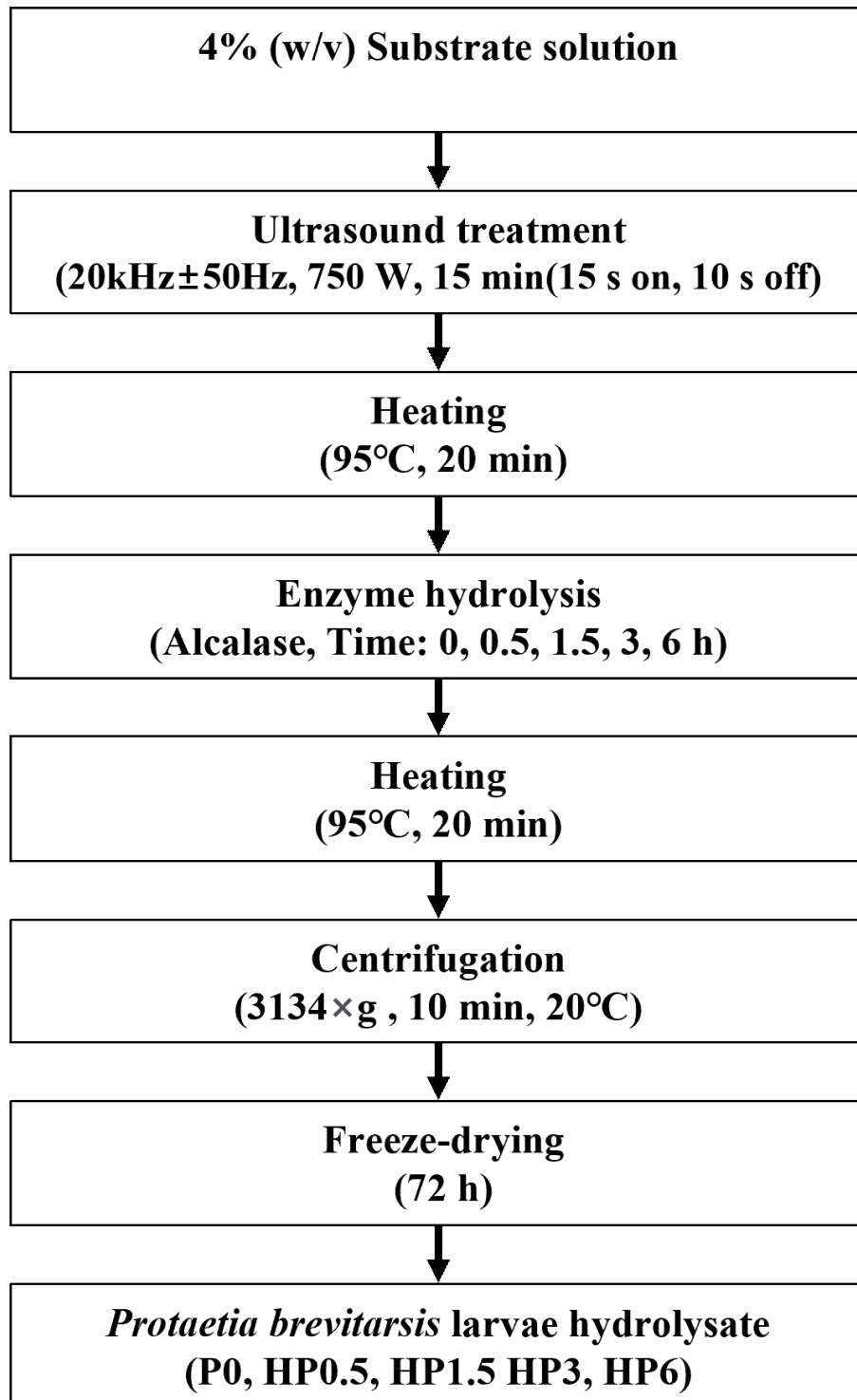


Fig. 4. Preparation of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates.

### 2.1.1 가수분해 수율 및 단백질 추출률

흰점박이꽃무지유충 alcalase (1)가수분해수율과 (2)단백질 추출률은 아래의 식으로 계산하였다.

$$(1) \text{ Hydrolysis yield (\%)} = \frac{\text{Freeze-dried hydrolysates (g)}}{\text{Defatted } \textit{protactiabrevitarsis} \text{ larvae (g)}} \times 100$$

$$(2) \text{ Protein extraction yield (\%)} = \frac{\text{Protein content of hydrolysates (\%)}}{\text{Protein content of defatted powder (\%)}} \times \text{Hydrolysis yield (\%)}$$

### 2.1.2 일반성분 분석

흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 일반성분은 AOAC (2005)에 준하여 분석하였다. 수분함량은 수분측정기(MA 50.R.WH, RADWAG, Torunsk, Poland), 조회분 함량은 550℃ 직접 회화법으로 정량하였으며 조단백질 함량은 킬달법, 조지방 함량은 속슬렛 추출법을 이용하였다. 탄수화물함량은 100에서 수분, 조회분, 조단백질, 조지방 함량을 뺀 값으로 계산하였다.

### 2.1.3 가수분해도 및 분자량 분포

흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 가수분해도는 Hoyle and Merritt (1994)의 방법을 변형하여 측정하였다. 가수분해 시간별 가수분해물을 원심분리기를 (Labo-Gene 1248R, GYROZEN Co., Ltd., Daejeon, Korea) 이용해 20℃에서 3,134×g, 10분간 원심분리 한 후 상층액 1 mL와 20% trichloroacetic acid 1 mL를 혼합하였다. 그 후 20℃에서 3,134×g, 10분간 원심분리하여 상층액을 BCA™ assay kit을 이용해 질소함량을 분석하였다. 가수분해도는 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{DH(\%)} = \frac{\text{20\%TCA soluble protein content in the sample}}{\text{Total protein content in the sample}} \times 100$$

흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 분자량 분포를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동(WSE-1150 PageRun Ace, ATTO, Tokyo, Japan)은 21 mA에서 0.1% SDS를 함유하는 Tris-Tricine buffer를 사용했으며

16.5%의 gradient polyacrylamide gel (ATTO, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 시료는 가수분해시간별로 20℃에서 3,134×g, 10분간 원심분리(Labo-Gene 1248R, GYROZEN Co., Ltd., Daejeon, Korea)하여 상층액을 사용했으며, 시료용액에 2% SDS와 6X loading dye를 혼합한 후 95℃에서 5분간 가열하여 이용하였다. 전기영동 후 겔은 Microwave를 이용하여 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색한 다음 증류수를 이용하여 24시간동안 탈색하였다. 표준물질로 1-29 kDa의 단백질(EzStandard LMW, ATTO, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

#### 2.1.4 구성아미노산

흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 구성아미노산 분석 아미노산분석기(L-8900, HITACHI, Tokyo, Japan)를 사용하여 식품공전(MFDS 2021)의 아미노산 분석방법으로 측정하였다.

#### 2.1.5 pH

2%(w/v) 단백질가수분해물 용액을 제조한 후 pH-meter (S470 SevenExcellence™, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)를 사용하여 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

#### 2.1.6 단백질 용해도

흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 용해도는 Maryia et al. (2019)의 방법을 변형하여 측정하였다. 2%(w/v) 단백질가수분해물 용액을 제조한 후 1 M NaOH 또는 1 M HCl을 첨가하여 pH를 2에서 10으로 조정하였다. 단백질용액을 진탕배양기로 20℃에서 1시간 동안 교반한 다음 3,000×g에서 20분간 원심분리하였다(Labo-Gene 1248R, GYROZEN Co., Ltd., Daejeon, Korea). 그 후 BCA™ assay kit을 이용하여 상등액의 질소 함량을 분석하였다. 단백질 용해도는 총 질소 함량에 대한 상등액의 질소함량의 비율로 계산하였다.

### 2.1.7 입자크기, 제타전위, 입도분포도

흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 입자크기 및 입자분포도는 DelsaMax Pro (DelsaMax Pro, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 dynamic light scattering (DLS) 원리에 의하여 측정하였다. 입자크기는 particle diameter (nm) 제타전위는 zeta-potential (mV), 입도분포도는 polydispersity index로 나타내었으며 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

### 2.1.8 표면장력

표면장력은 KRÜSS EasyDyneS K20(Hamburg, Germany)을 이용해 du Noüy ring 방법으로 측정하였다. 표면장력 측정을 위해 동결건조된 2%(w/v) 단백질가수분해물 용액을 제조했으며 5회 연속 측정된 평균값으로 나타내었다. 단백질가수분해물 용액 제조를 위해 사용된 증류수의 표면장력은 72.24±0.15 mN/m이었다.

### 2.1.9 표면소수성

흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 표면소수성은 Kim et al. (2021)의 방법을 이용하여 측정하였다. 동결건조된 단백질가수분해물 0.5 g을 0.025 M phosphate buffer (pH 7.4) 100 mL에 녹여 시료를 제조하였다. 그 다음 1 mg/mL bromophenol blue 200 µL와 시료 1 mL를 혼합한 후 진탕배양기를 이용하여 20 °C에서 10분 동안 교반한 다음 2,000×g에서 15분간 원심분리하였다(Labo-Gene 1248R, GYROZEN Co., Ltd., Daejeon, Korea). 대조구로 0.025 M phosphate buffer 1 mL와 1 mg/mL bromophenol blue 200 µL를 혼합하여 사용하였다. 상층액을 10배 희석한 후 분광광도계(Epoch™, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)를 이용하여 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표면소수성은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{BPB bound}(\mu\text{g}) = \frac{A - B}{A}$$

A : absorbance of control at 595nm

B : absorbance of sample at 595nm



### 2.1.10 접촉각 측정

흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 젖음성을 관찰하기 위해 접촉각을 측정하였다. 접촉각측정은 Jo and Schaaf (2021)의 방법을 변형하여 사용하였다. 접촉각은 접촉각측정기(Phoenix-150, SEO Company)를 사용하여 sessile drop 방법으로 측정하였으며, 접촉각 이미지는 소프트웨어(Surfaceware, SEO Company)를 사용해 촬영하였다. 유리커버슬라이드를 2%(w/v) 단백질가수분해물에 1시간 동안 담그고 40℃에서 24시간 동안 건조하여 시료를 코팅하였다. 그 후 약 6 µL의 증류수를 코팅된 유리커버슬라이드에 떨어뜨려 액적이 형성된지 3초 후 접촉각을 측정하였다.

### 2.1.11 유화력(EAI) 및 유화 안정성(ESI)

유화력(EAI)과 유화안정성(ESI)은 Pearce and Kinsella (1978)의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저 동결건조된 단백질가수분해물 2 g을 증류수 100 mL와 혼합한 후 200 rpm에서 30분간 교반하여 2%(w/v) 단백질 분산액을 제조하였다. 이 후 단백질 분산액 45 g과 medium chain triglyceride oil (MCT, Medifood, Korea) 5 g을 Ultra-Turrax (T25D, IKA, Staufen, Germany)를 이용해 15,000 rpm에서 2분 동안 균질하여 Oil-in-water 에멀전을 제조하였다. 형성된 에멀전은 균질 직후, 10분 후 채취하여 0.1%(w/v) SDS 3.9 mL와 혼합하여 40배 희석하였다. 흡광도는 분광광도계(Epoch™, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)를 이용하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유화력과 유화안정성은 아래의 식으로 계산하였다.

$$EAI = \frac{2.303 \times 2 \times A_0 \times \text{Dilution}}{\varnothing \times C \times 10000}$$
$$ESI = \frac{A_0}{A_{\Delta}} \times t$$

$A_0$  = absorbance of the diluted emulsion immediately after homogenization

$C$  = weight of protein per unit volume in the aqueous phase (g/mL)

$\varnothing$  = oil volume fraction of the emulsion

$A_{\Delta}$  = change in absorbance between 0 and 10 min and  $t$  is the time interval (10min)

### 2.1.12 SEM(scanning electron microscopy)

Alcalase 가수분해시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 형태를 관찰하기 위하여 동결건조 된 시료를 Sputter coater (Q150RS, Quorum technologies, Lewes, UK)로 금 코팅을 하였으며, 전자현미경(MIRA3, TESCAN, Brno, Czech)을 이용하여 단백질가수분해물을 관찰하였다. 이때 시료는 200배 확대하여 5 kV의 전압에서 촬영하였다.

## 2.2. 분산매 농도에 따른 oil in water 에멀전 제조 및 특성

에멀전 제조는 Ding et al. (2021)의 방법을 변형하여 사용하였다. 바이오폴리머 유화제인 0.5시간 동안 가수분해한 가수분해물을 분산매로 사용하였다. 1%, 2%, 3%, 4%, 5%(w/v) 단백질가수분해물 용액을 2시간 동안 200 rpm에서 교반한 다음 4°C에서 24시간 동안 보관하면서 수화시켰으며, 미생물 활성을 방지하기 위해 Sodium azide (0.02%)을 첨가하였다. 분산상으로 medium chain triglyceride oil (MCT, Medifood, Korea)과 (R)-(+)-limonene (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 1:1(w/w)로 사용하였다. 분산상과 분산매의 비율은 1:99(w/w)이며 초고속균질기(T25D, Ika, Staufen, Germany)를 이용하여 10,000 rpm으로 1분 동안 균질하였다. 그 후 20,000 psi의 초고압균질기(Picomax MN400, Micronox, Sungnam, Korea)에서 3회 통과시켜 에멀전을 제조하였다. 제조된 에멀전은 25°C에서 보관하면서 외관, 입자특성, 크리밍, 포집효율을 관찰하였다.

### 2.2.1. 입자크기, 제타전위, 입도분포도

에멀전의 입자특성은 2.1.7의 방법으로 측정하였다.

