



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0065786
(43) 공개일자 2022년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23K 10/20 (2016.01) A23K 10/14 (2016.01)
A23K 20/142 (2016.01) A23K 20/147 (2016.01)
A23K 40/30 (2016.01) A23K 50/40 (2016.01)
A23K 50/80 (2016.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 29/30 (2022.01) A23L 33/17 (2016.01)
A23L 35/00 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23K 10/20 (2016.05)
A23K 10/14 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-7011321

(22) 출원일자(국제) 2020년09월16일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년04월05일

(86) 국제출원번호 PCT/NL2020/050572

(87) 국제공개번호 WO 2021/054824

국제공개일자 2021년03월25일

(30) 우선권주장

2023838 2019년09월17일 네덜란드(NL)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인

프로텍스 비.브이.

네덜란드, 5107 엔씨 동겐, 인더스트리스트라트 3

(72) 발명자

폴, 아만

네덜란드, 씨디 라이젠 5121, 파스투르 길리스스트라트 147디

(74) 대리인

특허법인씨엔에스

전체 청구항 수 : 총 44 항

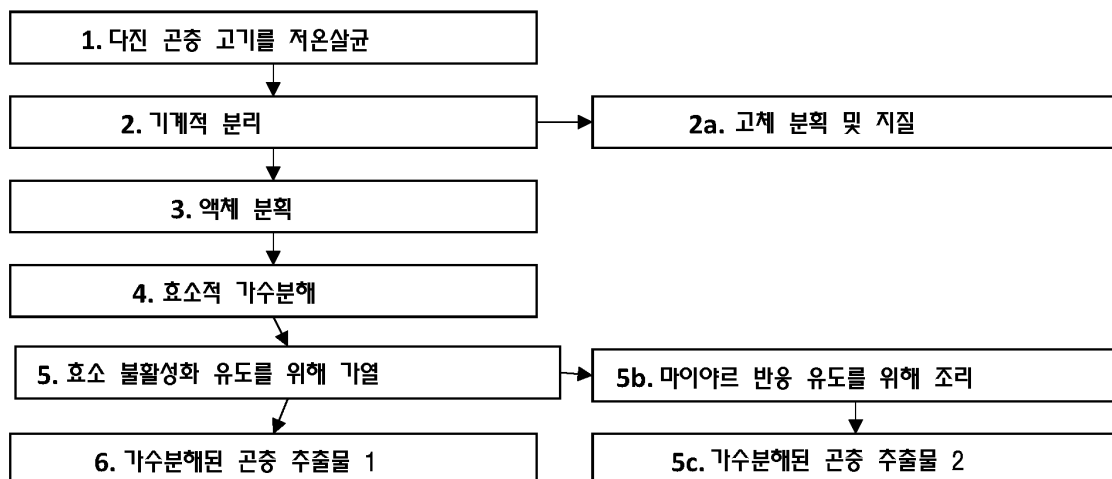
(54) 발명의 명칭 수용성 곤충 단백질의 가수분해물 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 특히 단백질 공급원으로서 동애등에 유충 단백질 유래 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 특히 단백질 공급원으로서 동애등에 유충 단백질 유래 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 및 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물에 관

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



한 것이다. 또한, 본 발명은 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 용도 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 용도에 관한 것이다. 끝으로, 본 발명은 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하거나 또는 이로 구성된 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분에 관한 것이며, 그리고 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하거나 또는 이로 구성된 식품 제품 또는 식품 성분에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A23K 20/142 (2016.05)
A23K 20/147 (2016.05)
A23K 40/30 (2016.05)
A23K 50/40 (2016.05)
A23K 50/80 (2016.05)
A23L 29/06 (2016.08)
A23L 29/30 (2022.01)
A23L 33/17 (2016.08)
A23L 35/00 (2016.08)

(30) 우선권주장

2024481 2019년12월17일 네덜란드(NL)
 2025546 2020년05월11일 네덜란드(NL)
 2025547 2020년05월11일 네덜란드(NL)

명세서

청구범위

청구항 1

효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법으로서,

- a) 적어도 하나의 수용성 단백질을 포함하는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계로서, 상기 조성물의 pH가 pH 4 내지 pH 8이고, 상기 수용성 단백질 조성물 내 적어도 하나의 수용성 단백질이 가용화되는 단계, 및 적어도 하나의 펩티다제를 추가로 제공하는 단계;
- b) 단계 a)의 적어도 하나의 펩티다제를 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물과 혼합하여, 단백질/펩티다제 혼합물을 제공하는 단계;
- c) 단계 b)의 단백질/펩티다제 혼합물을 75℃ 미만의 온도에서 가열하여 단백질/펩티다제 혼합물 내 적어도 하나의 수용성 단백질이 적어도 하나의 펩티다제에 의해 효소적으로 가수분해되어, 효소적으로 가수분해된 단백질/펩티다제를 제공하는 단계; 및
- d) 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 75℃ 내지 110℃의 온도에서 가열하여 단계 c)의 가수분해된 단백질/펩티다제 용액 내의 효소적 가수분해를 종결시켜, 적어도 하나의 펩티다제가 가열에 의해 열-불활성화되도록 하여, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물이 1개 초과와 수용성 단백질, 바람직하게는 2개 초과와 상이한 수용성 단백질, 보다 바람직하게는 3개 초과와 상이한 수용성 단백질, 가장 바람직하게는 4개 초과와 상이한 수용성 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 c)에서 가열은 35℃ 내지 60℃의 온도, 및/또는 가열은 2시간 내지 12시간 동안, 바람직하게는 단계 c)에서 가열은 35℃ 내지 60℃의 온도에서 2시간 내지 12시간 동안 이루어지는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)에서 가열은 40℃ 내지 55℃의 온도 및/또는 가열은 4시간 내지 9시간 동안, 바람직하게는 단계 c)에서 가열은 40℃ 내지 55℃의 온도에서 4시간 내지 9시간 동안, 보다 바람직하게는 단계 c)에서 가열은 45℃ 내지 53℃의 온도에서 5시간 내지 7시간 동안, 가장 바람직하게는 가열은 50℃의 온도에서 6시간 동안 이루어지는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물의 pH가 5 내지 7.7, 바람직하게는 6 내지 7.5이고, 보다 바람직하게는 pH가 7.0인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 제공된 적어도 하나의 펩티다제가 아미노-펩티다제, 바람직하게는 엔도펩티다제 또는 엑소펩티다제 또는 이의 혼합물이거나 또는 이들을 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 적어도 하나의 펩티다제가 류실 아미노-펩티다제, 파파인, 프로나제, 세린 프로테아제, 알칼라제, 서브틸리신, 서브틸리신 A, α-키모트립신, 카텝신 III, 에스페라제, 뉴트라제, 펩신, 썬모리신, 트립신을 포함하거나 또는 이들로부터 선택되며, 바람직하게는 적어도 하나의 펩티다제가 류실 아미노-펩티다제이거나 또는 이를 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 b)에서 단백질/펩티다제 혼합물 내 적어도 하나의 펩티다제의 양이 단백질/펩티다제 혼합물의 총 중량의 0.05중량% 내지 7중량%, 바람직하게는 0.1중량% 내지 6중량%, 보다 바람직하게는 0.2중량% 내지 5중량%, 가장 바람직하게는 0.5중량% 내지 3중량%, 예컨대 단백질/펩티다제 혼합물의 총 중량의 1.0중량% - 2.0중량%인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)의 가수분해된 단백질/펩티다제 용액 내의 단계 d)의 효소적 가수분해가 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 30초 내지 30분, 바람직하게는 45초 - 20분, 보다 바람직하게는 1분 - 15분, 가장 바람직하게는 2분 내지 10분 동안 가열함으로써 종결되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)의 가수분해된 단백질/펩티다제 용액 내의 단계 d)의 효소적 가수분해가 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 80℃ - 105℃, 바람직하게는 85℃ - 103℃, 보다 바람직하게는 90℃ - 100℃ 온도로 가열함으로써 종결되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 d) 이후 선택적 추가 단계 e)에서 단계 d)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이 상기 효소적으로 가수분해된 단백질 내 변형된 아미노기를 제공하기 위한 마이아르 반응을 겪게 되며, 상기 마이아르 반응은 다음의 하위 단계를 포함하는, 방법:

e1) 탄수화물을 제공하고 탄수화물을 단계 d)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질과 혼합하여, 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가된 탄수화물 혼합물을 제공하는 단계;

e2) 단계 e1)의 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가된 탄수화물 혼합물을 가열하여, 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물을 제공하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 단계 e1)에서 첨가된 탄수화물의 최종 농도가 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가된 탄수화물 혼합물의 총 중량의 0.05중량% 내지 6.0중량%이며, 바람직하게는 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가된 탄수화물 혼합물의 총 중량의 0.1중량% 내지 5.0중량%, 보다 바람직하게는 0.2중량% 내지 3중량%, 가장 바람직하게는 0.3중량% - 1.0중량%인, 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 단계 e2)에서 단계 e1)의 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가된 탄수화물 혼합물을 100℃ 내지 170℃, 바람직하게는 120℃ - 168℃, 보다 바람직하게는 135℃ - 166℃, 예컨대 140℃ 내지 165℃의 온도에서 가열하는 것인, 방법.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 e2)에서 단계 e1)의 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가된 탄수화물 혼합물을 1분 내지 120분, 바람직하게는 2분 - 60분, 보다 바람직하게는 3분 - 30분, 가장 바람직하게는 5분 - 20분, 예컨대 10분 - 17분 또는 약 15분의 시간 동안 가열하는 것인, 방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 e1)에서 제공된 탄수화물이 수크로스 또는 글루코스 또는 이들의 혼합물, 바람직하게는 수크로스인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 d) 이후 선택적 추가 단계 f1)에서 단계 d)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 바람직하게는 분무-건조, 유동층 건조에 의한 건조, 동결건조, 굴절 건조 중 임

