

(43) 공개일자 2025년06월05일

- (71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

- 경상남도

경상남도 창원시 의창구 중앙대로 300 (사림동)

(72) 발명자

김진우

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호

최옥희

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

(54) 발명의 명칭 **효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법**

본 발명은 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법은 이취로 인해 기호도를 충족하기 못하였던 식용곤충의 특이한 이취를 현저히 감소시킬 수 있는 효과가 있으며, 그중에서도 특히 흰점박이꽃무지 유충에 대하여 이취가 현저히 감소될 수 있어, 식품 및 사료 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

[illegible]

(52) CPC특허분류

A23K 10/20 (2016.05)

A23L 35/00 (2025.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2250/204 (2013.01)

(72) 발명자

이예영

경상남도 창원시 마산합포구 진동면 진북산업로 58, 106동 302호

이슬비

경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61, 107동 802호

배성문

경상남도 진주시 소호로 39, 119동 1603호

박지혜

경상남도 창원시 성산구 동산로 115, 109동 302호

김중원

경상남도 진주시 대발골로 92, 205동 801호

이영한

경상남도 진주시 진주성로182번길 9

장다현

경상남도 진주시 금산면 덕의길 15, 101동 1403호

윤진욱

경상남도 진주시 초전남로 31-4, 401호

김영광

경상남도 진주시 금산면 중장로154번길 49, 102동 303호

정찬식

부산광역시 사하구 다대로429번길 20, 209동 1404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395077480

과제번호 RS-2021-RD01241

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 경상국립대학교 농업생명과학연구원

연구사업명 지역특화작목 기술개

연구과제명 식용곤충을 이용한 기호성 식품과 반려동물사로 개발 (위탁과제명:곤충유래 이취 저

감을 위한 미생물자원 개발)

과제수행기관명 경상국립대학교산학협력단

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

식용곤충을 절식시켜 체내 배설물을 제거하는 단계; 및
식용곤충에 효모를 급이하는 단계를 포함하는, 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 식용곤충은 흰점박이꽃무지 유충, 갈색거저리 유충, 쌍별귀뚜라미, 벼메뚜기, 백강잠누에, 누에번데기 및 장수풍뎅이 유충으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 효모는 위커하모마이세스 속(*Wickerhamomyces*) 균주인 것을 특징으로 하는, 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 위커하모마이세스 속(*Wickerhamomyces*) 균주는 위커하모마이세스 아노말러스 Y29(*Wickerhamomyces anomalus* Y29)(수탁번호: KACC 83082BP)인 것을 특징으로 하는, 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 위커하모마이세스 아노말러스 Y29는 보리알로부터 분리된 것을 특징으로 하는, 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법.

청구항 6

- a) 식용곤충을 절식시켜 체내 배설물을 제거하면서 효모를 급이하는 단계;
- b) 식용곤충을 세척하여 동결건조하는 단계; 및
- c) 동결건조한 시료를 분쇄하는 단계를 포함하는, 식용곤충 분말 제조방법.

청구항 7

제6항의 제조방법으로 제조되는 식용곤충 분말.

청구항 8

제7항의 식용곤충 분말을 포함하는, 식품 조성물.

청구항 9

제7항의 식용곤충 분말을 포함하는, 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)는 딱정벌레목, 풍뎅이과, 풍뎅이목에 속하는 곤충으로 한국, 일본, 대만, 중국, 유럽에 서식한다. 이 곤충의 성충은 복숭아, 배 등의 성숙한 과일, 옥수수, 참나무 수액을 먹으며, 유충은 퇴비, 건조 더미 등 유기물이 풍부한 토양에 서식하며 살아있는 식물의 지하 부분에는 거의 해를 끼치지 않는 것으로 알려져 있다.

[0004] 흰점박이꽃무지 유충은 한국에서 다양한 질병에 대한 전통 의약품으로 사용되어 왔다. 흰점박이꽃무지 유충은 필수아미노산, 불포화지방산, 식이섬유, 미네랄 등을 다량 함유하고 있어, 우수한 영양공급원으로 평가되고 있다. 이 때문에 흰점박이꽃무지 유충은 영양가가 높은 대체 식품소재로 인식되고 있으며, 이를건강기능식품으로 활용하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다.

[0005] 다만, 흰점박이꽃무지 유충은 특유의 이취로 인해 기호적 특성이 크게 저하되어 식품소재로 활용에 어려움이 있고, 현재 이를 극복하고자 하는 연구가 진행되고 있으나, 이취 저감 정도가 소비자들에게 선호되기에는 여전히 부족한 실정이다.

