

쌍별귀뚜라미 단백질 가수분해물의 제조 및 항산화 활성

조혜린¹ · 이유정¹ · 홍지은¹ · 이승욱^{1,*}

¹계명대학교 식품가공학과

Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Gryllus bimaculatus*

Hye-Rin Cho¹, Yoo-Jung Lee¹, Ji-Eun Hong¹, and Syng-Ook Lee^{1,*}

Department of Food Science and Technology, Keimyung University

Abstract *Gryllus bimaculatus* (GB) has recently been registered as a food variety in Korea. In the present study, we prepared protein hydrolysates from GB and evaluated their antioxidant capacity. Protein hydrolysates were prepared from dried GB using enzymatic hydrolysis using five different proteases, and protein hydrolysates showing high hydrolysis value (alcalase, flavourzyme, and neutrase) were separated further into fractions ≤ 3 kDa and then lyophilized. Based on RC₅₀ values of hydrolysates (≤ 3 kDa) obtained from four different antioxidant analyses, the flavourzyme hydrolysates showed relatively high levels of antioxidant capacity among the three hydrolysates, and in particular, it showed considerably strong antioxidant activity in 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assays. The flavourzyme hydrolysate also significantly inhibited peroxidation of linoleic acid. These results suggest that protein hydrolysates from GB represent potential sources of natural antioxidants. Our current studies are focused on identification of active peptides from the flavourzyme hydrolysate.

Keywords: *Gryllus bimaculatus*, protein hydrolysates, flavourzyme, peptide, antioxidant

서 론

최근 국제식량농업기구(FAO)에서는 미래의 식량부족을 대비하기 위한 해결방안으로 식용곤충을 제시하였으며 전 세계적으로 이에 대한 관심이 증대되고 있다. 이에 발맞추어 곤충산업 육성법이 제정되면서 곤충시장이 활성화 되고 있으며, 농촌진흥청에 따르면 곤충시장 규모는 2020년에 1조억 원에 이를 것으로 예상되고 있다(Kim과 Jung, 2013). 현재 국내 식품공전에 승인된 식용곤충으로는 메뚜기, 누에번데기, 백강잠, 갈색거저리 유충, 장수풍뎅이 유충, 흰점박이꽃무지 유충, 쌍별귀뚜라미까지 포함해서 총 7종이다(Baek 등, 2017).

쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)는 메뚜기목 귀뚜라미과에 속하는 아열대성 곤충으로 일본, 대만, 인도, 아프리카에 주로 분포한다(Lee와 Kwon, 2013). 곤충산업에 대한 관심이 높아지면서 식용, 약용 및 가축의 사료로 활용할 수 있는 곤충종 중에서 쌍별귀뚜라미가 관심을 받고 있으며, 쌍별귀뚜라미는 월동 기간을 거치지 않고 온도만 맞으면 사계절 번식이 가능하며 단백질 함량이 62% 이상으로 높고 불포화지방산과 필수지방산이 많아 식품원료나 가공식품으로 이용가치가 높다. 또한, 식용 귀뚜라미는 17세기에 결석치료 및 이뇨제로 사용하였으며 일본에서는 설사, 이

질 및 장티푸스를 치료하는데 사용되기도 하였다(Park, 2001). 이외에도 면역력 증가, 알코올 분해 촉진을 위한 효과적인 원료로도 연구되었다. 한편 국내에서 이루어진 쌍별귀뚜라미에 관한 연구로는 쌍별귀뚜라미와 장수풍뎅이 유충의 탈지 분말과 유지의 특성 분석(Jang과 Choi, 2017)과 쌍별귀뚜라미의 생태 및 성장에 따른 수용성 단백질의 변화(Lee, 2002) 등이 있지만 쌍별귀뚜라미의 항산화능에 대한 연구는 부족한 실정이다.

항산화 물질은 체내의 세포 산화 및 활성 라디칼을 소거하여 노화를 억제하는 것으로 알려져 있으며(Kim 등, 2003), 천연 항산화제 중 하나인 생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의 되는데 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되어 분자량이 작아 생체내로 쉽게 흡수된다(Kim 등, 2013). 또한 생리활성 펩타이드는 항산화, 고혈압 완화, 면역 조절, 진통완화 및 항균작용 등 다양한 기능적 특성을 갖고 있다(Ha와 Yoo, 2017). 곤충을 이용한 생리활성 펩타이드에 관한 선행연구로는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 제조 및 항산화 활성(Yu 등, 2017), 흰점박이꽃무지 유충 단백질 가수분해물의 제조 및 항산화 활성(Lee 등, 2017) 등이 있으며, 따라서 단백질이 풍부한 쌍별귀뚜라미 역시 생리활성을 갖는 펩타이드의 생산을 위한 유용한 원료로 주목받고 있다.

따라서 본 연구에서는 5종의 단백질 분해효소를 이용하여 쌍별귀뚜라미로부터 생리활성 펩타이드를 함유하는 단백질 가수분해물을 제조하였으며, TNBS와 SDS-PAGE를 통해 가수분해도가 우수한 3종의 단백질 분해효소를 선정하여 DPPH 라디칼, ABTS 라디칼, H₂O₂, FRAP 소거활성 및 지질과산화 억제활성 측정을 통해 쌍별귀뚜라미 단백질 가수분해물의 항산화 활성을 알아보고자 하였다.

