



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월16일
(11) 등록번호 10-1888921
(24) 등록일자 2018년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 27/24 (2016.01)

(52) CPC특허분류
A23L 27/24 (2016.08)
A23L 35/00 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0046994
(22) 출원일자 2018년04월23일
심사청구일자 2018년04월23일

(56) 선행기술조사문헌
KR101651603 B1*
KR1020170055062 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

정장호

서울특별시 광진구 능동로 209, 광개토관 609호(군자동)

조주형

서울특별시 광진구 능동로 209, 충무관 310B호(군자동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

두호특허법인

전체 청구항 수 : 총 11 항

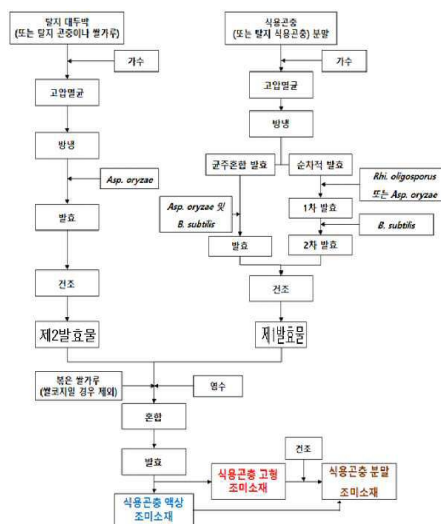
심사관 : 박철호

(54) 발명의 명칭 **곤충을 이용한 발효조미소재의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 곤충을 라이조푸스 올리고스포르스(*Rhizopus oligosporus*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 순차적으로 발효시켜 제1발효물을 얻는 단계; 대두를 아스피질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 발효시켜 제2발효물을 얻는 단계; 및 상기 제1발효물과 상기 제2발효물 및 염수를 혼합하여 숙성시키는 단계;를 포함함으로써, 공정 시간이 현저히 단축되고, 대두를 곤충으로 대체함에도 우수한 관능을 나타내는 조미소재의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2250/204 (2013.01)

(72) 발명자

조혜령

서울특별시 광진구 능동로 209, 층무관 310B호(군자동)

김지수

서울특별시 광진구 능동로 209, 층무관 310B호(군자동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545014259

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 발효공정에 의한 식용곤충의 식품 및 조미소재 연구

기여율 1/1

주관기관 세종대학교산학협력단

연구기간 2016.07.07 ~ 2018.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

곤충을 라이조푸스 올리고스포르스(*Rhizopus oligosporus*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 순차적으로 발효시켜 제1발효물을 얻는 단계;

대두를 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 발효시켜 제2발효물을 얻는 단계; 및

상기 제1발효물과 상기 제2발효물 및 염수를 혼합하여 숙성시키는 단계;를 포함하는 조미소재의 제조 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 곤충은 갈색거저리 유충(고소애), 쌍별 귀뚜라미(쌍별이), 누에번데기, 메뚜기, 장수풍뎅이 유충(장수애), 백강잠, 흰점박이꽃무지 유충(꽃뽕이)로 구성된 균으로부터 선택된 적어도 하나인, 조미소재의 제조 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 라이조푸스 올리고스포르스로의 발효는 24시간 내지 72시간 수행되는 조미소재의 제조 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 바실러스 서브틸리스로의 발효는 24시간 내지 72시간 수행되는 조미소재의 제조 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 아스퍼질러스 오리제로의 발효는 24시간 내지 72시간 수행되는 조미소재의 제조 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 제1발효물과 제2발효물 및 염수의 혼합 시에 볶은 쌀가루를 함께 혼합하는 조미소재의 제조 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 제1발효물과 제2발효물 및 볶은 쌀가루는 합계 100중량부에 대하여 20 내지 90중량부, 5 내지 40중량부, 5 내지 40중량부의 비율로 혼합하는, 조미소재의 제조 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 숙성은 20℃ 내지 65℃에서 3일 내지 65일간 수행되는, 조미소재의 제조 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 숙성은 55℃ 내지 65℃에서 3일 내지 5일간 수행되는, 조미소재의 제조 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 숙성물의 액상과 고상을 분리하는 단계를 더 포함하는 조미소재의 제조 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 분리된 액상 또는 고상을 건조하는 단계를 더 포함하는 조미소재의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 곤충을 이용한 조미소재의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 식용곤충(edible insect)이란, 식용을 목적으로 하는 곤충을 말하며 아시아, 아프리카, 남아메리카 및 호주 등 많은 지역에서 동물성 단백질, 필수아미노산, 미량영양소 섭취를 위해 흰개미, 메뚜기, 딱정벌레 등의 다양한 곤충을 식용으로 사용하고 있다. 식용곤충은 종(species) 및 서식지에 따라 영양분의 함량 차이가 있을 수 있으나 일반적으로 영양소로는 건조중량 대비 조단백질 함량이 50~60% 정도로 높게 함유되어 있어 양질의 단백질 공급원으로서 중요성이 보고된 바 있으며, 그 밖에 조지방은 8.1%에서 평균적으로 22%이고 많게는 59%의 함량을 지니기도 한다. 또한, 섬유소는 4.9~12.1%를 함유하고 있으며, 무기질(Fe, Ca, Zn)과 비타민 B군 등을 함유하고 있다. 이러한 식용곤충은 식량공급원의 다양성 확보 측면과 가축에 의한 단백질 식품 공급에 한계성을 극복하기 위한 중요한 대안 식품으로 관심 받고 있다. 일반적으로 사람들이 식용으로 사육하는 소, 돼지, 닭 등의 가축에 있어 소비되는 곡물사료의 양은 각 고기 1kg을 생산하는데 8, 4 그리고 1kg의 곡물이 소비가 된다고 보고되어 있어 육류생산의 효율성에 문제가 제기되고 있다. 반면, 곤충은 냉온 동물로 체온을 유지하지 않아 적은 양의 사료와 물로도 충분히 성장할 수 있고 식물의 잎 및 유기농산품 부산물을 사용하여 사육할 수 있기 때문에, 가축보다 적은 비용으로 고단백질의 식량을 생산할 수 있다. 그러나 곤충의 경우 식품으로 섭취한다는 인식은 해외에서나 국내에서도 사회적으로 부정적 인식이 강하여 식량자원으로 받아들일 수 있는 태도의 변화와 식품으로 혐오감을 없앨 수 있는 전략이 필요하다.

[0004] 한편, 된장과 간장은 청국장, 고추장, 쌈장 등과 더불어 콩을 발효시켜서 만든 한국의 전통적인 발효식품으로, 곡류 단백질에 부족하기 쉬운 필수아미노산 및 지방산, 유기산, 미네랄, 비타민 등을 보충해 주는 영양학적인 우수성을 가지고 있다. 또한 된장과 간장은 저온 제조되어 장기간의 발효 및 숙성 기간을 가지며 주로 세균 주도형으로 발효 숙성이 이루어져, 다른 나라의 콩 발효식품과 발효, 숙성 기간, 발효미생물의 종류 등에서 차이를 보인다. 동아시아의 조미소재로는 중국은 장유, 두반장, 두시, 면장, 황장 등 5종, 한국은 된장, 간장, 고추장 등 3종, 일본은 쇼유와 미소 등 2종의 조미소재를 이용하고 있다. 이러한 장류들은 모두 콩의 단백질을 미생물을 통해 발효시키는 조미식품으로 발효과정 중 미생물이 생산하는 2차 대사산물에 의해 혈전용해능, 항산화능, 항암활성, 면역증가 및 항균효과 등 각종 생리활성이 보고되어 있다.

[0005] 이러한 된장과 간장은 대두단백질의 발효를 통하여 각종 정미물질(amino acid, peptide 등)의 생성으로 특유의 맛을 가지고 있어 한국인들에게는 중요한 조미식품 중 하나로 이용되어 왔다.

[0006] 본 발명자들은 식용곤충의 식품화 전략 방안으로 단백질 발효 식품인 된장과 간장 등의 주 원료로 이용되는 대두를 식품의약품안전처에서 식품 원료로 사용 허용이 된 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor* larvae), 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 누에번데기(*Bombyx mori* pupa) 등 단백질이 풍부한 식용곤충 원료로 대체하여 고상, 액상 및 분말 형태의 조미소재를 제조하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 KR 10-1837937

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 대두를 곤충으로 대체한 조미소재의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명은 곤충을 이용함에도 우수한 관능을 나타내는 조미소재를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 공정 시간이 현저히 단축된 조미소재의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 1. 곤충을 라이조푸스 올리고스포르스(*Rhizopus oligosporus*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 순차적으로 발효시켜 제1발효물을 얻는 단계; 대두를 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 발효시켜 제2 발효물을 얻는 단계; 및 상기 제1발효물과 상기 제2발효물 및 염수를 혼합하여 숙성시키는 단계;를 포함하는 조미소재의 제조 방법.
- [0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 곤충은 갈색거저리 유충(고소애), 쌍별 귀뚜라미(쌍별이), 누에번데기, 메뚜기, 장수풍뎅이 유충(장수애), 백강잠, 흰점박이꽃무지 유충(꽃뽕이)으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나인, 조미소재의 제조 방법.
- [0015] 3. 위 1에 있어서, 상기 라이조푸스 올리고스포르스로의 발효는 24시간 내지 72시간 수행되는 조미소재의 제조 방법.
- [0016] 4. 위 1에 있어서, 상기 바실러스 서브틸리스로의 발효는 24시간 내지 72시간 수행되는 조미소재의 제조 방법.
- [0017] 5. 위 1에 있어서, 상기 아스퍼질러스 오리제로의 발효는 24시간 내지 72시간 수행되는 조미소재의 제조 방법.
- [0018] 6. 위 1에 있어서, 상기 제1발효물과 제2발효물 및 염수의 혼합 시에 볶은 쌀가루를 함께 혼합하는 조미소재의 제조 방법.
- [0019] 7. 위 6에 있어서, 상기 제1발효물과 제2발효물 및 볶은 쌀가루는 합계 100중량부에 대하여 40 내지 90중량부, 5 내지 40중량부, 5 내지 40중량부의 비율로 혼합하는, 조미소재의 제조 방법.
- [0020] 8. 위 1에 있어서, 상기 숙성은 20℃ 내지 65℃에서 3일 내지 65일간 수행되는, 조미소재의 제조 방법.
- [0021] 9. 위 1에 있어서, 상기 숙성은 55℃ 내지 65℃에서 3일 내지 5일간 수행되는, 조미소재의 제조 방법.
- [0022] 10. 위 1에 있어서, 상기 숙성물의 액상과 고상을 분리하는 단계를 더 포함하는 조미소재의 제조 방법.
- [0023] 11. 위 10에 있어서, 상기 분리된 액상 또는 고상을 건조하는 단계를 더 포함하는 조미소재의 제조 방법.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 제조방법에 따르면 발효공정시간이 현저히 단축된 조미소재를 얻을 수 있다.
- [0026] 본 발명의 제조방법에 따르면 발효원물로서 대두 대신 곤충으로 100% 대체가능하다.
- [0027] 본 발명의 제조방법에 따르면 곤충을 발효원물로서 사용함에도 불구하고 우수한 관능을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 곤충소재 발효조미소재의 표준 가공공정도이다.
- 도 2는 발효에 이용되는 균주별 protease의 활성을 측정한 것이다.
- 도 3은 발효에 이용되는 균주별 chitinase의 활성을 측정한 것이다.

- 도 4는 단일, 혼합 균주별 protease의 활성과 chitinase의 활성을 측정된 것이다.
- 도 5는 Paper disc법을 통한 단일, 혼합 균주의 protease 활성을 측정된 것이다.
- 도 6은 단일, 혼합 균주에 따른 제1발효물 제조 공정도이다.
- 도 7은 제2발효물의 제조 공정도이다.
- 도 8은 *Bacillus subtilis* 종류를 달리하여 제조한 제1발효물의 제조공정도이다.
- 도 9는 곤충 또는 대두로 제조된 액상 조미소재의 관능 강도의 특성을 파악한 것이다.
- 도 10은 분말형태의 조미소재를 활용하여 제조한 flake이다.
- 도 11은 분말형태의 조미소재를 활용하여 제조한 snack이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명은 조미소재의 제조 방법에 관한 것이다. 곤충을 라이조푸스 올리고스포러스(*Rhizopus oligosporus*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 순차적으로 발효시켜 제1발효물을 얻는 단계; 대두를 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 발효시켜 제2발효물을 얻는 단계; 및 상기 제1발효물과 상기 제2발효물 및 염수를 혼합하여 숙성시키는 단계;를 포함한다.
- [0033] 이하 본 발명의 일 실시예에 따른 조미소재의 제조 방법을 상세히 설명한다.
- [0034] 먼저, 곤충을 라이조푸스 올리고스포러스(*Rhizopus oligosporus*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 순차적으로 발효시켜 제1발효물을 얻는다.
- [0035] 상기 곤충의 경우 곤충 원물 또는 탈지된 곤충박을 사용할 수 있다. 상기 탈지된 곤충박의 경우 수층 초음파 추출방법(Aqueous-ultrasonication extraction)과 채유기를 이용한 압착추출방법(Press extraction)을 이용해 탈지할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당 분야에서 공지된 탈지방법으로 탈지할 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 곤충의 경우 곤충이라면 제한되지 않고 사용될 수 있다.
- [0037] 상기 곤충의 경우 메뚜기, 쌍별 귀뚜라미, 갈색거저리 유충, 누에번데기, 장수풍뎅이 유충, 백강잠, 흰점박이꽃무지 유충 등 식용 곤충을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0038] 상기 제1발효물을 얻기 위한 발효 미생물로서 특히 chitinase와 protease 활성이 높은 *R. oligosporus* 또는 *B.subtilis*를 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는 둘 다 혼합하여 사용할 수 있다. 혼합 사용 시, *B.subtilis*의 사용을 다른 미생물에 비해 protease, chitinase 등의 활성이 가장 높으므로 우선적으로 고려할 수 있다. 다만, 다른 진균의 생육을 저해하는 특성을 볼 때, 우선적으로 *R. oligosporus*의 접종 후 발효시킨 뒤 *B.subtilis*를 2차적으로 접종하여 발효시킬 수 있다.
- [0039] 발효물에 대한 결과물로서 이취가 나지 않도록 하기 위한 이화학 분석을 하였을 때, protease는 140Unit/g이상, 바람직하게는 145Unit/g 이상, 아미노태 질소는 270mg% 내지 310mg%, 바람직하게는 275mg% 내지 305mg% 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 제1발효물을 얻기 위한 발효 조건으로서, 발효 시간은 48시간 내지 144시간, 바람직하게는 72시간 내지 120시간일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 발효시간은 *R. oligosporu*과 *B.subtilis*의 발효시간을 각각 나누어 24시간 내지 72시간, 바람직하게는 36시간 내지 60시간 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 습도는 15% 이하, 바람직하게는 12% 이하를 유지하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 그리고, 대두를 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 발효시켜 제2발효물을 얻는다.
- [0042] 상기 대두의 경우 대두원물을 사용할 수도 있고, 탈지된 대두박을 사용할 수도 있다.
- [0043] 상기 탈지된 대두박의 경우 수층 초음파 추출방법(Aqueous-ultrasonication extraction)과 채유기를 이용한 압착추출방법(Press extraction) 등을 이용해 탈지가 가능하나 이에 제한되지 않으며, 당 분야에서 공지된 탈지방법이라면 제한되지 아니하고 이용할 수 있다.
- [0044] *A.oryzae*의 경우 일반적으로 식품의 발효에 사용되는 균주로서 안정성이 담보되어 있기 때문에 사용하나, 이에

제한되는 것은 아니다.