[0006] 이에 본 발명자들은 효모를 이용한 흰점박이꽃무지 유충의 이취 성분 원인 규명 및 이취 원인의 저감화 방법을 개발하였으며, 이의 휘발성 화합물 향미 분석등의 성분 분석을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2131882호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 식용곤충 분말 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조되는 식용곤충 분말을 제공하는 데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 식용곤충 분말을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 식용곤충 분말을 포함하는 사료 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 식용곤충을 절식시켜 체내 배설물을 제거하는 단계; 및 식용곤충에 효모를 급이하는 단계를 포함하는, 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법을 제공한다.

[0016] 이어서, 본 발명은 a) 식용곤충을 절식시켜 체내 배설물을 제거하면서 효모를 급이하는 단계; b) 식용곤충을 세척하여 동결건조하는 단계; 및 c) 동결건조한 시료를 분쇄하는 단계를 포함하는 식용곤충 분말 제조방법을 제공한다.

[0017] 나아가, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조되는 식용곤충 분말을 제공한다.

[0018] 더불어, 본 발명은 상기 식용곤충 분말을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0019] 마지막으로, 본 발명은 상기 식용곤충 분말을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법은 이취로 인해 기호도를 충족하기 못하였던 식용곤충의 특이한 이취를 현저히 감소시킬 수 있는 효과가 있으며, 그중에서도 특히 흰점박이꽃무지 유충에 대하여 이취가 현저히 감소될 수 있어, 식품 및 사료 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, Neighbor Joining method을 사용하여 구축한 LSU rRNA 유전자의 D1/D2 영역 서열에 따른 계통수를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, PLS-DA scores plot 및 permutation test(A)와 *W. anomalus* Y29 급이와 물 급이 흰점박이꽃무지 유충의 휘발성 화합물 프로필에 대한 PLS-DA score plot(B)을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, *W. anomalus* Y29 급이와 물 급이 흰점박이꽃무지 유충의 휘발성 화합물의 계층적 클러스터링 히트맵을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, *W. anomalus* Y29 급이와 물 급이(W) 흰점박이꽃무지 유충의 휘발성 화합물의 Box plots를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, *W. anomalus* Y29가 흰점박이꽃무지 유충의 성장에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/

고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.

- [0028] 일 측면에서, 본 발명은 식용곤충을 절식시켜 체내 배설물을 제거하는 단계; 및 식용곤충에 효모를 급이하는 단계를 포함하는, 효모를 이용한 식용곤충의 이취 저감 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 식용곤충은 흰점박이꽃무지 유충, 갈색거저리 유충, 쌍별귀뚜라미, 벼메뚜기, 백강잠누에, 누에번데기 및 장수풍뎅이 유충으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것, 바람직하게는 흰점박이꽃무지 유충일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 효모는 위커하모마이세스 속(*Wickerhamomyces*) 균주인 것, 바람직하게는 위커하모마이세스 아노말러스(*Wickerhamomyces anomalus*), 더 바람직하게는 위커하모마이세스 아노말러스 Y29(*Wickerhamomyces anomalus* Y29)(수탁번호: KACC 83082BP)일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 위커하모마이세스 아노말러스 Y29는 보리알로부터 분리된 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 일 측면에서, 본 발명은 a) 식용곤충을 절식시켜 체내 배설물을 제거하면서 효모를 급이하는 단계; b) 식용곤충을 세척하여 동결건조하는 단계; 및 c) 동결건조한 시료를 분쇄하는 단계를 포함하는 식용곤충 분말 제조방법을 제공한다.
- [0035] 일 측면에서, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조되는 식용곤충 분말을 제공한다.
- [0037] 일 측면에서, 본 발명은 상기 식용곤충 분말을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 식용곤충 분말을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0039] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [0040] 또한 상기 식품 조성물은 식용곤충 분말 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수록된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수

있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 식용곤충 분말을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 식용곤충 분말을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 본 발명의 식용곤충 분말을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 식용곤충 분말과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 식용곤충 분말의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0043] 일 측면에서, 본 발명은 상기 식용곤충 분말을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명의 식용곤충 분말은 식용곤충의 유효한 성분 또는 유효한 영양성분 인하여 동물이나 가축의 성장 촉진제로서 사료 조성물에 포함될 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따른 식용곤충 발효물을 포함하는 사료는 당업계에 공지된 다양한 형태의 사료로 제조 가능하며, 바람직하게는 농후사료, 조사료 또는 특수사료가 포함될 수 있다. 농후사료에는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자 열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머진인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물(液狀物)을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(肉粉), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류 등이 있다. 조사료에는 야초, 목초, 풋베기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋베기작물, 곡실(穀實) 등을 사일로에 채워 놓고 젖산 발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎 등이 있다. 특수사료에는 폐각, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료 원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제 등이 있다.