*Corresponding author: Syng-Ook Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea
Tel: +82-53-580-5570
Fax: +82-53-580-5372
E-mail: synglee@kmu.ac.kr
Received June 17, 2019; revised August 13, 2019;
accepted August 13, 2019

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 주 시료는 2018년 4월 3일에 농업법인회사 (주)MG내츄럴(Damyang, Korea)에서 생산, 판매된 것으로 열풍 건조 된 쌍별귀뚜라미를 구입하여 -20°C 동결고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다. Alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain 및 papain 단백질 분해효소는 Novo사 제품을 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 가수분해도 측정을 위해 사용된 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid picrylsulfonic acid (TNBS)는 G-Biosciences사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, linoleic acid 와 sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Wako사(Osaka, Japan)로부터 구입하였다. Trichloroacetic acid 99.0% (TCA)는 Samchun (Pyeongtaek, Korea)에서 구입하였다. Linoleic acid, sodium phosphate monobasic dihydrate, sodium phosphate dibasic anhydrous, ethyl alcohol 99.9%(absolute alcohol), sodium bicarbonate, hydrochloric acid, acetic acid, glacial, methyl alcohol은 덕산(Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ)은 TCI 사(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 전기영동에서 사용되는 TEMED, 30% acrylamide/bis solution 29:1은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다. 그 밖의 언급이 없는 분석용 시약 및 유기용매는 모두 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

쌍별귀뚜라미 단백질 가수분해물 제조

열풍 건조 된 쌍별귀뚜라미를 증류수에 현탁하여 4% (w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 95°C 에서 20분간 가열시켜 자가 효소를 불활성화 시켰다. 기질용액에 기질 대비 1% (v/w)의 단백질 가수분해 효소(alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain papain)를 첨가하여 55°C , 100 rpm에서 0~8시간 동안 가수분해 한 후 95°C 에서 20분간 가열하여 효소를 불활성화하였다. 방랭한 후 단백가수분해물을 4°C 에서 $12,000\times\text{g}$ 으로 15분 동안 원심분리하여 고형분을 제거하고 상등액을 얻었으며, 상등액은 저분자 펩타이드의 분리를 위해서 cell strainer로 필터하였다. Membrane filter (Amicon Ultra-15, EMD Milipore Co., MA, USA)를 이용하여 4°C 에서 $5,000\times\text{g}$ 으로 1시간 동안 원심분리 함으로써 최종적으로 분자량 3 kDa 이하의 단백가수분해물을 얻은 후 동결건조하여 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

SDS-PAGE를 이용한 단백질분석

각 효소별 쌍별귀뚜라미의 단백질 가수분해 특성을 확인하기 위하여 Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 가수분해물의 단백질 패턴을 측정하였다. SDS-PAGE는 15% gel을 사용하였으며, 각 가수분해물은 $3,000\times\text{g}$, 4°C , 10분 원심분리 후 얻은 상등액 24 μL 를 gel에 loading하여 80 V에서 약 2시간 전기영동 하였다. loading한 gel은 0.1% coomassie brilliant blue로 염색한 뒤 탈색액(acetic acid: methanol:water=1:3:6)을 이용하여 탈색시켜 Gel Logic 2200 PRO Imaging System (Carestream Health Inc., Rochester, NY, USA)을 이용하여 polyacrylamide gel을 스캐닝한 후 이미지로 영상화 시킨 후 단백질 패턴을 분석하였다. 이때 분자량 마커는 Bio-Rad의 제품을 이용하였다.

단백질의 가수분해도 측정

TNBS 방법(G-Biosciences Co.)을 이용하여 효소제별 처리 시간에 따른 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 가수분해도를 측정하였다. 100 mM sodium bicarbonate (pH 8.5) 990 μL 와 1% TNBS 10 μL 를 혼합(v/v)하여 0.01% TNBS를 제조하였다. TNBS 50 μL 와 효소제 처리 시간별 반응혼합액 100 μL 를 섞어 37°C 에서 2시간 반응시킨 후 10% SDS와 1 N hydrogen chloride (1 N HCl)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 후 microplate spectrophotometer (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 335 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성 측정은 Hatano 등(1988)의 방법을 변형하여 측정하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)를 DMSO에 녹여 15 mM로 만든 후 MeOH로 희석하여 0.2 mM로 만들어 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 160 μL 에 0.2 mM의 DPPH 40 μL 를 가하여 30분간 실온에서 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 50%를 환원시키는데 필요한 농도를 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 trolox를 사용하여 시료의 항산화능을 $\mu\text{g TE}$ (trolox equivalent)/mg으로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거활성 측정

ABTS 라디칼 소거활성 실험은 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 최종농도가 7 mM인 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)와 2.45 mM인 potassium persulfate를 혼합하여 16시간 동안 암소에서 반응하여 라디칼을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 20 μL 에 희석된 ABTS 용액 180 μL 를 가하여 1분 동안 실온에서 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 50%를 환원시키는데 필요한 농도를 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 trolox를 사용하여 시료의 항산화능을 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 으로 나타내었다.

H_2O_2 소거활성 측정

Hydrogen peroxide (H_2O_2) 소거활성 측정은 Miller(1985)의 방법을 이용하였다. peroxidase는 PBS로 희석하여 음성대조군과 반응 후 흡광도 값을 1.0-1.3 사이로 맞춰준 후 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 20 μL 에 PBS 100 μL 와 1 mM H_2O_2 20 μL 를 가한 후 5분간 실온에서 방치시켰다. 1.25 mM ABTS 30 μL 와 3 U/mL peroxidase를 넣고 37°C 에서 10분간 반응시킨 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 50%를 환원시키는데 필요한 농도를 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 trolox를 사용하여 시료의 항산화능을 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 으로 나타내었다.