- [0045] 발효물에 대한 이화학 분석을 통해 protease 는 140Unit/g 이상, 바람직하게는 145Unit/g이상, 아미노태 질소는 270mg% 내지 310mg%, 바람직하게는 275mg% 내지 305mg% 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 제2발효물을 얻기 위한 발효 조건으로서는 발효 온도는 25℃ 내지 40℃, 바람직하게는 28℃ 내지 36℃일 수 있다. 발효 시간은 24시간 내지 72시간, 바람직하게는 33시간 내지 48시간일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 나아가 46시간 내지 50시간 이내로 하얀 균사가 났을 때 발효를 완료할 수 있다. 이는 과도한 발효를 통해 상기 제2발효물에 진균류 포자가 생성되기 시작하면 이들 포자의 소수성 성질로 인해 차후 제조공정에서 친수성 성분들과 분리현상이 나고, 황색에서 흑색까지 유색의 포자색으로 인해 제조품 외관상 보기 안 좋으므로 상품성의 저해를 막기 위함이다.
- [0047] 또한, 다른 발효 조건으로서 습도는 5% 내지 25%, 바람직하게는 8% 내지 22%를 유지하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 상기 제1발효물을 얻는 단계와 제2발효물을 얻는 단계의 수행 순서는 한정되지 않으며, 제1발효물을 얻는 단계의 수행 후에 제2발효물을 얻는 단계를 수행할 수도 있고, 그 반대의 경우도 가능하며, 독립적으로 동시에 수행할 수도 있다.
- [0049] 본 발명의 방법은 곤충과 대두를 탈지하여 탈지 곤충박, 탈지 대두박을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0050] 탈지 곤충박 또는 탈지 대두박을 얻기 위하여 압착추출법 또는 수증 초음파 추출법, 유기용매처리법 등을 이용할 수 있으나 이에 제한되는는 않는다. 다만 압착추출법의 경우 수증 초음파 추출법보다 탈지율이 높았으며, 이는 실시예에 나타나 있다.
- [0051] 곤충원물로부터 탈지 곤충박을 얻는 단계에서, 곤충원물 내 미생물의 제어를 위해 예를 들어 115℃ 내지 130℃에서 5분 내지 35분간, 바람직하게는 118℃ 내지 124℃에서 8분 내지 32분간 증자할 수 있다. 또한, 이 경우 증자 대신 열수 처리 등 당 분야에서 공지된 미생물의 제어를 위한 모든 방법으로 수행할 수 있다.
- [0052] 이후, 상기 제1발효물과 상기 제2발효물 및 염수를 혼합하여 숙성시킨다.
- [0053] 본 발명은 우리나라 전통방식으로 제조된 제1발효물만을 사용하여 조미소재를 만드는 것이 아니라, 일본의 발효 방식으로 제조된 제2발효물과 혼합함으로써 만들 수 있다. 이를 통해 발효 조미소재의 제조시간을 단축할 수 있었다. 또한, 동물단백질인 곤충 단백질 발효하여 얻은 제1발효물에서 분리될 수 있는 glycine이나 alanine 같은 감미성 아미노산과 제2발효물 제조시 사용되는 대두나 탈지 대두박에서 올 수 있는 glutamate나 aspartate같은 정미성 아미노산 등의 혼합을 통해 기호성을 상승시킬 수 있는 장점이 있다.
- [0054] 제1발효물과 제2발효물의 혼합비는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 제1발효물과 제2발효물을 1: 0.1 내지 0.5의 중량비, 구체적으로 1: 0.2 내지 0.4, 보다 구체적으로 1: 0.25 내지 0.33의 중량비로 혼합할 수 있다. 혼합비가 상기 범위 내인 경우 관능이 우수하고, 아미노산 함량이 높은 조미소재를 얻을 수 있다.
- [0055] 염수는 예를 들면 15% 내지 30%의 농도, 바람직하게는 15% 내지 25%의 농도를 가진 염수를 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 염수는 조미소재의 염도를 조절하는 것으로서 기호에 맞게 적절히 첨가될 수 있으며, 예를 들면 제1발효물과 제2발효물 합계 100중량부에 대하여 275 내지 375중량부로 포함될 수 있으며, 구체적으로 300 내지 350중량부로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 필요에 따라, 본 발명의 방법은 상기 제1발효물, 제2발효물 및 염수의 혼합 시에 볶은 쌀가루를 함께 혼합할 수 있다.
- [0058] 볶은 쌀가루를 첨가하면 첨가하지 않은 조미소재에 비해 우수한 관능을 나타낸다.
- [0059] 볶은 쌀가루는 예를 들면 제1발효물을 기준으로 했을 때 1: 0.1 내지 0.5의 중량비, 구체적으로 1: 0.2 내지 0.4, 보다 구체적으로 1: 0.25 내지 0.33의 중량비로 혼합할 수 있다. 혼합비가 상기 범위 내인 경우 우수한 관능을 나타낸다.
- [0060] 제1발효물, 제2발효물 및 볶은 쌀가루를 혼합한 구체적인 실시예에 따르면, 예를 들어, 상기 제1발효물과 제2발효물 및 볶은 쌀가루는 합계 100중량부에 대하여 20 내지 90중량부, 5 내지 40중량부, 5 내지 40중량부로 혼합하여 조미소재를 만들 수 있다. 우수한 풍미를 위하여 바람직하게는 합계 100중량부에 대하여 40 내지

80중량부, 10 내지 30중량부, 10 내지 30중량부의 비율로 혼합할 수 있고, 보다 바람직하게는 50 내지 70중량부, 15 내지 25중량부, 15 내지 25중량부의 비율로 혼합하여 조미소재를 만들 수 있다. 상기 비율로 조미소재를 만들 경우 다른 비율에 비해 관능이 우수할 뿐만 아니라, 아미노산의 함량이 높은 특성을 보인다.

[0061] 상기 혼합 후 숙성시키는 단계에서 염도는 15% 내지 25%, 바람직하게는 18% 내지 23%를 유지하며, pH는 4.5 이상, 바람직하게는 5.0 이상을 유지하며, 총 질소량은 0.8% 이상 1.8%, 바람직하게는 0.9% 내지 1.6%를 유지하며 숙성시킬 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 상기 숙성은 예를 들면 20℃ 내지 65℃에서 3일 내지 65일간 수행될 수 있고, 구체적으로 20℃ 내지 30℃에서 25 내지 65일, 35℃ 내지 45℃에서 5 내지 17일 또는 55℃ 내지 65℃에서 3 내지 5일간 수행될 수 있고, 공정 시간 단축을 위해 바람직하게는 55℃ 내지 65℃에서 3일 내지 5일간 수행될 수 있다. 다만 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 방법은 충분한 숙성 이후에 숙성물을 살균하고 냉각시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0063] 살균 방법은 특별히 한정되지 않고 당 분야에 공지된 방법을 제한없이 사용할 수 있으며, 구체적인 예를 들면 가열 살균할 수 있으며, 이는 열수에 의할 수 있다. 열수 살균은 예를 들면 5분 내지 15분간 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 냉각은 상온 냉각할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명의 방법은 상기 숙성물을 액상과 고상으로 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0066] 분리된 액상은 간장과 같은 액상 조미소재로서 활용 가능하며, 분리된 고상은 된장과 같은 고상 조미소재로서 활용 가능하다.

[0067] 분리는 당 분야에 공지된 방법이 제한없이 적용될 수 있으며, 예를 들면 필터 프레스, 원심분리 등에 의할 수 있다.

[0068] 본 발명의 방법은 상기 분리된 액상 또는 고상을 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0069] 상기 액상과 고상의 건조를 통해 분말 형태의 조미소재를 얻을 수 있다.

[0070] 상기 분말형태의 조미소재를 얻을 수 있는 방법은 보존성을 높이기 위한 수분제거 방법을 사용할 수 있으며, 당 분야에서 공지된 수분제거 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 동결건조, 열풍건조, 상압건조, 감압건조 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 상기 분말 형태의 조미소재의 경우, 음식에 조미소재로 첨가될 수도 있고, 분말을 밀가루 등의 다른 분말과 혼합하여 또는 단독으로 반죽하여 제과 또는 제빵할 수도 있다.

[0073] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0075] **실시예**

[0076] **1. 식용 곤충의 탈지과정**

[0077] 곤충 식품소재의 지방층 제거 및 영양성분 분리를 위해 식품 제조 시 사용가능한 수층 초음파 추출방법(Aqueous-ultrasonication extraction)과 채유기를 이용한 압착추출방법(Press extraction)을 수행하였다.

[0078] 그 결과 초음파 추출방법의 경우 탈지율이 41.8%였으나, 압착추출방법의 경우 77.9%로 두 방법 중 압착추출방법이 탈지 효율이 높았다. 이에 따라 압착추출방법으로 쌍별귀뚜라미(*Gyllus bimaculatus*), 누에번데기(*Silkworm pupa*) 및 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor larvae*)를 탈지하여 탈지된 곤충박을 제조하였다.

[0079] **2. 곤충 발효를 위한 적합 균주의 선발**

[0080] **(1) 실험 방법**

[0081] **1) protease의 활성 측정**

[0082] Protease 활성 측정은 각 균주를 배지에 48시간동안 배양한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 채취해 조효소제로 사용하였다. 2% casein용액 5ml에 각 조효소제를 0.5~1ml 넣고 37℃, 30분간 반응시킨 후 TCA를 5ml를 넣어 enzyme을 중지시키고, 다시 enzyme solution을 넣어 총량을 11ml가 되도록 맞춘 후 혼합액을 37℃로 30분동안 반응시킨 후 0.45 um 필터를 여과하여 casein을 제거한 후 Na₂CO₃를 5ml씩 넣어준 다음 Folin-Ciocalteu 용액을 1ml씩 넣어 혼합하여 반응시킨다. Standard는 1.1 mM tyrosine standard stock solutions

을 이용하여 표준곡선을 만들었으며, 660 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성은 30분간 생성된 tyrosine의 양을 시료의 수용성 단백질 양으로 나누었을 때 나타나는 값을 이용해 Units/mg으로 표기하였다.

[0083] **2) chitinase의 활성 측정**

[0084] Chitinase 활성 측정의 경우 각 균주를 효소생산배지(1% colloidal chitin, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.1 KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O)에서 37°C, 150 rpm, 48시간 동안 진탕배양한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 채취해 5분간 100°C에서 끓인 후 남아있는 물질을 제거하기 위해 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 채취한 시료의 효소활성은 DNS(dinitrosalicylic acid)법으로 유리된 환원당을 정량하였다. 효소 1 unit은 1시간에 N-acethyl-D-glucosamin을 생산하는 효소의 양 mg/ml를 lunit으로 측정하였다.

[0085] **(2) 실험 결과**

[0086] protease 활성을 측정한 결과 도 2와 같이 나타났다. 곰팡이류의 균주들에 비해 *Bacillus sp.* 균주들의 활성이 월등히 높은 것을 파악할 수 있었다. 특히 본 연구에서 청국장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis*(CBI) 균주의 경우가 protease 활성이 46.95 units으로 가장 높았다. 따라서 *Bacillus subtilis* 균주를 사용하는 것으로 결정하였다.

[0087] 또한, 일반적인 발효식품에 주로 이용되는 *Aspergillus oryzae*의 경우 균사가 짧은 단모균의 protease활성이 가장 높은 것으로 확인이 되어 *Aspergillus oryzae*의 사용이 필요할 경우 단모균을 이용하였다. 본 연구결과는 도 3과 같이 나타났다. Chitinase 활성의 경우 전체적으로 *Rhizopus oligosporus* 균주의 활성이 0.34 unit으로 가장 높게 측정되었다. 해당 균주의 경우 선행연구에서 chitinase활성이 높은 균주로 파악되어 있어 chitin을 포함하고 있는 식용 곤충의 분해 및 발효에 이용하기 가장 효율적인 균주로 파악되었다. 따라서 *Bacillus subtilis*나 *Rhizopus oligosporus* 균주를 활용하는 것이 맞을 것으로 판단하였다.

[0088] 따라서 단백질과 chitin이 포함된 곤충을 이용한 발효제품을 생산할 경우 이들 물질들에 분해력을 가지고 있는 효소 활성이 높은 미생물 균주에 대한 병용효과를 보는 것이 필요할 것으로 파악하였다. 이를 위해 chitinase 활성이 높은 *Rhizopus oligosporus*와 protease 활성이 높은 *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* 균주를 선별하였다.

[0089] **3. *Bacillus sp.* 균주의 *Aspergillus oryzae* 및 *Rhizopus oligosporus* 진균류의 생장억제 능력 검증**

[0090] **(1) 실험방법**

[0091] *Bacillus sp.* 균주의 경우 발효곰팡이 균주에 대한 저해능이 있는 것으로 알려져 있는데, 본 곤충 발효식품의 경우 단독 또는 혼합균주 병용의 경우 각 균주의 생육영향성을 파악할 필요가 있어 PDA, TSA를 1:1로 혼합한 배지 PDTSA(Potato dextrose tryptic soy agar)를 제조하여 그 생육영향성을 파악하였다. 사용 균주의 경우 한국 농업유전자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양받은 *Bacillus subtilis*(KACC No.17798), *Bacillus licheniformis*(KACC No.15829), 청국장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis*(CIB1, CIB2) 등 4종의 *Bacillus sp.* 균주와 진균류는 *Aspergillus oryzae*(C 업체, 상업용 단모균) 및 *Rhizopus oligosporus*(KACC No.60529)를 사용하였다. 진균류의 경우 직경 3mm의 agar plug 형태로 배지의 한가운데 접종하였고, *Bacillus sp.* 균주는 paper disc법으로 양 옆에 접종하였다. 그 후 30°C에서 72시간을 배양한 후 *Bacillus sp.* 균주와 진균류 간의 거리를 측정하여 억제율(Inhibition rate)로 환산하여 측정하였다. 이 때, *Bacillus licheniformis*(KACC No.15829)의 경우, 식품에 첨가할 수 있는 미생물로 지정되어 있지는 않으나, 청국장이나 된장 등 관련 연구에서 흔히 사용되는 미생물인 점을 고려하여, 함께 실험하였다.