[0045] 본 발명에 따른 사료 조성물은 다양한 사료 첨가제를 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 용어 "사료 첨가제"란 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질 개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 말한다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨(중조), 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리아산 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 사료 조성물은 성장 촉진을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용 가능하다. 상기 개체는 동물, 예를 들어 비-영장류(예를 들면, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 및 마우스) 및 영장류(예를 들면, 원숭이, 예를 들어 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이 및 침팬지)를 비롯한 포유동물을 나 타낸다. 또 다른 구체예에서, 상기 개체는 축산용 동물(예를 들면, 말, 소, 돼지 등) 또는 애완용 동물(예를 들면, 개 또는 고양이)이다. 또한, 어류, 예를 들어, 넙치, 가자미, 뱀장어, 민물장어, 바다장어, 우럭이다. 본 발명에 따른 사료 조성물의 복용량은 동물의 종(species), 크기(size), 무게(weight), 나이(age)와 같은 다수의 요인들에 좌우될 것이다. 원칙적으로, 전형적인 복용량은 개체/일 당 0.001 내지 100 g의 범위일 수 있다. 다만, 이에 한정되지 않는다.

[0049] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한

실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0051] <준비에 1> 흰점박이꽃무지 유충 준비

[0052] 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 2령 유충은 진주유충농장(Jinju, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 흰점박이꽃무지의 사육은 경상남도농업기술원 식용곤충연구소에서 진행하였으며, 65% 수분을 함유한 참나무발효톱밥(진주유충농장, Jinju, Korea)을 넣은 50 L 상자(360×510×285 mm)에 흰점박이꽃무지 2령 유충 150마리를 넣었다. 일주일 간격으로 참나무발효톱밥을 교체하였으며, 25 °C, 60% 습도에서 28일 동안 사육하여 3령 유충을 수확하였다.

[0054] <실시에 1> 효모 분리 및 동정

[0055] 1-1. 효모 분리

[0056] 경상남도농업기술원으로부터 제공받은 경상남도 지역에서 재배 및 수확된 보리알 100 g을 멸균된 막자사발에서 분쇄하였다. 그 후, 분쇄된 보리알을 멸균된 보리맥아추출물(경상국립대학교 맥주 양조동아리로부터 제공받음) 1,000 mL가 담긴 플라스크에 넣고 25 °C에서 1시간 동안 진탕 배양하였다. 현탁액 1 mL를 50 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin) 및 50 µg/mL 암피실린(ampicillin)이 보충된 YPD 한천 플레이트에 도말하고 효모 콜로니가 보일 때까지 25 °C에서 5일 동안 배양하였다. 동일한 배지에서 독특한 형태를 갖는 단일 콜로니를 순수 분리한 후, 배양 4일째에 배양물 냄새를 맡아 향긋한 냄새가 나는 3개의 분리균을 얻었다. 효모 콜로니는 순수 분리하여 25%(v/v) 글리세롤(glycerol)이 포함된 YPD 배지액에 혼합한 후, -80 °C에서 보관하였다.

[0057] 그 결과, 보리알로부터 주요 콜로니를 형성한 3개의 분리균인 Y29, MHGNU Y31 및 MHGNU Y32가 분리되었다.

[0059] 1-2. 효모 동정

[0060] 상기 실시예1-1에서 분리된 효모 분리균을 동정하기 위하여, internal transcribed spacer(ITS) 영역과 large ribosomal subunit(LSU) D1/D2 영역을 프라이머 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4(5'-TCCTCCGCTATTGATATGC)와 NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'), NL4(5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3')로 각각 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 Expin Gel SV(GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였으며, PCR 산물의 염기서열은 Macrogen Services(Daejeon, Korea)에서 분석하였다. DNA 서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information) GenBank 데이터베이스의 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램을 사용하여 분석하였으며, MEGA11 소프트웨어와 neighbor-joining method를 사용하여 LSU 영역의 뉴클레오티드 서열을 기반으로 한 계통수를 생성하였다.

[0061] 분리균 Y29, MHGNU Y31 및 MHGNU Y32의 ITS영역(560bp)의 rRNA 유전자 서열은 동일하였으며, GenBank(OR497838, OR497839 및 OR497840)에 기탁되었다. 분리주의 ITS 영역 서열은 중국의 보리에서 분리된 위커하모마이세스 아노말러스(*Wickerhamomyces anomalus*) 균주 Y6(GenBank accession no. MT742675)의 서열과 99.3% 동일성을 나타냈다. 분리균 Y29, MHGNU Y31 및 MHGNU Y32의 rRNA LSU D1/D2 영역 서열(592 bp)은 동일하였으며, GenBank(OR497846, OR497847 및 OR497848)에 기탁되었다. 분리균들의 LSU 영역의 서열은 *W. anomalus* 클론 17(GenBank OQ067121)의 서열과 100% 동일성을 나타내었다.. LSU rRNA 유전자의 D1/D2 도메인 서열을 기반으로 한 계통수는 Y29, MHGNU Y31 및 MHGNU Y32가 계통군 *W. anomalus* 내에 위치함을 보여주었다(도 1 참조).