FRAP 소거활성

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)법은 Benzie와 Strain (1996)의 방법을 이용하였다. FRAP reagent는 300 mM sodium

acetate와 300 mM acetic acid를 혼합하여 제조한 300 mM acetate buffer (pH 3.6)와 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃ · 6H₂O를 10:1:1 (v/v/v)로 혼합하여 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 40 μL와 증류수 40 μL, FRAP reagent 100 μL를 가하여 37°C에서 4분간 반응시킨 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FeSO₄를 표준물질로 하여 μM FeSO₄/mg로 표시하였다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 trolox를 사용하여 시료의 항산화능을 μg TE/mg으로 나타내었다.

Linoleic acid에 대한 산화방지효과

Linoleic acid에 대한 과산화억제활성을 확인하기 위해 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 2 mL와 시료 1 mL, 5% linoleic acid 1 mL, absolute alcohol 1 mL을 혼합하여 반응 기질 용액을 제조한 후, 40°C, 100 rpm으로 진탕하며 하루 간격으로 시료의 과산화억제효과를 측정하였다. 측정은 20% TCA (w/v) 100 μL, 0.8% thiobarbituric acid (TBA, w/v) 100 μL와 linoleic acid 반응 기질 용액 50 μL를 혼합하여 95°C 이상에서 20분간 반응시킨 후 5분간 냉각시킨 후 20°C, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액 180 μL를 532 nm에서 측정하였다. 이때 활성 비교를 위한 양성대조군으로 trolox를 사용하였다.

통계분석

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

결과 및 고찰

효소별 쌍별귀뚜라미의 단백질 가수분해물 제조 특성

산업적으로 많이 이용되는 단백질 가수분해 효소인 alcalase, bromelain, flavourzyme, neutrase 및 papain을 이용하여 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물을 제조하여 그 특성을 조사하였다. 각 효소별 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 특성을 확인하고자 SDS-PAGE 패턴을 이미지로 영상화시켜 Fig. 1에 나타내었다. 효소별 단백질가수분해물을 비효소군과 비교한 결과, 비효소군에 비해 alcalase, flavourzyme 및 neutrase 단백질가수분해물은 10 kDa 이하로 대부분의 단백질이 분해되어 밴드가 나타나지 않았다. 이에 반해 bromelain은 10 kDa에서 37 kDa 사이의 단백질 띠가 선명하게 나타났고, papain은 10 kDa에서 단백질 띠가 선명하게 나타나는 것을 확인하였다. 이는 alcalase, flavourzyme 및 neutrase의 경우 가수분해가 활발히 일어나 저분자 펩타이드를 많이 생성한 것에 비해 bromelain과 papain은 가수분해율이 상대적으로 낮음을 의미한다. Noh 등(2012)의 보고에 따르면 홍게껍질 alcalase, flavourzyme 및 neutrase 단백질가수분해물은 각각 75 kDa 이하, 15-150 kDa 사이, 150 kDa 이하에서 단백질 띠가 확인되었다. 이는 쌍별귀뚜라미의 우수한 가수분해가 일어난 alcalase, flavourzyme 및 neutrase 단백질가수분해물과 비교해 봤을 때, 홍게껍질에 효소 처리한 단백질가수분해물이 주로 75 kDa 이하에서 밴드가 나타나 쌍별귀뚜라미의 alcalase, flavourzyme 및 neutrase 단백질가수분해물

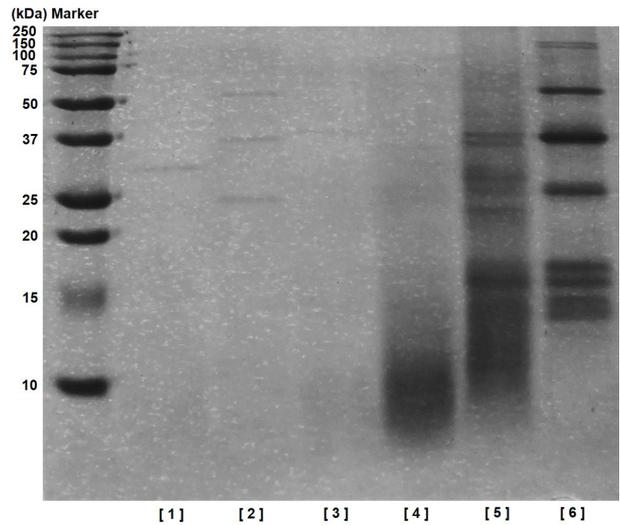


Fig. 1. Effect of five different proteases on SDS-PAGE profile of *Gryllus bimaculatus* protein hydrolysates. SDS-PAGE patterns of 15% gel of *Gryllus bimaculatus* hydrolysate. Lane [1]: alcalase, Lane [2]: neutrase, Lane [3]: flavourzyme, Lane [4]: papain, Lane [5]: bromelain, Lane [6]: no enzyme.

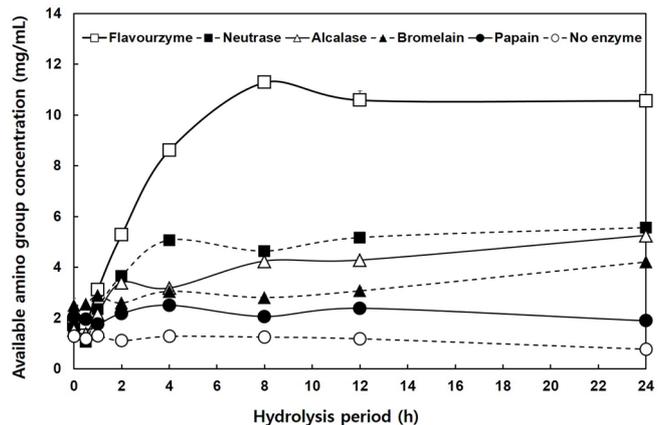


Fig. 2. Degree of hydrolysis of *Gryllus bimaculatus* by five different proteases at 55°C. Each value is mean±SE (n≥3).