### 2.2.2. 표면장력, 계면흡착 단백질 농도 및 단백질 흡착률

에멀전의 표면장력은 2.1.8의 방법으로 측정하였다. 계면흡착 단백질 농도와 단백질 흡착률은 Taha et al. (2018)의 방법을 이용하여 측정하였다. 에멀전 1 mL을 10,000×g에서 30분 동안 원심분리(Labo-Gene 1248R, GYROZEN Co., Ltd., Daejeon, Korea) 한 후 주사기를 이용해 상층에 있는 에멀전의 크림층을 제거한

후 하층에 있는 에멀전의 수성층을 0.22  $\mu\text{m}$  필터로 여과한 후 BCA<sup>TM</sup> assay kit 을 이용하여 단백질함량을 측정하였다. AP(%)는 아래의 식으로 계산하였다.

$$AP(\%) = \frac{(C_o - C_e) \times 100}{C_o}$$

$C_o$  = initial protein concentration (mg/mL)  
 $C_e$  = protein concentration of filtrate protein (mg/mL)

### 2.2.3. 크리밍 지수(CI%)

에멀전의 안정성을 측정하기 위해 Arancibia et al. (2021)의 방법을 이용하여 크리밍 양을 측정하였다. 에멀전 10 mL를 병에 담아 실온에서 보관했으며, CI는 1일, 10일 및 15일 후 아래의 식으로 계산하였다.

$$CI\%(t) = \frac{H_c}{H_t} \times 100$$

$H_c$  = the height of cream layer (mm)  
 $H_t$  = the total height of the nanoemulsion (mm)

### 2.2.4. 포집효율

에멀전 제조에 사용된 medium chain triglyceride oil (MCT, Medifood, Korea) 과 (R)-(+)-limonene (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 혼합액은 212 nm에서 최대 흡수를 나타내었다. 포집되지 않은 free oil을 제거하기 위해 에멀전 3 mL를 취하여 *n*-hexane (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd., Gyeonggi, Korea) 3 mL와 균질한 후 3,134 $\times$ g에서 10분 동안 원심분리하였다 (Labo-Gene 1248R, GYROZEN Co., Ltd., Daejeon, Korea). 원심분리 후 상층액을 *n*-hexane (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd)으로 희석하여 균질한후 212 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 표준곡선에 의해 free oil양을 계산했으며, 포집효율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{initial oil (g)} - \text{free oil (g)}}{\text{initial oil (g)}} \times 100$$

### 2.3. 통계 분석

통계 분석은 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. 흰점박이꽃무지유충 alcalase 가수분해물의 특성

##### 3.1.1. alcalase 가수분해 수율 및 단백질 추출률

Alcalase 가수분해 시간에 따른 흰점박이꽃무지유충의 가수분해 수율 및 단백질 추출률은 Table 2에 나타내었다. 초음파는 진동에 의한 공동현상(cavitation)에 의해 짧은 시간 안에 큰 에너지 발생이 가능하고 국부 온도 상승으로 인해 주위에 위치하는 반응물의 운동에너지를 증가시킴으로써 화학반응을 촉진한다. 추출 공정에 초음파 에너지를 사용하면 유용성분의 추출 효율과 속도를 증가시키는 효과를 얻을 수 있어 가수분해 전 초음파 처리를 진행하였다(Chung et al., 2016; Jo et al., 2017). 가수분해한 경우 87.21-90.91%의 수율을 나타냈지만 가수분해하지 않은 경우 43.49±3.11%로 가수분해를 통해 수율이 증가하는 것으로 나타났으며 가수분해 시간에 따른 유의적 차이는 없었다. 원심분리 후 가수분해물의 상층액에는 수용성 단백질이 존재하고 하층액에는 불용성 화합물이 존재한다. 키틴은 수용성 용매에 녹지 않기 때문에 원심분리 후 남은 잔사에 키틴 결합 질소가 존재할 것으로 생각된다. 가수분해를 통해 수용성 단백질이 포함된 상층액의 수율이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 이는 효소 가수분해로 인해 단백질의 용해도가 향상되었기 때문으로 생각된다. Fogang et al. (2021)의 연구에 의하면 *R. phoenicis* 유충을 pH를 달리하여 추출한 경우 *R. phoenicis* 유충 단백질의 용해도는 pH와 함께 점진적으로 증가했으며 이에 따라 단백질 추출 수율도 증가한 것으로 나타났다. 또한, 5종의 곤충(*T. molitor*, *Z. morio*, *A. diaperinus*, *A. domesticus* and *B. dubia*)를 이용해 산 가수분해를 진행한 결과 86.5 및 103% 이내인 것으로 나타나 본 연구결과와 유사한 가수분해 수율을 나타내었다(Yi et al., 2013). 일반적으로 단백질 추출 수율은 추출법, 온도, 완충액 조건 및 시료와 추출 용매의 비율과 같은 여러 요인에 따라 달라진다(Zhao et al., 2016; Miron et al., 2019). 본 연구결과에서는 가수분해 시간이 가수분해 수율과 단백질 추출 수율에 영향을 미치지 않았지만, 가수분해를 통해 *P.brevitars* 유충의 가수분해 수율 및 단백질 추출 수율을 향상시킬 수 있음을 보여준다.

Table 2. The hydrolysis yield and protein extraction yield of *Protaetia brevitarsis* larvae prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0–6 hour: P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6)

	Hydrolysis yield (%)	Protein extraction yield (%)
P0	43.49±3.11 <sup>B1)2)</sup>	33.51±0.16 <sup>B</sup>
HP0.5	87.21±2.41 <sup>A</sup>	94.74±4.23 <sup>A</sup>
HP1.5	89.21±1.06 <sup>A</sup>	96.30±3.42 <sup>A</sup>
HP3	89.95±1.71 <sup>A</sup>	97.06±3.59 <sup>A</sup>
HP6	90.91±0.79 <sup>A</sup>	95.54±3.12 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD

<sup>2)</sup>Means followed by the same letter (A–B) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

### 3.1.2. 일반성분

Alcalase 가수분해 시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 가수분해물의 일반성분 분석결과는 Table 3에 나타내었다. 흰점박이꽃무지유충 탈지분말의 일반성분은 건물기준 수분 8.16%, 조단백 39.59%, 조지방 0.57%, 조회분 6.58%로 나타났다. 일반적인 단백질 식품으로 난류는 8-14.4%, 육류 15.2-34.7%, 어류 10.4-47.7%의 단백질 함량을 가지며 실험에 사용한 흰점박이꽃무지유충 탈지분말의 단백질 함량은 이와 비슷하거나 높게 나타났다. Noh et al. (2015)의 연구에 따르면 가공 전 절식한 흰점박이꽃무지유충이 먹이를 급여한 흰점박이꽃무지유충 보다 단백질 함량이 낮게 나타났다. 본 연구에서는 절식한 흰점박이꽃무지를 사용했으며 일반성분 함량 차이는 먹이, 흰점박이꽃무지유충의 발육상태 등의 영향으로 인한 것으로 생각된다. 단백질 가수분해물의 경우 가수분해하지 않은 P0의 단백질 함량은 31.81%로 나타났으며 가수분해 한 시료는 43.11-43.19%로 가수분해를 통해 단백질 함량이 증가하는 것을 볼 수 있었다. Kim et al. (2020)의 연구에서 흰점박이꽃무지유충의 단백질추출단계별 일반성분을 분석한 결과 최종 추출분말에서 단백질 함량이 가장 높게 나타났다. 또한, P0의 회분함량이 17.29±0.33%로 단백질 가수분해물에 비해 1-1.84배 높게 나타났다. P3, P6은 P0에 비해 가수분해 후 수분 함량이 줄어들었으며 효소가수시간에 따른 수분함량의 차이는 나타나지 않았다. 단백질 가수분해물 후 조지방이 검출되지 않았는데 Ovissipour et al. (2009)에 따르면 alcalase 가수분해 공정 중 원심분리를 통해 지질이 분리되어 단백질 가수분해물의 지질함량이 낮아졌다고 보고했다. 탈지된 분말을 사용할 경우 단백질의 수율이 증가하며 지질의 소수성 특성으로 인해 단백질과 지질의 상호작용은 단백질 용해도를 제한하기 때문에 지방을 제거하는 것이 단백질 함량이 향상된 곤충 단백질을 얻는 데 유리하다고 알려져 있다(Lam et al., 2016). 단백질 가수분해물의 지질함량을 감소시킴으로써 지질 산화에 대한 안정성을 높일 수 있으며 제품으로 이용할 경우 제품의 안정성이 향상될 수 있다(Kristinsson and Rosco, 2000). WHO/FAO에 따르면 100 mg/g 이상일 경우 고단백식품으로 표기될 수 있다. 따라서 흰점박이꽃무지유충 단백질 가수분해물은 좋은 단백질 공급원이 될 수 있다고 생각한다.

Table 3. Proximate composition of *Protaetia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0–6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6)

	Moisture (%)	Crude fat (%)	Crude protein (%)	Crude ash (%)	Carbohydrate (%)
P0	6.12±0.34 <sup>A1)2)</sup>	ND <sup>3)</sup>	31.81±0.75 <sup>B</sup>	17.29±0.33 <sup>A</sup>	44.78±1.41 <sup>A</sup>
HP0.5	4.06±1.31 <sup>AB</sup>	ND	43.19±2.26 <sup>A</sup>	9.38±0.31 <sup>B</sup>	43.37±3.25 <sup>A</sup>
HP1.5	4.50±2.05 <sup>AB</sup>	ND	43.01±2.75 <sup>A</sup>	9.23±0.27 <sup>B</sup>	43.26±4.53 <sup>A</sup>
HP3	4.01±2.07 <sup>B</sup>	ND	43.11±2.59 <sup>A</sup>	9.23±0.20 <sup>B</sup>	43.65±4.46 <sup>A</sup>
HP6	3.49±0.71 <sup>B</sup>	ND	43.11±2.51 <sup>A</sup>	9.14±0.20 <sup>B</sup>	44.27±3.02 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD

<sup>2)</sup>Means followed by the same letter (A–B) are not significantly different by Tukey’s multiple range test at  $P<0.05$ .

<sup>3)</sup>ND: Not detected



### 3.1.3. 가수분해도 및 분자량 분포

가수분해 과정은 단백질의 펩타이드 결합을 끊고 저분자량의 펩타이드를 생성하는 생화학적 반응을 말한다(Hernández-Ledesma et al., 2014). 일반적으로 사용되는 protease로 alcalase는 단백질을 유리 아미노산으로 분해하는 능력이 있으며 이는 단백질 합성 및 생물학적 활성에 유리하다고 알려져 있다. 선행연구를 조사한 결과 alcalase를 이용했을 때 가수분해능력이 높고 유화능력이 향상되며 우수한 항산화 활성을 갖는 가수분해물을 생성하는 것을 확인하였다(Silk et al., 1985; Pan et al., 2011; Yang et al., 2011). 이를 바탕으로 단백질 분해효소로 alcalase를 선택하였다. 4% 흰점박이꽃무지유충 기질 용액에 alcalase를 1% 첨가했을 때 가수분해 시간에 따른 흰점박이꽃무지유충의 가수분해도는 Fig. 5와 같다. 효소를 첨가하지 않은 대조군 P0의 가수분해도는  $22.94 \pm 2.29\%$ 를 나타내었다. 이는 열처리로 인한 단백질 변성으로 단백질 부위가 풀려 가수분해 정도가 증가할 수 있으며 일반적으로 관찰되는 현상이다(Stanciuc et al., 2010; Hall et al., 2017). 또한, 가수분해 전 초음파 처리는 단백질 풀림을 유도하고 가수분해 효율을 높이는 펩티드 결합의 노출을 증가시키며 상호 작용력, 수소 결합 및 분자 간의 쌍극자 인력의 중간 매트릭스 시스템을 파괴하여 단백질 및 단백질 화합물의 가수분해 정도를 증가시킨다(Li et al., 2016). 가수분해도는 alcalase 첨가 후 0.5시간까지 급격히 증가했으며  $51.59 \pm 3.79\%$ 를 나타내었다. 그 이후로 가수분해 시간에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이는 효소 첨가시 반응성이 높은 펩타이드 결합들이 우선적으로 쉽게 분해되고, 반응성이 약한 펩타이드 결합이 천천히 분해되기 때문이다(Lee et al., 1995). 따라서 에너지 소비, 생산 효율을 고려하여 0.5시간 동안 가수분해를 진행하는 것이 적절하다고 생각된다.

가수분해도는 단백가수분해물의 분자량 분포에도 영향을 미쳤으며 가수분해 시간에 따른 단백가수분해물의 분자량분포는 Fig. 6에 나타내었다. 가수분해하지 않은 P0은 6.5-29 kDa 사이의 밴드를 보였으며, 가수분해한 처리구들의 경우 1.0-6.5 kDa 사이의 밴드를 나타냈다. 가수분해를 진행한 경우 6.5 kDa 이상의 밴드가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 alcalase를 처리했을 때 흰점박이꽃무지유충 단백질의 구조가 변화된 것을 확인했으며 alcalase가 펩타이드 결합을 절단함으로써 단백질의 3차, 4차 형태에 영향을 미칠 수 있다(Mokni

Ghribi et al., 2015). 또한, 단백질이 대부분 분해되어 우수한 가수분해가 일어났으며 가수분해물내에 저분자량 펩타이드가 많이 존재할 것으로 판단된다. 곤충 단백질에서 나타나는 15-32 kDa 사이의 밴드는 곤충의 몸체 바깥쪽 부분인 큐티클에서 유래하는 것으로 알려져 있다(Balabanidou et al., 2018; Kim et al., 2019). 가수분해 공정에서 수용성 단백질을 따로 분리하여 가수분해물을 제조했으며 곤충의 큐티클층은 비큐틸층에 비해 낮은 수용성을 갖기 때문에 큐티클층에 해당하는 밴드가 관찰되지 않는 것으로 생각된다(Okagu et al., 2020). 단백질 가수분해물의 분자량 분포에서도 가수분해 시간에 따른 차이가 나타나지 않았으며, 이는 본 연구에서 진행된 가수분해 조건의 경우 Alcalase가 흰점박이꽃무지유충 단백질을 가수분해하는 데 0.5시간이면 충분함을 나타내며 가수분해도 결과와도 일치하였다.

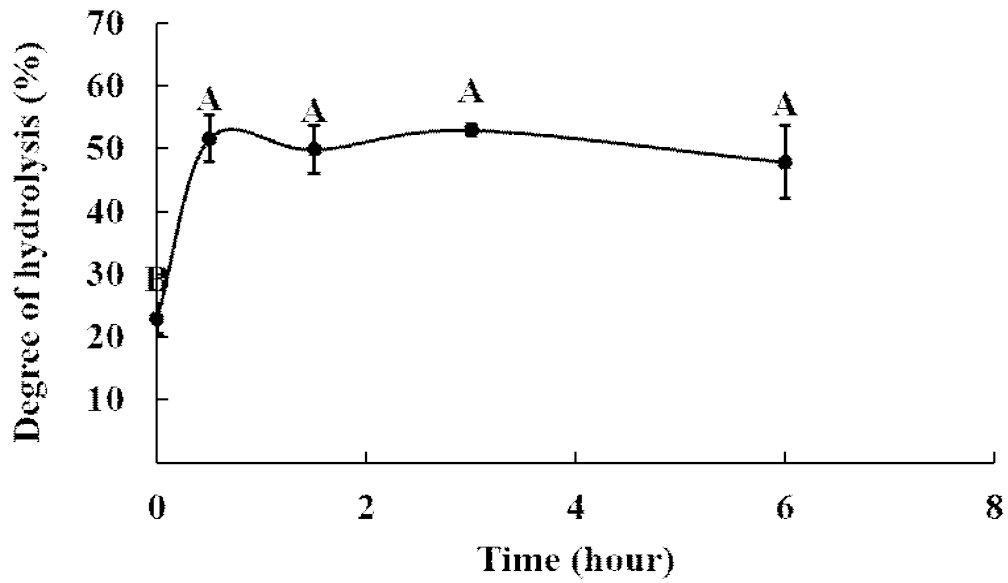


Fig. 5. Degree of hydrolysis of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5 HP1.5 HP3 HP6).

All values are mean±SD

Means followed by the same letter (A-B) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P < 0.05$ .