[0063] <실시에 2> *Wickerhamomyces anomalus* Y29의 접종

[0064] 상기 실시예 1의 위커하모마이세스 아노말러스 Y29(*Wickerhamomyces anomalus* Y29)(수탁번호: KACC 83082BP)(10⁸ CFU/mL)를 YPD 배지에서 2일 동안 배양하였다. 그후, 상기 준비예 1에서 수집된 흰점박이꽃무지 3

령 유충의 체내 배설물을 제거하기 위하여, 절식하는 동안 수집된 3령 유충을 상기 *W. anomalus* Y29 현탁액에 옮겼다. 2일 동안 *W. anomalus* Y29의 현탁액을 8시간 간격으로 교체하였으며, 증류수를 음성 대조군으로 사용하였다. 현탁액과 증류수는 유충의 몸체가 2/3 정도 잠기게 하여 호흡할 수 있도록 조절하였다. 절식 과정 후, 유충을 증류수로 세척하여 동결건조하였다. 동결건조된 시료를 식품 분쇄기를 사용하여 분쇄하고, 분석 전 -70 °C에서 밀폐 용기에 담아 보관하였다.

[0066] <실험예 1> 흰점박이꽃무지 유충의 휘발성 화합물 측정

[0067] 1-1. 흰점박이꽃무지 유충의 휘발성 화합물 측정

[0068] 흰점박이꽃무지 유충의 동결건조 분말을 내부표준물질과 NaCl 0.04 g을 함유한 증류수 2 mL를 사용하여 추출하였다. 샘플을 25 °C에서 10분 동안 가열하며 교반한 후, SPME(Solid Phase Micro-Extraction) fiber에 10분간 흡착시켰다. 휘발성 화합물의 분석은 TQ8030 Mass Spectrometer(Shimazu, Tokyo, Japan)가 장착된 GC-2010 Plus gas chromatograph를 사용하여 수행되었으며, 샘플은 DB-WAX column(30m × 0.25mm id, 0.25 μm film thickness, J&W Scientific, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 분석되었다. 헬륨은 carrier gas로 1 mL/min의 유속으로 적용되었다. 주입기와 검출기의 온도는 각각 250 °C와 230 °C로 설정되었다. GC oven 온도 프로그램은 40° C에서 3분 동안 유지하고, 5° C/min으로 90° C까지 증가시키고, 19° C/min으로 230° C까지 증가시킨 다음, 230° C에서 5분간 유지하였다. 휘발성 화합물은 Wiley Registry 11th edition/National Institute of Standards and Technology(NIST) Mass Spectral Library에서 제공되는 샘플 데이터의 MS ratios와 비교하여 동정하였다.

[0069] GC-MS를 통하여 측정한 휘발성 화합물을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

휘발성 화합물		함량
Hydrocarbon group	2-methylheptane	34.61%
	2,4-dimethylheptane	
	undecane	
	decane	
	2-methyloctane	
	4-methyldecane	
	3,7-dimethyldecane	
	dodecane	
	pentadecane	
	tetradecane	
	ethylbenzene	
	1,2-dimethylbenzene	
	1,3,5-trimethylbenzene	
	1,2,3,4-tetramethylbenzene	
	1,3-di-tert-butylbenzene	
	1,2,4, 5-tetramethylbenzene	
	butylated hydroxytoluene	
	phenol	

Ketone group	2,3-butanedione	25.0%
	3-heptanone	
	ketone, methyl 2,2,3-trimethylcyclopentyl	
	2-heptanone	
	3-octanone	
	2-octanone	
	3-hydroxy-2-butanone	
	4,6-dimethyl-2-heptanone	
	3-hydroxy-2-pentanone	
	2-undecanone	
	acetophenone	
	6-methyl-5-hepten-2-one	
	2-nonanone	
Alcohol group	2-butyl-1-octanol	19.23%
	2-methyl-1-butanol	
	3-methyl-1-butanol	
	2,4-dimethyl-1-heptanol	
	1-undecanol	
	1-octen-3-ol	
	3-octanol	
	2-ethyl-1-hexanol	
	5-ethyl-2-nonanol	
	2-undecanol	
Aldehyde group	2-methyl-2-butenal	7.69%
	2-ethyl-2-hexenal	
	nonanal	
	2-methyl-2-pentenal	
Sulphur-containing group	methyl propyl disulfide	3.85%
	propyl disulfide	
Terpene group	p-cymen/m-cymen	3.85%
	o-cymen	
Acid group	2-ethylbutanoic acid	1.92%
Other groups	chloroform	3.85%
	indole	
Total		100%