이 더 많은 저분자 펩타이드를 생산한 것으로 판단된다.

TNBS assay를 이용해 available amino group의 함량을 측정함으로써 각 효소별 단백질가수분해물의 가수분해도를 추가적으로 알아보았다(Torres-Fuentes 등, 2011). 각 효소별 시간에 따른 가수분해도를 알아보기 위해 펩타이드의 함량을 시간별(0-24시간)로 측정하였다(Fig. 2). 효소별 시간에 따른 펩타이드 생산량을 tyrosine의 함량으로 환산한 결과, 24시간 반응 후 available amino group 농도는 flavourzyme 10.56 mg/mL, neutrase 5.56 mg/mL, alcalase 5.25 mg/mL, bromelain 4.22 mg/mL, papain 1.90 mg/mL 및 비효소처리군 0.77 mg/mL 순으로 높게 나타났다. Alcalase, flavourzyme과 neutrase의 경우 0시간 대비 available amino group이 8시간동안 급격히 증가하였으나, bromelain과 papain은 완만하게 증가함을 확인 할 수 있었다. 기타 식용곤충 단백질가수분해물들과 available amino group농도를 비교해본 결과, 갈색거저리 유충과 흰잠박이꽃부지 유충 역시 flavourzyme에 의한 가수분해도가 가장 높게 나타났으며 장수풍뎅이 유충의 경우는 이와 달리 alcalase

Table 1. Yields of protein hydrolysates (≤ 3 kDa) prepared from hot air dried *Gryllus bimaculatus* using different proteases

Enzymes	Yields ¹⁾ of protein hydrolysates (%)
Alcalase	32.15 \pm 4.25 ^{a2)}
Flavourzyme	28.94 \pm 3.84 ^a
Neutrase	24.90 \pm 4.58 ^a
No enzyme	6.42 \pm 0.74 ^b

¹⁾Yields (%)=Total solid content of protein hydrolysate-total solid content of blank (without substrate)/total substrate content \times 100.

²⁾Each value is mean \pm SE (n \geq 3) and different superscripts (a,b) in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 2. DPPH radical scavenging activities of the hydrolysates from *Gryllus bimaculatus* with different proteases

Enzymes	RC ₅₀ (μ g/mL) ¹⁾	TEAC (μ g TE/mg) ²⁾
Alcalase	42.66 \pm 0.44 ^{b3)}	45.90 \pm 0.30 ^b
Flavourzyme	36.95 \pm 0.24 ^a	49.02 \pm 0.28 ^a
Neutrase	44.41 \pm 0.24 ^c	45.63 \pm 0.14 ^b
Trolox	1.83 \pm 0.01	-

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean \pm SE (n \geq 3) and different superscripts (a-c) in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

에 의한 가수분해도가 가장 높았다(Lee 등, 2017; Yu 등, 2017). 이때 쌍별귀뚜라미 flavourzyme 단백질가수분해물의 available amino group 농도는 갈색거저리 유충에 비해서는 약 두 배 정도 높았으며 흰점박이꽃무지 유충과 장수풍뎅이 유충과는 유사한 수준으로 나타났다. SDS-PAGE와 TNBS assay 결과를 통해 alcalase, flavourzyme 및 neutrase를 이용한 쌍별귀뚜라미 단백질 가수분해는 8시간까지 충분히 이루어지며 저분자 펩타이드의 생산량이 우수한 것을 확인하였다. 이는 단백질 분해효소를 이용한 가수분해는 12시간 이내에 가수분해가 충분히 이루어진다는 갈색거저리 유충과 흰점박이꽃무지 유충을 대상으로 한 선행 연구와 비슷한 결과였다(Lee 등, 2017; Yu 등, 2017). 일반적으로 생리활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드는 생체내로 쉽게 흡수되며 체내 이용률도 높다는 보고(Kim 등, 2013)에 따라 가수분해가 활발히 일어났던 alcalase, flavourzyme 및 neutrase 가수분해물을 3 kDa 이하로 한외여과 한 후 동결 건조하여 실험에 이용하였다. 각 단백질 가수분해물의 저분자 펩타이드 생산효율을 알아보기 위해 전체 기질의 고형분 함량에 대하여 3 kDa 이하로 분리한 고형분의 무게를 측정하여 수율을 나타냈다(Table 1). 효소를 처리하지 않았을 때의 3 kDa 이하 고형분 수율은 6.42%인데 반해, alcalase, flavourzyme 및 neutrase 단백질가수분해물은 각각 32.15, 28.94, 24.90%로 순으로 높은 것을 알 수 있었다. 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물이 효소를 처리하지 않은 대조구에 비해 유의적으로 3 kDa 이하의 수율이 높은 것을 알 수 있고, 그중에서도 alcalase의 수율이 가장 높은 것을 알 수 있다($p<0.05$). 따라서 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물은 alcalase 효소가 3 kDa 이하의 펩타이드 생산에 적합할 것으로 판단되며, 이 또한 선행연구결과와 갈색거저리 유충과 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물과 유사한 결과를 나타냈다.