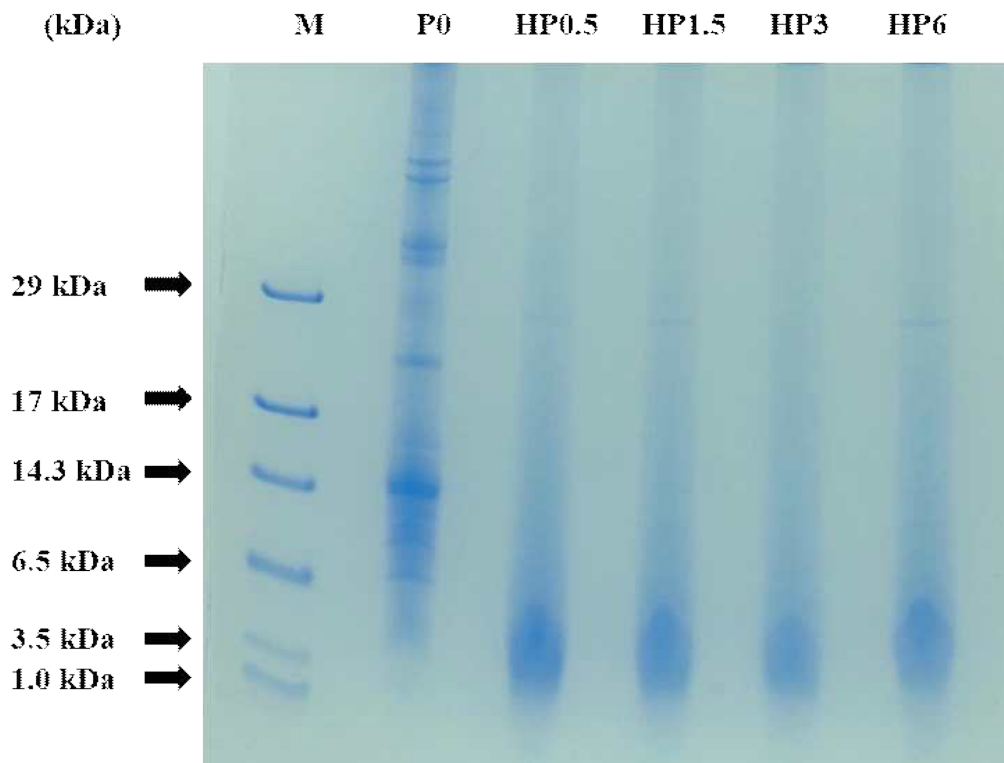


Fig. 6. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (M: Molecular weight marker; 0-6 hour: P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).

### 3.1.4. 구성아미노산

단백질은 곤충의 주요 영양원으로 식용곤충이 모든 필수아미노산을 제공할 수 있다고 알려져있다(Alves et al., 2019). Alcalase 가수분해 시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 아미노산 조성은 Table 4에 나타내었다. 가수분해 후 Tyr, Lys, Leu, Met, Val, Ile, Thr, Asp, Phe의 비율은 증가했으며 His, Gly, Ala, Pro 비율은 감소하였다. 총 아미노산 함량도 가수분해 후에 증가했으며 가수분해시간에 따른 유의적 차이는 없었다. 필수아미노산은 체내에서 합성되지 않는 아미노산으로 반드시 외부에서 섭취해야 하는 아미노산을 말하는데, 필수아미노산 모두 가수분해 후 유의적으로 높게 함유되어 있었다(Kim et al., 2019). HP0은 필수아미노산 중 Val, Lys, His이 가장 많이 함유되어있었으며 효소 가수분해 후 로이신이 증가하면서 단백질가수분해물에는 Val, Lys, Leu 비중이 가장 높았다. BCAA 분지쇄 아미노산은 골격근에서 산화될 수 있는 필수아미노산으로 근단백질에 함유된 필수아미노산 중 30%를 차지하며 Leu, Ile, Val이 있다(Alves et al., 2019). 이러한 아미노산은 운동이나 식이요법을 통해 체중 감량 시 근육 손실을 방지한다고 알려져 있다(Wagenmakers, et al., 1990). BCAA는 가수분해 후 유의적으로 증가했으며 총 아미노산 중 BCAA의 %비율을 비교한 결과, P0은 12.66%, HP0.5는 16.24%, HP1.5는 17.17%로 가수분해를 통해 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 소수성 아미노산 조성은 단백질의 유화 능력에 중요한 역할을 한다(Li et al., 2019). 따라서, 단백질의 기술적 특성에 영향을 미치는 다양한 요인 중 소수성 아미노산의 구성도 중요하며 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met이 소수성 아미노산으로 알려져 있다. 총 아미노산 중 소수성 아미노산의 비율은 P0 49.26%, HP0.5 45.03%, HP1.5 44.45%로 감소했으며 친수성 아미노산 비율은 P0 20.43%, HP0.5 26.83%, HP1.5 27.54%로 가수분해 후 증가하는 경향을 보였다. 이는 표면소수성 결과(Fig. 8)와도 유사한 경향을 나타내었다. 결론적으로 본 연구에서 사용한 흰점박이꽃무지유충의 아미노산은 가수분해를 통해 단백질 보충 등의 기능성 향상에 도움이 될 것이며, 외부로 노출된 높은 비율의 친수성 아미노산을 통해 수중유적형 유화제로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. Amino acid composition of *Protaetia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by different time of alcalase-mediated hydrolysis

Traits	Time (h)		
	0	0.5	1.5
<b>Amino acid (%)</b>			
<b>Essential amino acid</b>			
Tyrosine	2.48±0.28 <sup>B1)2)</sup>	5.67±0.37 <sup>A</sup>	5.75±0.71 <sup>A</sup>
Lysine	5.00±0.11 <sup>B</sup>	5.99±0.06 <sup>AB</sup>	6.58±0.47 <sup>A</sup>
Leucine	3.95±0.36 <sup>B</sup>	6.29±0.06 <sup>A</sup>	6.86±0.56 <sup>A</sup>
Methionine	0.87±0.02 <sup>B</sup>	1.48±0.08 <sup>A</sup>	1.47±0.04 <sup>A</sup>
Valine	5.43±0.23 <sup>B</sup>	6.02±0.00 <sup>A</sup>	5.71±0.00 <sup>AB</sup>
Threonine	3.68±0.10 <sup>B</sup>	4.65±0.03 <sup>A</sup>	4.47±0.18 <sup>A</sup>
Histidine	4.22±0.12 <sup>A</sup>	3.45±0.11 <sup>B</sup>	3.30±0.19 <sup>B</sup>
<b>Non-essential amino acid</b>			
Glycine	8.10±0.01 <sup>A</sup>	7.25±0.14 <sup>B</sup>	6.76±0.24 <sup>B</sup>
Serin	6.08±0.06 <sup>A</sup>	7.25±0.06 <sup>A</sup>	7.68±0.98 <sup>A</sup>
Alanine	7.47±0.20 <sup>A</sup>	6.26±0.21 <sup>B</sup>	5.92±0.12 <sup>B</sup>
Glutamic acid	16.01±0.03 <sup>A</sup>	13.95±0.02 <sup>A</sup>	13.51±1.08 <sup>A</sup>
Arginine	5.07±0.13 <sup>A</sup>	4.74±0.18 <sup>A</sup>	4.62±0.28 <sup>A</sup>
Asparagine	8.19±0.20 <sup>B</sup>	9.26±0.09 <sup>AB</sup>	9.64±0.47 <sup>A</sup>
Isoleucine	3.30±0.12 <sup>A</sup>	3.92±0.11 <sup>A</sup>	4.72±0.92 <sup>A</sup>
Phenylalanine	2.93±0.24 <sup>B</sup>	4.01±0.08 <sup>A</sup>	3.96±0.23 <sup>A</sup>
Proline	17.22±2.14 <sup>A</sup>	9.80±1.10 <sup>B</sup>	9.05±0.34 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD

<sup>2)</sup>Means in each row followed by the same letter (A-B) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

### 3.1.5. pH

Alcalase 가수분해 시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 pH는 Table 5에 나타내었다. 가수분해하지 않은 P0의 pH는 7.360이었고, 효소 가수분해 0.5시간까지 pH가  $6.929 \pm 0.047$ 로 급속히 감소하였다. 그 이후부터는 반응 종료시간까지 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 효소 가수분해를 6시간 진행한 HP6이 pH  $6.857 \pm 0.048$ 로 가장 낮은 값을 나타내었다. Ryu et al. (2015)의 보고에 따르면 굴의 효소가수분해 시간에 따른 pH 변화를 관찰한 결과 가수분해 8시간까지 서서히 감소하다가 그 이후에 급속히 감소하는 경향을 나타내었다. Suh et al. (2017)은 endo type 4가지 효소(alcalase, neutrase, protamex, alkaline protease)를 이용해 유청단백을 가수분해 시켰을 때 4가지 효소 모두 반응 시간이 진행됨에 따라 pH가 감소하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 이처럼 가수분해 동안 흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 pH가 감소하는 이유는 효소의 작용으로 단백질이 분해되면서 산성 아미노산의 carboxyl group이 유리되어 pH가 감소하였기 때문이다. 또한, 흰점박이꽃무지유충에 함유된 glycogen이 가수분해가 해당작용에 의하여 젖산으로 분해되어 축적되었기 때문이라 생각한다. 가수분해 0.5시간 이후 pH가 일정하게 유지되는 것을 통해 일정한 반응 시간 이후에는 그 가수분해 정도가 일정하게 유지됨을 알 수 있으며 이는 가수분해도 결과에서도 알 수 있다(Fig 3). 따라서 alcalase를 이용해 흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물 제조 시 0.5시간의 짧은 시간만으로 가수분해가 이루어지는 것을 확인하였다.

Table 5. pH of *Protaetia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour: P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6)

	P0	HP0.5	HP1.5	HP3	HP6
pH	7.360±0.060 <sup>A1)2)</sup>	6.929±0.047 <sup>B</sup>	6.889±0.039 <sup>BC</sup>	6.882±0.050 <sup>BC</sup>	6.857±0.048 <sup>C</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD

<sup>2)</sup>Means followed by the same letter (A-C) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .



### 3.1.6. 단백질 용해도

단백질 용해도는 단백질의 가용성 분획의 비율을 말하며 잘못 접힌 단백질은 응집체를 형성하고 수용액에 용해되지 않기 때문에 단백질 접힘의 품질을 평가하는 척도로 사용된다. Alcalase 가수분해시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백질 가수분해물의 용해도는 Fig. 7에 나타내었다. 가수분해하지 않은 P0의 용해도는 pH 2-4에서 각각 52.61%, 45.69%, 48.17%로 가장 낮았으며 pH 4 이상부터 점차 증가하였다. 이는 흰점박이꽃무지유충 단백질의 등전점이 pH 2-4 부근임을 나타낸다. pH 4 미만에서 카르복실기는 물 분자와 펩타이드의 친화도를 감소시키는 형태로 바뀌는 경향이 있다(Hall et al., 2017). 가수분해 후 모든 처리구가 pH 2-4에서 용해도 70% 이상으로 P0보다 유의적으로 증가했으며( $P < 0.05$ ), 특히 많은 식품 형태에 일반적으로 사용되는 산성 수용액에서 용해도가 증가한 것을 확인하였다.

가수분해 후 용해도 증가의 원인으로 첫째, 가수분해가 단백질의 평균 입자크기를 감소시켜 표면적을 증가시키고, 작아진 펩타이드는 가수분해하지 않은 단백질의 폴리펩타이드 보다 극성을 띠기 때문에 물분자와 수소결합력이 증가된 것으로 볼 수 있다(Liu et al., 2010; Zhao et al., 2012). 둘째로, 초음파 처리가 단백질 분자의 풀림 현상을 향상시킬 뿐만 아니라 가수분해물의 입자크기를 감소시켜 효소 작용이 향상되고 물분자와의 상호작용이 증가된 가수분해물을 생성할 수 있다. 이러한 결과는 다른 단백질을 이용한 가수분해물에서도 나타났다(Li et al., 2020; Tian et al., 2020). 곤충단백질의 경우 Mintah, et al. (2019)의 연구에서 alkaline protease로 가수분해된 *Hermetia illucens* 단백질 가수분해물에서도 유사한 결과가 나타났다. Hall, et al. (2017)은 *Gryllidae sigillatus*의 용해도가 pH 3과 4에서 가장 낮게 나타나 pH 3 부근이 등전점이라고 보고했다. 또한, alcalase로 가수분해했을 때 가수분해하지 않은 단백질에 비해 모든 pH 범위에서 용해도가 향상됨을 보여주었다. Purschke et al. (2018)의 연구에서도 가수분해하지 않은 *Locusta migratoria L.* 단백질의 용해도가 10-22% 범위를 나타냈으며 가수분해 후 용해도가 최대 55%까지 증가했다고 보고했다.

가수분해 시간에 따른 단백질 용해도를 관찰한 결과 유의적인 차이가 나타나지 않았으므로 0.5시간 동안 가수분해를 통해 높은 용해도를 갖는 단백질가수분해물

을 얻을 수 있다. 단백질 용해도는 새로운 단백질 성분의 개발에서 중요한 기능적 속성으로 산업에서 다른 기능보다 원하는 속성이다. 본 연구결과를 통해 흰점박이꽃무지유충 가수분해물을 넓은 pH 범위의 식품에 응용할 수 있으며 특히 스포츠 음료 및 산성을 갖는 소스와 같은 산성 식품에서 활용할 가능성을 보여준다.

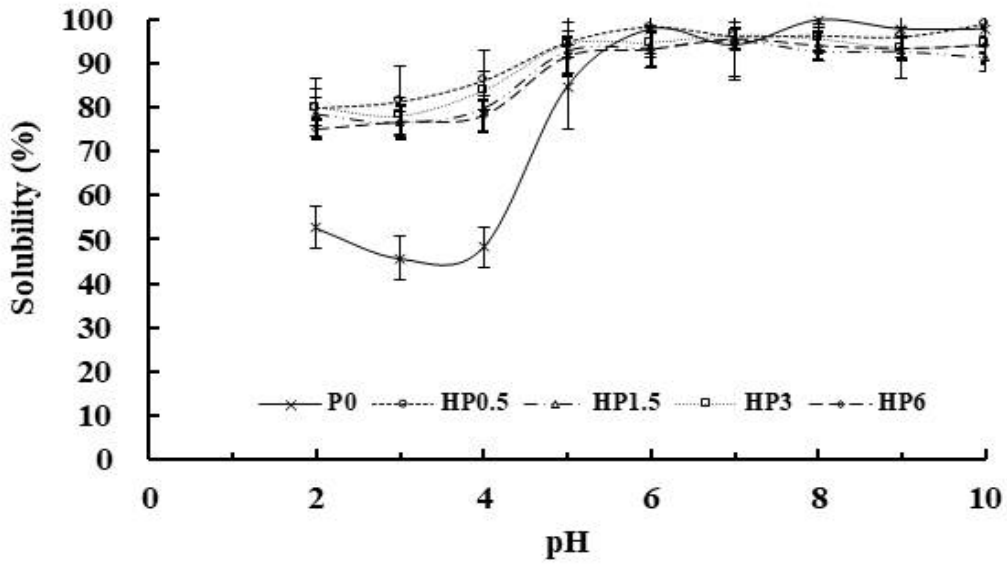


Fig. 7. Solubility of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6) at various pH conditions.