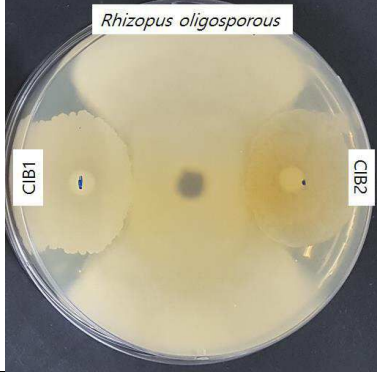
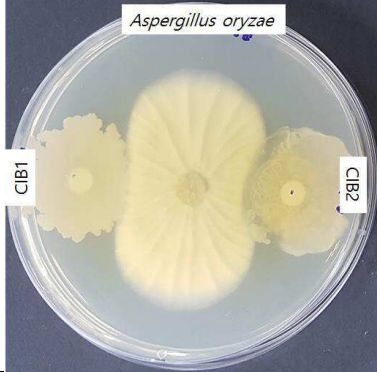
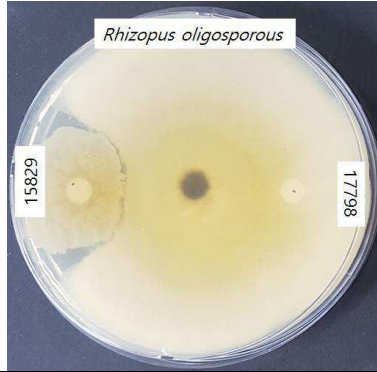
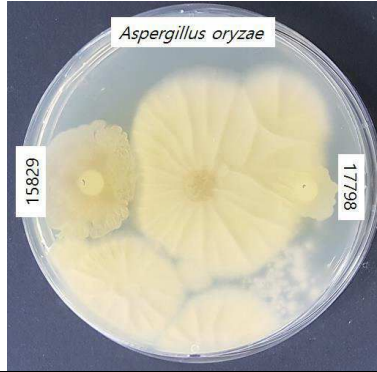
[0092] **(2) 실험 결과**

[0093] 본 연구결과 CIB1과 CIB2의 경우, *Aspergillus oryzae* 및 *Rhizopus oligosporus* 생장억제능이 높은 것을 확인할 수 있었으며, *Bacillus licheniformis*(KACC No.15829)의 경우 *Rhizopus oligosporus* 생장 억제능이 높고, *Aspergillus oryzae*의 경우에는 CIB1과 CIB2의 경우에 비해 약하나 어느 정도 생장 억제 능력을 보였다. 반면 *Bacillus subtilis*(KACC No.17798)의 경우에는 진균류의 생장억제 능력이 보이지 않는 것으로 조사되었다.

[0094] 따라서 곤충 발효 식품의 제조 시에 *Bacillus sp.* 균주와 진균류를 병용할 경우에 진균류의 발효 후 *Bacillus sp.* 균주의 발효가 진행되는 순차적 발효 방식을 선택해야 할 것으로 판단하였다(표 1).

표 1

[0095]

균주	<i>Bacillus</i> sp. 균주의 <i>Aspergillus oryzae</i> 및 <i>Rhizopus oligosporus</i> 생장억제 정도	
		
CIB1	72.5 ¹	69.2
CIB2	72.5	53.8
		
7798	0.0	0.0
15829	65.0	61.5

[0096]

(1. Inhibition rate (%)= ((R-r))/R x 100, R은 세균 콜로니로부터 가장 떨어져 있는 진균 콜로니의 가장 큰 직경; r은 세균 콜로니와 반대에 있는 진균 콜로니의 직경이다.)

[0097]

4. 단일, 혼합 균주에 따른 protease 및 chitinase 활성 측정을 통한 균주 선별

[0098]

(1) 실험 방법

[0099]

단일, 혼합 균주에 의한 Protease 활성을 측정하기 위하여 삼각플라스크에서 48시간 배양한 균주 *Bacillus subtilis*(KACC No.17798) (B) 2%, *Aspergillus oryzae*(단모균) (A), *Rhizopus oligosporus* (R)을 1% Casein broth 10 ml에 각각 접종하였다. 각 균주는 37℃, 160rpm shaking incubator에서 24시간동안 배양한 후 whatman filter paper로 여과 후 10,000rpm에 원심분리하여 얻은 상청액을 조효소액으로 사용하였다. Protease 활성측정은 37℃ 온도평형을 이룬 0.65% casein 용액 5ml에 조효소액을 각각 0ml, 0.5ml, 1ml 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 TCA 5ml를 넣고 enzyme를 중지시키고 다시 조효소액을 각각의 casein용액에 1ml, 0.5ml, 0ml 넣어 조효소액의 총량을 1 ml로 맞춰주고 전체량이 11ml가 되도록 해주었다. 혼합액을 37℃에서 30분간 다시 반응시키고 0.45 um 필터로 여과한 용액 2ml를 빈 vial에 옮기고 각각의 Na₂CO₃ 5ml와 Folin-Ciocalte's 용액을 1 ml 넣어서 혼합하여 30분간 반응시켰다. 0.45um 필터로 여과한 후 660nm에서 흡광도 측정하였고 1.1mM tyrosine standard stock solution을 이용하여 표준곡선에 대입하여 효소 활성을 나타냈다.

[0100]

한편, Chitinase 활성 측정은 각 균주를 효소생산배지(1.26% colloidal chitin(Sigma사 제품 또는 선행논문 실험방법으로 얻어진 Hand made형태; 2종), 0.23% glycerol, 0.08% peptone) 5ml에 *Bacillus subtilis*(KACC No.17798) (B) 2%, *Aspergillus oryzae*(단모균) (A), *Rhizopus oligosporus* (R)을 1% 각각 접종한 후 37℃, 160 rpm의 shaking incubator에서 48시간 동안 진탕배양한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상청액의 유리된 환원당을 DNS(dinitrosalicylic acid)법으로 정량하였다. 효소 1 unit은 1시간에 N-acetyl-D-glucosamin을 생산하는 효소의 양 mg/ml를 lunit으로 측정하였다.

[0101] (2) 실험 결과

[0102] Protease와 Chitinase활성을 측정한 결과는 도 4와 같다. Protease 활성 측정결과 *Bacillus subtilis*(B), *Aspergillus oryzae*(A), *Rhizopus oligosporus*(R) 세 개의 혼합균주(BAR)가 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 단일 균주에 비해서는 2배정도 높은 결과 값을 나타내었고 2개의 혼합균주보다도 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. Chitinase 활성 측정결과 *Rhizopus oligosporus*가 가장 높은 효소활성을 나타내어 곤충의 chitin 분해에 있어서는 *Rhizopus oligosporus*를 활용하는 것이 적합할 것으로 파악하였다. 따라서 곤충소제 조미액의 속성발효를 위해 40℃ 또는 60℃의 온도에서 발효할 경우 세 개의 혼합균주를 활용하여 발효하는 것이 곤충의 단백질 분해와 chitin 분해에 있어 유리할 것으로 판단하였다.

[0103] 5. Paper disc법을 통한 단일, 혼합 균주에 따른 protease 활성 측정을 통한 균주의 선별

[0104] (1) 실험 방법

[0105] Paper disc법을 통한 단일, 혼합균주에 따른 protease 활성 측정방법은 다음과 같다. skim milk broth 배지 10ml에 *Bacillus subtilis*(KACC No.17798) (B) 2%, *Aspergillus oryzae*(단모균) (A), *Rhizopus oligosporus* (R)을 각각 1% 접종하여 37℃에서 160rpm으로 48시간 진탕배양시킨 후 whatman filter paper로 여과하고 10,000rpm에 10분 원심분리하여 상등액을 채취하였다. 0.20 μ m syringe filter로 여과하여 얻은 상등액 20 μ l와 syringe filter 하지 않은 20 μ l를 각각 skim milk 배지와 chitin을 체에 거른 후 agar만을 섞은 mealworm powder배지, silkworm pupa배지에 paper disc법으로 접종하여 12시간, 24시간, 48시간에 나타난 환의 직경 크기를 측정하였다.

[0106] (2) 실험 결과

[0107] Paper disc법을 통한 단일, 혼합 균주의 protease 활성 측정결과는 도 5에 나타내었다. 시간의 경과에 따른 환의 직경 크기(최대값, 최소값 평균)를 측정한 후 *Bacillus subtilis*를 1로 기준으로 두었을 때 24시간, 48시간에 분해된 단일, 혼합 균주의 환의 크기를 비교하였다. 12시간이 지났을 때는 모든 배지에서 환이 나타나지 않았다. skim milk 배지에서는 24시간, 48시간이 지났을 때 B가 가장 높은 단백질 분해력을 나타내었고 다음으로 BR>BA 혼합균주 순으로 나타났다. mealworm 배지에서는 24시간에는 BAR이 B보다 약간 낮은 값을 나타내었지만 48시간 후에는 가장 높은 분해력을 나타내었고 BAR>B>BA 순이었다. silkworm pupa 배지에서는 24시간에 BA, BAR, BR, AR이 B보다 환의 크기가 컸고 48시간 경과 후 측정된 값은 BA>B>BAR 순으로 높게 나타났다.

[0108] Skim milk와 곤충소제별 단백질질이 모두 다르기 때문에 단백질 분해정도에 차이가 나타난 것으로 판단된다. 또한 syringe filter를 하고 난 다음 접종하였을 때 환이 나타나지 않은 것은 protease 활성효소가 Extracellular(Exo-type)형태는 아니었던 것으로 보이며 그로 인하여 균주가 존재하지 않는 조효소액 상태에서 protease 활성이 나타나지 않은 것으로 판단된다.

[0109] 6. 단일, 혼합 균주에 따른 제1발효물의 발효 양상

[0110] (1) 실험 방법

[0111] 단일 균주와 혼합 균주에 따른 발효 양상을 확인하기 위하여 갈색겨저리 유충 원물 가루와 탈지한 갈색겨저리 유충에 증류수를 첨가하여 증자한 후 단일균주와 혼합균주를 중량대비 *Bacillus subtilis*(B) 1%, *Aspergillus oryzae*(A) 0.5%, *Rhizopus oligosporus*(R) 0.5% 접종하였다.

[0112] 단일 균주의 경우 48시간 발효하였고 혼합 균주는 첫 번째 균주를 접종한지 48시간이 지난 후에 두 번째 균주를 접종하여 48시간 발효, 총 96시간 발효하였으며, 균주 접종 순서에 따른 발효 양상의 차이를 확인하기 위하여 순차적으로 접종한 샘플(예: B+A로 표시)과 동시에 접종한 샘플(예: BA로 표시)을 나누어 데이터를 확인하였다. 각 제1발효물의 제조 공정은 도 6에 제시하였다. 단일균주를 96시간동안 발효하지 않은 이유는 *Bacillus subtilis*의 경우 과 발효 시 아미노태질소를 많이 생성하여 냄새가 좋지 않고, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* 같은 곰팡이의 경우 포자를 내게 되어 색이 진해지고 발효 시 소수성인 포자들의 제품에 분리되어 나타날 수 있어 외관상 좋지 않기 때문에 48시간 동안만 발효를 진행하였다.

[0113] (2) 실험 결과

[0114] 단일 균주와 혼합균주에 따른 발효 양상 측정 결과는 표 2와 같이 나타났으며 단백질의 분해정도를 아미노태 질소값으로 추정하였을 때 혼합균주를 접종한 샘플이 단일균주를 접종한 샘플보다 1-2% 높은 값을 나타내었고 발효진균류인 *Aspergillus*나 *Rhizopus* 곰팡이를 1차로 접종하고 2차로 *Bacillus subtilis*를 순차적으로 접종한

시료 처리군들이 접종 순서를 반대로 먼저 *Bacillus subtilis*를 접종하거나 곰팡이와 동시에 접종한 샘플보다 아미노태 질소와 NDR이 가장 높은 값을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 곰팡이를 먼저 접종시킨 후 *Bacillus subtilis*를 접종하였을 때 *Bacillus subtilis*의 특유의 콕쿰한 발효취를 감소시켜(실험실원의 관능적 확인) 곤충단백질의 발효를 통한 상업적 이용에 도움이 될 수 있을 것으로 판단되었다. 이는 아래의 GC-MS 기기를 통한 향미성분 분석(표 3, GC-MS를 이용한 균주 발효 순서 변화에 의한 향기 성분 변화 비교 측정)으로도 그 결과를 확인할 수 있었는데 곤충을 이용하여 제1발효물을 제조할 경우 라이조푸스 올리고스포러스(*Rhizopus oligosporus*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 순차적으로 발효시킬 때 두 균주의 발효 순서에 따라 향기성분의 차이가 나타나는지 확인하기 위하여 SPME(Solid-Phase Microextraction) 방법으로 서로 다르게 순차적으로 발효시킨 2종 시료의 휘발성 화합물 추출 후 GC-MS를 이용하여 각 시료의 휘발성 향기성분들을 분석 및 동정하였다. 분석된 시료는 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor*)에 *R. oligosporus* 를 먼저 접종하여 48시간 발효시킨 후 *B. subtilis* 를 후 접종하여 48시간 2차 발효시킨 R+B 시료와 반대로 *B. subtilis* 를 접종하여 48시간 발효시킨 후 *R. oligosporus* 를 후 접종하여 48시간 2차 발효시킨 B+R 시료로 두 방식의 시료를 이용하였다.

[0115] 분석 결과 R+B의 경우 Esters 계열이 10개, Alcohols 계열이 9개, Aldehydes 계열이 5개, Acids 계열이 2개, Pyrazine 계열이 8개, Ketones 계열이 4개, Alkanes 계열이 3개, Amides 계열이 3개, Furans 계열이 1개, Aromatic hydrocarbons 계열이 1개, Miscellaneous compounds가 4개로 총 50개의 향기 성분을 동정하였다. 반면 B+R시료의 경우 Esters 계열이 3개, Alcohols 계열이 3개, Aldehydes 계열이 4개, Pyrazine 계열이 7개, Ketones 계열이 4개, Furans 계열이 1개, Aromatic hydrocarbons 계열이 1개, Miscellaneous compounds가 3개로 총 26개의 향기 성분이 동정 되어 R+B시료가 B+R시료에 비해 2배가량 향기성분이 다량 존재하여 복잡한 향을 내는 것으로 판단된다. 관능적 특성을 파악해 본 결과 B+R시료는 R+B시료에 비해 단조로운 발효취가 강하고, R+B의 경우 복잡적이면서 Floral한 향기가 높은 것으로 파악되었는데, 향기성분의 동정을 통해 확인한 결과 R+B 시료에 Aldehydes 계열의 B+R시료에 비해 약 7배 이상 높은 함량을 나타내는 것으로 분석되었다. 일반적으로 Aldehydes 계열의 향기성분은 과일과 꽃의 향기를 주로 나타내며, 향수의 성분으로도 주로 쓰이는 향기성분으로 알려져 있어, 이러한 특성으로 R+B시료의 관능적 향기 특성이 우수할 것으로 판단된다.