의의 하나 이상을 적용하여 건조시키거나, 또는 제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적 단계 e2) 이후 선택적 추가 단계 f2)에서 단계 e2)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 바람직하게는 분무-건조, 유동층 건조에 의한 건조, 동결건조, 굴절 건조 중 임의의 하나 이상을 적용하여 건조시키는 것인, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 d) 이후 선택적 추가 단계 f3)에서 단계 d)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이 농축되고, 바람직하게는 상기 농축된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 건조물 함량이 농축 단계 f3) 이후에 상기 농축된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총 중량을 기준으로 적어도 30중량%, 바람직하게는 적어도 50중량%가 되도록 농축되거나, 또는 제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적 단계 e2) 이후 선택적 추가 단계 f4)에서 단계 e2)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이 농축되고, 바람직하게는 농축 단계 f4) 이후에 단계 e2)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 농축된 마이야르 반응 생성물의 건조물 함량이 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 농축된 마이야르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 적어도 30중량%, 예컨대 적어도 50중량%가 되도록 농축되는 것인, 방법

청구항 18

제17항에 있어서, 선택적 농축 단계 f3) 이후에 농축된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 건조물 함량이 농축된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총 중량을 기준으로 30중량% 내지 80중량%, 바람직하게는 45중량% 내지 75중량%, 보다 바람직하게는 50중량% 내지 70중량%이거나, 또는 선택적 농축 단계 f4) 이후에 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 농축된 마이야르 반응 생성물의 건조물 함량이 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 농축된 마이야르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 30중량% 내지 80중량%, 바람직하게는 45중량% 내지 75중량%, 보다 바람직하게는 60중량% 내지 70중량%인, 방법

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 b)의 단백질/펩티다제 혼합물 내 수용성 곤충 단백질의 양이 단백질/효소 혼합물의 총 중량을 기준으로 0.2중량% 내지 30중량%, 바람직하게는 0.5중량% - 25중량%, 보다 바람직하게는 1중량% - 20중량%, 보다 바람직하게는 2중량% - 15중량%, 가장 바람직하게는 3중량% - 10중량%, 예컨대 단백질/효소 혼합물의 총 중량을 기준으로 3.5중량% 내지 7중량%, 또는 3중량% - 5중량%인, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 딱정벌레 유충, 집파리, 동애등에(black soldier fly), 벼메뚜기, 메뚜기, 귀뚜라미, 바퀴벌레 유충, 야자 바구미 유충, 누에, 물장군, 매미, 뱀부 웜, 개미, 여치, 나비, 멸구, 플랜트호퍼 및 벌 유충 중 임의의 하나 이상으로부터 유래한 수성 수용성 곤충 단백질 조성물이고, 상기 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 바람직하게는 동애등에로부터 유래하며, 그리고 바람직하게는 상기 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 유래한 수성 수용성 단백질 조성물인, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 수용액, 예컨대 물에 용해된 수용성 곤충 단백질 조성물, 바람직하게는 동애등에 유충으로부터 유래한 수용성 곤충 단백질 조성물이고, 상기 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 곤충을 하기 단계에 의해 또는 적어도 하기 단계에 의해 적어도 하나의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물로 전환시킴으로써 제공되는, 방법:

- (i) 곤충, 바람직하게는 동애등에 유충을 제공하는 단계,
- (ii) 단계 (i)의 곤충의 크기를, 바람직하게는 다지기(mincing)에 의해 감소시키는 단계, 그리고
- (iii) 단계 (ii)의 크기가 감소된 곤충으로부터 펄프를 얻는 단계, 그리고
- (iv) 단계 (iii)의 펄프를 70-100℃의 온도로 가열하는 단계, 그리고
- (v) 단계 (iv)의 가열된 펄프를 바람직하게는 경사분리 및/또는 원심분리를 포함하는 물리적 분리 단계로 처리

하여, 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계, 그리고

(vi) 단계 (v)의 곤충 단백질 조성물을 수용액 예컨대 물 또는 수성 완충액, 바람직하게는 물에 혼합하여, 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계.

청구항 22

제21항에 있어서, 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 유래하고 물에 용해된 수용성 곤충 단백질 조성물이고, 상기 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 하기 단계에 의해 또는 적어도 하기 단계에 의해, 바람직하게는 하기 단계에 의해 상기 동애등에 유충을 적어도 하나의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물로 전환시킴으로써 제공되는, 방법:

(i) 동애등에 유충, 바람직하게는 12-30일령, 바람직하게는 14-28일령, 보다 바람직하게는 14-26일령, 가장 바람직하게는 유충이 번데기 전(pre-pupae) 단계로 변형되기 12시간-3일 전, 예컨대 변형되기 1-2일 전의 동애등에 유충을 제공하는 단계,

(ii) 단계 (i)의 동애등에 유충의 크기를, 바람직하게는 다지기에 의해 감소시키는 단계로서, 여기서 단계 a)의 펄프 내 곤충 잔해의 평균 입자 크기가 10미크론 내지 500미크론 범위인 단계, 그리고

(iii) 단계 (ii)의 크기가 감소된 곤충으로부터 펄프를 얻는 단계, 그리고

(iv) 단계 (iii)의 펄프를 80-95℃의 온도, 바람직하게는 85-92℃의 온도로 가열하고, 바람직하게는 70초 - 100초, 보다 바람직하게는 75초 - 90초 동안 가열하는 단계, 그리고

(v) 단계 (iv)의 가열된 펄프를 바람직하게는 경사분리 및/또는 원심분리를 포함하는 물리적 분리 단계로 처리하여, 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계, 그리고

(vi) 단계 (v)의 곤충 단백질 조성물을 물 또는 수성 완충액, 바람직하게는 물에 혼합하여 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계.

청구항 23

제1항 내지 제10항, 제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 d)에서 제공된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질은 수용액 예컨대 물 또는 완충 수용액에서 단계 d)에서 제공된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총량의 중량을 기준으로 적어도 60중량%, 바람직하게는 적어도 70중량%, 예컨대 70중량% - 100중량%의 정도로 가용성이고, 및/또는 제11항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 e2)에서 제공된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이 수용액 예컨대 물 또는 완충 수용액에서 단계 e2)에서 제공된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 총량의 중량을 기준으로 적어도 60중량%, 바람직하게는 적어도 70중량%, 예컨대 70중량% - 100중량%의 정도로 가용성인, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제10항 또는 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되거나, 또는 제1항 내지 제10항 또는 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득가능하거나, 또는 제1항 내지 제10항 또는 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제공되는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질, 또는 제11항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되거나, 또는 제11항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득가능하거나 또는 제1항 내지 제10항 또는 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제공되는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물.

청구항 25

제24항의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질, 또는 제24항의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물로서, 상기 곤충 단백질 공급원은 제20항에 따른 동애등에 유충 단백질이고, 및/또는 상기 곤충 단백질 공급원은 제22항의 단계 (i)-(vi)에 따라 제공되는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물.

청구항 26

효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응

생성물로서, 상기 단백질의 총 중량을 기준으로 상기 단백질의 적어도 50중량%, 바람직하게는 55중량% - 100중량%, 보다 바람직하게는 65 중량% - 100중량%, 가장 바람직하게는 75중량% - 100중량%, 예컨대 80중량% - 95중량% 또는 85중량% - 100중량%가 1,000달톤 미만의 분자량을 가지는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 단백질의 총 중량을 기준으로 상기 단백질의 적어도 10중량%, 바람직하게는 15중량% - 60중량%, 보다 바람직하게는 20중량% - 55중량%, 가장 바람직하게는 30중량% - 50중량%, 예컨대 25중량% - 40중량% 또는 35중량% - 50중량%가 유리 아미노산 잔기인, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총량을 기준으로 또는 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 적어도 2.5중량%가 유리 아르기닌이고, 및/또는 적어도 2.5중량%가 유리 글루탐산이고, 및/또는 적어도 1.25중량%가 유리 류신이고, 및/또는 적어도 2.2중량%가 유리 리신이며, 바람직하게는 적어도 3.7중량%가 유리 아르기닌, 적어도 3.0중량%가 유리 글루탐산, 적어도 1.5중량%가 유리 류신 및 적어도 2.6중량%가 유리 리신이며, 그리고 바람직하게는 4.7중량% 미만이 유리 아르기닌 및/또는 4.0중량% 미만이 유리 글루탐산 및/또는 3.0중량% 미만이 유리 류신 및/또는 4.0중량% 미만이 유리 리신이며, 바람직하게는 4.5중량% 미만이 유리 아르기닌 및 3.7중량% 미만이 유리 글루탐산 및 2.7중량% 미만이 유리 류신 및 3.6중량% 미만이 유리 리신인, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용성 단백질은 cfu/g 단백질의 미생물 수를 대장균(*E. coli*)의 경우 50 미만, 예컨대 10 또는 10 미만, 및/또는 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 1 미만, 예컨대 0, 및/또는 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 500 미만, 예컨대 150 미만 또는 10 미만, 및/또는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C. perfringens*)의 경우 500 미만, 예컨대 50 미만 및 바람직하게는 10 미만으로 포함하며, 바람직하게는 cfu/g 단백질의 미생물 수가 대장균(*E. coli*)의 경우 10 미만 및/또는 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 0.1 미만 및 바람직하게는 살모넬라(*Salmonella*)의 부재 및/또는 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 10 미만 및/또는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C. perfringens*)의 경우 10 미만이며, 보다 바람직하게는 상기 수용성 단백질은 cfu/g 단백질의 미생물 수를 대장균(*E. coli*)의 경우 10 미만, 25g의 가수분해된 단백질의 평가시 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 부재, 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 10 미만 및 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C. perfringens*)의 경우 10 미만으로 포함하는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 단백질이 제1항 내지 제10항 또는 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 수득되거나 제공되는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이거나, 또는 제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 단백질이 제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 수득되거나 제공되는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 곤충 단백질 공급원은 동애등에 유충 단백질인, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질, 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물.