Table 3. ABTS⁺ radical scavenging activities of the hydrolysates from *Gryllus bimaculatus* with different proteases

Enzymes	RC ₅₀ (μ g/mL) ¹⁾	TEAC (μ g TE/mg) ²⁾
Alcalase	43.20 \pm 1.18 ^{b3)}	114.11 \pm 2.26 ^b
Flavourzyme	41.03 \pm 0.13 ^{ab}	112.24 \pm 1.21 ^b
Neutrase	38.47 \pm 0.51 ^a	121.41 \pm 1.50 ^a
Trolox	5.48 \pm 0.07	-

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

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean \pm SE (n \geq 3) and different superscripts (a-b) in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 4. Hydrogen peroxide radical scavenging activities of the hydrolysates from *Gryllus bimaculatus* with different proteases

Enzymes	RC ₅₀ (μ g/mL) ¹⁾	TEAC (μ g TE/mg) ²⁾
Alcalase	36.50 \pm 0.65 ^{b3)}	239.23 \pm 2.02 ^a
Flavourzyme	41.05 \pm 1.81 ^b	212.53 \pm 3.17 ^b
Neutrase	47.69 \pm 0.72 ^c	172.43 \pm 1.67 ^c
Trolox	9.37 \pm 0.36	-

¹⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS⁺ at 5 min after starting the reaction.

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean \pm SE (n \geq 3) and different superscripts (a-c) in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

효소별 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 활성산소종 소거활성

항산화 물질이 수소원자나 전자를 공여할 수 있는 능력을 평가할 때 이용되는 DPPH는 안정한 free 라디칼로 환원됨으로써 라디칼 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변하며(Choi 등, 2015), 항산화물질의 항산화능을 측정할 때 많이 이용된다(Choi 등, 2010). 이를 이용하여 8시간 동안 효소처리하여 생산한 3 kDa 이하 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼의 소거활성을 측정해 Table 2에 나타내었다. DPPH 라디칼을 50% 저해하는 농도를 RC₅₀값으로 나타낸 결과, flavourzyme 단백질가수분해물은 36.95 μ g/mL, alcalase는 42.66 μ g/mL, neutrase는 44.41 μ g/mL로 나타나 flavourzyme 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 높았다($p<0.05$).

ABTS 라디칼 소거활성법은 ABTS와 potassium persulfate의 24 시간 반응으로부터 생성된 ABTS⁺ free 라디칼이 샘플 내의 항산화 물질에 의해 제거되면서 라디칼 특유의 짙은 청록색이 무색으로 탈색되는 원리를 이용한 항산화 활성 측정법이다(Lee 등, 2011). 이는 DPPH 라디칼 소거활성법과 더불어 항산화 활성을 측정하는데 가장 널리 이용되는 방법이다(Yu 등, 2008). ABTS 라디칼을 50% 저해하는 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 농도를 RC₅₀값으로 환산한 결과를 Table 3에 나타냈다. 쌍별귀뚜라미 neutrase 단백질가수분해물의 RC₅₀값은 38.47 μ g/mL, flavourzyme은 41.03 μ g/mL, alcalase는 43.20 μ g/mL로 neutrase의 ABTS 라디칼 소거활성이 가장 높은 것을 확인할 수 있다($p<0.05$).

Hydrogen peroxide는 산소의 환원 대사 물질로서 정상세포의 미토콘드리아나 peroxisome 등에서 형성되는데 활성산소를 쉽게 생성하여 DNA 및 단백질 손상을 유발하거나, 생체막 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화 지질을 생성함으로써 생체 기능 저하, 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(Kang 등, 2002; Ko 등, 2017). 본 연구에서는 peroxidase의 기질인

Table 5. Ferric reducing antioxidant power of the hydrolysates from *Gryllus bimaculatus* with different proteases

Enzymes	FRAP ($\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$) ¹⁾	TEAC ($\mu\text{g TE}/\text{mg}$) ²⁾
Alcalase	155.32 \pm 1.15 ^{ab3)}	20.37 \pm 0.11 ^{ab}
Flavourzyme	164.51 \pm 1.09 ^a	21.48 \pm 0.13 ^a
Neutrase	149.10 \pm 6.25 ^b	19.64 \pm 0.76 ^b

¹⁾Ferric reducing antioxidant power.

²⁾Trolox equivalent antioxidant capacity.

³⁾Each value is mean \pm SE (n \geq 3) and different superscripts (a-c) in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

ABTS를 이용하여 효소별 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 H₂O₂ 소거활성을 측정하였고, 이를 RC₅₀값으로 Table 4에 나타내었다. 효소별 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 H₂O₂ 소거활성을 측정할 결과, alcalase 단백질가수분해물의 RC₅₀값은 36.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, flavourzyme은 41.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, neutrase은 47.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 alcalase의 H₂O₂ 라디칼 소거활성이 가장 높음을 확인할 수 있다($p < 0.05$).

FRAP 소거활성법은 산화제로 작용하는 ferric tripyridyltriazine (Fe³⁺-TPTZ)이 낮은 pH에서 항산화제와 반응하여 ferrous tripyridyl-triazine (Fe²⁺-TPTZ)로 환원되면서 발생하는 청색 파장의 환원력을 계산하는 방법이다(Kim 등, 2014). 효소별 쌍별귀뚜라미 FRAP법 측정에 따른 결과는 FeSO₄을 기준 물질로 환원력을 환산한 값으로 나타내었다(Table 5). Flavourzyme 단백질가수분해물이 164.51 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$, alcalase은 155.32 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$, neutrase는 149.10 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 로 나타났다. Flavourzyme 처리를 통해 얻은 단백질가수분해물의 항산화 활성이 가장 높음을 확인할 수 있다($p < 0.05$).