표 2

[0118]

Sample ⁴⁾	pH	Titrateable acidity	Total Nitrogen	Amino Nitrogen	NDR	
M	B	7.17±0.00 ^b	0.48±0.00 ⁱ	-	0.49±0.00 ⁱ	-
	A	6.46±0.01 ^{ij}	1.20±0.00 ^{cde}	-	0.39±0.01 ^j	-
	R	6.71±0.01 ^e	1.10±0.00 ^{ef}	-	0.69±0.00 ^h	-
	B+A	6.85±0.05 ^d	0.86±0.00 ^{fg}	7.55±0.00	0.85±0.00 ^g	11.26±0.00
	A+B	6.83±0.04 ^d	1.39±0.07 ^{cd}	7.72±0.15	1.47±0.00 ^d	19.17±0.33
	BA	6.62±0.01 ^{fg}	1.44±0.14 ^c	8.32±0.24	1.14±0.02 ^f	13.70±0.16
	B+R	6.95±0.01 ^c	0.77±0.00 ^{gh}	-	1.14±0.02 ^f	-
	R+B	7.20±0.00 ^b	1.47±0.03 ^c	-	2.18±0.05 ^b	-
	BR	7.33±0.05 ^a	0.58±0.00 ^{hi}	-	0.85±0.00 ^g	-

DM	B	6.90±0.01 ^{cd}	0.67±0.00 ^{hi}	-	0.53±0.00 ⁱ	-
	A	6.52±0.01 ^{hi}	1.25±0.00 ^{cde}	-	0.65±0.02 ^h	-
	R	6.42±0.01 ^r	1.11±0.21 ^{ef}	-	0.67±0.00 ^h	-
	B+A	6.44±0.01 ^{ij}	1.47±0.04 ^c	10.97±0.01	1.07±0.01 ^f	9.75±0.06
	A+B	6.43±0.01 ^r	2.21±0.00 ^a	10.61±0.08	2.40±0.00 ^a	22.62±0.15
	BA	6.42±0.01 ^r	1.97±0.07 ^{ab}	10.77±0.06	2.03±0.06 ^c	18.85±0.53
	B+R	6.72±0.01 ^e	1.15±0.00 ^{de}	-	1.06±0.00 ^f	-
	R+B	6.56±0.01 ^{gh}	1.92±0.00 ^b	-	2.04±0.06 ^c	-
	BR	6.68±0.01 ^{ef}	1.20±0.07 ^{cde}	-	1.32±0.01 ^e	-
F-value		411.415 ^{***3)}	102.543 ^{***}		1311.945 ^{***}	

- [0119] 1) mean±SD.
- [0120] 2) a~b means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.
- [0121] 3) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001
- [0122] 4) M : Meal worm
- [0123] DM : Deffated Meal worm
- [0124] B : Fermentation for 48hours after inoculating with *Bacillus subtilis*
- [0125] A : Fermentation for 48hours after inoculating with *Aspergillus oryzae*
- [0126] R : Fermentation for 48hours after inoculating with *Rhizopus oligosporus*
- [0127] B+A : Fermentation for 48hours after inoculating with *Bacillus subtilis*
- [0128] + Fermentation for 48hours after inoculating with *Aspergillus oryzae*
- [0129] A+B : Fermentation for 48hours after inoculating with *Aspergillus oryzae*
- [0130] + Fermentation for 48hours after inoculating with *Bacillus subtilis*
- [0131] BA : Fermentation for 96hours after inoculating *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae*
- [0132] at the same time
- [0133] B+R : Fermentation for 48hours after inoculating with *Bacillus subtilis*
- [0134] + Fermentation for 48hours after inoculating with *Rhizopus oligosporus*
- [0135] R+B : Fermentation for 48hours after inoculating with *Rhizopus oligosporus*
- [0136] + Fermentation for 48hours after inoculating with *Bacillus subtilis*
- [0137] BR : Fermentation for 96hours after inoculating *Bacillus subtilis* and *Rhizopus oligosporus*
- [0138] at the same time

표 3

Volatile compound ²⁾	RT ³⁾	R+B ¹⁾		B+R		Odor description
		Area ⁴⁾	Area % ⁵⁾	Area	Area %	
Esters (11)		10		3		

N-methyl urethane	9.5	311.6	10.7	333.3	19.0	
Methyl 3-hydroxybutyrate	16.8	6.4	0.2	- ⁶⁾	-	apple; green; fruity; wine-like
Methyl benzoate	31.8	4.3	0.1	-	-	eucalyptus, phenolic, wood, medicinal
Methyl methylundecanoate	35.8	5.9	0.2	-	-	
Ethyl laurate	36.8	14.2	0.5	-	-	floral; waxy; soapy; sweet
Ethyl tridecanoate	40.0	3.8	0.1	-	-	Green
Methyl myristate	42.5	13.0	0.4	-	-	fatty; waxy
Ethyl myristate	44.1	163.0	5.6	-	-	fatty odors
Ethyl linoleate	44.8	-	-	181.9	10.4	
Ethyl Oleate	45.4	6.4	0.2	272.0	15.5	Coconut, sweet
Isobutyl myristate	50.3	7.4	0.3	-	-	
Total esters peak area %		535.9	18.5	787.2	44.9	
Alcohols (9)		9		3		
Ethanol	10.8	192.6	6.6	-	-	Ethanol
isoamyl alcohol	19.9	19.7	0.7	-	-	Fusel oil, whisky
Acetoin	22.6	171.3	5.9	-	-	Buttery, cream
(R,R)-2,3-Butanediol	29.3	233.4	8.0	-	-	
(2S,3S)-(+)-2,3-Butanediol	29.7	20.3	0.7	6.9	0.4	
2,3-Butanediol	30.1	35.2	1.2	-	-	Burning
1,3-Butanediol	34.3	34.8	1.2	-	-	
Benzyl alcohol	38.0	9.8	0.3	4.3	0.2	pleasant aromatic odor
Phenethyl alcohol	39.3	5.7	0.2	26.5	1.5	rose, honey
Total alcohols peak area %		722.7	24.9	37.7	2.2	
Aldehydes (8)		5		4		
Acetaldehyde	4.2	572.9	19.8	-	-	Ethereal, pungent
3-Methylbutanal	10.1	26.1	0.9	47.7	2.7	Chocolate, malt
2-methyl-1-Butanol	19.8	-	-	8.8	0.5	
Nonanal	25.5	18.6	0.6	-	-	Oxidated oil, fat, citrus, green
3-Methoxy-2-butanol	28.7	-	-	9.5	0.5	
Benzaldehyde	29.3	-	-	29.2	1.7	Burnt sugar, almond, savory
methoxy acetaldehyde	32.3	17.9	0.6	-	-	
2,4-Decadienal	36.4	7.3	0.3	-	-	Deep fat flavor, chicken flavor at 10 ppm, citrus/orange/grapefruit flavor at lower dilutions
Total aldehydes peak area %		642.9	22.2	95.2	5.4	
Acids (2)			2		0	
Acetic acid	27.6	29.7	1.0	-	-	Sour, astringent, vinegar
2-Amino-4-methylbenzoic acid	33.8	12.7	0.4	-	-	
Total acids peak area %		42.4	1.5	-	-	
Pyrazine (10)		8		7		
Methylpyrazine	22.0	-	-	2.5	0.1	Nutty, green
2,5-dimethylpyrazine	23.7	27.5	0.9	313.4	17.9	Roasted, cooked
2,6-dimethylpyrazine	23.9	4.5	0.2	11.5	0.7	Baked potato, nutty, fruity, cooked rice
2,3-dimethylpyrazine	24.5	4.1	0.1	-	-	Cooked, nutty
2-Methyl-5-ethylpyrazine	25.7	-	-	2.8	0.2	
trimethylpyrazine	26.1	79.3	2.7	104.6	6.0	Cocoa, roasted, cooked
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	27.1	6.4	0.2	4.5	0.3	Roasty
tetramethylpyrazine	28.0	338.6	11.7	35.9	2.0	Milk-coffee, roasted, chocolate
ethyltrimethyl pyrazine	29.0	16.7	0.6	-	-	Candy, sweet
2-Butyl-3,5-dimethylpyrazine	32.6	35.9	1.2	-	-	Earthy

Total pyrazine peak area %		513.0	17.7	475.1	27.1	
Aromatic hydrocarbons (1)		1		1		
phenol	42.3	18.2	0.6	25.9	1.5	Phenol
		18.2	0.6	25.9	1.5	
Ketones (6)		4		4		
Acetone	7.4	15.1	0.5	219.0	12.5	Pungent, irritating, floral, cucumber like
2,3-Butanedione	12.1	241.7	8.3	43.2	2.5	Buttery (low)
2-Heptanone	19.1	-	-	26.2	1.5	Fruity, spicy, cinnamon, penetrating fruity odor in liquid
2-Nonanone	25.4	-	-	8.0	0.5	irritant odor
2-Tridecanone	36.1	7.5	0.3	-	-	Fatty(very weak)
2-Pentadecanone	43.1	19.3	0.7	-	-	Jasmine, celery-like
Total ketones peak area %		283.5	9.8	296.4	16.9	
Alkanes (3)		3		0		
1,13-Tetradecadiene	34.8	15.6	0.5	-	-	Coriander-like
Cyclohexano-15-crown-5	35.0	9.9	0.3	-	-	Pesticide, onion
15-Crown-5	44.9	6.4	0.2	-	-	Fatty, waxy, dairy
Total alkanes peak area %		31.9	1.1	-	-	
Amides (3)		3		0		
Diethylenetriamine	5.5	42.2	1.5	-	-	Ammoniacal
Betaine	19.1	4.2	0.1	-	-	
1,1-dimethylhydrazine	32.8	15.8	0.5	-	-	Ammoniacal, fishy
Total amides peak area %		62.2	2.1			
Furans (1)		1		1		
2-pentyl furan	20.4	7.2	0.2	3.5	0.2	Nutty, bean
Total Furans peak area %		7.2	0.2	3.5	0.2	
Miscellaneous compounds (6)		4		3		
Nonane	17.8	3.3	0.1	-	-	
3-Hydroxy-3-methyl-2-butanone	21.1	-	-	10.8	0.6	
Diisopropoxy methane	30.4	-	-	17.4	1.0	
Styrene oxide	32.3	17.6	0.6	-	-	aroma(향수)
1-Isopropoxypropane	32.6	13.1	0.5	3.2	0.2	
1,2-Dimethylcyclohexene	36.0	6.4	0.2	-	-	
Total MC peak area %		40.5	1.4	31.4	1.8	
Total volatile compound		2900.4	100.0	1752.3	100.0	

- [0140] 1) R+B: 1st fermented using *Rhi. oligosporus* and 2nd fermented using *B. subtilis*. B+R: 1st fermented using *B. subtilis* and 2nd fermented using *Rhi. oligosporus*.
- [0141] 2) Masshunter data analysis library of unknown compounds on DB-WAX column (Wiley library 2011)
- [0142] 3) Retention time
- [0143] 4) (Peak area/1000000)*100
- [0144] 5) Peak area percentage
- [0145] 6) - : Not detected.
- [0147] 7. 대두 및 곤충별 액상, 고상 및 분말형태 조미소재의 제조
- [0148] (1) 균주의 배양 및 사용방법
- [0149] 제1발효물과 제2발효물 그리고 액상, 고상 및 분말형태 조미소재의 제조를 위한 균주는 농촌진흥청 농업유전자원정보센터에서 분양받은 균주 *Rhi. Oligosporus*, 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis*(CIB1)와 C업체에서 상

업적으로 공급되는 *A. oryzae*(단모균)을 사용하였다. 본 연구에서는 *A. oryzae*는 구매한 분말 형태로 탈지 대두박으로 제2발효물의 제조에 사용하였다.

[0150] (2) 제2발효물의 제조

[0151] 대두를 실시예 1에서 나타난 바와 같이 탈지시키고, 물을 첨가한 뒤, Autoclave 121℃에서 15분간 증자시킨다. 냉각시킨 후 *A. oryzae*(단모균) 0.5%를 접종한 뒤 30℃에서 48시간 배양한다. 이후 건조시키는 과정을 통해 제2발효물을 얻는다. 이에 대한 상세한 제조공정은 도 7과 같다.

[0152] (3) 제1발효물의 제조

[0153] 본 연구에서는 lab test로 진행하여 액상, 고상 및 분말형태의 조미소재의 제조 가능성을 파악하는데 관점을 두어 먼저 곤충에 증류수를 첨가 후 Autoclave에 넣어 121℃에서 30분 동안 증자하였다. 이후 1차로 *Rhi. Oligosporus*를 0.5%의 농도로 접종한 후 37℃에서 48시간 발효시켰다. 이후에 *Bacillus sp.* 균주들 중에서 protease와 chitinase활성이 높은 균주로 조사된 *B. subtilis*를 2차적으로 1%의 농도로 접종하여 37℃에서 48시간 발효시킴으로써 제1발효물을 제조하였다. 이에 대한 상세한 제조공정은 도 8(또는 도1의 제1발효물 제조 오른쪽으로 *R. oligosporus* 와 *B. subtilis* 의 순차적 발효)과 같다.

[0154] (4) 액상, 고상 및 분말형태의 조미소재의 제조

[0155] 상기 (3)에서 얻어진 제1발효물과 제2발효물, 볶은 쌀가루를 6:2:2 비율로 혼합하며, 이 때 20% 염수를 1:2.5(w/w)로담금하여 40℃의 항온기에서 21일동안 숙성하였다. 액상 조미소재 제조의 비율은 표 4에 제시하였다. 숙성된 시료는 일반 조리용 필터망에 여과한 후 8000rpm에서 30분간 원심분리(HMR-220IV, Hani Industrial Co., Seoul, Korea)하여 지방층은 제거하고, 고형분은 고상 조미소재로, 액상은 액상 조미소재로서 얻었다. 나아가, 고상 또는 액상을 50℃로 열풍건조하여 분말형태의 조미소재를 얻었다. 이와 관련된 표준공정도는 도 1에 나타내었다.