청구항 32

제24항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 기호성 증진제(palatability enhancer) 및 습윤제 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 하나 이상을 추가로 포함하는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질, 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 기호성 증진제가 금속 피로포스페이트, 2-메틸 푸란, 2-메틸 피롤, 디메틸 디설파이드이고, 및/또는 습윤제가 프로필렌 글리콜, 글리세린, 옥수수 시럽 및 무기염으로부터 선택되는, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물.

청구항 34

펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분의 생산에서, 또는 식품 제품 또는 식품 성분의 생산에서, 바람직하게는 고양이 사료, 개 사료 또는 새우 사료 예컨대 흰다리새우용 사료의 생산에서 사용되는, 제24항 내지 제33항 중 어느 한 항의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 용도.

청구항 35

제33항에 있어서, 펫이 개 또는 고양이, 바람직하게는 개이거나, 또는 동물이 개, 고양이 또는 새우, 바람직하게는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)인, 용도.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 생산된 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분이 임의의 식품 또는 식품 성분 또는 펫, 고양이, 개, 물고기, 흰다리새우와 같은 새우, 참치, 대구, 양식 해양 생물, 양식 민물 생물, 대문짝 넙치(turbot), 연어, 잉어, 이유 동물(weaning animal), 이유 후 동물용, 바람직하게는 고양이, 개, 흰다리새우와 같은 새우용 사료 또는 사료 성분이거나, 제20항 및 제20항에 종속된 제21항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 곤충 종과 상이한 곤충 종, 예를 들면 화분매개자, 예컨대, 그러나 이에 한정되지 않는, 벌 또는 생물학적 방제에 사용되는 유익충, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 무당벌레 및 예컨대 호박벌, 모기, 흰개미 및 초파리용 사료이거나; 또는 사료 또는 식품 풍미제 또는 사료 또는 식품 풍미 증진제이거나, 또는 상기 생산된 식품 제품 또는 생산된 식품 성분이 임의의 육수, 소스, 풍미제, 식품 풍미제, 식품 풍미증진제, 수프, 육류 대체 제품 또는 성분 또는 육류 대용 제품 또는 성분, 예컨대 삶은 쇠고기, 쇠고기 육수, 돼지고기 육수, 쇠고기, 조리된 고기 대체품인, 용도.

청구항 37

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하거나 또는 이로 구성된, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분으로서, 바람직하게는 고양이 사료 제품 또는 성분, 개 사료 제품 또는 성분 또는 새우 사료 제품 또는 성분, 예컨대 흰다리새우용 사료 제품 또는 성분이거나, 또는 제24항 내지 제33항 중 어느 한 항의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하거나 또는 이로 구성된, 식품 제품 또는 식품 성분.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분이 펫, 고양이, 개, 물고기, 새우, 참치, 대구, 양식 해양 생물, 양식 민물 생물, 대문짝 넙치(turbot), 연어, 잉어, 이유 동물, 이유 후 동물, 바람직하게는 고양이, 개 또는 흰다리새우와 같은 새우용 임의의 식품 또는 사료 또는 식품 성분 또는 사료 성분이거나, 또는 식품 풍미제 또는 식품 풍미증진제 또는 사료 풍미제 또는 사료 풍미증진제, 또는 제37항에 따른 식품 풍미제 또는 식품 풍미증진제 또는 사료 풍미제 또는 사료 풍미증진제이거나 또는 식품 제품 또는 식품 성분이며, 상기 식품 제품 또는 식품 성분은 임의의 육수, 소스, 풍미제, 식품 풍미제 또는 식품 풍미증진제, 수프, 국수, 버거, 육류 대체 제품 또는 성분 또는 육류 대용 제품 또는 성분, 예컨대 삶은 쇠고기, 쇠고기 육수, 국수, 쇠고기 기반 수프, 쇠고기 기반 버거, 햄버거, 돼지고기 육수, 쇠고기, 조리된 고기인, 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분.

청구항 39

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 향산화제로서의 용도.

청구항 40

제37항 또는 제38항의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분의 항산화제로서의 용도.

청구항 41

제37항 또는 제38항의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분의 건강 증진 가능성이 있는 성분으로서의 용도.

청구항 42

항산화 가능성이 있는 제37항 또는 제38항의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분의 용도.

청구항 43

세포의 산화적 손상의 예방 및/또는 억제 방법에 사용하기 위한 제37항 또는 제38항의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분.

청구항 44

활성 산소종에 의해 유도된 전염증성 반응의 예방 및/또는 억제 방법에 사용하기 위한 제37항 또는 제38항의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 및 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르(Maillard) 반응 생성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 용도 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 용도에 관한 것이다. 끝으로, 본 발명은 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하거나 또는 이로 구성된 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분에 관한 것이며, 그리고 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하거나 또는 이로 구성된 식품 제품 또는 식품 성분에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 풍미는 동물이 음식을 수용함에 있어서 중요한 역할을 한다 (Clark, 1998; Dong *et al.*, 2016; Kato *et al.*, 1989). 확인된 다른 화합물 중에서 유리 아미노산 및 펩티드 기반 풍미제는 식품의 풍미를 증진시키기 위해 널리 사용된다. 유리 아미노산의 조합 또는 짧은 펩티드들의 조합은 특이적 풍미를 발생시킨다 (Kato *et al.*, 1989).

[0003] 고기 단백질 가수분해물 및 해양 단백질 가수분해물은 일반적으로 풍미를 증진시키기 위한 목적으로 펫 사료 제제 및 양식 사료 제제에 사용된다. 생산방법에 따라 이러한 단백질 가수분해물은 '소화 산물'(효소적 가수분해로 얻음) 또는 '기호제'(효소적 가수분해 후 제2의 풍미 생성 단계, 예를 들어 (가수분해된) 단백질의 마이야르 반응으로 얻음)로 지칭될 수 있다 (Anuar *et al.*, 2017). 풍미 증진과는 별도로, 단백질 가수분해물은 소화율이 높고 (Everson, 2008), 여러 건강 향상 특성을 가질 수 있다 (Senevirathne and Kim, 2012). 단백질 가수분해물은 소화관 및 면역 체계가 미성숙한 어린 동물을 기르는데 특히 유용하다. 유리 아미노산 및 (짧은) 펩티드는 소화하기 쉽고 몸에 쉽게 흡수된다 (Hou *et al.*, 2017).

[0004] 단백질 가수분해는 매력적이며 일정한 맛, 냄새, 풍미 및 기호성과 같은 조절 및 조정 측면을 고려할 때 비교적 복잡한 과정이다. 단백질을 가수분해하면 이취, 열악한 기능성 및 제품을 상업적으로 불가능하게 만드는 기타 요인들이 발생할 수 있다 (Wisutiphaet *et al.*, 2016). 그러나 가수분해된 크릴 밀(krill meal)과 같은 제품은 이취 문제없이 양식 및 펫 사료에 사용된다 (Tantikitti, 2014). 불행히도 남획은 남극 크릴새우의 개체수를 유

의하게 감소시켰다 (PEW Charitable Trusts, 2014). 적합한 대용 제품의 제공은 달성 가능하다면 종종 번거로운 과제이다.

[0005] 대부분의 소수성 L-아미노산은 쓴맛을 낸다 (Kato *et al.*, 1989). 몇몇의 경우에 단백질의 효소적 가수분해(특히 엔도펩티다제 사용)는 가수분해 후 수득된 생성물의 쓴맛에 기여하는 유리 아미노산 또는 작은 펩티드를 생성하며, 이는 유의한 단점을 추론한다. 이러한 생성물에 대해, 식품 가공 산업은 최종 생성물의 비용 및 복잡성에 기여할 뿐만 아니라 최종 생성물의 풍미 프로파일을 변경시키는 추가적인 쓴맛 제거 단계(예: 효소적 쓴맛 제거)를 사용해야 한다 (Tchorbanov *et al.*, 2011).