이상의 결과에서 DPPH 라디칼 소거능은 flavourzyme 단백질가수분해물이 RC₅₀ 36.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ABTS 라디칼 저해 활성은 neutrase 단백질가수분해물이 38.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H₂O₂ 소거활성은 alcalase 단백질가수분해물이 36.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, FRAP 소거활성은 flavourzyme 단백질가수분해물이 164.51 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ 로 가장 좋았다($p < 0.05$). 이는 효소별 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성, H₂O₂ 소거활성, FRAP 소거활성의 상관관계가 없다는 것을 의미하며, 선행연구에서 발표한 갈색거저리 유충(Yu 등, 2017), 흰점박이꽃무지 유충(Lee 등, 2017), 장수풍뎅이 유충(Ryu 등, 2019)의 단백질가수분해물 결과와 유사한 결과이다. 이로부터 단백질가수분해물들의 항산화 활성은 항산화 활성 측정법에 따라 차이가 있음을 확인할 수 있었으며, 또한 가수분해 효소의 기질 특이성에 의해 기인하는 차별화된 아미노산 배열 및 아미노산 조성에도 영향을 받는 것으로 판단된다.

선행 연구에서 발표한 여러 가지 시료들의 DPPH 라디칼 소거활성 결과를 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물과 비교해 보았을 때 Nakajima 등(2009)의 보고에 따르면 pancreatin 효소처리 명태 가수분해물 1g에서 1.34 mg TE에 해당하는 효과를 나타냈다. 쌍별귀뚜라미 alcalase, flavourzyme, neutrase 단백질가수분해물 1g에서 46.03, 49.03, 45.83 mg의 TE에 해당하는 효과를 나타내 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물이 우수한 것을 알 수 있다(data not shown). 또한 Yu 등(2017)의 연구에 따르면 갈색거저리 유충 alcalase 단백질가수분해물은 7.81 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 로 나타나 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 DPPH라디칼 소거활성이 상대적으로 우수한 것을 알 수 있다. Lee 등(2017)의 연구에 따르면 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물에 alcalase, flavourzyme, neutrase를 처리하여 제조한 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거활성을 알아본 결과 12.03,

13.42 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 로 나타났다. 쌍별귀뚜라미의 alcalase, flavourzyme, neutrase 단백질가수분해물의 TE로 나타낸 값은 45.90, 49.02, 45.63 $\mu\text{g TE}/\text{g}$ 로 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 DPPH 라디칼 소거 활성보다 더 우수한 것을 확인하였다.

ABTS 라디칼 소거능을 측정한 Centenaro 등(2011)의 연구 결과에 따르면 닭뿔에 flavourzyme을 처리하여 제조한 단백질가수분해물에서 0.248 mM TE/g으로 나타났고, 본 연구에서 사용한 쌍별귀뚜라미 neutrase 단백질가수분해물은 444.57 mM TE/g로 나타나 ABTS 라디칼 소거활성이 훨씬 우수한 것을 알 수 있다(data not shown). 또한 Yu 등(2017)의 연구에 따르면 갈색거저리 유충 alcalase 단백질가수분해물은 108.90 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 로 나타났으며, Lee 등(2017)의 연구에 따르면 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물에 alcalase를 처리하여 제조한 단백질가수분해물의 ABTS 라디칼 소거활성 결과 117.22 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 로 나타났다. 쌍별귀뚜라미의 neutrase 단백질가수분해물은 121.41 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 로 위 두가지 곤충 갈색거저리 유충, 흰점박이꽃무지 유충보다 항산화 활성이 우수한 ABTS 소거활성을 나타냄을 알 수 있다.

재주리 물고기 피부에 glycy l endopeptidase를 처리하여 제조한 젤라틴 가수분해물의 H₂O₂ 소거활성을 연구한 결과는 1.17 mM TE/g으로 보고하였다(Karnjanapratum과 Benjakul, 2015). 쌍별귀뚜라미 alcalase, flavourzyme, neutrase 단백질가수분해물은 각각 952.00, 837.51, 681.27 mM TE/g로 항산화 활성이 훨씬 우수한 H₂O₂ 소거활성을 나타냄을 알 수 있었다(data not shown). 또한 Yu 등(2017)의 연구에 따르면 갈색거저리 유충 alcalase 단백질가수분해물은 78.43 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 로 나타나 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 H₂O₂ 소거활성이 상대적으로 우수한 것을 알 수 있다. Lee 등(2017)의 연구에 따르면 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물에 alcalase, flavourzyme, neutrase를 처리하여 제조한 단백질가수분해물의 H₂O₂ 소거활성을 알아본 결과 163.19, 136.98, 151.51 $\mu\text{g TE}/\text{mg}$ 로 나타났다. 쌍별귀뚜라미의 alcalase, flavourzyme, neutrase 단백질가수분해물의 TE로 나타낸 값은 239.23, 212.53, 172.43 $\mu\text{g TE}/\text{g}$ 로 흰점박이꽃무지 유충 단백질가수분해물의 H₂O₂ 소거활성보다 더 우수한 것을 확인하였다.

Kittiphattanabawon 등(2012)의 보고에 따르면 블랙팁샤크의 젤라틴 가수분해물이 FRAP 소거활성을 알아본 결과 6.18 $\mu\text{M TE}/\text{g}$ 으로 보고하였는데, 쌍별귀뚜라미 flavourzyme 단백질가수분해물 83.80 mM TE/g으로 FRAP 소거활성이 훨씬 우수한 것을 확인할 수 있었다(data not shown).