- [0073] 상기 표 1에서 보듯이, Hydrocarbon group에 포함되어 있는 2-methylheptane, 2,4-dimethylheptane, decane, 4-methyldecane, tetradecane, 및 butylated hydroxytoluene은 불쾌한 냄새가 나는 화합물로 알려져 있으며, 특히 butylated hydroxytoluene은 미국 연방의약국(GRAS)에서 식품첨가물로 인정한 화합물이지만 여전히 독성이 있다고 알려진 화합물이다.
- [0074] Ketone group에 포함되어 있는 ketone은 주로 불포화지방산과 같은 지질이 산화되어 생성된다. 흰점박이꽃무지 유충은 불포화지방산 함량이 상당히 높으며, 불포화지방산은 포화지방산보다 더 불안정하고 쉽게 산화되어 ketone 화합물을 형성할 수 있다. 이러한 ketone 화합물은 부분적으로 불쾌한 냄새를 생성하는 역할을 한다.
- [0075] Alcohol group에 포함되어 있는 1-octen-3-ol은 낮은 냄새 역치에서 곤충의 비릿한 이취를 방출하는 물질로 알려져 있다.
- [0076] Aldehyde group의 휘발성 유기 aldehyde 화합물은 지질 산화에서 유래되며, 이러한 화합물은 썩은 냄새를 생성하는 것으로 알려져 있다.
- [0077] 또한, monoterpene(p-cymene 및 o-cymene)은 식물에 다량으로 존재하고 있으며, 곤충이 식물을 먹을 때 이 화합물도 곤충의 체내에 저장되게 된다. 이 화합물은 기분 좋은 풍미, 향산화, 항염증 및 항균 활성을 가지고 있다.

- [0079] 1-2. *W. anomalus* Y29를 급이한 흰점박이꽃무지 유충의 휘발성 화합물 측정
- [0080] 보리알에서 분리한 *W. anomalus* Y29를 급이한 흰점박이꽃무지 유충의 동결건조 분말의 냄새를 분석하였다.
- [0081] 흰점박이꽃무지 유충의 동결건조 분말의 휘발성 프로파일을 기반으로 partial least squares discriminant analysis(PLS-DA)의 scores plots 및 permutation test를 물 섭식 및 *W. anomalus* Y29 섭식 샘플에 적용하였으며, 이를 도 2에 나타내었다.
- [0082] 도 2A에서 보듯이, PLS-DA 모델($R^2X=0.528$, $R^2Y=0.966$, $Q^2=0.825$)은 물 섭식과 Y29 섭식 샘플 사이의 명확한 차이를 보여주었다.
- [0083] 도 2B에서 보듯이, R^2 와 Q^2 (0.71, -0.29)의 절편을 생성한 permutation test에서는 over-fitting이 나타나지 않았다.
- [0084] 이를 통해, *W. anomalus* Y29를 급이한 흰점박이꽃무지 유충 분말과 물을 급이한 흰점박이꽃무지 유충 분말의 냄새에 차이가 있음을 확인하였다.
- [0086] 미확인 휘발성 화합물을 포함한 80가지 휘발성 화합물에서 물 급이와 *W. anomalus* Y29 급이 유충 분말 시료간의 차이를 확인하기 위하여, 히트맵 계층적 클러스터 분석(Heatmap Hierarchical Cluster Analysis)을 수행하였으며, 이를 도 3에 나타내었다. 히트맵의 최대(0.3)에서 최소(-0.3)까지 표준화된 색상 패턴은 휘발성 화합물의 상대적 농도를 나타낸다.
- [0087] 도 3에서 보듯이, *W. anomalus* Y29 급이 유충 분말에서 상대적으로 높은 농도를 갖는 휘발성 화합물의 수가 물 급이 유충 분말에 비하여 현저히 낮으며, *W. anomalus* Y29 급이 유충 분말에서는 휘발성 화합물 13종의 농도가 유의하게 감소하였다.
- [0088] 물 급이와 비교하여 *W. anomalus* Y29 급이 유충 분말에서 유의하게 감소한 휘발성 화합물과 증가한 휘발성 화합물 중 15종의 화합물의 농도 차이를 비교하여 도 4에 나타내었다.
- [0089] 도 4에서 보듯이, 불쾌한 냄새를 발산하는 것으로 알려진 2-methylheptane, 4-methyldecane, 1-undecanol, 및 butylated hydroxytoluene을 포함하여 p-cymene/m-cymene, 1,3,5-trimethylbenzene, 3-hydroxy-2-pentanone, nonanal, 1,2,4,5-tetramethylbenzene, 및 acetophenone의 농도는 *W. anomalus* Y29 급이 유충 분말에서 유의하게 감소하였다. 좋은 냄새를 발산하는 것으로 알려진 chloroform 및 3-heptanone의 농도는 *W. anomalus* Y29 급이 유충 분말에서 유의하게 증가하였다.
- [0090] 이를 통해, *W. anomalus* Y29의 급이가 휘발성 화합물의 농도에 영향을 주기보다는 전체 휘발성 화합물의 농도를 낮추는 효과가 있다는 것을 확인하였으며, 그로 인하여 *W. anomalus* Y29의 급이가 흰점박이꽃무지 유충의 악취를 감소시키는 효과를 나타내었다는 것을 확인하였다.
- [0092] <실험예 2> 흰점박이꽃무지 유충의 성장 측정
- [0093] 상기 실시예 2에서 흰점박이꽃무지 유충의 2일 절식 단계에서 유충이 *W. anomalus* Y29를 섭취하였을 때, 흰점박이꽃무지 유충의 성장이 정상적으로 이루어졌는지 측정하였으며, 이를 도 5에 나타내었다.
- [0094] 도 5에서 보듯이, 흰점박이꽃무지 유충이 죽는 증상은 관찰되지 않았으며, *W. anomalus* Y29를 급이한 유충의 무게는 물 급이 유충의 무게와 전혀 차이가 없었다.
- [0095] 이를 통해, 흰점박이꽃무지 유충이 *W. anomalus* Y29를 집적 섭취한 경우에도 전혀 유해한 영향이 없음을 확인하였다.
- [0097] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예, 실험예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한