[0006] 곤충은 일반적으로 전세계의 많은 문화권에서 음식으로 소비된다. 유럽 국가들에서 곤충 단백질은 동물 사료 내 고가의 단백질 성분으로 빠르게 수용되고 있다. 유럽 연합은 이미 펫 사료 및 양식 사료 제제에 곤충 단백질을 포함하는 것을 승인하였다. 계육분 및 어분은 각각 펫 사료 및 양식 사료 제형 내 일반적인 성분이다. 곤충 단백질은 이들 시장에서 계육분 및 어분의 대안으로 점점 더 많이 인식되고 있다. 산업적 규모로 생산되고 있는 모든 곤충 중에서 동애등에(black soldier fly, *Hermetia illucens*) 유충은 광범위한 유기 잔류물 및 독특한 영양 조성에서 성장하는 능력으로 인해 특별한 주목을 받아왔다. 양식 및 펫 사료에서 동애등에 유충(BSF) 단백질의 영양적 적합성은 잘 확립되어 있다.

[0007] 펫(pets, 반려동물)은 나이가 들면서 다양한 건강 장애가 발생한다. 노화는 펫의 체내 자유 라디칼 손상을 가속화하여 인지 및 운동 시스템의 오작동으로 이어질 수 있다. 마찬가지로 면역 반응의 결과로 발생하는 어류의 산화 스트레스는 건강을 위협할 수 있다. 호중구(백혈구)는 신체의 1차 방어 메커니즘을 담당한다. 신호를 받으면 호중구는 병원성 미생물의 침입 부위로 돌진한다. 그런 다음 호중구는 식균 작용 및 활성 산소종(ROS)의 방출에 의해 병원체를 불활성화한다. ROS의 생성은 숙주 방어에 중요하다. 그러나 장기적으로 호중구에 의한 과도한 ROS 생성은 동물 세포를 손상시키고 세포 노화, 암, 면역 저하 등을 유발할 수 있다. ROS를 제거할 수 있는 식이는 동물 신체의 산화적 손상을 줄이고 결과적으로 건강을 유지하는데 도움이 될 수 있다. 동 분야는 이러한 식이 중재가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 예를 들어 크릴 기반 단백질 가수분해물 및 다른 (희소한) 단백질 자원에서 유래한 가수분해물을 예를 들어 맛, 풍미, 냄새, 기호성을 고려할 때 적어도 유사한 품질 특성을 갖는 단백질 가수분해물로 대체할 수 있는 해결책을 찾을 필요가 있다. 본 발명은 또한 유익한 건강 특성을 갖는, 곤충으로부터 수득된 식품 및 사료 성분의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 크릴-단백질 기반 가수분해물, 육류 단백질 유래 가수분해물, 어류-단백질 가수분해물 등과 같이 현재 일반적으로 적용되는 단백질 가수분해물을 대체하기에 적합한 대체 제품에 대한 증가하는 요구에 대해 해결책을 제공하고자 한다. 또한 본 발명은 육류-없는 식이에 적용하고 예를 들어 농업 및 양식업에서 유래한 육류의 생산 및 소비를 줄이는 것과 관련하여 적용하기 위한, 육류 대체 제품 및 육류 대용 제품에 대한 수요 증가에 대한 해결책을 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명에 따르면, 상기 정의된 바와 같은 단백질 가수분해물이 제공되며, 여기서 단백질 공급원은 곤충 단백질, 예컨대 동애등에 곤충 바이오매스로부터 단리된 단백질, 예컨대 동애등에 유래 단백질, 특히 단백질 공급원으로서 동애등에 유충으로부터 얻은 단백질이다.

[0011] 곤충은 이제 식품 단백질 및 사료 단백질의 새로운 공급원으로 간주되고 있다 (Smetana *et al.*, 2019). 동애등에 유충과 같은 곤충은 예를 들어 농업 산업의 부산물을 먹으며 순환 경제에서 중요한 역할을 할 예정이다. 예를 들어 유충은 농업 부산물을 귀중한 단백질 및 지질 공급원으로 업사이클링할 수 있다. 특히, 동애등에 유충은 이러한 농업 부산물을 귀중한 단백질 및 지질 공급원으로 업사이클링할 수 있으며, 이러한 농업 부산물은 기존 가축의 사료 공급원으로서 적합하지 않다. 일반적으로 이러한 곤충은 비교적 많은 양의 단백질과 함께 아미노산(필수 아미노산 및 비필수 아미노산 모두)을 함유한다. 따라서, 본 발명의 양태에 따르면, 이러한 곤충 기반 단백질 공급원은 특히 동애등에 유충이 단백질 공급원으로 적용될 때 곤충 단백질 가수분해물의 생산을 위한 원료로서 제공된다. 예를 들어, 동애등에 유충 유래 단백질은 현재 펫 사료 응용 분야에서 예를 들어 크릴-단백질 기반 가수분해물을 대체하기에 적합한 단백질 가수분해물의 제공에 적합하다. 예를 들어, 동애등에를 비롯한

여러 곤충은 건조물 기준으로 60% 초과 단백질 함유하며, 이는 예를 들어 콩(40%), 쇠고기(40%) 및 닭고기(55%)의 단백질 함량과 비교할 때 상대적으로 높다 (Paul *et al.*, 2016). 여기서 나열된 단백질 함량 백분율은 결합된 필수 및 비필수 아미노산 함량 백분율과 관련된다. 본 발명자들은 이제 곤충 유래 단백질을 단백질 가수분해물 제공을 위한 공급원으로 적용하는 것이 오늘날의 일반적인 가수분해물(현재 관행의 몇 가지 단점을 들자면, 천연 자원의 감소; 안정적 품질의 제품의 생산 및 조절의 번거로움)과 관련된 현재의 많은 문제점들을 해결하는 가치 있는 접근방식임을 깨달았다. 따라서, 본 발명으로 인해 곤충의 곤충-단백질 기반 가수분해물의 공급원으로서 잠재성은 탐구 기회로 전환된다.

[0012] 이에 따라 본 발명은 여러 추가 양태 중에서 곤충 단백질 가수분해물의 제조방법에 관한 것이며, 여기서 단백질은 단백질 공급원으로 동애등에 유충, 거저리, 귀뚜라미 및 메뚜기와 같은 곤충으로부터 수득되고, 특히 단백질 공급원으로서 동애등에로부터 수득되며; 본 발명의 방법에 의해 수득되거나 또는 수득가능한 가수분해 생성물을 포함하는 사료 성분 조성물 및 식품 성분 조성물에 관한 것이며; 그리고 예를 들어 펫 사료, 동물 사료, 인간이 섭취하기 위한 식품 제품의 제조에서의 이러한 조성물의 적용에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명의 제1 양태는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 상기 방법은
- [0014] a) 적어도 하나의 수용성 단백질을 포함하는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계로서, 상기 조성물의 pH는 pH 4 내지 pH 8이고, 상기 수용성 단백질 조성물 내 적어도 하나의 수용성 단백질은 가용화되는 단계, 및 적어도 하나의 펩티다제를 추가로 제공하는 단계;
- [0015] b) 단계 a)의 적어도 하나의 펩티다제를 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물과 혼합하여, 단백질/펩티다제 혼합물을 제공하는 단계;
- [0016] c) 단계 b)의 단백질/펩티다제 혼합물을 75℃ 미만의 온도에서 가열하여 단백질/펩티다제 혼합물 내 적어도 하나의 수용성 단백질이 적어도 하나의 펩티다제에 의해 효소적으로 가수분해되어, 효소적으로 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 제공하는 단계; 및
- [0017] d) 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 75℃ 내지 110℃의 온도에서 가열하여 단계 c)의 가수분해된 단백질/펩티다제 용액 내의 효소적 가수분해를 종결시켜, 적어도 하나의 펩티다제가 가열에 의해 열-불활성화되도록 하여, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0018] 전형적으로, 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 단백질 공급원으로서 동애등에 유충으로부터 유래한다. 본 발명의 방법의 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하도록 동애등에 유충이 단백질 추출 수단 및 방법에 적용되는 경우, 동애등에 유충은 12일 내지 30일령, 바람직하게는 14일 내지 28일령, 보다 바람직하게는 14 - 26일령, 가장 바람직하게는 유충이 번데기 전(pre-pupae) 단계로 변형되기 12시간 - 3일 전, 예컨대 변형되기 1 - 2일 전이라면 적합하다.
- [0019] 본 발명에 따르면, 예를 들어 다진(minced) 동애등에 유충 고기는 수용액으로 제공되는 수용성 곤충 단백질 조성물의 공급원으로 적용된다. 다진 곤충 잔해의 평균 입자 크기가 10 내지 500미크론 범위일 때 유리하다. 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 예를 들어 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 특히 실시예 1, 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 기술된 바와 같이 동애등에 유충으로부터 단백질성 분획을 분리하는 방법을 적용하여 동애등에 유충으로부터 얻은 수용성 곤충 단백질 조성물이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질은 첨가된 탄수화물의 존재하에 단백질 가수분해물을 가열함으로써 마이아르 반응을 겪게 된다. 그러나, 본 발명의 방법의 단계 a)에서 제공되는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 단백질성 분획을 분리하기 위한 하기의 유충 처리 방법 단계 (i)-(vi)를 적용함에 따라 동애등에 유충으로부터 얻은 수용성 곤충 단백질 조성물인 경우에 유리하다:
- [0020] (i) 동애등에 유충, 바람직하게는 12-30일령, 바람직하게는 14-28일령, 보다 바람직하게는 14-26일령, 가장 바람직하게는 유충이 번데기 전 단계로 변형되기 12시간-3일 전, 예컨대 변형되기 1-2일 전의 동애등에 유충을 제공하는 단계,
- [0021] (ii) 단계 (i)의 동애등에 유충의 크기를, 바람직하게는 다지기에 의해 감소시키는 단계로서, 여기서 단계 a)의 펄프 내 곤충 잔해의 평균 입자 크기가 10미크론 내지 500미크론 범위인 단계, 그리고
- [0022] (iii) 단계 (ii)의 크기가 감소된 곤충으로부터 펄프를 얻는 단계, 그리고