단백질가수분해물의 linoleic acid 과산화 억제 활성

지질의 산화물인 활성 라디칼, 과산화물, 저분자 카르보닐화합물 등 각종 활성화합물들은 공기 중의 산소에 의하여 산화되어 과산화 지질을 생성한다(Paik 등, 1992). 지질의 산화로 생성된 과산화물은 DNA 손상작용에 큰 역할을 하기 때문에 산화 초기에 이를 억제시키는 것이 식품의 안정성 측면에서 중요하다(Kim 등, 2012). 지질 산화 초기에 발생하는 과산화물 ferrous chloride (FeCl₂)와 반응하여 빨간색에 가까운 FeCl₃ 색소를 생성하고, 지질 산화가 계속 일어나면 malonaldehyde와 같은 저분자 화합물이 생기는데 이것은 TBA와 결합하여 적색복합체를 생성한다(Cho 등, 2006). 본 실험은 불포화지방산인 linoleic acid를 기질로 하여 쌍별귀뚜라미의 산화방지 효과를 알아보았다.

앞선 4가지 항산화 실험과 3kDa 이하의 저분자 생산 수율 결과를 종합해 보았을 때 3종의 갈색거저리 유충 단백질가수분해물의 항산화 활성은 비슷했으나, available amino group 함량이 가장 높았던 flavourzyme 단백질가수분해물을 이용하여 linoleic acid 과산

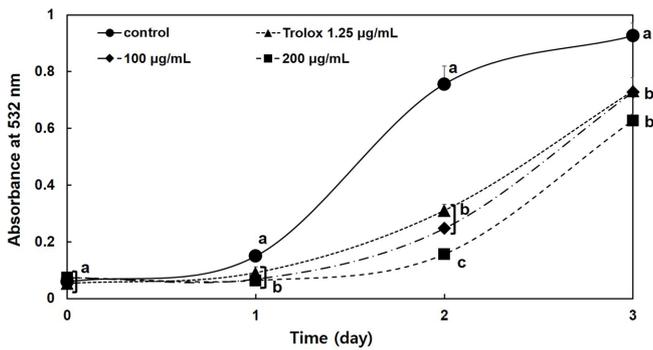


Fig. 3. Inhibitory effects of trolox and the flavourzyme hydrolysates from *Gryllus bimaculatus* on linoleic acid peroxidation. Each value is mean±SE (n≥3) and different superscripts (a-c) at the same day are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

화 억제 활성 실험을 진행하였다. 쌍별귀뚜라미 flavourzyme 단백질가수분해물은 100과 200 µg/mL의 농도로 양성대조군인 trolox는 1.25 µg/mL 농도를 이용하여 지질과산화물의 산화 억제를 시간별로 측정하여 Fig. 3에 표시하였다. 시간이 지날수록 음성대조군의 지질과산화물이 증가하였으며, 음성대조군의 3일째 흡광도 값을 100%로 봤을 때 flavourzyme 단백질가수분해물은 100과 200 µg/mL의 농도에서 지질 과산화물이 각각 21.45와 32.29%로 양성대조군과 대비하였을 때 유의적으로 산화가 억제됨을 확인하였다. 갈색거저리 유충 alcalase 단백질가수분해물, 흰점박이꽃무지 유충 alcalase 단백질가수분해물의 linoleic acid에 대한 항산화 활성 결과에 따르면 200 µg/mL 농도에서 양성대조군 trolox를 100%로 봤을 때 환산하여 나타낸 결과 각각 33% (Yu 등, 2017), 34% (Lee 등, 2017)로 쌍별귀뚜라미 flavourzyme 단백질가수분해물과 비슷한 지질 산화 억제 활성을 보였다.

본 연구에서는 총 5종의 단백질분해효소를 대상으로 쌍별귀뚜라미 단백질가수분해물의 제조특성을 조사하였으며, 제조한 단백질가수분해물(≤3 kDa) 대상으로 항산화 활성을 평가함으로써 향후 새로운 기능성 식품 또는 소재 개발을 위한 쌍별귀뚜라미의 활용 가능성을 제시하였다.

요약

동결건조된 쌍별귀뚜라미 분말을 4%(w/v)의 기질용액으로 제조한 후, 기질 대비 단백질 가수분해 효소(alcalase, flavourzyme, neutrase, bromelain, papain)를 1%(w/v) 첨가 하여 24시간 가수분해시킨 단백질가수분해물을 제조하였다. 각 효소별 가수분해물을 이용하여 SDS-PAGE와 available amino group 함량을 측정하여 확인한 결과, flavourzyme 단백질가수분해물이 가장 높은 가수분해도를 보인 반면 bromelain과 papain은 상대적으로 낮은 가수분해도를 보였다. 가수분해도가 높았던 3종의 효소(alcalase, flavourzyme, neutrase)를 이용하여 제조한 단백질가수분해물을 각각 한외여과막을 통해 분자량 3 kDa 이하로 분리한 후 항산화 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성의 경우 flavourzyme이 항산화 활성이 가장 우수하였으며, ABTS 라디칼 소거활성은 neutrase, flavourzyme 및 alcalase 단백질가수분해물 순으로 높게 나타났다. H₂O₂ 소거활성은 alcalase와 flavourzyme 단백질가수분해물이 neutrase 단백질가수분해물에 비해 상대적으로 높게 나타났으며, FRAP법은 flavourzyme, alcalase, neutrase 단백질가수분해물 순으로 높게 나타났다. 저분자 펩타이드 생산 효율이 가장 높았던 쌍별귀뚜라미