### 3.1.7. 입자크기, 제타전위, 입도분포도

단백질 입자의 크기는 용해도, 거품 및 유화 특성과 같은 단백질의 기능적 특성에 영향을 미칠 수 있다(Pezeshk et al., 2021). Alcalase 가수분해시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백가수분해물의 입자특성은 Table 6에 나타내었다. 가수분해하지 않은 흰점박이꽃무지유충 단백질의 입자크기는 153.32 nm로 가장 큰 입자크기를 가졌고 가수분해물의 평균 입자크기는 125에서 141 nm 범위로 가수분해 후에 입자크기가 작아지는 경향을 보였다. 또한, HP6의 입자가 HP1.5, HP3보다 큰 이유는 저분자 펩타이드의 소수성 아미노산 잔기가 응집할 가능성이 더 크기 때문일 수 있다(Yin et al., 2021).

입자분산지수(polydispersity index, PDI)는 0.40-0.57의 범위를 나타내었다. 입자분산지수는 입자크기 분포의 분산정도를 나타내며 값이 작을수록 좁은 입자분포를 나타낸다(Jo et al., 2014). PDI의 범위는 0-1 사이의 값으로 표시되며, PDI가 0.3 이하일 경우 단분산상 형태를 나타내며, 그 이상일 경우 중분산상 또는 다분산상 형태의 입자가 분포되어 있다는 것을 나타낸다(Kim et al., 2020). 본 연구 결과 다양한 크기의 입자가 분포된 것으로 확인된다.

단백질의 표면 전하는 안정성에 영향을 주는 요인으로 에멀전 시스템을 고려할 때 매우 중요하다. 제타전위는 -28.86 mV에서 -31.97 mV을 나타냈으며 6시간 동안 가수분해한 HP6이 -31.97 mV로 제타전위 절댓값이 가장 높아 수용액에서 높은 안정성을 나타내었다. 6시간을 제외하고 가수분해시간에 따른 유의적 차이가 나타나지 않았다. 가수분해는 표면 단백질의 친수성 부분의 노출 정도와 3차 단백질 구조에 영향을 미치며 이는 결합 정도, 전하, 순표면전하 분포에 영향을 준다. Park et al. (2021)은 프로테아제 농도를 달리하여 가수분해도를 증가시킨 결과 가수분해의 증가가 제타전위의 절댓값을 증가시키는 것을 보여주었다. 또한, Teh et al. (2016)의 연구에서는 대마단백질(*Cannabis sativa* L.)의 가수분해시간이 증가할수록 제타전위가 증가해 본 연구와 유사한 경향을 보였다. 이는 가수분해가 이온화 가능한 아미노기 및 카르복실기를 증가시켰기 때문이다. 일반적으로 제타전위 절댓값이 높으면 분자 사이에 정전기적 반발력이 발생하는데, 이는 응집 방지를 위한 핵심 특성으로 값이 +30 mV 이상 또는 -30 mV 이하 일 때 안정하다고 할 수 있으며 제타전위의 절댓값이 낮을수록 단백질 응집을 일으

킬 수 있다(Singhal et al., 2016).

다른 연구에서는 가수분해물 입자 사이의 정전기 반발이 증가하면 용해도와 물 관련 특성이 모두 개선된다고 하였다(Soria-Hernández et al., 2015; Park et al., 2021). 따라서, 가수분해물 분자 사이의 정전기적 반발력의 증가는 용해도 및 이와 관련된 기능적 특성의 증가에 유리할 것으로 생각되며 전반적으로 가수분해물 모두 안정한 상태의 제타전위를 나타내어 유화제로 사용하기에 적합하다고 생각된다(García-Moreno et al., 2021).

Table 6. Particle size, zeta-potential and poly dispersity index analysis of *Protaetia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6)

	Diameter (nm)	Zeta potential (mV)	PDI
<b>P0</b>	153.32±5.06 <sup>A1)2)</sup>	-29.31±1.23 <sup>A</sup>	0.50±0.12 <sup>A</sup>
<b>HP0.5</b>	138.10±9.57 <sup>B</sup>	-30.99±2.56 <sup>AB</sup>	0.57±0.00 <sup>A</sup>
<b>HP1.5</b>	125.92±12.99 <sup>C</sup>	-28.60±1.67 <sup>A</sup>	0.40±0.13 <sup>B</sup>
<b>HP3</b>	131.46±7.68 <sup>C</sup>	-28.86±3.56 <sup>A</sup>	0.51±0.11 <sup>A</sup>
<b>HP6</b>	141.05±6.79 <sup>B</sup>	-31.97±2.47 <sup>B</sup>	0.57±0.00 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD

<sup>2)</sup>Means followed by the same letter (A-C) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

### 3.1.8. 표면장력

Alcalase 가수분해시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물의 표면장력은 Fig. 8에 나타내었다. 단백질은 양친매성 특성을 갖고 있어 경계면으로 이동하는 경향이 있다. 가수분해 여부와 관계없이 흰점박이꽃무지유충 단백질은 물(72 mN/m)에 대한 표면장력을 감소시켰으며, 모든 시료가 표면장력을 낮추는 표면활성제임을 알 수 있었다. 가수분해하지 않은 P0과 가수분해된 HP0.5-HP3은 유의적 차이를 나타내지 않았으며 가수분해 시간이 가장 긴 HP6의 표면장력이  $48.36 \pm 1.75$  mN/m로 가장 낮은 값을 나타내었고( $P < 0.05$ ) 가수분해시간에 따른 유의적 차이도 나타나지 않았다. Moghadam et al. (2020)은 가수분해시간에 따라 표면장력이 감소했으며 가수분해물이 가수분해되지 않은 것에 비해 높은 표면활성을 나타내 유화 활성이 향상되었다고 보고했다. 가수분해는 단백질의 3차 구조를 파괴하고 분자량을 감소시켜 표면 및 계면 특성에 영향을 준다(Thaiphanit et al., 2016). 가수분해물은 천연 단백질보다 더 작은 크기를 가지며 가수분해를 통해 향상된 용해도로 인해 계면으로 확산속도가 빨라 표면활성이 높다. 이에 비해 가수분해하지 않은 단백질의 경우 분자 크기가 크기 때문에 표면활성이 낮고 분자 유연성을 감소할 수 있어 계면에서 막을 형성하는 능력이 낮을 수 있다(Moghadam et al., 2020). 또한, 표면장력의 감소는 공기와 물 계면에서 흡착될 수 있는 가용성 단백질 분자 증가와 관련이 있다(Żmudziński et al., 2021). 본 연구결과 공기와 물 계면에 노출된 소수성, 친수성 분자가 증가한 것으로 보인다.

### 3.1.9. 표면소수성

단백질의 표면소수성은 극성 환경과 접촉하는 단백질 표면에 있는 소수성 그룹의 수를 나타내며 거품 및 유화 특성과 관련된 단백질의 중요한 특성이다 (Dickinson, 2008). Alcalase 가수분해시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백질 가수분해물의 표면소수성은 Fig. 8에 나타내었다. 가수분해하지 않은 P0이  $11.91 \pm 2.95$ 로 가장 높았으며 HP0.5, HP1.5 HP3은 유의적 차이를 나타내지 않았다. 가수분해한 시료 중 HP6의 표면소수성이  $0.95 \pm 0.86$ 으로 가장 낮았다. 이를 통해 alcalase 효소 가수분해가 단백질의 표면소수성을 감소시키는 것을 확인하였다. 단백질의 표면소수성은 아미노산 조성, 표면 소수성 아미노산 및 단백질 펩타이드의 크기와 관련이 있는 것으로 알려져있다(Avramenko et al., 2013). 또한, 가수분해로 인해 단백질 내부에 있던 소수성 그룹을 노출 시켜 단백질이 표면 소수성이 증가하거나(Xu et al., 2016; Mintah et al., 2019) 이와 반대로 가수분해로 인해 유리 소수성 아미노산으로 절단되거나 소수성 작용이 증가하여 단백질간의 응집으로 인해 표면 소수성이 낮아질 수 있다(Zhang et al., 2012; Zheng et al. 2015). Zang et al. (2019)의 연구를 보면 trypsin 효소를 이용해 가수분해도를 달리했을 때 표면소수성을 관찰한 결과 가수분해도 3%까지 쌀 단백질의 표면소수성이 증가하다가 6%부터 감소했다고 보고하였다. 이와 유사하게 alcalase 효소를 이용해 돼지 플라즈마 단백질을 가수분해한 연구에서도 가수분해가 진행될수록 표면소수성이 감소하였다(Liu, et al., 2010). 또한, 수중유적형 유화제를 제조하기 위해 다양한 효소를 사용해 난백 단백질 가수분해물을 제조한 결과 가수분해하지 않은 것에 비해 가수분해한 단백질의 표면소수성이 낮아지는 것을 확인하였다(Ling et al., 2020). 표면소수성과 용해도를 비교하면 표면소수성이 높은 P0의 용해도가 가수분해물에 비해 낮아졌는데 이는 가수분해하지 않은 단백질 표면에 더 많은 소수성 그룹이 존재하여 수용액에서 낮은 용해도를 유발할 수 있기 때문이다(Shi et al., 2018). 본 연구결과 표면소수성 그룹이 alcalase로 인해 파괴되어 가수분해가 진행될수록 낮아진 것으로 생각된다.



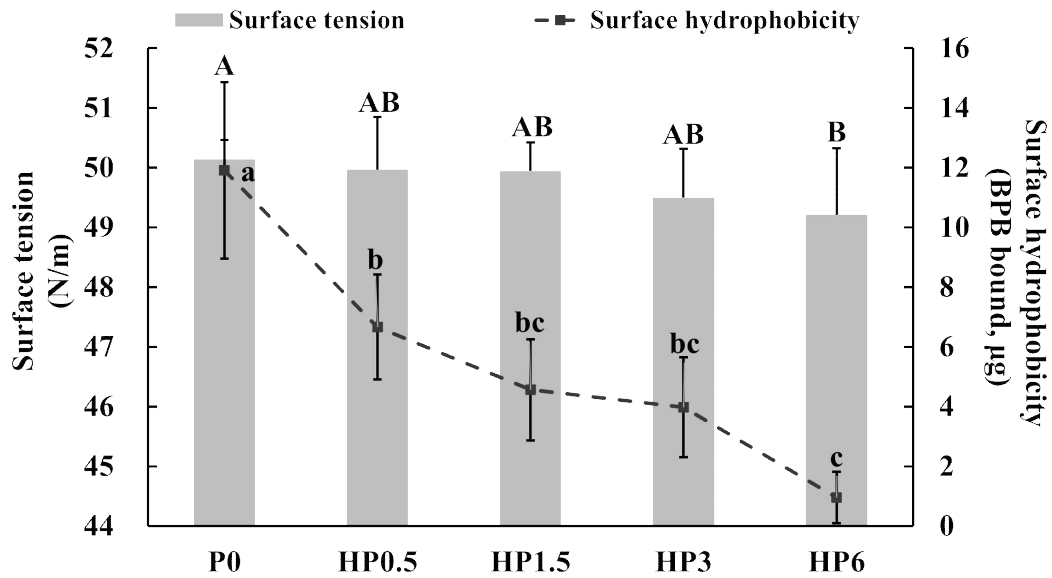


Fig. 8. Surface tension and surface hydrophobicity of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).

All values are mean±SD

Means followed by the same letter (A-B) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

Means followed by the same letter (a-c) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

### 3.1.10. 접촉각

접촉각은 표면의 친수성 또는 소수성을 측정하는데 사용하는 젖음성을 나타낼 때 사용한다. 접촉각이  $90^\circ$ 보다 높으면 젖음성이 좋지 않으며  $90^\circ$ 보다 낮으면 젖음성이 좋다는 것을 의미한다. 즉,  $\theta < 90^\circ$  은 친수성을 나타내어 oil in water 에 멀전이 형성되며  $\theta > 90^\circ$ 은 소수성을 나타내어 water in oil 에 멀전을 형성한다. 이론적으로  $\theta = 90^\circ$ 을 갖는 입자는 오일과 수상층에 동등하게 젖음성을 나타내기 때문에 최적화된 안정성을 갖는 에멀전이 만들어지지만, 실제로는 입자가 수상층에 약간 더 위치할 때 유화 안정성이 향상된다고 보고되었다(Dickinson 2017; Sharkawy et al., 2021; Sun et al., 2021). Alcalase 가수분해시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백가수분해물의 접촉각은 Fig. 9에 나타내었다. 본 연구에서 가수분해하지 않은 P0의 접촉각은  $40.72 \pm 1.23^\circ$ 로 가장 높게 나타났다. 가수분해 시간이 증가하면서 접촉각이 감소하였고 가수분해 시간이 가장 긴 HP6는  $15.59 \pm 0.19^\circ$ 로 가장 낮은 값을 나타내었다. 이는 가수분해 할수록 친수성 아미노산이 증가하고(Table 4) 표면소수성이 감소 되었기(Fig. 8) 때문으로 생각된다. 따라서, 가수분해를 통해 가수분해물의 젖음성이 좋아져 수중유적형 유화제로 적합할 것으로 생각된다. 하지만 친수성 특성이 지나치면 오일과 물 계면에서 단백질이 흡착되는 능력이 떨어져 안정적인 에멀전을 형성할 수 없기 때문에 적절한 가수분해 시간을 파악하는 것이 필요하다.

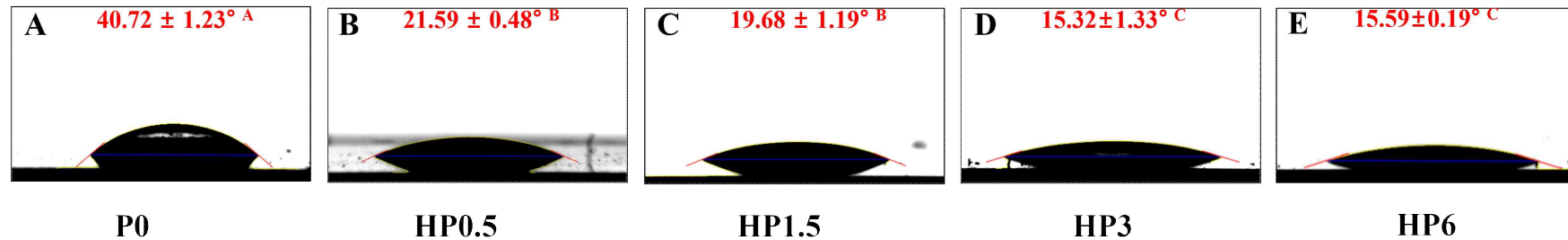


Fig. 9. Contact angle of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by different time of alcalase-mediated hydrolysis (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).

All values are mean±SD

Means followed by the same letter (A-B) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P < 0.05$ .