- [0023] (iv) 단계 (iii)의 펄프를 80 - 95℃의 온도, 바람직하게는 85 - 92℃의 온도로 가열하고, 바람직하게는 70초 - 100초, 보다 바람직하게는 75초 - 90초 동안 가열하는 단계, 그리고
- [0024] (v) 단계 (iv)의 가열된 펄프를 바람직하게는 경사분리 및/또는 원심분리를 포함하는 물리적 분리 단계로 처리하여, 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계, 그리고
- [0025] (vi) 단계 (v)의 곤충 단백질 조성물을 물 또는 수성 완충액, 바람직하게는 물에 혼합하여, 본 발명에 따른 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법의 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계.
- [0026] 본 발명자들은 이러한 유충 처리 방법을 본 발명의 방법의 일부로 적용함으로써, 상기 방법의 단계 a)에서 단백질 공급원으로서 동애등에 유충으로부터 얻은 단백질 펄프가 얻어지며, 상기 펄프는 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 특히 실시예 1의 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 개괄된 방법과 같이 당업계에 공지된 대안적인 동애등에 유충 처리 방법을 적용하여 이러한 유충으로부터 얻은 펄프와 비교할 때, 특징 및 구조적 특성이 놀랍게도 개선됨을 확인하였다. 특히, 본 발명의 방법의 단계 (iv)에서 100초 미만의 비교적 짧은 가열 시간은 개선된 유충 펄프를 얻는데 필수적인 것으로 간주된다. 본 발명자들은 시간-온도 조합을 사용함으로써 단백질 분획 내에 더 적은 오일이 포획되어, 단백질 공급원으로 동애등에 유충으로부터 단백질 펄프를 단리하기 위한 대안적인 현행 수단 및 방법을 사용하여 제공된 단백질 공급원과 비교할 때 본 발명의 방법의 단계 a)에서 보다 순수한 단백질 공급원을 제공함을 발견하였다. 또한 마이아르 반응으로 인한 펄프(단백질)의 변색이 크게 방지되어, 얻어지는 생성물의 품질이 향상됨이 밝혀졌다. 예를 들어, 다진 동애등에 유충을 90℃에서 80초 동안 또는 90℃±2℃의 온도에서 75-85초 동안 가열할 때 지방 함량이 감소된 단백질이 얻어진다. EP2953487에서, 가열 시간은 적어도 5분, 심지어 30분이다. 또한, 다진 동애등에 펄프에 대한 최대 100초, 바람직하게는 약 70-90초의 비교적 짧은 가열 시간은 당업계에 공지된 현행 방법에 적용된 긴 가열 시간과 비교하여 덜 과립화되고 덜 응집된 곤충 펄프가 얻어진다. 덜 과립화된 유충 펄프는 펄프에 포함된 단백질의 효소적 가수분해에 유리하다. 입자상 물질은 효소 분자에 대한 접근성이 낮기 때문에 과립화는 효소 효율을 감소시킨다. 본 발명의 방법의 일부로서 유충 처리 방법 단계를 적용함으로써, 동애등에 유충 펄프가 100초 초과 예컨대 5분에서 30분 동안 가열 처리되어 얻어지는 더 큰 단백질 응집체 및 입자와 비교하여, 짧은 가열 시간은 더 작은 단백질 클러스터, 응집체, 입자, 또는 심지어 (주로) 단백질 단량체 및/또는 작은 다량체로 구성된 단백질 조성물을 생성한다.
- [0027] 본 발명의 제2 양태는 본 발명의 방법에 의해 수득된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질, 또는 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질에 관한 것이며, 또는 본 발명의 방법에 의해 수득된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물에 관한 것이며, 또는 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 제3 양태는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물에 관한 것으로, 여기서 상기 단백질의 총 중량을 기준으로 상기 단백질의 적어도 50%는 1,000달톤 미만의 분자량을 가지며, 바람직하게는 55중량% - 100중량%, 보다 바람직하게는 65중량% - 100중량%, 가장 바람직하게는 75중량% - 100중량%, 예컨대 80중량% - 95중량% 또는 85중량% - 100중량% 또는 85중량% - 90중량%이다.
- [0029] 본 발명의 제4 양태는 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분의 생산, 또는 식품 제품 또는 식품 성분의 생산에서의 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물의 용도에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 제5 양태는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물을 포함하거나 이로 구성된 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분, 또는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물을 포함하거나 이로 구성된 식품 제품 또는 식품 성분에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명의 제6 양태는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물의 향산화제로서의 용도에 관한 것이다. 특히 향산화 활성이 있는 식품 또는 사료 성분으로 사용된다. 따라서 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 및 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물은 향산화 특성을 갖는다.
- [0032] 본 발명의 제7 양태는 본 발명의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분의

항산화제 및/또는 건강 증진 가능성이 있는 성분으로서의 용도에 관한 것이다.

[0033] 본 발명의 일 양태는 세포의 산화적 손상의 예방 및/또는 억제 방법에 사용하기 위한 본 발명의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분에 관한 것이다.

[0034] 본 발명의 추가 양태는 본 발명에 따라 항산화 활성을 갖는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하는 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분에 관한 것이다. 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하는 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분의 항산화 활성은 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 항산화 특성에서 기인한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 본 발명은 첨부된 도면을 참조하여 하기에서 보다 상세하게 논의될 것이다.

도 1은 동애등에 유충으로부터 유래한 수성 수용성 단백질 조성물로부터 단백질 가수분해물을 제조하기 위한 제조 흐름도를 나타낸다; 그리고

도 2는 인간이 섭취하기에 적합한 제품의 미생물 수에 대한 목표 한계(target limit) 및 한계 기준(critical limit)을 나타낸다.

도 3은 30분 인큐베이션 후 BSF 수성 단백질 가수분해물(BSF-APH), 계육분(CM) 및 어분(FM)의 DPPH 라디칼 제거 능력(radical scavenging activity)을 나타낸다(n=3).

도 4는 60분 인큐베이션 후 BSF 수성 단백질 가수분해물(BSF-APH), 계육분(CM) 및 어분(FM)의 DPPH 라디칼 제거 능력을 나타낸다(n=3).

도 5는 30분 인큐베이션 후 BSF 수성 단백질 가수분해물(BSF-APH), 계육분(CM) 및 어분(FM)의 ABTS 양이온 라디칼 제거 능력을 나타낸다(n=3).

도 6은 SIEFED 분석법을 이용한 BSF 수성 단백질 가수분해물(BSF-APH), 계육분(CM) 및 어분(FM)의 MPO 반응 조절 활성을 나타낸다(n=3).

도 7은 고전적(Classical) 측정법을 이용한 BSF 수성 단백질 가수분해물(BSF-APH), 계육분(CM) 및 어분(FM)의 MPO 반응 조절 활성을 나타낸다(n=3).

도 8은 BSF 수성 단백질 가수분해물(BSF-APH), 계육분(CM) 및 어분(FM)의 호중구 반응 조절 활성을 나타낸다(n=3).

도 9A는 개 사료 기호성 테스트(0.5% HIE 2)를 나타낸다.

도 9B는 개 사료 기호성 테스트(1.25% HIE 2)를 나타낸다.

도 9C는 개 사료 기호성 테스트(2.50% HIE 2)를 나타낸다.

도 10A는 각 시간 간격에서의 지터(Jittered) 카운트 관찰수를 시간 경과에 따른 각 사료에 대한 예측 성능 적합성과 함께 나타낸다(화살표로 표시).

도 10B는 공격 시간을 표시한다. 새우 한 마리가 사료를 섭취하기 시작하는 평균 시간으로, 표준오차를 나타낸다. 다른 위 첨자는 사료군 간에 통계적으로 유의한 차이가 나타난 위치를 보여준다($p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 발명의 제1 목적은 단백질 가수분해물을 제공하기 위한 개선된 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 제2 목적은 현재의 단백질 가수분해물에 비해 보다 지속가능한, 현재의 단백질 가수분해물에 대한 대체 단백질을 제공하는 것이다.

[0037] 본 발명의 목적은 단백질 가수분해물의 보다 지속가능한 제조방법을 제공함으로써 보다 지속 가능한 단백질 가수분해물을 제공하며, 적어도 상기 단백질 가수분해물을 예를 들어 펫 사료, 식품 성분, 가축 사료 또는 양식 사료의 제조에서 현재 적용되는 이러한 단백질 가수분해물과 같은 현재의 단백질 가수분해물에 대한 대체 제품

으로 적용하도록 허용되는 품질 측정값 및 특성을 충족하는 단백질 가수분해물을 제공하는 것이다.