범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0099]

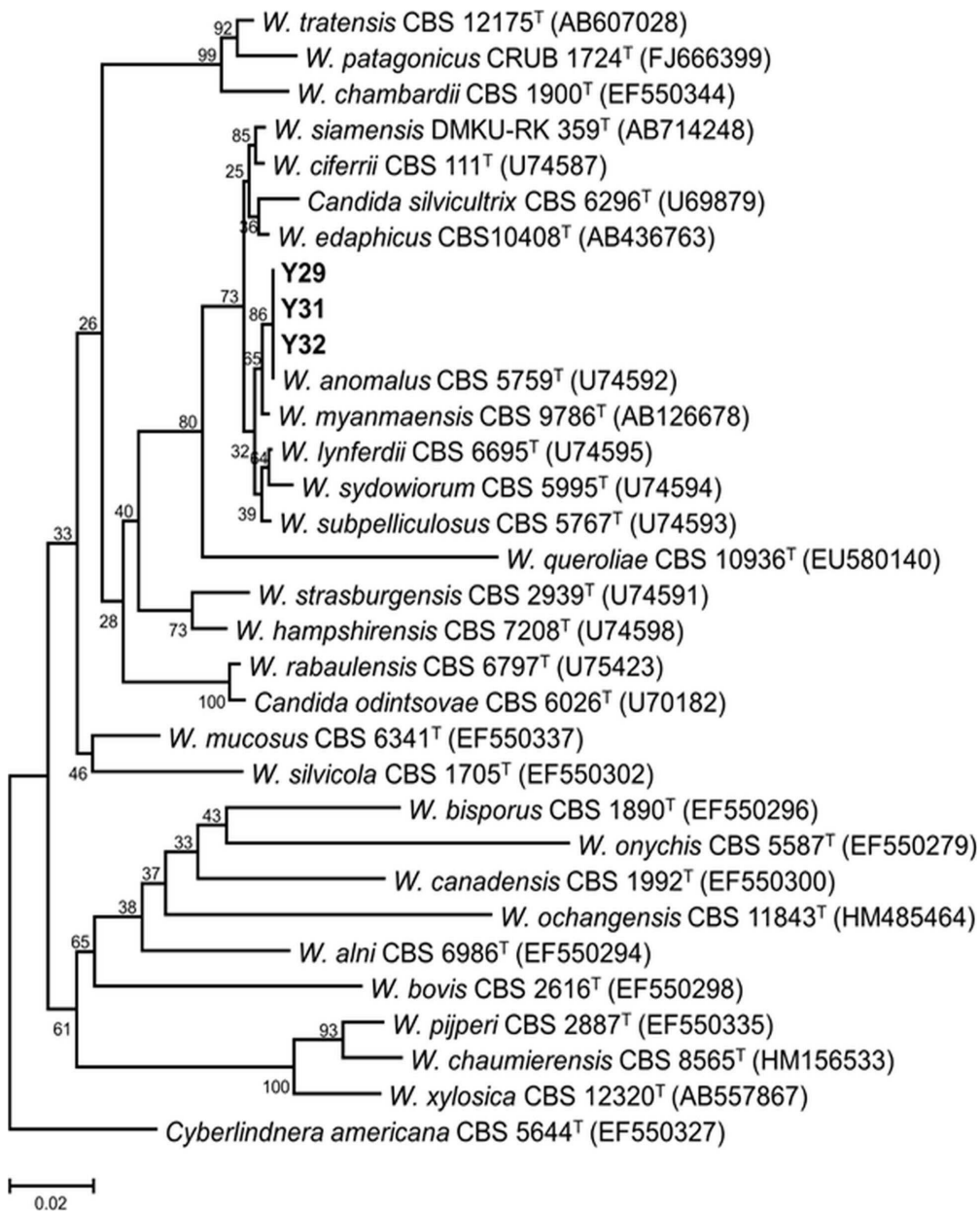
기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)