[0156] 일반 대두로 만든 제1발효물의 경우 상기 제1발효물 제조 과정에서 곤충박 대신 대두박으로 사용하여 얻을 수 있다. (SS)

[0157] (SS : 대두 제1발효물:탈지대두 제2발효물:볶은쌀가루,

[0158] MS : 갈색거저리 유충으로 제조된 제1발효물:탈지대두 제2발효물:볶은쌀가루,

[0159] CS : 쌍별귀뚜라미 제1발효물: 탈지대두 제2발효물:볶은쌀가루,

[0160] PS : 누에번데기 제1발효물: 탈지대두 제2발효물:볶은쌀가루)

표 4

% weight of ingredients			
Fermented Product 1	Fermented Product 2	Roasted rice flour	20% brine
17.1	5.7	5.7	71.4

[0162] 8. 액상 조미소재의 발효기간에 따른 성분 분석

[0163] 제조분리된 액상 조미소재를 100℃에서 10분간 끓인 후 부유물을 제거하고 냉각하여 액상 형태로 제조하였다. 또한, 분석용 시료는 0일, 7일, 14일 21일에 일정량을 이용하여 실험을 실시하였다. 액상 조미소재의 품질 특성을 위한 측정은 pH와 적정산도, 색도, 가용성 고형분, 염도(Salinity, Mohr법), 환원당(DNS법), 아미노태 질소(Formal 적정법), 유리아미노산 측정 등을 실시하여 시간별 발효양상에 따른 특성을 모니터링 하였다.

[0164] (1) pH, 적정산도 측정

[0165] 각 액상 조미소재 시료의 숙성 기간이 지남에 따라 pH 및 적정산도 변화를 측정한 결과는 표 5와 같이 나타내었다. 숙성 0일차의 pH는 6.03-6.31 정도였고 7일차에 5.77-6.03으로 급격히 감소한 이후 21일차까지 조금씩 감소하는 경향이 나타났다.

[0166] 적정산도 또한 발효초기 0.19-0.23%에서 7일차에 0.36-0.45%로 급격히 증가하였고 조금씩 증가하여 21일차에 0.48-0.58%를 나타내었다.

표 5

	Sample ²⁾	Fermentation time (days)			
		0	7	14	21
pH	SS ⁴⁾	6.31±0.01 ^{a1)2)}	5.87 ± 0.02 ^c	5.77 ± 0.01 ^c	5.71±0.02 ^c
	MS	6.26±0.01 ^b	6.03 ± 0.02 ^b	5.87 ± 0.01 ^b	5.81±0.01 ^b
	CS	6.03±0.01 ^c	5.77 ± 0.01 ^c	5.70 ± 0.02 ^c	5.70±0.01 ^c
	PS	6.31±0.02 ^a	6.08 ± 0.00 ^a	5.93 ± 0.01 ^a	5.85±0.01 ^a
	F-value	817.558^{***2)}	415.869^{***}	485.465^{***}	178.871^{***}
Titratable acidity (%)	SS	0.19±0.00	0.45 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.00 ^{bc}	0.58±0.00 ^a
	MS	0.19±0.00	0.38 ± 0.00 ^b	0.43 ± 0.01 ^c	0.48±0.00 ^b
	CS	0.23±0.06	0.40 ± 0.02 ^b	0.58 ± 0.01 ^a	0.58±0.00 ^a
	PS	0.19±0.00	0.36 ± 0.03 ^b	0.50 ± 0.03 ^b	0.55±0.00 ^a
	F-value	NS	13.095^{***}	15.687^{***}	3.585^{***}

[0167]

[0168] 1) Mean±S.D

[0169] 2) ^{a-c}Means in a column with superscripts differ significantly at the 5% level (Tukey's HSD test.)

[0170] 3) NS: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

[0171] 4) SS : Soybean sauce

[0172] MS : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) Seasoning sauce

[0173] CS : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) Seasoning sauce

[0174] PS : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) Seasoning sauce

[0175] (2) 액상 조미소재의 가용성 고형분 및 염도 측정

[0177] 총 가용성 고형분 및 염도계, Mohr법에 따른 염도는 표 6과 같은 결과를 보인다. 총 가용성 고형분 측정결과 전반적으로 모든 시료에서 가용성 고형분이 증가하였으나 14일 이후에는 큰 변화를 나타내지 않았다. 21일차에 모든 시료에 40.00 ° Brix를 나타내어 시료간의 유의적 차이가 없었고 염도의 경우에는 시간이 지남에 따라 감소하거나 유지하는 양상을 보였는데 21일차의 염도를 측정하였을 때 염도계는 17.20-18.00%, Mohr법에 따른 NaCl은 15.72-17.79%로 나타났다.

표 6

[0178]

	Sample ³⁾	Fermentation time (days)			
		0	7	14	21
Total soluble solids (° Brix)	SS ⁴⁾	25.00± 0.00 ¹⁾²⁾	35.50 ± 0.58 ^a	42.00 ± 2.30 ^a	40.00 ± 0.00
	MS	25.00 ± 0.00 ^b	34.00 ± 0.00 ^b	36.00 ± 0.00 ^b	40.00 ± 0.00
	CS	25.00 ± 0.00	33.50 ± 0.58 ^b	42.00 ± 2.31 ^a	40.00 ± 0.00
	PS	25.00 ± 0.00	34.00 ± 0.00 ^b	39.00 ± 3.83 ^{ab}	40.00 ± 0.00
	F-value	NS³⁾	18.00^{***}	5.211[*]	NS
Salinity (%)	SS	17.50 ± 0.00 ^b	17.75 ± 0.29 ^a	16.40 ± 0.00	17.20 ± 0.00 ^b
	MS	17.38 ± 0.25 ^b	17.00 ± 0.00 ^b	16.40 ± 0.00	17.20 ± 0.00 ^b
	CS	18.00 ± 0.00 ^a	16.50 ± 0.00 ^c	18.00 ± 0.00	18.00 ± 0.00 ^a
	PS	17.50 ± 0.00 ^b	16.94 ± 0.00 ^c	17.60 ± 0.00	17.20 ± 0.00 ^b
	F-value	19.667^{***}	67.00^{***}	NS	2.4315^{***}
NaCl (%)	SS	16.48 ± 0.14 ^c	16.00 ± 0.08	15.72 ± 0.07 ^c	16.02 ± 0.13 ^c

MS	17.24 ± 0.00 ^b	16.18 ± 0.07	16.37 ± 0.00 ^b	15.67 ± 0.17 ^b
CS	17.79 ± 0.07 ^a	16.00 ± 0.15	17.54 ± 0.00 ^a	17.30 ± 0.17 ^a
PS	16.48 ± 0.14 ^c	16.22 ± 0.17	17.45 ± 0.18 ^a	16.60 ± 0.27 ^c
F-value	147.960 ^{***}	NS	347.968 ^{***}	56.375 ^{***}

[0179] 1) Mean±S.D

[0180] 2) ^{a-c}Means in a column with superscripts differ significantly at the 5% level (Tukey's HSD test.)

[0181] 3) NS: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

[0182] 4) SS : Soybean sauce

[0183] MS : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) Seasoning sauce

[0184] CS : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) Seasoning sauce

[0185] PS : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) Seasoning sauce

[0186] (3) 색도 측정

[0187] Hunter 색도계의 측정결과 표 7과 같이 나타내었다. 명도인 L값의 경우 SS는 숙성기간이 지남에 따라 감소하였고, PS의 경우 증가하였으며 MS와 CS는 큰 변화를 보이지 않았다. 적색도인 a값의 경우 대체로 숙성 기간이 지남에 따라 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

표 7

[0188]

	Day	0	7	14	21
	sample ³⁾				
L	SS ⁴⁾	42.75 ± 0.01 ^{a1)2)}	38.71 ± 0.16 ^a	34.75 ± 0.16 ^b	33.04 ± 0.09 ^c
	MS	38.14 ± 0.44 ^b	36.25 ± 0.07 ^b	39.00 ± 0.09 ^a	37.33 ± 0.03 ^a
	CS	36.54 ± 0.14 ^c	38.80 ± 0.04 ^a	34.75 ± 0.18 ^b	34.94 ± 0.04 ^b
	PS	30.52 ± 0.06 ^d	31.87 ± 0.20 ^d	30.86 ± 0.10 ^c	34.00 ± 0.12 ^d
	F-value	1877.255 ^{***1)}	2404.519 ^{***}	2325.987 ^{***}	5095.617 ^{***}
a	SS	7.04 ± 0.09 ^b	9.71 ± 0.22 ^a	8.02 ± 1.06 ^a	8.61 ± 0.04 ^c
	MS	6.04 ± 0.44 ^c	7.02 ± 0.13 ^c	8.78 ± 0.07 ^a	9.96 ± 0.04 ^a
	CS	7.48 ± 0.13 ^a	9.30 ± 0.02 ^b	8.74 ± 0.06 ^a	9.59 ± 0.03 ^b
	PS	2.16 ± 0.01 ^d	4.50 ± 0.04 ^d	3.38 ± 0.07 ^b	3.65 ± 0.02 ^d
	F-value	2421.067 ^{***}	1388.992 ^{***}	94.026 ^{***}	19845.696 ^{***}
b	SS	19.12 ± 0.15 ^a	13.59 ± 0.39 ^a	7.66 ± 0.23 ^c	6.37 ± 0.05 ^c
	MS	12.08 ± 0.25 ^b	8.94 ± 0.24 ^b	14.20 ± 0.27 ^a	13.01 ± 0.04 ^a
	CS	11.46 ± 0.30 ^c	13.64 ± 0.13 ^a	8.28 ± 0.03 ^b	8.87 ± 0.08 ^b
	PS	1.43 ± 0.03 ^d	2.58 ± 0.02 ^c	1.88 ± 0.05 ^d	2.08 ± 0.03 ^d
	F-value	4758.675 ^{***}	1931.212 ^{***}	3214.044 ^{***}	28264.374 ^{***}

[0189] 1) Mean±S.D

[0190] 2) ^{a-c}Means in a column with superscripts differ significantly at the 5% level (Tukey's HSD test.)

- [0191] 3) NS: not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$
- [0192] 4) SS : Soybean sauce
- [0193] MS : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) Seasoning sauce
- [0194] CS : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) Seasoning sauce
- [0195] PS : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) Seasoning sauce

[0196] **(4) 환원당 측정**

[0197] 환원당 측정결과 표 8과 같이 분석되었으며, 숙성기간과 각 시료들간의 통계적으로 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 환원당은 단맛을 내는 물질로 관능적인 중요한 지표 중 하나이다. 실험결과 발효기간이 지날수록 환원당 함량이 증가하는 경향을 보였으며 0일차에서 7일차에 2-4배 가까이 증가하였으며, 21일째 모든 시료에서 가장 높은 환원당 함량이 측정되었다. 숙성 초기에 환원당 함량이 증가하는 양상은 시료 내의 전분질이 균주가 생성하는 α -아밀라아제의 작용으로 당화하는 과정에서 나타나는 현상이다. SS가 0일차부터 높은 환원당의 함량을 나타낸 것은 동물성 식품인 곤충에 비해 탄수화물 함량이 높기 때문으로 사료되며 21일차에 가장 높은 환원당의 함량을 나타낸 시료는 CS였고 0일차에 비해 증가한 수치 역시 가장 높았다.

표 8

	Day	0	7	14	21
	sample ⁴⁾				
Reducing sugar	SS	2.08±0.03 ^{a123)}	4.34±0.06 ^a	4.26±0.03 ^b	4.56±0.06 ^b
	MS	0.70±0.01 ^d	2.90±0.01 ^c	3.04±0.05 ^c	3.17±0.02 ^b
	CS	0.90±0.00 ^c	3.57±0.08 ^b	3.79±0.05 ^b	4.95±0.85 ^a
	PS	0.98±0.00 ^b	2.89±0.01 ^c	3.11±0.03 ^c	3.42±0.21 ^b
	F-value		5303.381 ^{***2)}	668.122 ^{***}	880.815 ^{***}

- [0198]
- [0199] 1) Mean±S.D
- [0200] 2) ^{a-c} Means in a column with superscripts differ significantly at the 5% level (Tukey's HSD test.)
- [0201] 3) NS: not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$
- [0202] 4) SS : Soybean sauce
- [0203] MS : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) Seasoning sauce
- [0204] CS : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) Seasoning sauce
- [0205] PS : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) Seasoning sauce

[0207] **(5) 액상 조미소재의 아미노태 변화 측정**

[0208] 액상 조미소재의 숙성 기간에 따른 아미노태 질소 변화는 표 9에 제시하였다.

[0209] 아미노태 질소는 protease activity가 높고, 저분자 peptide와 아미노산이 다량으로 생성됨에 따라 높아지는 것으로 액상 조미소재의 숙성 정도와 보존기간 품질의 지표가 된다. 발효 초기 아미노태 질소 함량은 0.38~0.49%로 7일차에 0.76~0.86%로 2배 가까이 급증한 이후 21일까지는 대체로 조금씩 증가하는 양상을 보였으며, MS가 21일차에 0.97%로 가장 높은 아미노태 질소값을 나타내었다.

표 9

	Day	0	7	14	21
	sample ¹⁾				
AN	SS	0.41±0.02 ^{a12)}	0.76±0.00 ^a	0.85±0.01 ^c	0.88±0.01 ^c
	MS	0.49±0.02 ^a	0.86±0.01 ^a	0.88±0.00 ^b	0.97±0.01 ^a
	CS	0.38±0.03 ^c	0.82±0.01 ^b	0.93±0.01 ^a	0.94±0.00 ^b
	PS	0.39±0.00 ^{bc}	0.80±0.01 ^c	0.86±0.00 ^b	0.86±0.01 ^c
	F-value ²⁾	67.981 ^{***}	104.667 ^{***}	41.826 ^{***}	83.667 ^{***}

[0211]

[0212] 1) Mean±S.D

[0213] 2) ^{a-c} Means in a column with superscripts differ significantly at the 5% level (Tukey's HSD test).

[0214] 3) NS: not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

[0215] 4) SS : Soybean sauce

[0216] MS : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) Seasoning sauce

[0217] CS : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) Seasoning sauce

[0218] PS : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) Seasoning sauce

[0219] (6) 아미노산 분석

[0220] 곤충 소재 액상 조미소재의 발효가 완료된 14일차의 데이터의 유리 아미노산 분석 결과는 표 10과 같다.

[0221] 전체적으로 총 아미노산의 함량은 SS의 경우 43181.5 mg/kg, MS가 40379.57 mg/kg, CS가 43678.85 mg/kg, PS가 43678.85 mg/kg으로 분석이 되었다.

[0222] 필수 아미노산의 경우는 SS가 20662.04 mg/kg, MS가 20430.41 mg/kg, CS가 22320.92 mg/kg, PS가 21156.66 mg/kg으로 확인되었다.

[0223] 총 아미노산 중 필수아미노산의 비율을 확인해본 결과 SS의 경우는 47.85%이고, MS는 50.6%로 유사하였으며, CS는 51.10%, PS는 52.27%, 비율로 확인이 되었다.