- [0038] 상기 목적 중 적어도 하나는 본 발명의 곤충 기반 단백질 가수분해물을 제공함으로써 달성된다.
- [0039] 본 발명은 특정 구현예와 관련하여 설명될 것이지만, 본 발명은 이에 제한되지 않으며 청구범위에 의해서만 제한된다.
- [0040] 또한, 발명의 상세한 설명 및 청구범위에서 제1, 제2, 제3 등의 용어는 예를 들어 유사한 요소, 조성물 내 구성 성분 또는 별도의 방법 단계들을 구별하기 위해 사용되는 것이며, 반드시 순차적 또는 시간적 순서를 설명하는 것은 아니다. 용어는 적절한 상황에서 상호 교환 가능하며 본 발명의 구현예는 달리 명시되지 않는 한 본원에 설명되거나 예시된 것과 다른 순서로 실시할 수 있다.
- [0041] 본원에 기술된 본 발명의 구현예는 달리 명시되지 않는 한 조합 및 협력하여 실시할 수 있다.
- [0042] 또한, 다양한 구현예는 "바람직한" 또는 "예" 또는 "예를 들어" 또는 "특히"로 지칭되지만 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니라 본 발명이 구현될 수 있는 예시적인 방식으로 해석되어야 한다.
- [0043] 청구범위에 사용된 "포함하는"이라는 용어는 예를 들어 이후에 나열된 요소 또는 방법 단계 또는 조성물의 구성 성분으로 제한되는 것으로 해석되어서는 안되며; 다른 요소나 방법 단계 또는 특정 조성물의 구성성분을 배제하지 않는다. 언급된 특징, 정수, (방법) 단계 또는 구성요소의 존재를 지정하는 것으로 해석되어야 하지만 하나 이상의 다른 기능, 정수, 단계 또는 구성 요소, 또는 이들의 그룹의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다. 따라서, "단계 A 및 B를 포함하는 방법"이라는 표현의 범위는 단계 A 및 B로만 구성된 방법으로 제한되어서는 안 되며, 오히려 본 발명과 관련하여 상기 방법의 유일한 열거된 단계는 A 및 B이며, 또한 추가로 청구범위는 이러한 방법 단계의 등가물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, "구성요소 A 및 B를 포함하는 조성물"이라는 표현의 범위는 구성요소 A 및 B로만 구성된 조성물로 제한되어서는 안 되며, 오히려 본 발명과 관련하여 조성물의 열거된 구성요소는 A 및 B뿐이며, 또한 추가로 청구범위는 이러한 구성요소의 등가물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0044] 또한, 부정관사 "일(a)" 또는 "하나(an)"에 의한 요소 또는 구성요소에 대한 언급은 문맥에서 요소 또는 구성요소 중 하나 및 하나만 존재하도록 명확하게 요구하지 않는 한, 하나 초과와 요소 또는 구성요소가 존재할 가능성을 배제하지 않는다. 따라서 부정관사 "일(a)" 또는 "하나(an)"는 보통 "적어도 하나"를 의미한다.
- [0045] 본 발명의 제1 양태는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 상기 방법은
- [0046] a) 적어도 하나의 수용성 단백질을 포함하는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계로서, 상기 조성물의 pH는 pH 4 내지 pH 8이고, 상기 수용성 단백질 조성물 내 적어도 하나의 수용성 단백질이 가용화되는 단계, 및 적어도 하나의 펩티다제를 추가로 제공하는 단계;
- [0047] b) 단계 a)의 적어도 하나의 펩티다제를 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물과 혼합하여, 단백질/펩티다제 혼합물을 제공하는 단계;
- [0048] c) 단계 b)의 단백질/펩티다제 혼합물을 75℃ 미만의 온도에서 가열하여 단백질/펩티다제 혼합물 내 적어도 하나의 수용성 단백질이 적어도 하나의 펩티다제에 의해 효소적으로 가수분해되어, 효소적으로 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 제공하는 단계; 및
- [0049] d) 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 75℃ 내지 110℃의 온도에서 가열하여 단계 c)의 가수분해된 단백질/펩티다제 용액 내의 효소적 가수분해를 종결시켜, 적어도 하나의 펩티다제가 가열에 의해 열-불활성화되도록 하여, 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0050] 전형적으로, 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 단백질 공급원으로서 동애등에 유충으로부터 유래한다. 본 발명의 방법의 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공할 수 있도록 동애등에 유충이 단백질 추출 수단 및 방법에 적용되는 경우, 동애등에 유충은 12일 내지 30일령, 바람직하게는 14일 내지 28일령, 보다 바람직하게는 14-26일령, 가장 바람직하게는 유충이 번데기로 변형되기 전 12시간-3일 전, 예컨대 변형되기 1-2일 전이라면 적합하다.
- [0051] 본 발명에 따르면, 예를 들어 다진 동애등에 유충 고기는 수용액으로 제공되는 수용성 곤충 단백질 조성물의 공급원으로 적용된다. 다진 곤충 잔해의 평균 입자 크기가 10 내지 500미크론 범위일 때 유리하다. 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 예를 들어 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 특히 실시예 1, 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 기술된 바와 같이 동애등에 유충으로부터 단백질성 분획을 단리하는 방법을 적용하여 동애등에 유

충으로부터 얻은 수용성 곤충 단백질 조성물이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질은 첨가된 탄수화물의 존재하에 단백질 가수분해물을 가열함으로써 마이야르 반응을 겪게 된다. 그러나, 본 발명의 방법의 단계 a)에서 제공되는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 단백질성 분획을 단리하기 위한 하기의 유충 처리 방법 단계 (i)-(vi)를 적용함에 따라 동애등에 유충으로부터 얻은 수용성 곤충 단백질 조성물인 경우에 유리하다:

- [0052] (i) 동애등에 유충, 바람직하게는 12-30일령, 바람직하게는 14-28일령, 보다 바람직하게는 14-26일령, 가장 바람직하게는 유충이 번데기 전 단계로 변형되기 12시간-3일 전, 예컨대 변형되기 1-2일 전의 동애등에 유충을 제공하는 단계,
- [0053] (ii) 단계 (i)의 동애등에 유충의 크기를, 바람직하게는 다지기에 의해 감소시키는 단계로서, 여기서 단계 a)의 펄프 내 곤충 잔해의 평균 입자 크기가 10미크론 내지 500미크론 범위인 단계, 그리고
- [0054] (iii) 단계 (ii)의 크기가 감소된 곤충으로부터 펄프를 얻는 단계, 그리고
- [0055] (iv) 단계 (iii)의 펄프를 80-95℃의 온도, 바람직하게는 85-92℃의 온도로 가열하고, 바람직하게는 70초 - 100초, 보다 바람직하게는 75초 - 90초 동안 가열하는 단계, 그리고
- [0056] (v) 단계 (iv)의 가열된 펄프를 바람직하게는 경사분리 및/또는 원심분리를 포함하는 물리적 분리 단계로 처리하여, 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계, 그리고
- [0057] (vi) 단계 (v)의 곤충 단백질 조성물을 물 또는 수성 완충액, 바람직하게는 물에 혼합하여 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계.
- [0058] 본 발명자들은 이러한 유충 처리 방법 단계를 본 발명의 방법의 일부로 적용함으로써, 상기 방법의 단계 a)에서 단백질 공급원으로서 동애등에 유충으로부터 얻은 단백질 펄프가 얻어지며, 상기 펄프는 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 특히 실시예 1의 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 개괄된 방법과 같이 당업계에 공지된 대안적인 동애등에 유충 처리 방법을 적용하여 이러한 유충으로부터 얻은 펄프와 비교할 때, 특징 및 구조적 특성이 놀랍게도 개선됨을 확인하였다. 특히, 본 발명의 방법의 단계 (iv)에서 100초 미만의 비교적 짧은 가열 시간은 개선된 유충 펄프를 얻는데 필수적인 것으로 간주된다. 본 발명자들은 시간-온도 조합을 사용함으로써 단백질 분획 내에 더 적은 오일이 포획되어, 단백질 공급원으로 동애등에 유충으로부터 단백질 펄프를 단리하기 위한 대안적인 현행 수단 및 방법을 사용하여 제공된 단백질 공급원과 비교할 때 본 발명의 방법의 단계 a)에서 보다 순수한 단백질 공급원을 제공함을 발견하였다. 또한 마이야르 반응으로 인한 펄프(단백질)의 변색이 크게 방지되어, 얻어지는 생성물의 품질이 향상됨이 밝혀졌다. 예를 들어, 다진 동애등에 유충을 90℃에서 80초 동안 또는 90℃±2℃의 온도에서 75-85초 동안 가열할 때 지방 함량이 감소된 단백질이 얻어진다. EP2953487에서, 가열 시간은 적어도 5분, 심지어 30분이다. 또한, 다진 동애등에 펄프에 대한 최대 100초, 바람직하게는 약 70-90초의 비교적 짧은 가열 시간은 당업계에 공지된 현행 방법에 적용된 긴 가열 시간과 비교하여 덜 과립화되고 덜 응집된 곤충 펄프가 얻어진다. 덜 과립화된 유충 펄프는 펄프에 포함된 단백질의 효소적 가수분해에 유리하다. 입자상 물질은 효소 분자에 대한 접근성이 낮기 때문에 과립화는 효소 효율을 감소시킨다. 본 발명의 방법의 일부로서 유충 처리 방법 단계를 적용함으로써, 동애등에 유충 펄프가 100초 초과 예컨대 5분에서 30분 동안 가열 처리되어 얻어지는 더 큰 단백질 응집체 및 입자와 비교하여, 짧은 가열 시간은 더 작은 단백질 클러스터, 응집체, 입자, 또는 심지어 (주로) 단백질 단량체 및/또는 작은 다량체로 구성된 단백질 조성물을 생성한다.
- [0059] 본 발명에 따른 방법의 경우, 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 1개 초과와 수용성 단백질, 바람직하게는 2개 초과와 상이한 수용성 단백질, 보다 바람직하게는 3개 초과와 상이한 수용성 단백질, 가장 바람직하게는 4개 초과와 상이한 수용성 단백질을 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따르면, 곤충에 존재하는 임의의 수의 상이한 수용성 단백질이 상기 방법의 단계 a)에서 제공되는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물에 대해 선택될 수 있다. 따라서, 곤충에 존재하는 모든 수용성 단백질이 상기 방법의 단계 a)에서 제공되는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물의 일부라는 것도 본 발명의 일부이다. 대안적으로, 적어도 하나의 수용성 곤충 단백질을 포함하는 선택된 수의 단백질 및/또는 선택된 세트의 특이적 단백질은 본 발명의 방법 a)에서 적어도 하나의 수용성 단백질을 포함하는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물로서 제공된다. 곤충 공급원으로부터 유래한 모든 수용성 곤충 단백질을 포함하는 수용성 단백질 조성물이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 방법의 단계 a)에서 제공되는 적어도 하나의 수용성 단백질을 포함하는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 본 발명에 따른 다진 곤충 고기 또는 순수 고기, 예컨대 동애등에 고기 또는 바람직하게는 다진 동애등에 유충 고기로부터 유래한 단백질 조성물이다. 바람직하게는, 본 발명의 방법의 단계 a)에서 제공되는 적어도 하나의 수용성 단백질을 포함하는 수성