수탁번호 : KACC83082BP

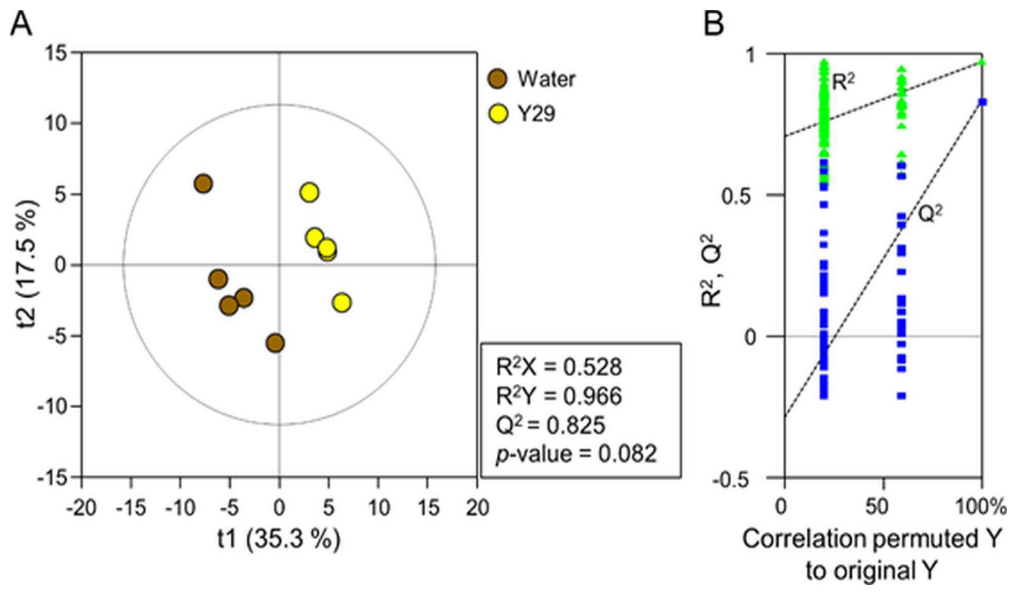
수탁일자 : 20231023

도면