flavourzyme 단백질가수분해물을 이용하여 농도별 linoleic acid 과산화 억제 활성을 측정된 결과 농도 의존적으로 유의적인 과산화 억제 활성을 보였다. 최종적으로 본 연구를 통해 고단백질 소재인 쌍별귀뚜라미로부터 여러 단백질분해효소원들을 이용한 단백질가수분해물 제조 특성 및 우수한 항산화 활성을 확인할 수 있었으며, 이번 연구는 향후 식용곤충 유래 기능성 식품소재 개발을 위한 기초자료로 활용이 가능할 뿐만 아니라 식용곤충 산업 활성화에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 이공학 개인기초연구지원사업(과제번호: 2016R1D1A1B03933985)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Baek MH, Hwang JS, Kim MA, Kim SH, Goo TW, Yun EY. Comparative analysis of nutritional components of edible insects registered as novel foods. *J. Life Sci.* 27: 334-338 (2017)
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76 (1996)
- Centenaro GS, Centenaro MS, Hernandez CP. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. *J. Food Sci. Technol.* 3: 280-288 (2011)
- Cho HS, Park BH, Kim KH, Kim HA. Antioxidative effect and quality characteristics of cookies made with sea tangle powder. *J. Korean Soc. Food Cult.* 21: 541-549 (2006)
- Choi IY, Song YJ, Lee WH. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of some herbal extracts. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 28: 871-876 (2010)
- Choi MH, Kang JR, Sim HJ, Kang MJ, Seo WT, Bae WY, Shin JHI. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of sumaeyaksuk depending on harvest times and processing methods. *Korean J. Food Preserv.* 22: 399-407 (2015)
- Ha YJ, Yoo SK. Process optimization of peptides production from protein of sea cucumber and its antioxidant capacity analysis. *KSAST.* 34: 338-348 (2017)
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 36: 2090-2097 (1988)
- Jang HW, Choi SY. 쌍별귀뚜라미와 장수풍뎅이 유충의 탈지 분말과 유지의 특성 분석(abstract no. P03-105). In: Abstracts: 2017 KFN International Symposium and Annual Meeting. November 8-10, Hwabaek International Convention Center, Gyeongju, Korea. The Korean Society of Food Science and Nutrition, Seoul, Korea (2017)
- Kang MJ, Shin SR, Kim KS. Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from dandelion (*Taraxacum officinale*). *Korean J. Food Preserv.* 9: 253-259 (2002)
- Karnjanapratum S, Benjakul S. Antioxidative gelatin hydrolysate from unicorn leatherjacket skin as affected by prior autolysis. *Int. Aquat. Res.* 7: 101-114 (2015)
- Kim DB, Oh JW, Lee JS, Kim YH, Park IJ, Cho JH, Lee OH. Antioxidant activities of green and purple kohlrabi juices. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 601-608 (2014)
- Kim DH, Park SR, Debnath T, Hasnat M, Lim BO. Evaluation of the antioxidant activity and anti-inflammatory effect of *Hericium erinaceus* water extracts. *Korean J. Med. Crop Sci.* 21: 112-117 (2013)
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 337-342 (2012)
- Kim HS, Jung CE. Nutritional characteristics of edible insects as potential food materials. *J. Apic.* 28: 1-8 (2013)

- Kim NH, Choi DW, Song KB. Preparation of chicken feather protein hydrolysates and isolation of iron-binding peptides. *Korean J. Food Preserv.* 20: 435-439 (2013)
- Kim TK, Shin HD, Lee YH. Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 266-271 (2003)
- Ko GA, Koh SY, Ryu JY, Cho SK. Comparison of proximate compositions, antioxidant, and antiproliferatives between blueberry and sageretia thea (osbeck) M.C. Johnston fruit produced in Jeju Island. *J. Appl. Biol. Chem.* 60: 161-171 (2017)
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Shahidi F. Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme: Antioxidant activity and its potential in model systems. *Food Chem.* 135: 1118-1126 (2012)
- Lee DH. Study on the change in the water soluble protein according to the life cycle and growth of *Gryllus bimaculatus de Geer*. Master's thesis. University of Kyungsoo, Busan, Korea (2002)
- Lee EA, Kwon OS. The effect of invasive cricket species, *Gryllus bimaculatus* on the survival of Korean cricket species, *Teleogryllus emma*. *J. Ecol. Environ.* 46: 67-74 (2013)
- Lee HS, Ryu HJ, Song HJ, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Protaetia brevitarsis* larvae. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46: 1164-1170 (2017)
- Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS. Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 29-36 (2011)
- Miller HE. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. *Zbl. Bakt.-int. J. Med. M.* 259: 151-154 (1985)
- Nakajima K, Yoshie-Sratak Y, Ogushi M. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. *Food Chem.* 114: 844-851 (2009)
- Noh KH, Min KH, Seo BY, Kim SH, Seo YW, Song YS. Characteristics of protein from red crab (*Chionoecetes japonicus*) shell by commercial proteases. *Korean J. Nutr.* 45: 429-436 (2012)
- Paik TH, Lee YK, Yi JH. Photooxidation of linoleic acid and protective action of various antioxidants. *Korean J. Biochem.* 25: 551 (1992)
- Park KT. Insect resources. World science publishing company. Seoul, Korea. pp. 202 (2001)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Ryu HJ, Song HJ, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Allomyrina dichotoma* larvae. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 48: 410-417 (2019)
- Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chem.* 129: 485-490 (2011)
- Yu JS, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Kang TS, Jeong HS. ACE inhibitory and antioxidative activities of silkworm larvae (*Bombyx mori*) hydrolysate. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 136-140 (2008)
- Yu MH, Lee HS, Cho HR, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46: 435-441 (2017)