수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 얻은 단백질 조성물이다. 전형적으로, 이들 유충은 14-24일령, 예컨대 19-22일령이다. 전형적으로, 이러한 동애등에 유충은 상기 유충의 총 질량을 기준으로 약 35중량% 내지 65중량%의 단백질을 함유한다.

[0060] 특히, 본 발명에 따른 방법에서, 단계 c)에서 가열은 35℃ 내지 60℃의 온도에서 실시되고/되거나 가열은 2시간 내지 12시간 동안 실시되며, 그리고 본 발명의 방법에서 바람직하게는 단계 c)에서 가열은 35℃ 내지 60℃의 온도에서 2시간 내지 12시간 동안 실시된다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 단계 c)에서의 가열이 45℃ 또는 55℃에서, 방법의 단계 c) 동안의 가열이 4시간 또는 8시간 동안 실시되도록 적용된다. 전형적으로, 방법의 단계 c)의 가열 동안의 온도는 50℃였고, 전형적으로 가열 시간은 6시간이었다. 본 발명의 방법의 단계 c)의 가열 동안의 pH는 바람직하게는 pH 6 내지 8이고, 전형적으로 pH는 6.5 - 7.5, 바람직하게는 6.8 - 7.2, 예컨대 pH 7이다. 본 발명의 구현예에서 단계 c)의 가열 온도는 50℃이고, 단계 c)의 가열 시간은 6시간이고 pH는 7이다. 이들 공정 조건이 본 발명에 따른 방법에서 적용되었던 본 발명의 구현예는 실시예 부문에서 추가로 예시된다. 당업자는 가열 시간, 효소적 가수분해 단계 c)가 수행되는 온도 및 수용성 단백질 수용액의 pH의 조합이 효율적인 단백질 가수분해의 목적을 위해 선택되고 최적화되는 세 가지 파라미터임을 인식한다. 즉, 선택된 단백질 가수분해 효소에 대해 최적의 pH 조건, 효소 활성과 관련된 최적의 온도 및 단백질의 효소적 가수분해의 원하는 범위를 고려한 적절한 반응 시간이 본 발명의 방법을 위해 선택된다. 특히, 수성 수용성 단백질 조성물의 pH가 본 발명에 따라 효소적 가수분해가 반응 시간 내에 효율적으로 진행되도록 하는 것이 본 발명의 일부이다. 유사하게, 가열 온도는 단백질 가수분해 효소가 선택된 반응 시간 내에 효율적으로 가수분해되도록 선택된다. 또한, 효소적 가수분해 단계를 위한 선택된 시간은 선택된 효소, 가수분해 온도, 효소 농도, pH 및 가수분해 시간의 조합을 고려하여, 가수분해된 단백질의 본질적으로 최대 달성가능한 분획을 제공하기 위해 적합한 한 오래 지속되도록 선택한다. pH, 효소 농도, 가수분해를 위한 가열 온도 및 가수분해 단계를 위한 반응 시간의 적절한 조합을 선택하는 것은 곤충 단백질의 효소적 가수분해를 고려할 때 본 발명의 일부이다. 놀랍게도, 본 발명의 방법을 적용함으로써 수용성 곤충 단백질은 중성에 가까운 pH 또는 중성 pH에서 비교적 짧은 시간 내에 비교적 높은 정도로 효율적으로 가수분해된다. 즉, 동애등에 유충 단백질과 같은 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하고, 상기 단백질 조성물을 효소적 가수분해 단계를 위해 pH 7, 약 50℃에서 약 6시간 동안 본 발명의 가수분해 방법에 적용하여, 단백질의 총 중량을 기준으로 분자량이 1000달톤 미만인 85중량% 초과 단백질, 예컨대 90중량% 초과, 95중량% 초과 및 구현예에서 100중량% 이하의 단백질을 포함하고, 펩신 소화율이 100%인 가수분해된 단백질이 생성된다. 또한, 유리 아미노산 잔기의 함량은 전형적으로 단백질의 총 중량을 기준으로 30중량% 초과, 예컨대 40중량% 초과이다. 따라서, 놀랍게도 동애등에 유충 단백질과 같은 곤충 단백질의 펩신 소화율은 예를 들어 100%로 매우 높으며, 또한 곤충 단백질의 효소적 분해 방법 단계 후 유리 아미노산 잔기의 함량도 비교적 높아, 동애등에 유충 단백질을 고려할 때 단백질의 총 중량을 기준으로 34중량% - 50중량% 또는 40중량% - 50중량%만큼 높다. 또한 실시예 부문을 참조한다.

[0061] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법으로서, 상기 방법의 단계 c)에서 가열은 40℃ 내지 55℃의 온도에서 실시되고/되거나 가열은 4시간 내지 9시간 동안 실시되며, 바람직하게는 단계 c)에서 가열은 40℃ 내지 55℃의 온도에서 4시간 내지 9시간 동안, 보다 바람직하게는 단계 c)에서 가열은 45℃ 내지 53℃의 온도에서 5시간 내지 7시간 동안, 가장 바람직하게는 50℃의 온도에서 6시간 동안 실시된다.

[0062] 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 단계 a)를 포함하고, 여기서 상기 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물의 pH는 5 내지 7.7, 바람직하게는 6 내지 7.5, 보다 바람직하게는 pH는 7.0이다. 수용성 곤충 단백질은 pH 약 7의 수용액에서 특히 안정적이다. 본 발명자들은 이러한 단백질이 본 발명의 방법에 적용될 때 pH가 약 7인 수성 수용성 곤충 단백질 조성물이 단백질의 효율적이고 효과적인 효소적 가수분해를 위한 적합한 단백질 공급원임을 확인하였다. 본 발명의 방법은 일정한 정도의 가수분해 및 펩신 소화율을 갖는 가수분해된 단백질을 제공하기 위한 강력한 수단을 제공한다. 이로써, 가수분해된 곤충 단백질 조성물 사이의 배치 간 변동이 최소화된다. 선택된 pH, 온도, 효소 용량, 가수분해 시간에 따라, 본 발명의 방법은 곤충 단백질에서 달성 가능한 펩신 소화율 및 유리 아미노산 잔기의 함량이 기재된 바와 같이 예를 들어 (거의) 100% 펩신 소화율 및 단백질의 총 중량을 기준으로 30중량% 초과, 예컨대 40중량% 초과인 유리 아미노산 잔기와 같이 더 높기 때문에, 일정한 조성의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 제공한다.