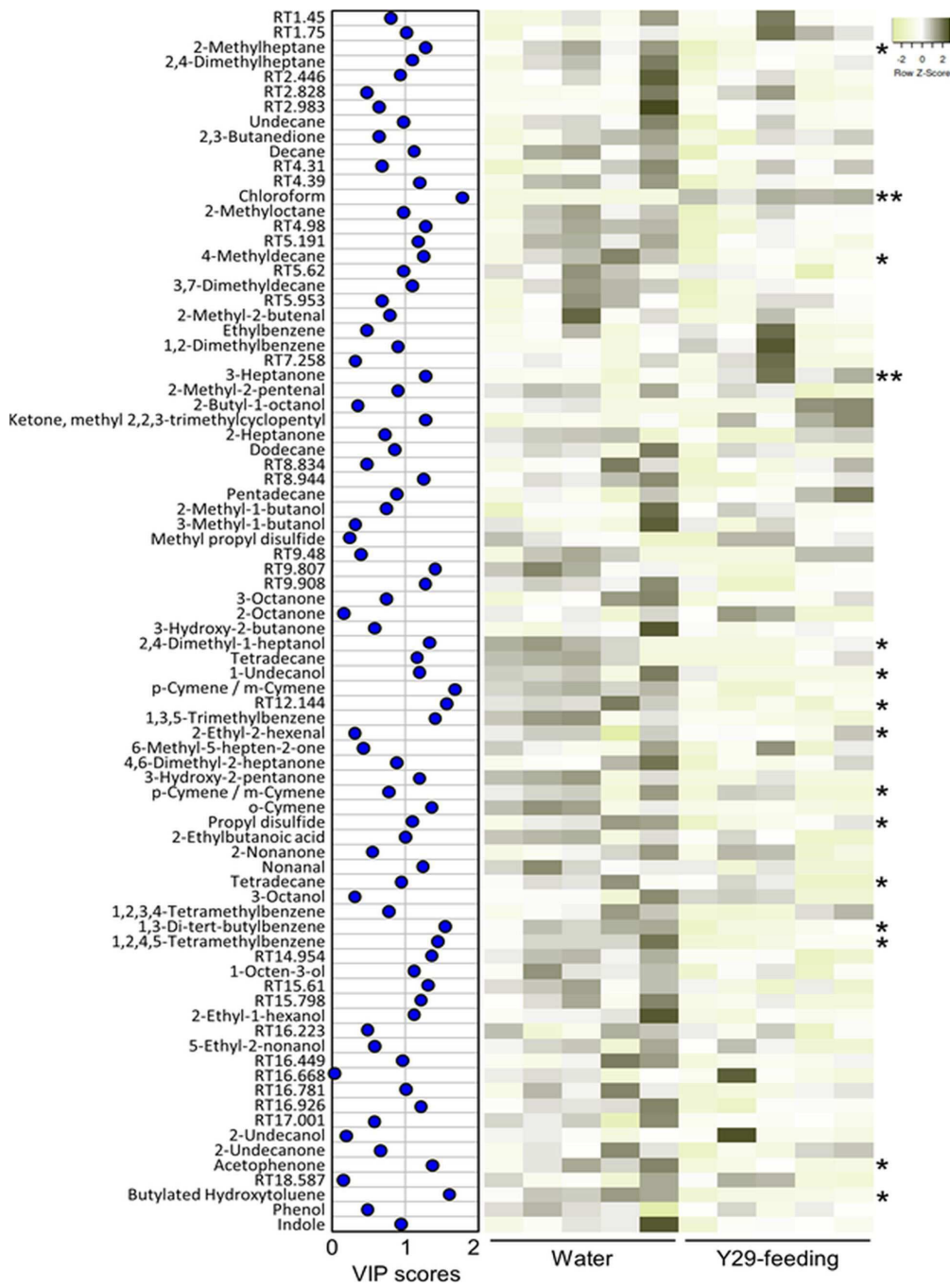
도면1



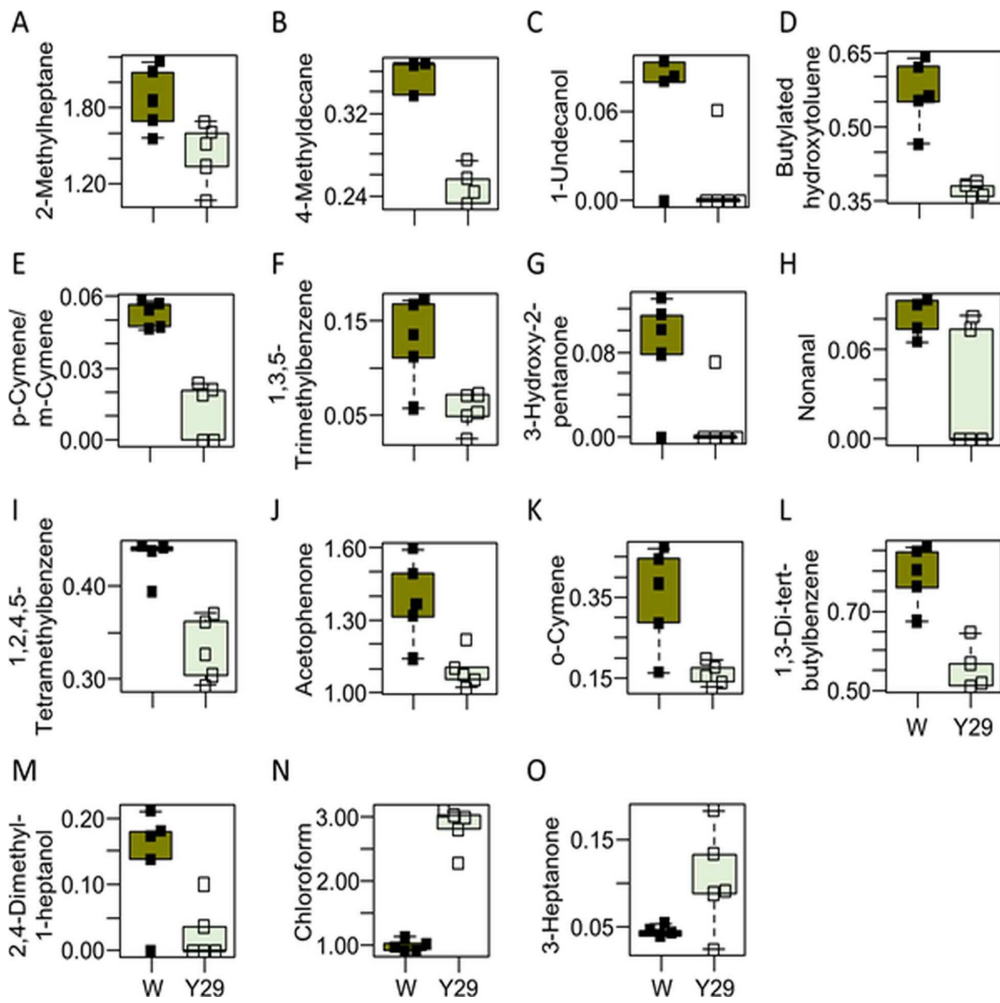
도면2



도면3



도면4



도면5