### 3.1.11. 유화력(EAI) 및 유화 안정성 지수(ESI)

유화 특성은 일반적으로 두 가지 지표로 평가할 수 있으며 유화력(Emulsifying activity index, EAI)은 고정된 단백질량으로 유화시킬 수 있는 오일의 최대량을 말하며 높을수록 더 미세하고 더 많은 수의 분산된 지방구를 나타낸다. 유화 안정성 지수(Emulsifying stability index, ESI)는 일정 기간 일어나는 구조적 변화에 저항하는 에멀전의 능력을 말한다(Farooq and Boye et al., 2011; Chang and Nickerson et al., 2018). Alcalase 가수분해시간에 따른 흰점박이꽃무지유층 단백질 가수분해물의 유화력 및 유화 안정성은 Fig. 10에 나타내었다. 유화력은 가수분해하지 않은 P0가  $5.403 \pm 0.334 \text{ m}^2/\text{g}$ 로 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었고 가수분해한 처리구의 경우  $6.824\text{--}6.969 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 범위를 가졌다. 가수분해 시간에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 유화 안정성 지수도 마찬가지로 가수분해하지 않은 P0이  $47.01 \pm 13.87 \text{ min}$ 으로 유의적으로 가장 낮은 값을 나타내었다. 가수분해한 처리구는  $81.61\text{--}129.83 \text{ min}$ 의 범위를 가졌으며 HP6가  $81.61 \text{ min}$ 으로 HP0.5-HP3에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 단백질 가수분해의 경우 특정 지점까지 긍정적인 영향을 미칠 수 있으며, 가수분해가 과도하게 일어날 때 유화특성이 떨어질 수 있다. Galves et al. (2021)은 가수분해하지 않은 단백질과 비교할 때 DH 2%에서 높은 유화력을 보였으며, 이는 가수분해 동안 펩타이드 사슬 간의 상호작용이 파괴되어 하전된 부위가 노출되고 단백질 가수분해물의 표면활성이 증가하기 때문이라고 하였다(Ghribi et al., 2015). 또한, 더 높은 용해도와 더 작은 분자량을 갖는 가수분해물이 계면에서 빠르게 확산 및 흡착할 수 있다(Ai et al., 2019). 이와 반대로 Avramenko et al. (2013)은 렌틸콩의 천연 단백질의 유화력이 가수분해물보다 높게 나타나 가수분해가 유화특성을 감소시켰다. Liu et al. (2010)은 일반적으로, 작은 펩타이드는 계면으로 빠르게 확산되지만 전하 반발로 인해 쉽게 응집되어 오일을 주변에 막을 형성하지 않을 수 있으며, 큰 펩타이드처럼 계면에서 전개 및 재배열이 부족으로 유화액을 안정화하는데 덜 효율적이라고 하였다.

본 연구결과에 가수분해물의 가수분해도는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 HP0.5, HP1.5, HP3가 가장 높은 유화특성을 나타내었다. 가수분해도는 단백질의 크기를 나타내지 않고 가수분해 후 절단된 단백질 결합의 백분율을 나타내기 때

문에 유화 특성 결과가 단백질의 분자량, 입자크기, 표면소수성, 용해도 등 여러 요인과 관련이 있다고 생각한다(Wang et al., 2021). 또한, 4%의 흰점박이꽃무지 유충 기질용액에 alcalase를 1% 첨가해 가수분해하였을 때 공정효율을 고려하여 HP0.5가 가장 적절했다. 그 후 가수분해시간을 0.5시간으로 선택하여 수중유적형 에멀전을 제조하여 단백질 분산액 농도에 따른 에멀전 특성을 평가하였다.

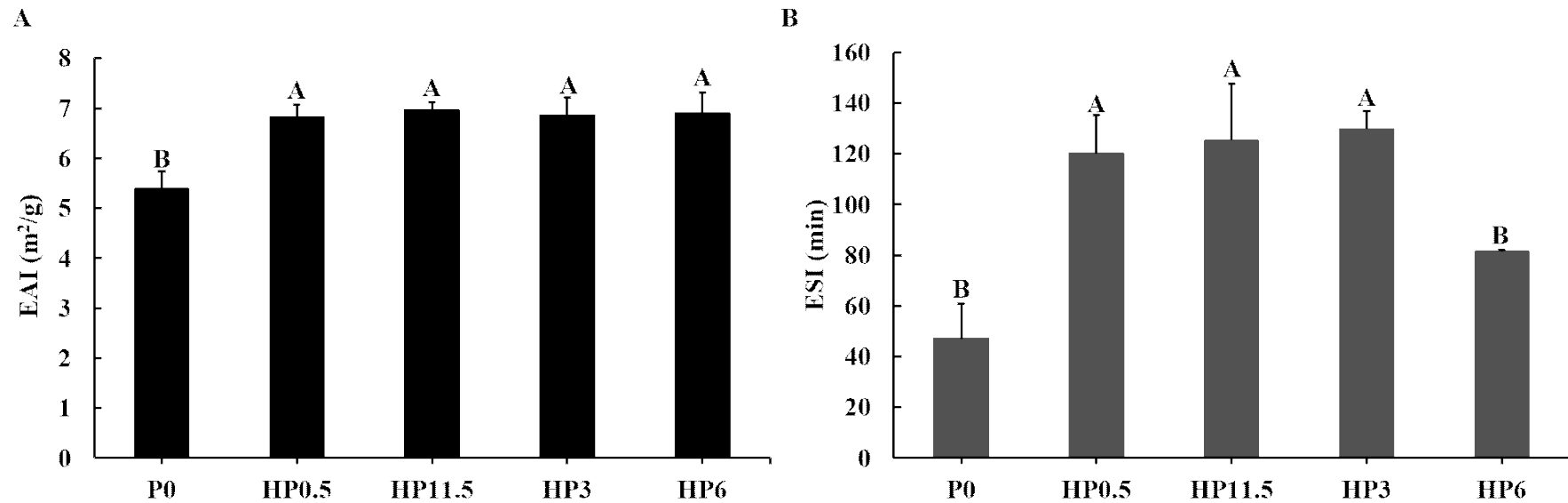


Fig. 10. Emulsifying activity index (A) and emulsifying stability index (B) of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (0-6 hour:P0, HP0.5, HP1.5, HP3, HP6).

All values are mean±SD

Means followed by the same letter (A-B) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

### 3.1.12. SEM(scanning electron microscopy)

흰점박이꽃무지유충 탈지분말과 Alcalase 가수분해시간에 따른 흰점박이꽃무지유충 단백질의 미세구조를 관찰하기 위해 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM)을 사용했으며 이미지를 Fig. 11에 나타내었다. 흰점박이꽃무지유충 탈지 분말(A)은 표면이 거칠고 불규칙한 구조와 큰 덩어리 형태의 입자 모양을 나타내었다. 초음파 처리만 진행한 P0(B)은 덩어리 입자가 분쇄되어 쪼개진 형상을 보였으며 표면에 금이 가서 주름지고 얇은 평면 형태를 보였다. 이러한 현상은 Tian et al. (2020)의 연구에서도 관찰되었으며 이는 초음파 처리로 인해 단백질 전개가 일어났기 때문일 수 있다. 가수분해 과정 후(C, D, E, F)에는 구형의 입자 형태를 나타내었으며 가수분해시간에 따라 구형의 입자가 분리되거나 작아지는 경향을 보였다. 이는 카사바를 아밀라아제 효소로 가수분해했을 때 구형 입자가 나타났다고 보고한 선행연구와 유사한 경향을 나타내었다(Dukare et al., 2021).

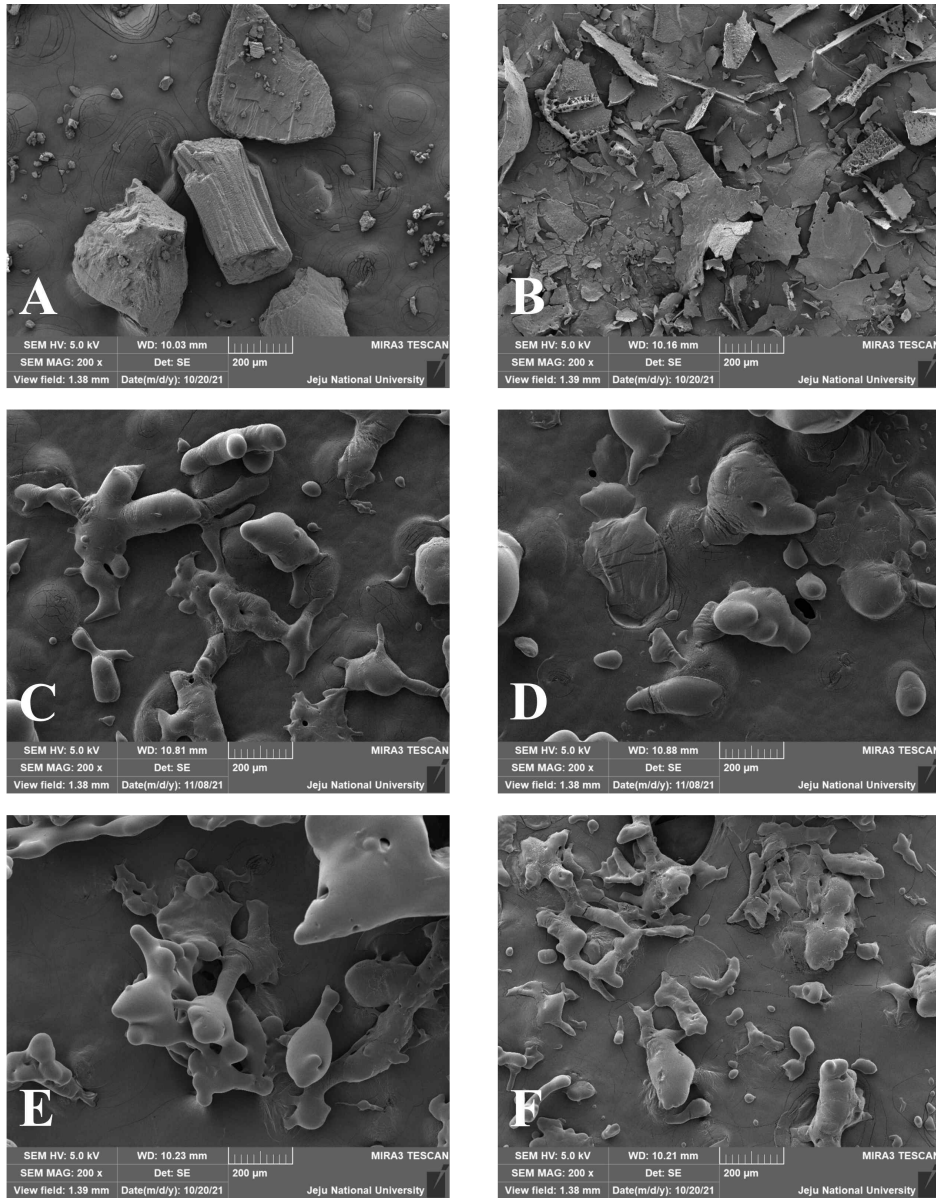


Fig. 11. Images observed by Scanning electron microscope of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates prepared by alcalase-mediated hydrolysis with different time (A) Defatted *Protactia brevitarsis* larvae powder; (B) P0; (C) HP0.5; (D) HP1.5; (E) HP3; (F) HP6. Images with a 200  $\mu$ m scale bar provided were taken at 200 $\times$  magnification.



## 3.2. 분산매 농도에 따른 oil in water 에멀전 특성

### 3.2.1. 에멀전 입자특성

가수분해효율과 유화특성을 고려한 결과 0.5시간 동안 가수분해하는 것을 최적으로 확립하였다. 다양한 농도의 흰점박이꽃무지유충 단백질가수분해물에 의해 안정화된 oil in water 에멀전의 입자크기, 제타전위, 입도분포도는 Table 7에 나타내었다. 유화활성에 대한 단백질가수분해물 농도의 영향은 천연 pH에서 5가지의 농도(1-5%)로 이루어졌다. 에멀전의 입자크기는 모두 200 nm 이하를 나타내었고 제조 직후 1-2% 농도로 제조된 에멀전의 입자크기는 각각 124.98 nm, 126.93 nm로 유의적 차이가 없었다( $P>0.05$ ). 이에 비해 3%로 농도가 증가함에 따라 입자크기가 점진적으로 증가했으며( $P<0.05$ ) 4%로 제조된 에멀전의 입자크기가 가장 큰 값을 나타내었다. 이를 통해 1-2%에서 에멀전 입자크기가 안정기에 도달했음을 알 수 있다. 이는 분산매의 농도가 높으면 단백질과 단백질 사이의 거리를 감소시키고 제타 전위를 감소시켜 단백질 응집을 일으킬 수 있기 때문으로 생각된다(Zhao et al., 2019). 저장 기간이 지날수록 에멀전의 입자크기가 증가했는데 이는 액적의 응집으로 인한 결과로 생각된다. 저장 기간 입자크기는 증가했지만 모두 나노에멀전의 형태를 보였다. 또한, 제조 직후 모든 에멀전의 제타전위는 절댓값 30에 가까워 안정적인 상태임을 알 수 있다. 그중에서도 입자크기가 가장 작았던 단백질가수분해물 농도 1% 에멀전의 제타전위가 가장 컸으며 이는 액적 응집에 대한 저항성이 큰 것을 의미하며 에멀전 입자크기 결과와 일치하는 경향을 보였다.

저장 기간이 지날수록 제타전위는 감소했고 3-5%는 절댓값이 30 이하로 떨어지면서 반발력이 낮아졌지만 1-2%는 저장 10일까지 안정적인 상태를 보였다. Ansarifar et al. (2019)의 연구에 따르면 대두 분리단백질 농도가 0.1%에서부터 1%까지 증가함에 따라 에멀전의 제타전위가 증가했지만 1.5%와 2%에서는 감소했다. 이는 단백질 농도가 증가할수록 분자 간 공간이 감소하고 결과적으로 입자가 결합하여 더 큰 응집을 형성할 수 있으며 표면 전하가 줄어들 뿐만 아니라 새로운 구조의 제타 전위로 변화시키기 때문이라고 보고했다. 입도분포도는 모두 0.25 이하로 단분산상태를 나타내었다.