표 10

[0224]

No.	Amino acid	SS ¹⁾	MS	CS	PS
1	Aspartate	3847.01	3588.97	3532.32	3600.62
2	Glutamate	9416.51	5966.05	7445.2	7220.63
3	Serine	424.61	524.53	1399.13	1461.04
4	Glycine	1431.89	1468.06	1630.3	1887.2
5	Threonine	1074.89	1622.46	1607.73	1560.66
6	Alanine	1717.19	1805.59	2271.01	2052.23
7	Proline	149.54	111.42	131.59	172.97
8	Histidine	3087.16	4331.41	3991.89	2677.88
9	Arginine	667.46	591.47	651.11	551.62
10	Tyrosine	2822.48	3514.96	2843.8	2980.59
11	Valine	653.28	606.43	866.34	1013.75
12	Methionine	2168.84	1724.86	2184.17	1882.78
13	Phenylalanine	2914.43	2553.61	2850.6	2503.93

14	Isoleucine	4207.84	3657.93	4438.28	3524.36
15	Leucine	4596.55	4987.55	5104.83	5138.85
16	Lysine	4001.82	3324.28	2730.56	2244.17
Total		43181.5	40379.57	43678.85	40473.29
Essential amino acid		20662.04	20430.41	22320.92	21156.66

[0225] 1) SS : Soybean sauce

[0226] MS : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) Seasoning sauce

[0227] CS : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) Seasoning sauce

[0228] PS : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) Seasoning sauce

[0229] 묘사분석을 통하여 대두 및 곤충 소재를 이용한 액상조미소재의 관능 강도 특성을 cob-web graph를 이용해 확인한 결과 전반적으로 제조된 시료들 간의 맛이나 향에는 큰 차이가 없는 것으로 보인다. 반면 외관상의 차이가 나타나는데, 갈색도는 누에번데기 액상조미소재(PS)에서 가장 높게 나타났고 갈색거저리 유충 액상조미소재(MS)에서 가장 낮게 나타났다. 이와 반대로 탁도의 경우 MS가 가장 높았고 PS가 가장 낮게 조사되었다. 냄새나 향미에 있어서는 전반적으로 큰 차이가 보이지 않았지만 곤충 특유의 비린내와 이취로 인해 대두 액상조미소재(SS)보다 강도가 높게 측정되었다. 또한 고소한 맛은 갈색거저리 유충 조미소재(MS)에서 가장 높게 측정됨을 알 수 있었다(도 9).

[0230] 10. *Bacillus subtilis* 종류를 달리하여 제조한 제1발효물을 이용한 액상 조미소재의 기호도 평가(lab test)

[0231] (1) 실험 방법

[0232] 단일 또는 혼합 균주에 따른 발효양상에 나타난 결과에 따르면 *Rhizopus oligosporus*로 1차 발효시키고 *Bacillus subtilis*로 2차 발효 시킬 경우 조미소재에 문제가 될 수 있는 곤충 특유의 향과 발효에 의해 생성되는 콧냄새 발효취를 보완할 수 있을 것으로 확인되어 도 8과 같은 가공공정을 통한 제1 발효물을 제조하였다.

[0233] 또한 곤충소재가 *Bacillus subtilis*로 인해 발효되었을 시 나타날 수 있는 관능적 향미특성과 단백질 분해 정도를 파악하기 위해 제1발효물:제2발효물:볶은 쌀가루 = 6:2:2 비율로 제조한 액상 조미소재를 40℃에서 7일간 발효시킨 후 lab blind test를 통해 관능적 기호도를 파악하였고 제1발효물의 아미노태 질소를 통해 단백질 분해 정도를 측정하였다.

[0234] (2) 실험 결과

[0235] 제1발효물의 아미노태 질소를 통해 *Bacillus subtilis*간의 단백질 분해정도를 측정한 데이터는 표 11과 같고 액상 조미소재를 제조한 후 관능적 기호도를 평가한 내용은 정리하여 표 12에 나타내었다. 표준 균주인 KACC 17798은 *Bacillus* 특유의 강한 불쾌취가 나고 원 곤충재료의 특유한 향취가 그대로 나는 경향을 보였으며 짠맛이 강하게 느껴지는 것으로 조사되었다. 청국장에서 분리한 CIB1의 경우 곤충 특유의 향을 잡아주어 불쾌취나 이취가 많이 나지 않고 짠맛이 약하게 느껴진다는 평가를 받았고, 청국장에서 분리한 CIB2의 경우 17798 균주보다 불쾌취나 이취는 약하였지만 후미가 살짝 쓰고 뚱다는 느낌을 받는 사람이 많은 것으로 조사되었다. *Bacillus*의 종류에 따라 대두단백질과 곤충단백질을 분해하는 정도의 차이가 있었지만 CIB1의 경우 대체적으로 단백질 분해정도를 나타내는 지표인 아미노태 질소 값이 높게 측정되었고 lab test에서도 곤충 특유의 냄새가 낮게 나타나 거부감이 낮고 기호도 평가에서 좋은 결과를 나타내었다. 따라서 *Rhizopus oligosporus*를 이용하여 1차 발효하고 CIB 1으로 2차 발효한 제1발효물을 이용하여 액상 조미소재를 제조할 경우 단백질도 다량 분해할 수 있으며, 곤충 특유의 불쾌취도 제거할 수 있어 소비자의 선호도가 높은 조미소재 제조가 가능할 것으로 판단된다.

표 11

[0236]

Sample ⁴⁾	pH	Titratable Acidity	Amino Nitrogen
----------------------	----	--------------------	----------------

SM	17798	7.76±0.01 ^{a1,2)}	0.34±0.07 ^c	0.69±0.02 ^j
	CIB1	7.49±0.03 ^c	0.60±0.03 ^d	1.30±0.03 ^g
	CIB2	7.38±0.01 ^d	0.77±0.00 ^{cd}	1.53±0.04 ^f
MM	17798	7.65±0.01 ^b	0.96±0.00 ^c	1.98±0.00 ^c
	CIB1	7.77±0.01 ^a	0.96±0.00 ^c	2.42±0.00 ^a
	CIB2	7.73±0.01 ^a	0.86±0.00 ^c	2.18±0.02 ^b
CM	17798	6.83±0.01 ^f	1.63±0.00 ^a	1.94±0.02 ^c
	CIB1	6.84±0.01 ^f	1.49±0.07 ^b	1.67±0.05 ^e
	CIB2	6.95±0.00 ^e	1.34±0.14 ^b	1.77±0.00 ^d
PM	17798	6.47±0.00 ⁱ	1.68±0.07 ^a	0.82±0.00 ⁱ
	CIB1	6.78±0.00 ^g	1.58±0.07 ^a	1.31±0.02 ^g
	CIB2	6.57±0.01 ^h	1.61±0.03 ^a	1.12±0.01 ^h
<i>F-value</i>		3515.931 ^{***3)}	129.690 ^{***}	1180.616 ^{***}

[0237] 1) SM : Fermented Product 1 using Soybean

[0238] MM : Fermented Product 1 using *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm)

[0239] CM : Fermented Product 1 using *Gyllus bimaculatus* (Cricket)

[0240] PM : Fermented Product 1 using *Bombyx mori* Pupa(Silkworm)

표 12

[0242]

Sample ¹⁾		Flavor	
Fermented Product 1	Fermented Product 2		
SM	R+17798	MK	짠맛 강함, 곤충 냄새
		CK	짠 맛과 향
		PK	약간의 단맛으로 인해 짠맛이 약함
	R+CIB1	MK	약간의 점성, 혀를 감싸는 느낌, 맛이 깔끔
		CK	짠맛이 강함. 곤충냄새는 없음
		PK	짠맛이 강함.
	R+CIB2	MK	짠 맛과 곤충 냄새
		CK	살짝 짜고 후미가 뚝음
		PK	후미가 살짝 쓰고 뚝으며 짠 맛
MM	R+17798	SK	많이 짜고 군내, 단순한 느낌
	R+CIB1	SK	곤충 맛 거의 나지 않음, floral 향, 부드러움
	R+CIB2	SK	특유의 곤충 맛이 나며 짠맛 강함
CM	R+17798	SK	비린내, 군내가 남, 짠맛
	R+CIB1	SK	곤충 향이 거의 안 나고 맛과 향이 좋은 편
	R+CIB2	SK	짜고 귀뚜라미 특유의 곤충 향(안 좋게 느껴짐)이 강함
PM	R+17798	SK	누에번데기 향이 강함, 짠맛과 후미가 뚝음
	R+CIB1	SK	짠 맛, 오징어 구운 맛
	R+CIB2	SK	짠 맛이 덜하지만 깊은맛이 없고 후미가 살짝 뚝음

[0243] 1) SM : Fermented Product 1 using Soybean

[0244] MM : Fermented Product 1 using *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm)

- [0245] CM : Fermented Product 1 using *Gyllus bimaculatus* (Cricket)
- [0246] PM : Fermented Product 1 using *Bombyx mori* Pupa(Silkworm)
- [0247] SK : Fermented Product 2 using Soybean
- [0248] PK : Fermented Product 2 using *Bombyx mori* Pupa(Silkworm)
- [0249] MK : Fermented Product 2 using *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm)
- [0250] CK : Fermented Product 2 using *Gyllus bimaculatus* (Cricket)

[0252] **11. 고상 조미소재의 발효기간에 따른 성분 분석과 비교**

- [0253] 곤충 소재 고상 조미소재의 pH, 적정산도, 염도, 가용성 고형분, 환원당의 발효가 완료된 21일차의 데이터를 확인해 본 결과 표 13과 같다.
- [0254] pH의 경우 전반적으로 pH 6.24~6.65로 측정이 되었으며, 적정산도의 경우 1.19~1.80%로 확인이 되었다.
- [0255] 염도의 경우 mohr법으로 측정한 NaCl의 경우는 16.46~19.53%로 확인이 되었고, 염도계로 측정된 salinity의 값은 18.75~22.5%로 측정되었다.
- [0256] 가용성 고형분의 경우는 귀뚜라미 고형조미소재가 45.0 brix%, 환원당은 6.06%로 확인이 되었으며, 갈색거저리 유충 액상조미소재의 경우 가용성 고형분은 50.0 brix%, 환원당이 4.71%로 측정되었다. 누에번데기 고형조미소재는 가용성 고형분이 50.0 brix%로 확인되었고 환원당은 5.79%로 조사되었으며, 대두 된장의 경우 가용성 고형분이 60.0 brix%, 환원당은 9.27%로 가장 높게 나타났다.

표 13

Content Sample	pH	Titratable acidity(%)	Salinity(%)	Total soluble solids(* brix)	Reducing sugar(%)
SP ²⁾	6.46±0.00 ¹⁾	1.50±0.00	18.54±0.00	60.00±0.00	9.27±0.05
MP	6.65±0.00	1.19±0.00	16.46±0.12	50.00±0.00	4.71±0.08
CP	6.24±0.00	1.79±0.00	18.91±0.12	45.00±0.00	6.06±0.09
PP	6.55±0.00	1.80±0.00	19.53±0.07	50.00±0.00	5.79±0.02

- [0257]
- [0258] 1) Mean±S.D.
- [0259] 2) SP : Soybean paste (doenjang; fermented Korean soybean paste)
- [0260] MP : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) seasoning paste
- [0261] CP : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) seasoning paste
- [0262] PP : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) seasoning paste
- [0264] 곤충소재 고상 발효조미소재의 21일차 일반성분(탄수화물, 조단백질, 조지방, 조회분 및 무염성 회분)은 표 14와 같다.
- [0265] 탄수화물은 곤충소재 고상 조미소재가 20.10~22.65%로 확인이 되었고, 대두 고상 조미소재(된장)이 35.0%로 가장 높게 나타났다. 조단백질은 대두 된장이 27.29%로 가장 낮았으며, 갈색거저리 유충 고상조미소재가 32.90%, 누에번데기 고상조미소재는 37.54%, 귀뚜라미 고상조미소재가 41.51% 순으로 확인이 되었다. 조지방의 경우는 대두 된장이 9.75%로 가장 낮았으며 귀뚜라미 고상조미소재가 13.69%, 누에번데기 고상조미소재는 20.34%, 갈색거저리 유충 고상조미소재는 24.49%로 조사되었다. 조회분은 대두가 23.25%로 가장 높았으며, 곤충소재 고상조

미소재는 19.31~22.04%로 유사하게 확인되었다. 또한 소금농도를 제외한 무염성 회분은 대두된장이 4.71%로 가장 높았으며, 곤충소재 고상조미소재의 경우 1.62~2.85%로 확인이 되었다.

표 14

[0266]

Content Sample	Carbohydrate	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Saltless ash
SP ²⁾	35.00±3.19 ¹⁾	27.29±0.13	9.75±3.18	23.25±0.14	4.71±0.24
MP	20.45±0.21	32.90±0.26	24.49±0.54	19.31±0.07	2.85±0.57
CP	22.65±0.32	41.51±0.13	13.69±0.29	20.53±0.48	1.62±0.76
PP	20.10±0.36	37.54±0.38	20.34±0.02	22.04±0.05	2.51±0.55

[0267]

1) SP : Soybean paste (doenjang; fermented Korean soybean paste)

[0268]

MP : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) seasoning paste

[0269]

CP : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) seasoning paste

[0270]

PP : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) seasoning paste

[0272]

곤충 소재 고상 발효조미소재의 아미노태 질소함량과 총질소 함량 및 질소분해율(Nitrogen Degradation Ratio)의 결과는 표 15와 같다.

[0273]

아미노태 질소함량의 경우 0.98~1.13%로 측정이 되었다. 총질소의 경우는 대두 된장이 4.37%로 가장 낮게 나타났으며, 갈색거저리 유충 고상조미소재가 5.26%로 확인이 되었고, 누에번데기 고상조미소재가 6.00%로 분석되었으며, 귀뚜라미 고상조미소재는 6.64%로 조사되었다. 질소분해율의 경우 대두 된장이 24.67%로 가장 높았으며 곤충소재 고상조미소재는 16.67~18.84%로 확인이 되었다.

표 15

Content Sample	Amino nitrogen	Total nitrogen	NDR
SP ²⁾	1.07±0.00 ¹⁾	4.37±0.00	24.67±0.27
MP	0.98±0.00	5.26±0.00	18.56±0.18
CP	1.11±0.00	6.64±0.00	16.67±0.11
PP	1.13±0.00	6.00±0.02	18.84±0.53

[0274]

[0275]

1) SP : Soybean paste (doenjang; fermented Korean soybean paste)

[0276]

MP : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) seasoning paste

[0277]

CP : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) seasoning paste

[0278]

PP : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) seasoning paste

[0280]

곤충 소재 고상 조미소재의 발효가 완료된 14일차의 데이터의 유리 아미노산 분석 결과는 표 16과 같다.

[0281]

고상 조미소재의 분석된 아미노산 중 Glutamate의 함량이 곤충 액상 조미소재에 비해 2배 가까이 높게 측정되었으며 쌍별 귀뚜라미(CS)의 필수 아미노산은 9445.64mg/kg으로 가장 높게 나타났으며 총 아미노산은 평균 1000~3000mg/kg, 필수아미노산의 함량은 평균 1000mg/kg로 높게 나타났다.