Table 7. Changes in particle diameter, zeta potential and polydispersity index of emulsions stabilized by various concentration of *Protaetia brevitarsis* larvae protein hydrolysates during storage

Protein conc. (%)	Particle diameter (nm)				Zeta potential (mV)				Polydispersity index			
	Days											
	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10
1	124.98±	135.85±	139.93±	158.17±	-32.18±	-32.33±	-30.64±	-30.16±	0.24±	0.23±	0.20±	0.25±
	3.06 <sup>Cc1)2)</sup>	4.31 <sup>Db</sup>	2.98 <sup>Db</sup>	12.88 <sup>Ca</sup>	1.09 <sup>Cb</sup>	1.15 <sup>Cb</sup>	1.38 <sup>Bab</sup>	2.57 <sup>Ba</sup>	0.01 <sup>Aa</sup>	0.01 <sup>BCa</sup>	0.02 <sup>Ca</sup>	0.11 <sup>Aa</sup>
2	126.93±	140.63±	149.00±	153.60±	-31.29±	-31.32±	-29.31±	-30.24±	0.22±	0.22±	0.22±	0.21±
	1.17 <sup>Cd</sup>	2.43 <sup>Cc</sup>	4.00 <sup>Cb</sup>	2.20 <sup>Ca</sup>	0.94 <sup>Bb</sup>	0.68 <sup>BCb</sup>	1.17 <sup>Aa</sup>	0.66 <sup>Ba</sup>	0.01 <sup>Ba</sup>	0.01 <sup>Ca</sup>	0.01 <sup>Bab</sup>	0.02 <sup>Ab</sup>
3	131.99±	146.53±	161.25±	163.33±	-30.31±	-30.41±	-28.55±	-29.84±	0.22±	0.23±	0.23±	0.23±
	1.62 <sup>Bc</sup>	2.43 <sup>Bb</sup>	4.51 <sup>Ba</sup>	5.99 <sup>BCa</sup>	0.52 <sup>Ab</sup>	0.73 <sup>ABb</sup>	1.27 <sup>Aa</sup>	0.42 <sup>ABb</sup>	0.01 <sup>Ba</sup>	0.01 <sup>BCa</sup>	0.01 <sup>Aa</sup>	0.01 <sup>Aa</sup>
4	132.98±	147.73±	164.56±	168.99±	-30.10±	-30.49±	-28.97±	-29.47±	0.23±	0.23±	0.24±	0.23±
	1.62 <sup>Ad</sup>	2.41 <sup>Bc</sup>	2.01 <sup>ABb</sup>	6.40 <sup>Ba</sup>	0.43 <sup>Abc</sup>	0.49 <sup>ABc</sup>	0.72 <sup>Aa</sup>	0.85 <sup>ABab</sup>	0.01 <sup>ABb</sup>	0.00 <sup>ABab</sup>	0.00 <sup>Aa</sup>	0.01 <sup>Aab</sup>
5	129.89±	152.16±	168.55±	179.88±	-29.85±	-29.89±	-28.54±	-28.54±	0.23±	0.24±	0.24±	0.25±
	3.51 <sup>Bd</sup>	5.05 <sup>Ac</sup>	3.98 <sup>Ab</sup>	12.13 <sup>Aa</sup>	0.46 <sup>Ab</sup>	1.27 <sup>Ab</sup>	0.95 <sup>Aa</sup>	1.19 <sup>Aa</sup>	0.01 <sup>ABa</sup>	0.00 <sup>Aa</sup>	0.00 <sup>Aa</sup>	0.05 <sup>Aa</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD

<sup>2)</sup>Samples designated with different capital letter (A-D) indicated significant difference ( $P<0.05$ ) when compared between different storage days (same sample). Samples designated with different lower case letter (a-d) indicated significant difference ( $P<0.05$ ) when compared between different samples (same storage days).

### 3.2.2. 표면장력, 계면흡착 단백질 농도 및 단백질 흡착률

단백가수분해물 농도에 따른 에멀전의 표면장력, 계면흡착 단백질 농도( $C_0-C_e$ ) 및 단백질 흡착률(AP%)은 Table 8에 나타내었다. 단백질가수분해물 농도에 따른 에멀전의 표면장력은 47.17~48.81 mN/m이었으며, 3%부터 표면장력이 유의적으로 낮아지기 시작했으며 그 이후 5%까지 단백질가수분해물의 첨가량이 증가할수록 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 3%(w/v) 이상의 농도에서는 계면을 포화시키고 수상에 단분산된 후 과잉의 단백질 분자가 소수성 상호작용을 통한 양친매성 특성으로 인해 수상에서 응집되고 미셀을 형성하는 것으로 보인다.

AP(%)은 물과 오일 사이 계면에서 에멀전의 안정성에 중요한 역할을 하며, 분산상으로 사용된 단백질가수분해물에서 유화에 관여하는 단백질 함량을 뜻한다(Shao et al., 2014; Dickinson, 2017). 계면흡착 단백질 농도는 단백질 농도가 1%에서 5%로 증가하면서 0.36 mg/mL에서 0.66 mg/mL로 유의적으로 증가했으며( $P<0.05$ ), 3-5%끼리는 유의적 차이가 나타나지 않았다( $P>0.05$ ). 이에 비해 단백질 흡착률은 1%에서 4%까지 유의적 차이가 없었으며 5%에서 AP(%)가 감소하였다. 이를 통해 계면에 흡착되는 단백질 농도는 증가하지만, 유화에 관여하는 단백질(단백질 흡착률)은 차이가 없거나 감소하는 것을 알 수 있다. 이와 유사하게 완두콩 단백질로 제조된 에멀전이 단백질 농도가 증가함에 따라 AP(%)가 감소한다고 보고했다(Peng et al., 2016). 유청단백질, 카제인 나트륨, 콩 단백질을 사용한 에멀전의 경우도 단백질 농도가 증가하면서  $C_0-C_e$ 가 증가했지만 AP(%)가 감소하는 것으로 나타났다(Chen et al., 2022). 따라서, 에멀전을 안정화하는데 고농도의 단백질이 필요하지 않았으며 적절한 단백질 농도를 찾는 것이 중요하다고 판단된다.

Table 8. The surface tension (mN/m), protein adsorption ( $C_0-C_e$ ) and adsorbed protein percentage (AP%) of emulsions stabilized by various concentration of *Protoetia brevitarsis* larvae protein hydrolysates

Protein conc. (%)	Surface tension (mN/m)	$C_0-C_e$ (mg/mL)	AP (%)
1	48.81±0.14 <sup>A1)2)</sup>	0.36±0.10 <sup>C</sup>	11.22±1.39 <sup>AB</sup>
2	48.40±0.22 <sup>A</sup>	0.47±0.16 <sup>BC</sup>	8.67±0.14 <sup>AB</sup>
3	47.78±0.20 <sup>B</sup>	0.71±0.12 <sup>AB</sup>	12.30±1.99 <sup>A</sup>
4	47.59±0.73 <sup>B</sup>	0.81±0.04 <sup>A</sup>	11.50±0.23 <sup>A</sup>
5	47.17±0.75 <sup>B</sup>	0.66±0.04 <sup>AB</sup>	8.03±0.62 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD

<sup>2)</sup>Means followed by the same letter (A-C) are not significantly different by Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

### 3.2.3. 에멀전 크리밍 지수(CI)

CI는 에멀전의 안정성을 측정하는데 이용되며(Zhang et al., 2021), 흰점박이꽃무지유층 단백질가수분해물에 의해 안정화된 oil in water 에멀전을 10일 동안 보관하면서 단백질가수분해물 농도에 따른 크리밍 지수는 Fig. 12에 나타내었다. 크리밍 지수는 특정 시간 안에 액적막의 저항, 중력 또는 유체 역학 및 기계적 힘에 의해 파열되는 오일 방울의 유착에 대한 민감성을 결정하기 위해 사용되며, 크리밍 지수가 높을수록 oil in water 에멀전의 저장수명이 감축될 수 있다(Anvari et al., 2017). Fig. 12에 나타냈듯이 24시간 이후 에멀전 상층에 오일층이 생겨 두 층으로 분리된 것을 확인하였다. 저장 24시간 후에는 단백질가수분해물 농도가 1-3%일 때는 유의적 차이가 없었고, 4-5%가 가장 낮은 크리밍 지수를 보였다. 저장 5일 후에는 단백질가수분해물 농도 4-5% 에멀전의 크리밍이 진행되면서 속도가 상대적으로 빨라 모든 농도 간에 유의적 차이가 나타나지 않았다. 저장 5일부터 10일 사이에 3%의 크리밍 현상이 급속하게 일어나 유의적으로 가장 큰 크리밍지수를 나타냈다. 농도가 높을수록 크리밍 지수가 낮은 이유는 수상에 흡착되지 않은 단백질 때문일 수 있으며 더 높은 분산매 농도는 기름방울 경계면에서 단백질 분자의 흡착을 촉진하여 기름방울의 밀도를 약간 증가시키고 결과적으로 크리밍 속도를 감소시킬 수 있다고 하였다. 본 연구에서는 단백질 흡착률의 큰 차이는 없었지만, 1-2%와 3-5%를 비교했을 때 계면 흡착 단백질 농도가 높아지면서 밀도가 증가하여 크리밍 속도를 감소시킨 것으로 생각된다. Zhang et al. (2019)는 알긴산 나트륨 농도가 증가함에 따라 점도가 증가하면서 액적에 가해지는 항력을 증가시키고 에멀전의 크리밍 속도를 감소시킬 수 있다고 보고했다. 유청단백질과 잔탄검 혼합물(Sun et al., 2009), 젤라틴(Anvari et al., 2017), 분리콩단백질(Tang and Liu, 2013), 완두콩단백질(Liang and Tang, 2014)로 제조된 에멀전에서도 유화제로 사용된 물질의 농도가 높을수록 크리밍 속도가 낮아져 본 연구와 유사한 결과가 나타났다.

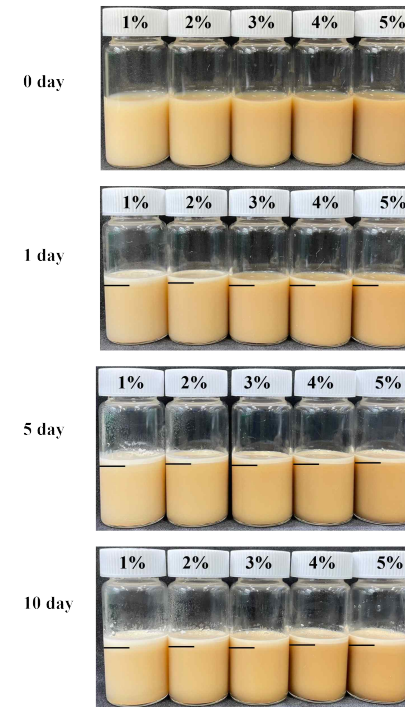
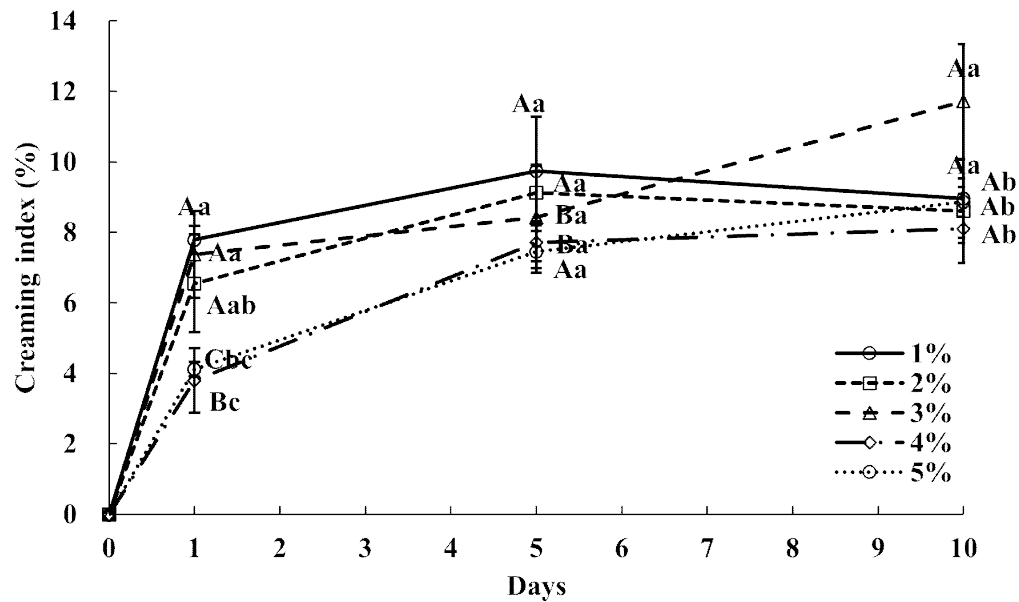


Fig. 12. Changes in creaming index(%) of emulsions stabilized by various concentration of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates during storage.

Samples designated with different capital letter (A-C) indicated significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared between different storage days (same sample). Samples designated with different lower case letter (a-c) indicated significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared between different samples (same storage days).

#### 3.2.4. 포집효율

에멀전을 10일 동안 보관하면서 단백가수분해물 농도에 따른 포집효율은 Fig. 13에 나타내었다. 흰점박이꽃무지유충 단백가수분해물에 의해 안정화된 에멀전에서 리모넨의 캡슐화 효율은 약 95% 이상이었으며 단백질 농도에 따른 유의적 차이가 나타나지 않았다( $P>0.05$ ). 이를 통해 단백질 농도는 캡슐화 효율에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 또한, 10일 지난 후에도 캡슐화 효율이 변함없이 높은 효율을 나타내었다. 리모넨은 휘발성이 강하고 쉽게 산화될 가능성이 큰 특성으로 인해 생체 이용률이 낮아질 수 있다(Errenst et al., 2021). Lopes et al. (2019)은 리모넨을 캡슐화하기 위해 Span 85와 키토산-셀룰로오스 복합체를 사용한 결과 51.29% 캡슐화 효율을 나타내었다. 연구결과 흰점박이꽃무지유충 단백가수분해물은 리모넨을 보호하는 효과가 있었으며 캡슐화 기술에 곤충 단백질의 사용 가능성을 보여주었습니다.

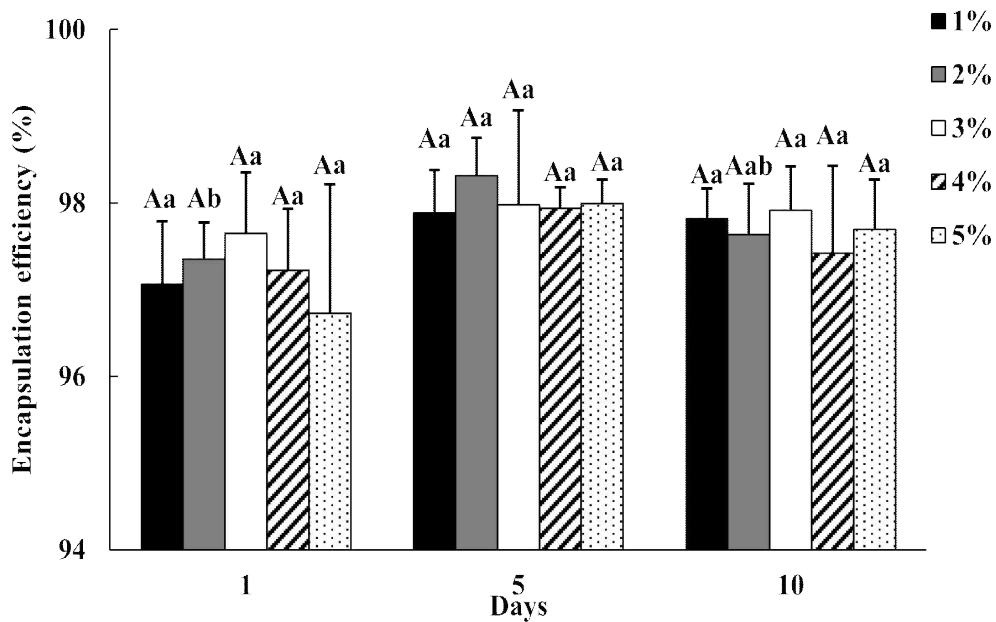


Fig. 13. Encapsulation efficiencies(%) of limonene by various concentration of *Protactia brevitarsis* larvae protein hydrolysates during storage.