표 16

Amino acid	SP ¹⁾	MP	CP	PP
Aspartate	1888.15	1384.54	1683.41	1636.18
Glutamate	4066.03	2036.12	2877.16	2724.87
Serine	219.43	165.9	554.28	529.68
Histidine	600.03	559.55	663.48	693.18
Glycine	493.1	563.37	639.94	596.92
Threonine	727.99	643.44	918.94	778.22
Arginine	54.42	30.54	63.08	44.2
Alanine	1325.53	1518.16	1620.21	1063.09
Tyrosine	344.29	660.47	812.06	283.37
Valine	1239.68	1315.81	1195.03	1201.14
Methionine	259.55	213.93	366.11	374.97
Phenylalanine	1255.8	1126.82	1300.15	1151.87
Isoleucine	1369.41	1070.66	1256.69	1119.82
Leucine	2096.95	1771.87	2049.51	1735.89
Lysine	1021.25	1523.74	1632.65	1467.16
Proline	1671.61	1604.85	1379.07	1058.58
Total	18633.21	16189.77	19011.79	16459.16
Essential amino acid	8625.08	8256.36	9445.64	8566.45

[0283] 1) SP : Soybean paste (doenjang; fermented Korean soybean paste)

[0284] MP : Fermented *Tenebrio molitor* larvae(Mealworm) seasoning paste

[0285] CP : Fermented *Gyllus bimaculatus* (Cricket) seasoning paste

[0286] PP : Fermented *Bombyx mori* Pupa(Silkworm) seasoning paste

[0288] **12. 분말 형태의 조미소재의 snack과 flake로의 활용**

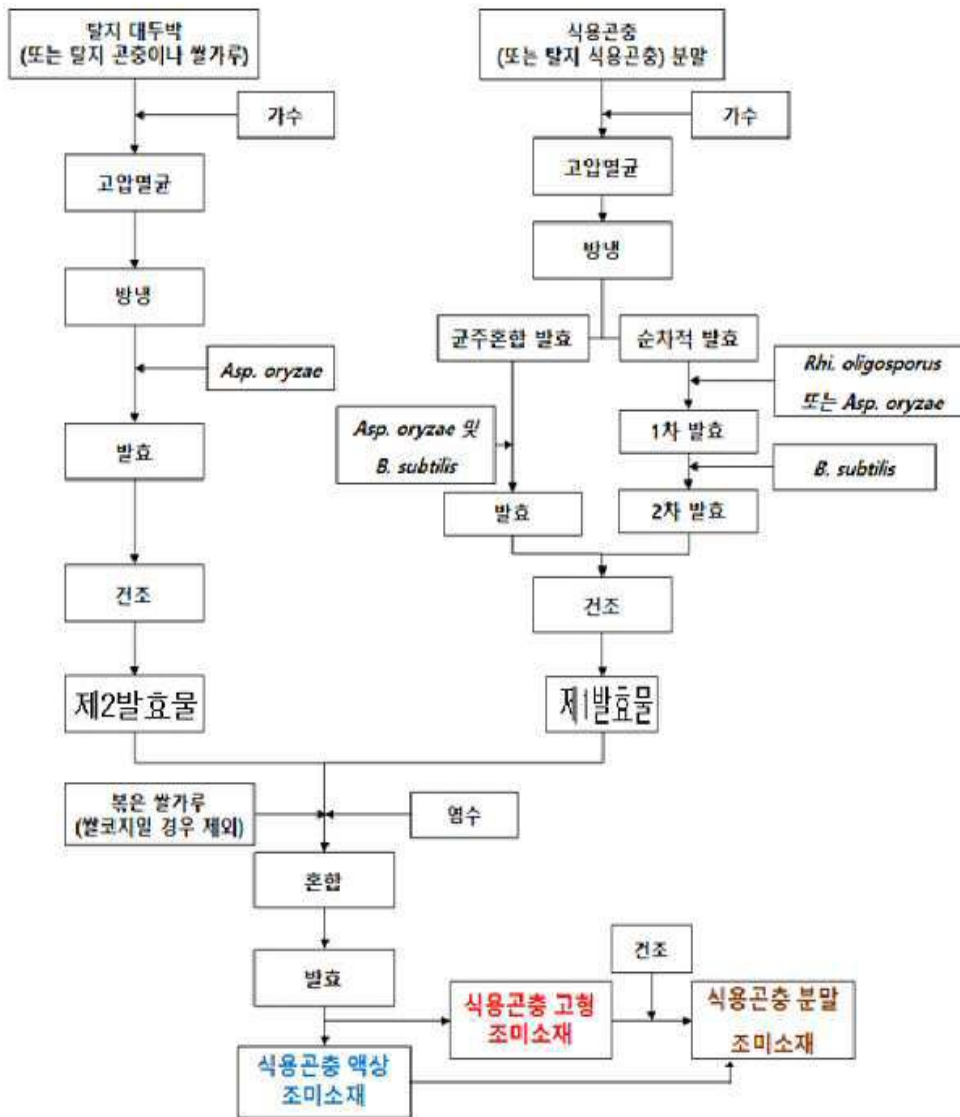
[0289] 고상 조미소재는 단백질 등 식품으로 이용가능한 성분이 다량 존재하여, 이를 열풍 건조 분말화하여 제조된 분말형태의 조미소재의 경우, 조미소재로서의 활용뿐만 아니라 flake, 스낵 등 다양한 식용품으로 활용될 가치가 있다고 판단이 되었다.

[0290] lab scale에 따라 고상 조미소재 분말(분말 형태의 조미소재)을 이용하여 스낵 및 flake를 제조하였으며, 시료는 도 10과 도 11에 나타내었다.

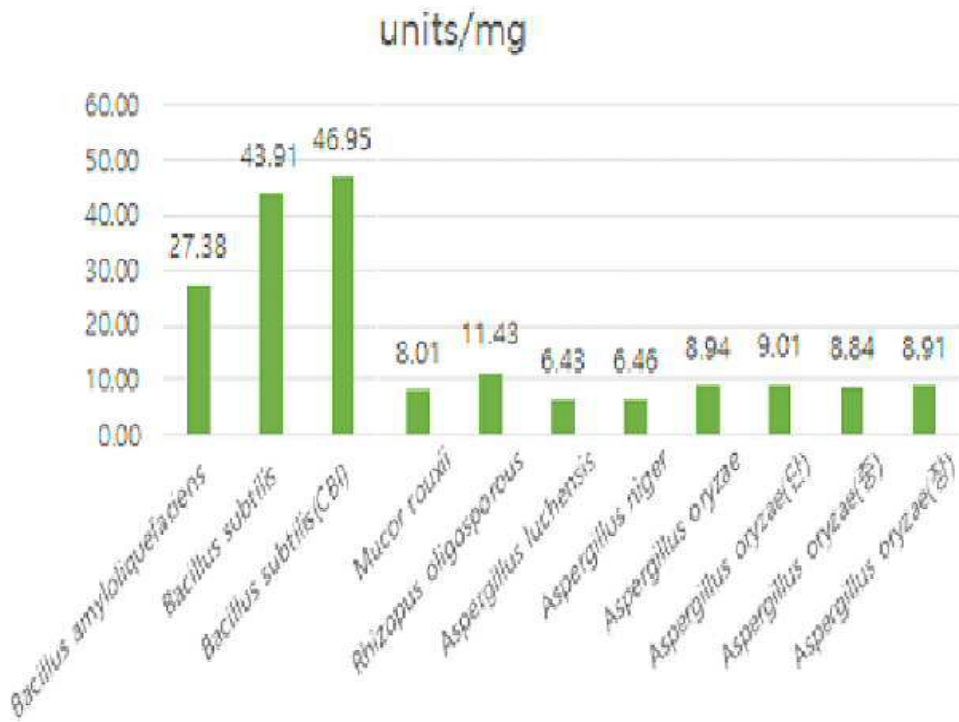
[0291] 본 lab에서 제조한 flake는 압출성형방법으로 제조하였다. 압출성형방법은 곡류를 분쇄, 압출 성형하여 펠릿을 제조한 후 이를 압착하여 flake를 제조하는 방법으로 원료간의 재조합이 가능하고 공정도 비교적 간단하여 flake제조에 많이 이용되고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 고상 조미소재 분말을 이용한 flake제조는 압출성형방법을 통해 제조하였으며, 제조방법은 고상 조미소재를 50℃로 열풍건조한 후 옥수수가루와 비율별로 혼합하고 염도를 조정하여 flake형태로 제조할 수 있었다. 스낵의 경우, 고상 조미소재 분말을 이용하여 일반 스낵제조회사의 제조방법에 따라 제조할 수 있었다.