Samples designated with different capital letter (A) indicated significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared between different storage days (same sample). Samples designated with different lower case letter (a-b) indicated significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared between different samples (same storage days).



## 4. 결론

본 연구에서는 제주산 흰점박이꽃무지유충 단백질을 천연유화제로 활용하기 위해 alcalase 가수분해 시간에 따른 단백가수분해물의 물리화학적 특성을 분석했으며, 최적 가수분해시간을 확립한 후 분산매 농도에 따른 에멀전의 특성을 관찰하였다. Alcalase 가수분해 시간에 따른 특성을 비교한 결과, 가수분해 후 단백질의 추출률과 함량이 증가했으며, 분자량이 작아지는 것으로 나타났다. 가수분해 후에 총 아미노산 함량이 증가했으며 가수분해시간에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다. 또한, 단백가수분해물의 등전점 부근인 pH 2-4에서 단백질 용해도가 증가해, 다양한 pH에서 활용이 가능한 단백가수분해물이 제조되었다. 단백가수분해물의 유화특성을 관찰한 결과, 가수분해로 인해 표면소수성과 접촉각이 낮아졌고 친수성이 증가하는 것을 확인했으며 가수분해 후 유화력이 향상되었다. 또한, 0.5시간부터 6시간까지 가수분해도가 약 50% 이상으로 나타나 유의적 차이가 없었으며, 이로써 0.5시간만으로도 가수분해가 충분하다는 것을 확인하였다. 유화력은 가수분해시간에 따라 차이가 없었지만, 가수분해시간이 가장 긴 HP6는 입자끼리 응집되어 HP0.5-3보다 입자가 커졌고, 친수성이 가장 강한 것으로 나타났다. 이로 인해 유화 안정성이 낮아지면서 HP6는 유화제로 사용하기에 부적합하다고 판단되었다. 따라서, 가수분해 효율과 단백가수분해물의 특성을 고려했을 때, 최적 가수분해시간으로 0.5시간이 선정되었다. 가수분해 시간을 확립한 뒤에는 분산매 농도를 달리하여 oil in water 에멀전을 제조하였다. 분산매 농도 3%부터 입자크기가 증가했고 농도가 증가할수록 입자 간 반발력이 감소했으며 저장 기간이 증가할수록 변화가 컸다. 또한, 표면장력, 계면흡착 단백질 농도, 단백질흡착률 및 크리밍지수를 측정된 결과, 단백질농도는 증가하지만 유화에 관여하는 단백질은 큰 차이가 없었으며 1%와 2%만으로도 에멀전을 제조하는데 충분한 농도임을 확인하였으며, 캡슐화 효율도 95% 이상으로 높게 나타났다.

본 연구결과 단백가수분해물은 단백질과 필수아미노산 함량이 높으며, 유화력도 보유하고 있어 대체 단백질과 유화제가 사용되는 식품 분야에 적용할 수 있으며, 캡슐화 효율이 높아 기능성 물질의 수송체로써 사용도 기대된다. 이를 통해 대체 단백질원으로서 곤충 단백질의 활용 가능성이 커질 것으로 생각된다.

## References

- Ahmadifard, N., Murueta, C.J.H., Abedian-Kenari, A., 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.
- Ahuja, K., Mamtani, K. (2019). Easy availability, high protein and low-fat concentration characteristics to boost product demand. Global Market Insight. USA.
- Ai, M.M., Tang, T., Zhou, L., Ling, Z., Guo, S.G., Jiang, A. (2019). Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of preserved egg white hydrolysates. *Food Hycolloids*, 87, 933-942.
- Akharume, F. U., Aluko R.E., Adedeji, A.A. (2021). Modification of plant proteins for improved functionality: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 198-224.
- Alemzadeh, E., Shahidi, F., Mohebbi, M., Ramezani, N., Koocheki, A., Mohamadian, A. (2019). Optimization of limonene microencapsulation based on native and fibril soy protein isolate by VIKOR method. *LWT*, 115, 107884.
- Alves, A.V., Freitas de Lima, F., Granzotti da Silva, T., Oliveira, V.S.D., Kassuya, C.A.L., Sanjinez-Argandoña, E.J. (2019). Safety evaluation of the oils extracted from edible insects (*Tenebrio molitor* and *Pachymerus nucleorum*) as novel food for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 102, 90-94.
- Ansarifar, E., Shahidi, F., Mohebbi, M., Ramezani, N., Koocheki, A., Mohamadian, A. (2019). Optimization of limonene microencapsulation based on native and fibril soy protein isolate by VIKOR method. *LWT*, 115, 107884.
- Anvari, M., Joyner, H.S. (2017). Effect of formulation on structure-function relationships of concentrated emulsions: Rheological, tribological, and microstructural characterization. *Food Hydrocolloids*, 72, 11-26.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis. 18th ed. Association of official analytical chemists, Washington D.C., U.S.A.

- Arancibia, C., Riquelme, N., Zúñiga, R.N., Matiacevich, S. (2017). Comparing the effectiveness of natural and synthetic emulsifiers on oxidative and physical stability of avocado oil-based nanoemulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 44, 159-166.
- Arno, G.B. Wouters, A.G.B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., Delcour, J.A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 786-800.
- Avramenko, N.A., Low, N.H., Nickerson, M.T. (2013). The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. *Food Research International*, 51(1), 162-169.
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68-74.
- Chang, C., Nickerson, M.T. (2018). Encapsulation of omega 3-6-9 fatty acids-rich oils using protein-based emulsions with spray drying. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 2850-2861.
- Chen, M., Xu, F., Nsor-Atindana, J., Chen, X., Liu, F., Wu, J., Zhong, F. (2022). High protein and high oil emulsions: Phase diagram, stability and interfacial adsorption. *LWT*, 153, 112464.
- Choi, M.J., Kim, H.G., Lee, Y.J., Park, D.H., Lee, S.Y. (2018). The principle of emulsifier in food application and trends in food emulsifier market, *Food science and industry*, 51(2), 136-147.
- Choonpicharn, S., Jaturasitha, S., Rakariyatham, N., Suree, N., Niamsup, H. (2014). Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Niletilapia skin, *Journal of science and Technology*, 52, 3134-3139.
- Chung H.S., Cho J.S., Kim H.S., Kim D.S., Lee Y.G., Seong J.H., Moon K.D. 2016. Quality characteristics of coffee beverage processed by ultrasound-assisted extraction. *Korean Journal of Food Preservation*, 23(5), 660-665.
- Chung M.Y., Hwang J.S., Goo T.W., Yun E.Y. (2013). Analysis of general composition and harmful material of *Protaetia brevitarsis*. *Journal of Life Science*, 23(5), 664-668.
- Costa-Neto, E.M., Dunkel, F.V. (2016). Insects as food: history, culture and modern use around the world. In *Insects as Sustainable Food Ingredients*, 29-60.

- Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4(5), 932-942.
- Dickinson, E. (2017). Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, 68, 219-231.
- Ding, Y., Chen, L., Shi, Y., Akhtar, M., Chen, J., Ettelaie, R. (2021). Emulsifying and emulsion stabilizing properties of soy protein hydrolysates, covalently bonded to polysaccharides: The impact of enzyme choice and the degree of hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 113, 106519.
- Dukare, A.S., Arputharaj, A., Bharimalla, A.K., Saxena, S., Vigneshwaran, N. (2021). Nanostarch production by enzymatic hydrolysis of cereal and tuber starches. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2(25), 100121.
- Errenst, C., Petermann, M., Kilzer, A. (2021). Encapsulation of limonene in yeast cells using the concentrated powder form technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 168, 105076.
- Farooq, Z., Boye, J.I. (2011). Pulse food. Novel food and industrial applications of pulse flours and fractions. 283-323. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 283-323.
- Fathi, P., Moosavi-Nasab, M., Mirzapour-Kouhdasht, A., Khalesi, M. (2021). Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combined ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. *Food Bioscience*, 42, 101110.
- Fernández Sosa, E.I., Chaves, M.G., Henao Ossa, J.S., Quiroga, A.V., Avanza, M.V. (2021). Protein isolates from *Cajanus cajan* L. as surfactant for o/w emulsions: pH and ionic strength influence on protein structure and emulsion stability. *Food Bioscience*, 42, 101159.
- Finke, M.D., Oonincx, D.G.A.B. (2014). Mass production of beneficial organisms. insects as food for insectivores. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 583-616.
- Foegeding, E.A., Diaz, J.T. (2011). Food protein functionality: a comprehensive approach. *Hydrocolloids*, 25(8), 1853-1864.
- Fogang Mba, A.R., David-Briand, E., Viau, M., Riaublanc, A., Kansci, G., Genot, C. (2021). Protein extraction yield, lipid composition, and emulsifying properties of aqueous extracts of *Rhynchophorus phoenicis* larvae extracted at pH 3.0 to 10.0. *Future Foods*, 4, 100037.
- Food and Agriculture Organization, World Health Organization. Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint

- FAO/WHO/UNU expert consultation. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43411>. Accessed at July 13. 2021.
- Galves, C., Galli, G., Miranda, C.G., Kurozawa, L.E. (2021). Improving the emulsifying property of potato protein by hydrolysis: an application as encapsulating agent with maltodextrin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 70, 102696.
- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. (2004). Parmentier influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69, 615-622.
- Gould, J., Wolf, B. (2018). Interfacial and emulsifying properties of mealworm protein at the oil/water interface. *Food Hydrocolloids*, 77, 57-65.
- Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Peniche, C., Higuera-Ciajara, I., Doxastakis, G., Kiosseoglou, V. (2000). Chitin and chitosan developments in food Science. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 265-308.
- Hall, F.G., Jones, O.G., O'Haire, M.E., Liceaga, A.M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 224(1), 414-422.
- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M.J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., Recio, I. (2014). Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, 38, 82-100.
- Hoyle, N.T., Merritt, J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of food science*, 59, 76-79.
- Jo J, Shin S, Jung H, Min B, Kim S, Kim J. (2017). Process development for production of antioxidants from lipid extracted microalgae using ultrasonic-assisted extraction. *Korean Institute of Chemical Engineers*, 55(4), 542-547.
- Jo, Y.J., Lee, S.B., Lee, J.K., Kwon, Y.J. (2014). Preparation of nanoemulsions containing curcumin by high pressure homogenization. *Korean Society for Food Engineering*, 18(4), 341-347.
- Jo, Y.J., Van der Schaaf, U.S. (2021). Fabrication and characterization of double ( $W_1/O/W_2$ ) emulsions loaded with bioactive peptide/polysaccharide complexes in the internal water ( $W_1$ ) phase for controllable release of bioactive peptide. *Food Chemistry*, 344(15), 128619.
- Jongema, Y. (2015). List of edible insects of the world. Available from: [https://www.wur.nl/upload\\_mm/8/a/6/0fdfc700-3929-4a74-8b69-f02fd35a1696\\_Worldwide%20list%20of%20edible%20insects%202017.pdf](https://www.wur.nl/upload_mm/8/a/6/0fdfc700-3929-4a74-8b69-f02fd35a1696_Worldwide%20list%20of%20edible%20insects%202017.pdf). Accessed at April

15. 2021.
- Kim, E., Shin, G. (2020). Evaluation of physicochemical properties of curcumin nanoemulsion with food grade emulsifiers. *Korean Journal of Food Preservation*, 27(1), 119-126.
- Kim, H.S., Park, H.Y., Kwon, H.S., Lee, S.H., Ha, J, Lee, S.W., Cho, S.J. (2019). Variations in antioxidant activity in *Protaetia brevitarsis* larvae depending on the feeding source. *Journal of Mushrooms*, 17(4), 261-267.
- Kim, S.M., An, C.W., Ah, H.J. (2019). Characterization and application of the proteins isolated from edible insects. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 537-542.
- Kim, T.K., Yong H.I., Chun, H.H., Lee, M.A., Kim, Y.B., Choi, Y.S. (2020). Changes of amino acid composition and protein technical functionality of edible insects by extracting steps. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(2), 298-305.
- Kim, T.K., Yong, H.I., Jeong, C.H., Han, S.G., Kim, Y.B., Paik, H.D., Choi, Y.S. (2019). Technical functional properties of water and salt soluble proteins extracted from edible insects. *Food Science of Animal Resources*, 39(4), 643-654.
- Kim, T.K., Yong, H.I., Kim, Y.B., Jung, S.M., Kim, H.W., Choi, Y.S. (2021). Effects of organic solvent on functional properties of defatted protein extracted from *Protaetia brevitarsis* larvae. *Food chemistry*, 336(30), 127679.
- Kinsella, J.E., Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods:a survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7(3), 219-80.
- Kralove I., Sjöblom, J. (2009). Surfactants used in food industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363-1383.
- Kristinsson, H.G, Rasco, B.A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 657-666.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A. (2010). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 43-81.
- Krstonošić, V., Kalić, M.D., Dapčević-Hadnađev, T., Lončarević, I., Hadnađev, M. (2020). Physico-chemical characterization of protein stabilized

- oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A*, 602, 125045.
- Lange, K.A., Nakamura, Y. (2021). Edible insects as future food: chances and challenges. *Journal of Future Foods*, 1(1), 38-46.
- Lam, A.C.Y., Can Karaca, A., Tyler, R.T., Nickerson, M.T. (2016). Pea protein isolates: structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126-147.
- Lam, R.S.H., Nickerson, M.T. (2013). Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975-984.
- Lee, S.H., Cho, Y.J., Kim, S., Ahn, B.J., Choi, C. (1995). Optimal conditions for the enzymatic hydrolysis of isolated sesame meal protein. *Applied Biological Chemistry*, 38(3), 248-253.
- Li, F., Wang, B., Kong, B., Shi, S., Xia, X. (2019). Decreased gelling properties of protein in mirror carp (*Cyprinus carpio*) are due to protein aggregation and structure deterioration when subjected to freeze-thaw cycles. *Food Hydrocolloids*, 97, 105223.
- Li, S., Yang, X., Zhang, Y., Ma, H., Qu, W., Ye, X., Muatasim, R., Oladejo, A.O. (2016). Enzymolysis kinetics and structural characteristics of rice protein with energy-gathered ultrasound and ultrasound assisted alkali pretreatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 85-92.
- Li, Y., Cheng, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Mintah, B.K., Dabbour, M., Jiang, H., Ma, H. (2020). Modification of rapeseed protein by ultrasound-assisted pH shift treatment: ultrasonic mode and frequency screening, changes in protein solubility and structural characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 69, 105240.
- Liang, H.N., Tang, C.H. (2014). Pea protein exhibits a novel pickering stabilization for oil-in-water emulsions at pH 3.0. *Food Hydrocolloids*, 58(2), 463-469.
- Ling, Z., Ai, M., Zhou, Q., Guo, S., Zhou, L., Fan, H., Cao, Y., Jiang, A. (2020). Fabrication egg white gel hydrolysates-stabilized oil-in-water emulsion and characterization of its stability and digestibility. *Food Hydrocolloids*, 102, 105621.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y., Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118(2), 403-410.
- Lopes, S., Afonso, C., Fernandes, I., Barreiro, M.F., Costa, P., Rodrigues, A.E.

- (2019). Chitosan-cellulose particles as delivery vehicles for limonene fragrance. *Industrial Crops and Products*, 139, 111407.
- Mahmoud, M.I., Malone, W.T., Cordle, C.T. (1992). Enzymatic hydrolysis of Casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *Food science*, 57(5), 1223-1229.
- Maryia M, Martine J.J.I, 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.
- McClements, D.J. (2015). Food emulsions. principles, practices, and techniques (3rd ed.), CRC press, Boca Raton, FL, USA.
- McClements, D.J., Bai, L., Chung, C. (2017). Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions. *Annual Review of Food Science and Technology*, 28(8), 205-236.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA). 2021 Comprehensive plan for fostering the insect industry. 2021[cited 2021 Aug 15]. Availavle from: <https://www.mafra.go.kr/mafra/1329/subview.do>
- Miñones Conde, J., Rodríguez Patino, J.M. (2007). The effect of enzymatic treatment of a sunflower protein isolate on the rate of adsorption at the air - water interface. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 1001-1009.
- Mintah, B.K., He, R., Dabbour, M., Xiang, J., Agyekum, A.A., Ma, H. (2019). Techno-functional attribute and antioxidative capacity of edible insect protein preparations and hydrolysates thereof: effect of multiple mode sonochemical action. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58, 104676.
- Miron, L.T., Bosch, G., Postma, R.P., Eppink, M.H.M. (2019). Preliminary evaluation of aqueous protein extraction from black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.). *Industrial Biotechnology*, 15(6), 365-369.
- Moghadam, M., Salami, M., Mohammadian, M., Emam-Djomeh, Z., Jahanbani, R., Moosavi-Movahedi, A.A. (2020). Physicochemical and bio-functional properties of walnut proteins as affected by trypsin-mediated hydrolysis. *Food Bioscience*, 36, 100611.
- Mokni Ghribi, A., Maklouf Gafsi, I., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougateg, A., Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, 187(15), 322-330.
- Mun S.H. (2020). Application of rice protein as a natural emulsifier. *Korean*



- Journal of Food and Cookery Science*, 36(1), 109–117.
- Nasri, R., Amor, I. B., Bougatef, A., Arroume, N. N., Dhulster, P., Gargouri, J., Chaabouni, M. K., Nasri, M. (2012). Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 133, 835–841.
- Nielsen, P.M. (1997). *Functionality of protein hydrolysates*. Taylor & Francis Group, New York, USA. pp 443–472.
- Noh, C.W., Jeon, S.H., Son, D., Cho, Y.S., Lee, B.J. (2015). Changes of nutritive component with before processing feeding type for larva of *Protaetia Brevitarsis*. *The Journal of the Korean Society of International Agriculture*, 27(5), 675–681.
- Ovissipour, M., & Ghomi, M. R. (2009). *Biotechnology in seafood production* (1st ed., pp. 1–198). Tehran: Islamic Azad University Publication.
- Okagu, O.D., Verma, O., McClements, D.J., Udenigwe, C.C. (2020). Utilization of insect proteins to formulate nutraceutical delivery systems: Encapsulation and release of curcumin using mealworm protein-chitosan nano-complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 333–343.
- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M.A., Ramírez-Suarez, J.C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*, 109(4), 782–789.
- Pan, M., Jiang, T.S., Pan, J.L. (2011). Antioxidant activities of rapeseed protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 4(7), 144–1152.
- Park, J.W., Sung, J.M., Choi, Y.S., Park, J.D. (2021). pH-dependent pasting and texture properties of rice flour subjected to limited protein hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 117, 106754.
- Peng, W., Kong, X., Chen, Y., Zhang, C., Yang, Y., Hua, Y. (2016). Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. *Food Hydrocolloids*, 52, 301–310.
- Pezeshk, S., Rezaei, M., Hosseini, H., Abdollahi, M. (2021). Impact of pH-shift processing combined with ultrasonication on structural and functional properties of proteins isolated from rainbow trout by-products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106768.
- Porschke, B., Meinschmidt, P., Horn, C., Rieder, O., Jäger, H. (2018). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and*

- Technology*, 244, 999–1013.
- Rumpold, B.A., Schlüter, O.K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 1–11.
- Ryu, T.H., Kim, J.H., Shin, J.Y., Kim, S.H., Yang, J.Y. (2015). Optimization of hydrolysis using oyster and oyster cooking drip. *Journal of Life Science*, 25(7), 795–800.
- Salvatore, S., Yvan Vandenplas, Y. (2016). Hydrolyzed proteins in allergy, *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series*, 86, 11–27.
- Sathe, S.K., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. (1982). Functional properties of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC] proteins. *Journal of Food Science*, 47(2), 503–509.
- Shao, Y., Tang, C.H. (2014). Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions: influence of ionic strength and heat pretreatment. *Food Hydrocolloids*, 37, 149–158.
- Sharkawy, A., Barreiro, M.F., Rodrigues, A.E. (2021). New pickering emulsions stabilized with chitosan/collagen peptides nanoparticles: synthesis, characterization and tracking of the nanoparticles after skin application. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp*, 616, 126327.
- Shen, P., Zhou, F., Zhang, Y., Yuan, D., Zhao, Q., Zhao, M. (2020). Formation and characterization of soy protein nanoparticles by controlled partial enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 105, 105844.
- Shi, A.M., Jiao, B., Liu, H.Z., Zhu, S., Shen, M.J., Feng, X.L., Hu, H., Liu, L., Faisal, S., Wang, Q., Adhikari, B. (2018). Effects of proteolysis and transglutaminase crosslinking on physicochemical characteristics of walnut protein isolate. *LWT*, 97, 662–667.
- Silk, D., Grimble, G., Rees, R. (1985). Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 44(1), 63–72.
- Singh, Y., Cullere, M., Kovitvadhi, A., Chundang, P., Zotte, A.D. (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 & Emerging Technologies*, 65, 102444.
- Singhal, A., Stone, A.K., Vandenberg, A., Tyler, R., Nickerson, M.T. (2016). Effect of genotype on the physicochemical and functional attributes of faba bean (*Vicia faba* L.) protein isolates. *Food Science and Biotechnology*,

- 25(6), 1513-1522.
- Soria-Hernández, C., Serna-Saldívar, S., Chuck-Hernández, C. (2015). Physicochemical and functional properties of vegetable and cereal proteins as potential sources of novel food ingredients. *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), 269-277.
- Stanciuc, N., Hintoiu, A., Stanciuc, S., Rapeanu, G. (2010). Thermal treatment can modify the susceptibility of whey protein concentrate to enzymatic hydrolysis. *Innovative Romanian Food Biotechnolog*, 7, 30-36.
- Suh, H.J., Han, S.H., Shin, J.C., Kim, J.H., Jang, J.H. (2017). Optimal enzyme selection for organic whey protein hydrolysis. *The Korean Society of Food and Nutrition*, 30(6), 1359-1363.
- Sun, C., Gunasekaran, S. (2009). Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 165-174.
- Sun, G., Liu, X., McClements, D.J., Liu, S., Li, B., Li, Y. (2021). Chitin nanofibers improve the stability and functional performance of pickering emulsions formed from colloidal zein. *Journal of Colloid and Interface Science*, 589, 388-400.
- Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G.I.N., You, L., Zhang, J., Liu, Y., Ma, L., Gao, J., Dong, Y. (2016). Transforming insect biomass into consumer wellness foods: A review. *Food Research International*, 89(1), 129-151.
- Taha, A., Hu, T., Zhang, Z., Bakry, A.M., Khalifa, I., Pan, S., Hu, H. (2018). Effect of different oils and ultrasound emulsification conditions on the physicochemical properties of emulsions stabilized by soy protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 49, 283-293.
- Tang, C.H. Liu, F. (2013). Cold, gel-like soy protein emulsions by microfluidization: emulsion characteristics, rheological and microstructural properties, and gelling mechanism. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 61-72.
- Teh, S.S., Bekhit, A.E.D.A., Carne, A., Birch, E.J. (2016). Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain. *Food Chemistry*, 203(15), 199-206.
- Thaiphanit, S., Schleining, G., Anprung, P. (2016). Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. *Food*

- Hydrocolloids*, 60, 252-264.
- Tian, R., Feng, J., Huang, G., Tian, B., Zhang, Y., Jiang, L., Sui, X. (2020). Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein hydrolysates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 68, 105202.
- Toldrá, F., Reig, M., M., Aristoy, M.C., Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267(30), 395-404.
- Wagenmakers, A.J., Coakley, J.H., Edwards, R.H. (1990). Metabolism of branched-chain amino acids and ammonia during exercise: clues from McArdle's disease. *International Journal of Sports Medicine*, 101-103.
- Wang, J., Jousse, M., Jayakumar, J., Fernández-Arteaga, A., Lamo-Castellví, S., Ferrando, M., Güell, C. (2021). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) protein concentrates as a sustainable source to stabilize o/w emulsions produced by a low-energy high-throughput emulsification technology. *Foods*, 10(5), 1048.
- Weng, W., Tang, L., Wang, B., Chen, J., Su, W., Osako, K., Tanaka, M. (2014). Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 342-351.
- Xiaoming, C., Ying, F., Hong, Z., Zhiyong, C. (2010). Review of the nutritive value of edible insects. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. pp 85-92.
- Xu, X., Liu, W., Liu, C., Luo, L., Chen, J., Luo, S., McClements, D.J., Wu, L. (2016). Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin. *Food Hydrocolloids*, 61, 251-260.
- Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z., Jiang, Y. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*, 124(2), 551-555.
- Yi, L., Lakemond, C.M.M., Sagis, L.M.C., Eisner-Schadler, V., Huis, A.V., van Boekel, M.A. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food chemistry*, 141(4), 3341-3348.
- Yin, Z., Wu, Y., Chen, Y., Qie, X., Zeng, M., Wang, Z., Qin, F., Chen, J., He, Z. (2021). Analysis of the interaction between cyanidin-3-O-glucoside and casein hydrolysates and its effect on the antioxidant ability of the complexes. *Food Chemistry*, 340, 127915.
- Yun, E.Y., Hwang, J.S. (2016). Status and prospect for development of insect

- foods. *Food science and industry*, 49(4), 31–39.
- Zang, X., Yue, C., Wang, Y., Shao, M., Yu, G. (2019). Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin. *Journal of Cereal Science*, 85, 168–174.
- Zhang, J., Wu, N., Yang, X., He, X.-T., Wang, L. (2012). Improvement of emulsifying properties of maillard reaction products from  $\beta$ -conglycinin and dextran using controlled enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 301–312.
- Zhang, T., Sun R., Ding, M. Tao, L., Liu, L., Tao, N., Wang, X., Zhong, J. (2020). Effect of extraction methods on the structural characteristics, functional properties, and emulsion stabilization ability of tilapia skin gelatins. *Food Chemistry*, 328(30), 127114.
- Zhang, X., Qi, B., Xie, F., Hu, M., Sun, Y., Han, L., Li, L., Zhang, S., Li, Y. (2021). Emulsion stability and dilatational rheological properties of soy/whey protein isolate complexes at the oil–water interface: influence of pH. *Food Hydrocolloids*, 113, 106391.
- Zhang, Y., Yang, N., Xu, Y., Wang, Q., Huang, P., Nishunari, K., Fang, Y. (2019). Improving the stability of oil body emulsions from diverse plant seeds using sodium alginate. *Molecules*, 24(21), 3856.
- Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X.D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W., Zhou, Q. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*, 134(3), 1360–1367.
- Zhao, X., Wu, T., Xing, T., Xu, X.I., Zhou, G. (2019). Rheological and physical properties of O/W protein emulsions stabilized by isoelectric solubilization/precipitation isolated protein: the underlying effects of varying protein concentrations. *Food Hydrocolloids*, 95, 580–589.
- Zhao, X., Vázquez-gutiérrez, J.L., Johansson, D.P., Landberg, R., Langton, M. (2016). Yellow mealworm protein for food purposes—extraction and functional properties. *PLoS ONE*, 11(2), e0147791.
- Zheng, X.Q., Wang, J.T., Liu, X.L., Sun, Y., Zheng, Y.J., Wang, X.J., Liu, Y. (2015). Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. *Food Chemistry*, 172, 407–415.
- Zielińska, E., Karaś, M., Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *LWT*, 91,

168-174.

Żmudziński, D., Goik, U., Ptaszek, P. (2021). Functional and Rheological Properties of *Vicia faba* L. Protein Isolates. *Biomolecules*, 11(2), 178.

## 감사의 글

어느새 2년이라는 시간이 흘러 학위논문 제출을 하게 되었습니다. 돌이켜 생각해보니 연구실에서 지내온 시간을 통해 성장할 수 있었고 많은 것을 배우고 깨달을 수 있어 값진 시간이었습니다. 저를 이 자리까지 올 수 있게 해주신 분들에게 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저 처음부터 끝까지 저를 믿어주시고 뭐든지 할 수 있다고 해주셨던 천지연 교수님! 힘들어서 포기하고 싶은 순간에도 끝까지 붙잡아 주시고 아낌없이 지도해 주셔서 감사합니다. 교수님과 함께한 모든 시간이 행복했습니다. 바쁘신 와중에도 논문심사를 맡아주시고 찾아뵈실 때마다 항상 따뜻한 미소로 필요한 실험 장비를 흔쾌히 사용하게 해주신 고영환 교수님, 학부생 때부터 대학원까지 수업시간마다 큰 가르침을 주셨던 임상빈 교수님, 꼼꼼한 손길로 논문심사를 맡아주시고 학부생 때 WASET 활동과 상담을 통해 함께하는 시간이 즐거웠던 김현정 교수님, 수업시간마다 많은 것을 배울 수 있었고 세심한 손길로 부족한 부분을 지적해주신 박은진 교수님, 훌륭하신 교수님들이 계셔서 많이 성장할 수 있었습니다. 감사드립니다.

또한, 저희 식품 생명공학과를 위해 힘쓰시는 호정 조교쌤, 진우 조교쌤 덕분에 편안한 학교생활을 할 수 있었습니다. 감사드립니다. 식품가공학연구실을 떠난다고 생각하니 아쉬운 마음이 크지만 혜윤, 은성, 정현, 지용, 희정, 지현, 아라 연구실을 잘 부탁하고 함께할 수 있어서 행복했고 고마웠어!!!

힘들 때마다 투정 부리는 거 들어주고 응원해준 나의 영원한 가공방메이트 하영, 기쁜 일, 슬픈 일 모두 나누고 격려해주는 나의 친구들 유경, 정진, 다인, 정아 서로 힘들 때마다 이야기하고 밥 친구였던 대학원 동기 다빈 오빠, 기도로 응원해주고 나의 안식처였던 성안 교회 우재순 목사님, 찬미 언니, 선주 언니, 은주 언니, 요셉공동체 덕분에 졸업할 수 있었습니다. 너무나도 사랑하고 고맙습니다.

마지막으로 항상 응원하고 격려해주고 하고 싶은 거 모두 할 수 있게 해준 우리 가족 말 안 듣는 딸, 동생이었지만 앞으로 효도하겠습니다. 사랑합니다. 일일이 나열할 수 없지만, 저와 함께했던 모든 분께 진심으로 감사드립니다.