도면

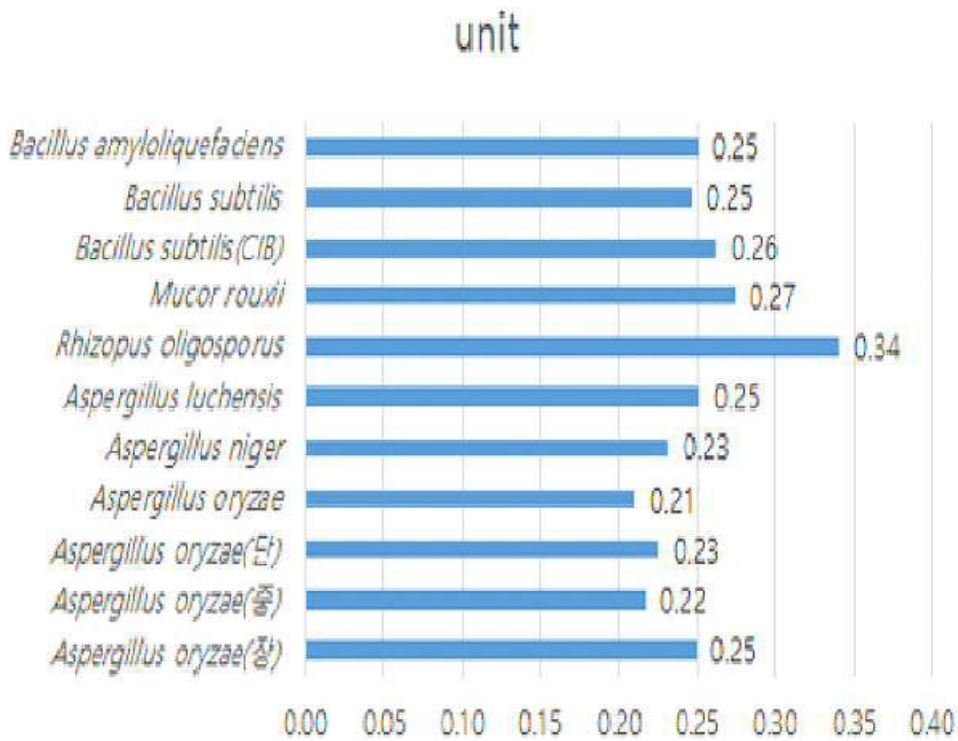
도면1



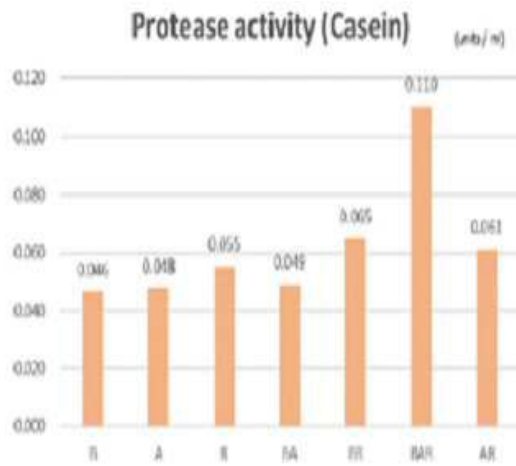
도면2



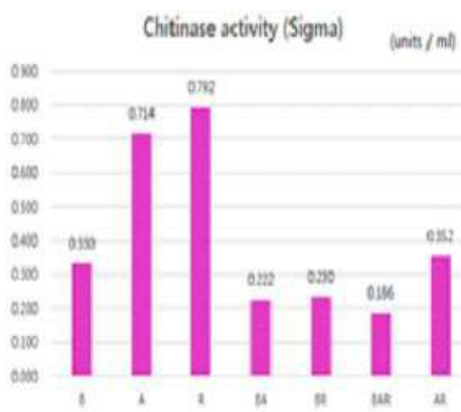
도면3



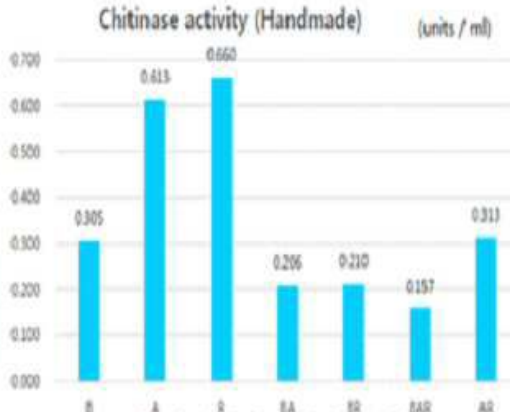
도면4



BAR > BR > AR > R > BA > A > B

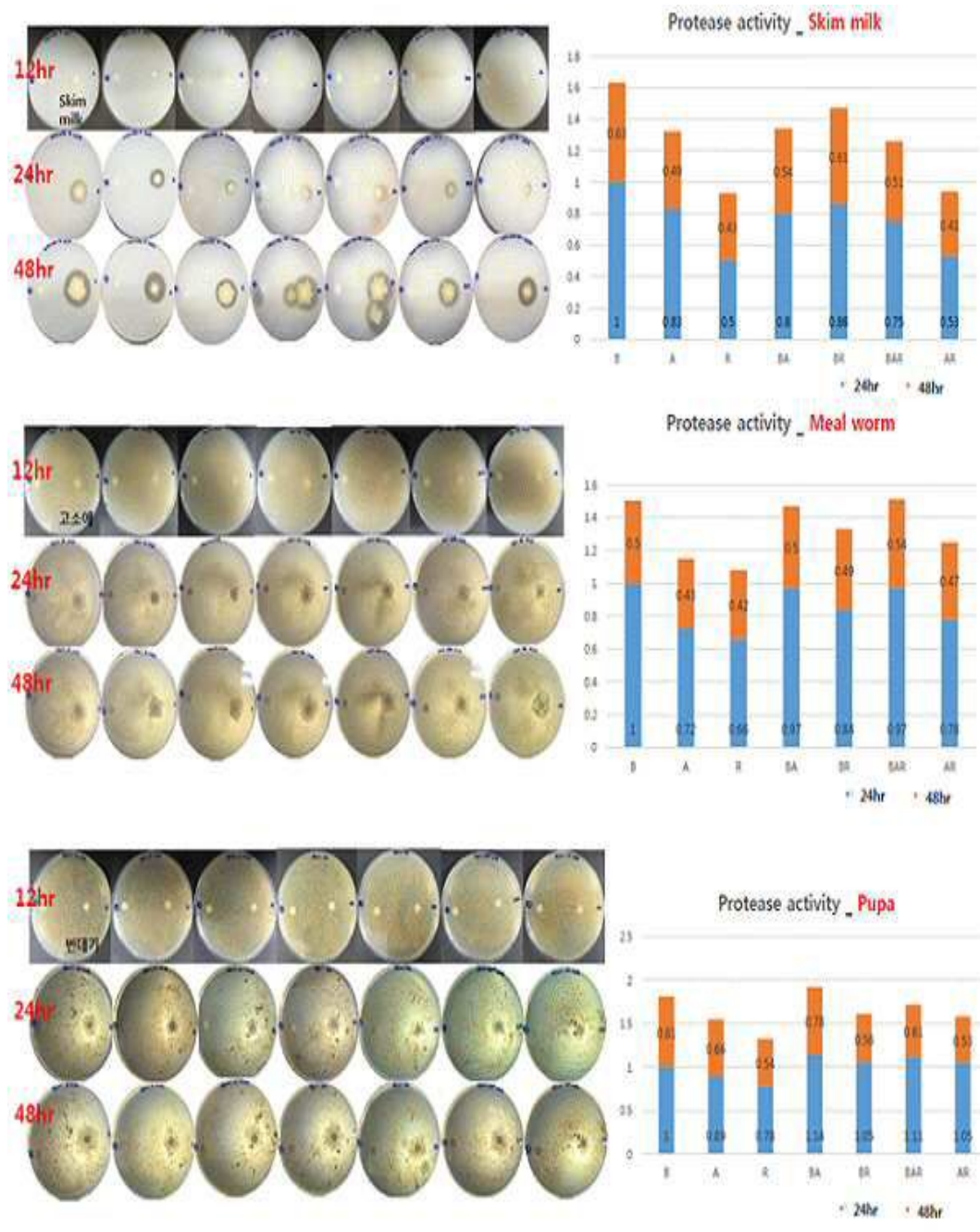


R > A > AR > B > BR > BA > BAR



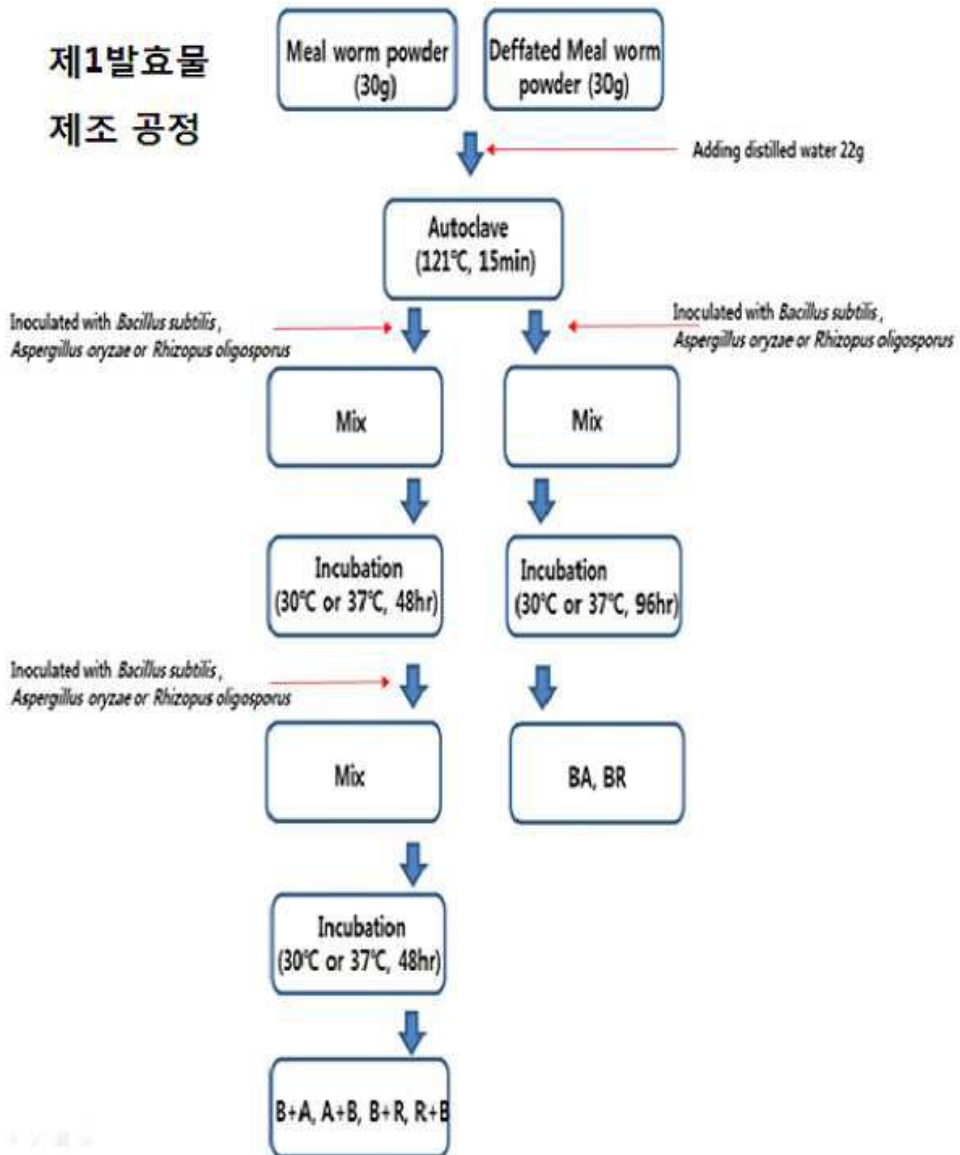
R > A > AR > B > BR > BA > BAR

도면5

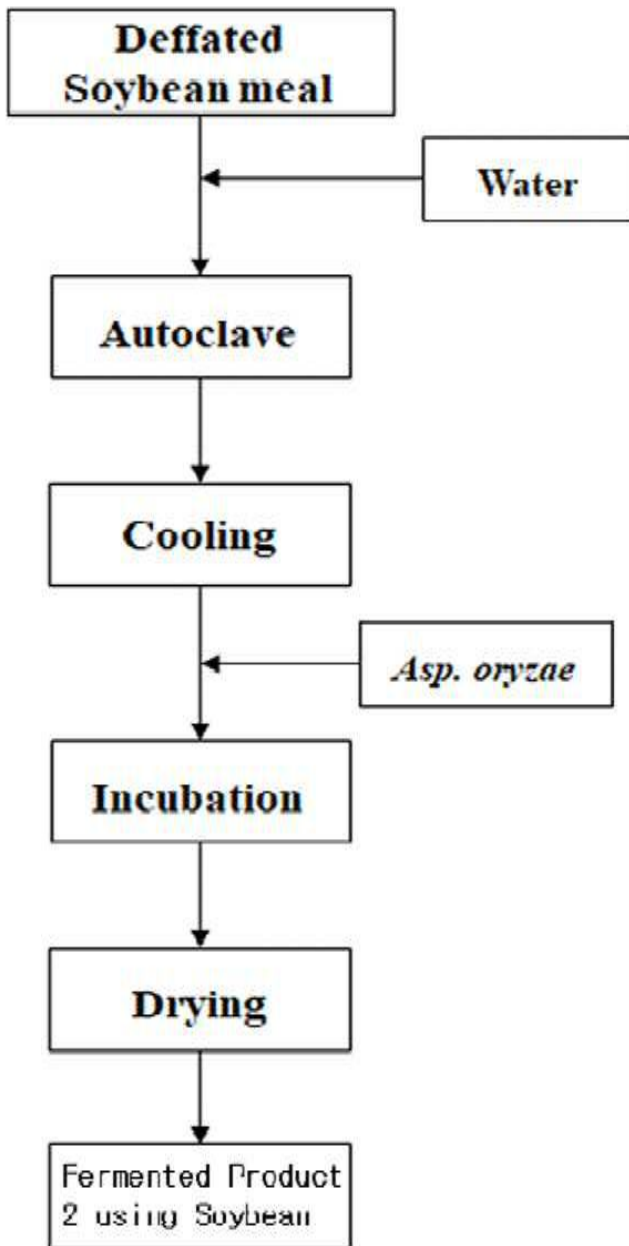


도면6

제1발효물
제조 공정

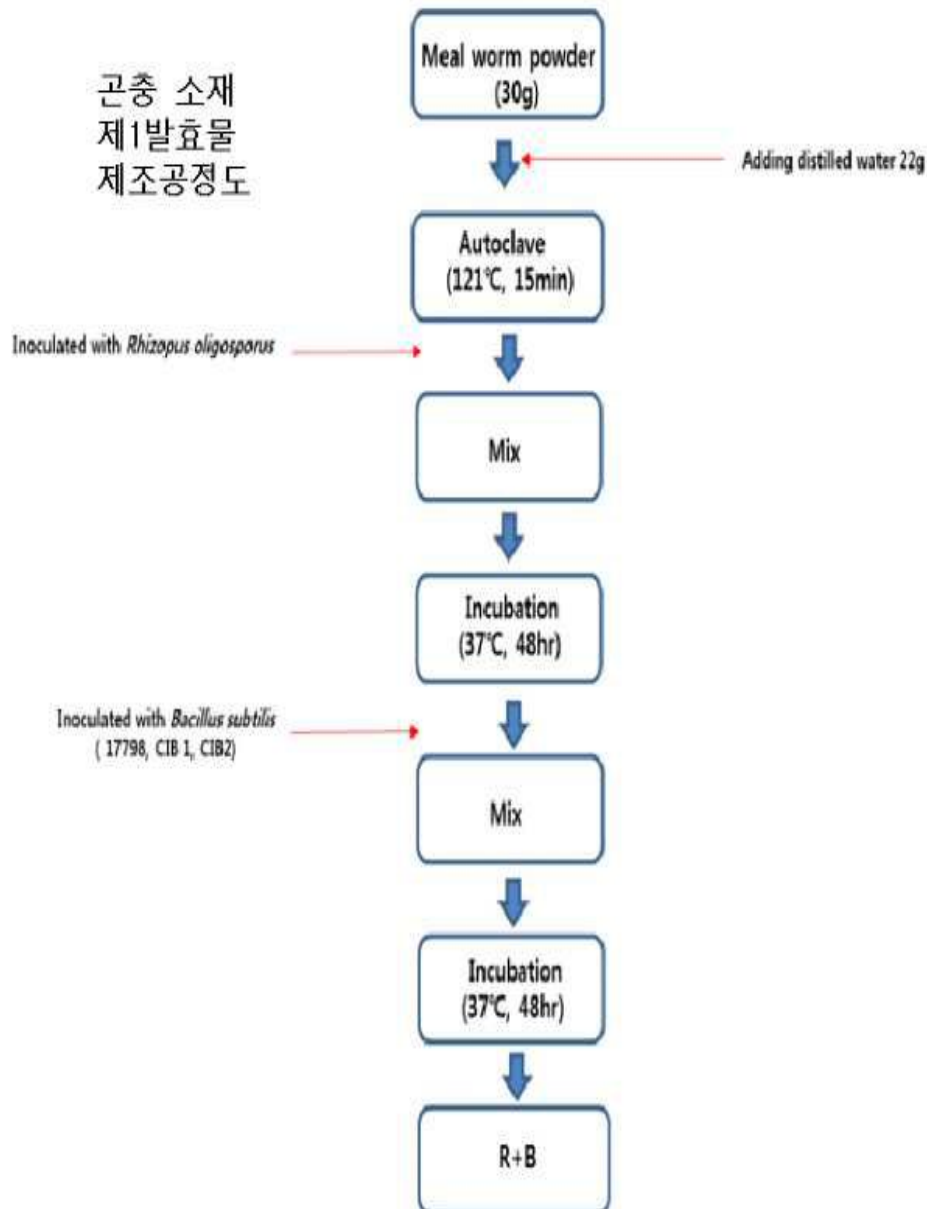


도면7

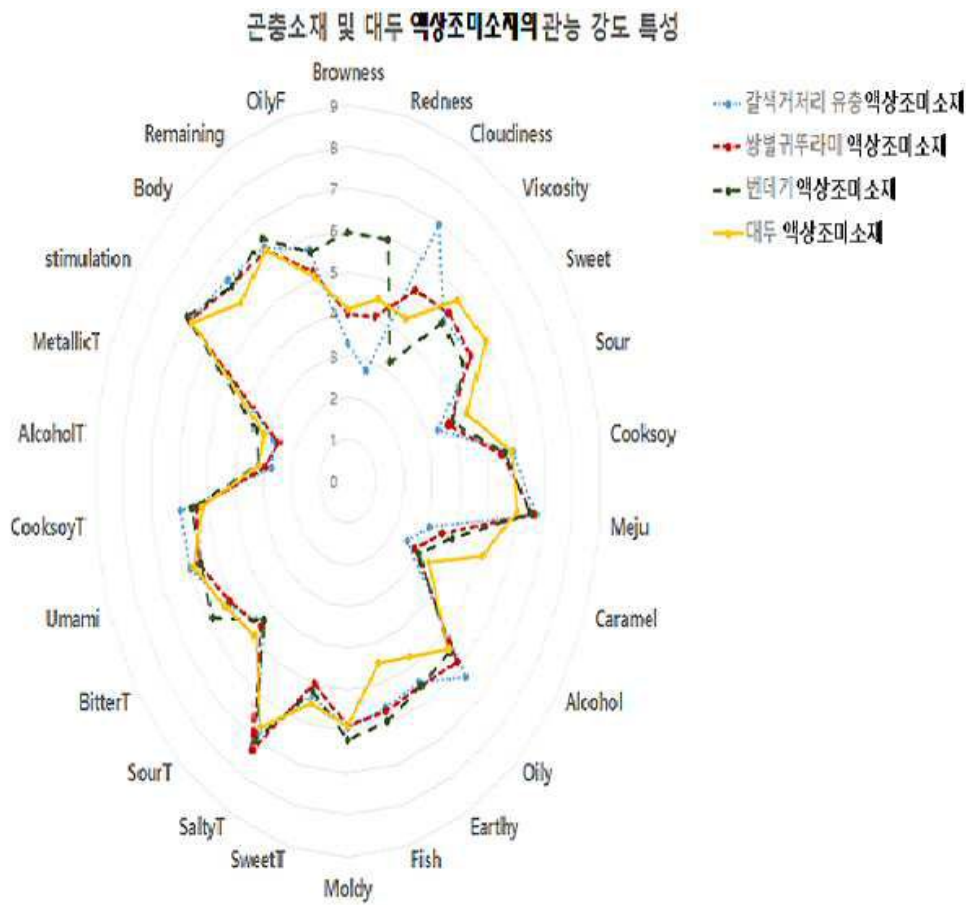


도면8

곤충 소재
제1발효물
제조공정도



도면9



도면10



도면11