[0063] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법으로서, 여기서 방법의 단계 a)에서 제공된 적어도 하나의 펩티다제는 아미노-펩티다제, 바람직하게는 엔도펩티다제 또는 엑소펩티다제 또는 이들의 혼합물이거나, 또는 본 방법의 단계 a)에서 제공된 적어도 하나의 펩티다제는 아미노-펩티다제, 바람직하게는 엔도펩티다제 또는 엑소펩티다제 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

- [0064] 본 발명에 따른 방법에서 단계 a)의 적어도 하나의 펩티다제는 류실 아미노-펩티다제, 파파인, 프로나제, 세린 프로테아제, 알칼라제, 서브틸리신, 서브틸리신 A, a-키모트립신, 카텝신 III, 에스페라제, 뉴트라제, 펩신, 썬 모리신, 트립신을 포함하거나 이들로부터 선택되는 것이 바람직하며, 또는 상기 방법에서 바람직하게는 단계 a)의 적어도 하나의 펩티다제는 류실 아미노-펩티다제를 포함한다. 본 발명자들은 특히 본 발명의 방법에서 적어도 하나의 류실 아미노-펩티다제의 적용이 가수분해된 곤충 단백질 조성물의 제공에 매우 적합함을 확인하였다. 예를 들어, 유리 아미노산 잔기의 양은 류실 아미노-펩티다제가 적용될 때 본 발명의 방법에서 가수분해 단계를 거친 단백질의 총 중량을 기준으로 34중량% 초과이다. 놀랍게도, 동애등에 유충 단백질, 즉 수용성 유충 단백질을 본 발명의 방법에 적용하면 1000 달톤 미만의 질량을 갖는 펩티드의 양이 단백질의 총 중량을 기준으로 85 중량% 초과, 예컨대 100중량% 이하이며, 또한 가수분해된 단백질 내 유리 아미노산 잔기의 함량은 단백질의 총 중량을 기준으로 33중량% 초과, 예컨대 45중량% 초과인 가수분해된 단백질 조성물을 제공한다. 이러한 고도의 가수분해는 예를 들어
- [0065] 인간 섭취, 예를 들어 고양이 또는 개에게 먹이기 위한 식품 성분, 펫 사료 성분 및 동물 사료 성분으로 적용, 예를 들어 가축 사육, 농업, 수산 양식 등에 적용하기에 적합한 가수분해된 단백질 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법의 강력함은 높은 소화율 및 높은 함량의 작은 펩티드 및 유리 아미노산 잔기와 함께 식품 및 사료의 풍미 및 미각의 적절한 공급원을 제공한다.
- [0066] 특정 구현예는 본 발명에 따른 방법으로, 단계 b)에서 단백질/펩티다제 혼합물 내 적어도 하나의 펩티다제의 양이 단백질/펩티다제 혼합물의 총 중량의 0.05% 내지 7중량%이며, 바람직하게는 0.1% 내지 6중량%, 보다 바람직하게는 0.2% 내지 5중량%, 가장 바람직하게는 0.5% 내지 3중량%, 예컨대 1.0% - 2.0중량%이다. 전형적으로, 류실 아미노-펩티다제와 같은 효소의 이와 같이 선택된 양은 동애등에 유충에서 얻은 수용성 단백질과 같은 곤충 단백질의 효율적인 효소적 가수분해에 적합하다. 전형적으로, 펩티다제는 빠르고 효율적인 단백질 가수분해에 적합한 양으로 본 발명의 방법에서 존재하며, 여기서 수용성 곤충 단백질은 단백질 조성물의 총 중량을 기준으로 2중량% - 25중량%, 바람직하게는 3.5중량% - 20중량%, 예컨대 약 3.8중량% 또는 약 19중량%의 농도로 제공된다.
- [0067] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 단계 d)에서 단계 c)의 가수분해된 단백질/펩티다제 용액 내의 효소적 가수분해는 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 30초 내지 30분, 바람직하게는 45초 - 20분, 보다 바람직하게는 1분 - 15분, 가장 바람직하게는 2분 내지 10분 동안 가열함으로써 종결된다.
- [0068] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 단계 d)에서 단계 c)의 가수분해된 단백질/펩티다제 용액 내의 효소적 가수분해는 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 80℃ - 105℃, 바람직하게는 85℃ - 103℃, 보다 바람직하게는 90℃ - 100℃의 온도로 가열함으로써 종결된다. 전형적으로, 본 발명의 방법의 효소 불활성화 단계 d)는 1.5분 - 8분, 바람직하게는 2분이 걸린다. 전형적으로, 효소 불활성화 단계는 본 발명의 방법의 단계 d)에서 가수분해된 단백질/펩티다제 용액을 100℃에서, 예를 들어 2분 동안 가열함으로써 이루어진다.
- [0069] 일 구현예는 본 발명의 방법이며, 단계 d) 이후 선택적 추가 단계 e)에서 단계 d)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 상기 효소적으로 가수분해된 단백질 내 변형된 아미노기를 제공하기 위해 마이야르 반응을 겪게 되며, 상기 마이야르 반응은 다음의 하위 단계를 포함한다:
- [0070] e1) 탄수화물을 제공하고 탄수화물을 단계 d)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질과 혼합하여 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가 탄수화물 혼합물을 제공하는 단계;
- [0071] e2) 단계 e1)의 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가 탄수화물 혼합물을 가열하여 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 제공하는 단계.
- [0072] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 선택적 단계 e1)에서 첨가된 탄수화물의 최종 농도는 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가된 탄수화물 혼합물의 총 중량의 0.05중량% 내지 6.0중량%이며, 바람직하게는 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가된 탄수화물 혼합물의 총 중량의 0.1중량% 내지 5.0중량%, 보다 바람직하게는 0.2중량% 내지 3중량%, 가장 바람직하게는 0.3중량% - 1.0중량%이다.
- [0073] 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법의 일부로서, 선택적 단계 e2)에서 선택적 단계 e1)의 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가 탄수화물 혼합물을 100℃ 내지 170℃, 바람직하게는 120℃ - 168℃, 보다 바람직하게는 135℃ - 166℃, 예컨대 140℃ 내지 165℃의 온도에서 가열한다. 선택적 단계 e1)의 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가 탄수화물 혼합물을 가열하기 위해 적용되는 온도는 145℃ - 160℃, 예컨대 150℃, 155℃ 인 것이 바람직하다. 바람직한 구현예에서, 마이야르 반응 동안의 온도는 150℃ 이다. 본 발명자들은 145℃ -

155℃에서, 바람직하게는 약 10분 - 20분 동안, 예컨대 150℃에서 20분 동안 가열하면 마이야르 반응 생성물이 생성되며, 상기 마이야르 반응 생성물, 즉 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이 예를 들어 고양이 사료 및 개 사료의 펫 사료 성분으로, 또는 예를 들어 국수, 수프, 햄버거 등과 같은 사람이 이용하는 식품 제품의 식품 성분으로 사용될 경우에 매우 매력적이고 기분 좋은 맛 및/또는 풍미 및/또는 기호성을 갖게 됨을 확인하였다.

[0074] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 선택적 방법 단계 e2)에서 선택적 방법 단계 e1)의 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가 탄수화물 혼합물을 1분 내지 120분, 바람직하게는 2분 - 60분, 보다 바람직하게는 3분 - 30분, 가장 바람직하게는 5분 - 20분, 예컨대 10분 - 17분 또는 약 15분의 시간 동안 가열한다. 본 발명자들은 본 발명의 방법과 함께 제공된 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 단백질을 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질/첨가 탄수화물 혼합물의 총 중량의 0.3중량% - 1.0중량%의 양으로 첨가된 수크로스 또는 글루코스, 바람직하게는 수크로스 또는 글루코스 또는 이들의 혼합물의 존재하에 약 15분 동안 가열하여 마이야르 반응을 거치면 놀랍도록 강렬하고 매력적인 쇠고기 같은 맛 또는 돼지고기 같은 맛이 나는 것을 확인하였다. 맹검 시험에서, 일련의 인간 피험자의 모든 개인들은 만장일치로 본 발명의 방법으로 제공되는 단백질 가수분해물을 포함하거나 또는 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하는 식품의 맛, 풍미 및/또는 기호성은 곤충 단백질 가수분해물 또는 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이 풍부하지 않은 식품의 맛, 풍미 및/또는 기호성을 능가하고 우수하였음을 나타냈다.

[0075] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 선택적 방법 단계 e1)에서 제공된 탄수화물은 수크로스 또는 글루코스 또는 이들의 혼합물, 바람직하게는 수크로스이다. 본 발명자들은 동애등에 유충의 수용성 단백질을 본 발명의 방법에 적용한 경우, 본 발명의 방법이 강한 고기와 같은 맛 및 기호성을 갖는 마이야르 생성물을 일관되게 제공함을 확인하였다. 당업자는 글루코스, 수크로스 또는 이들의 혼합물과는 별도로, 아미노산 잔기 측쇄에 결합하고 반응하는 적합성으로 추가의 탄수화물이 공지되어 있음을 이해한다. 예는 글루코스-6-인산이다. 따라서, 본 발명의 방법에서 선택적 단계 e1)의, 글루코스-6-포스페이트와 같이 수크로스 및/또는 글루코스가 있거나 없는 다른 탄수화물 또는 이의 혼합물이 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 제공하기 위해 적용하는 것도 본 발명의 일부이다. 수크로스 및 글루코스와 상이한 탄수화물을 포함하거나, 또는 수크로스 및/또는 글루코스를 적어도 하나의 다른 탄수화물과 조합함으로써, 본 발명의 방법은 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물 또는 고급 당화 최종 생성물을 제공하기에 적합하며, 이들은 상기 방법에서 수크로스 또는 글루코스를 적용할 때 얻어지는 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물 또는 고급 당화 최종 생성물과 상이한 맛 및/또는 풍미 및/또는 기호성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 방법은 선택된 탄수화물(들)의 유형, 본 발명의 방법의 선택적 단계 e1) 및 e2) 동안 탄수화물(들)의 농도, 및 마이야르 반응 동안의 가열 시간 및 가열 온도를 조절함으로써 상기 방법에 적용된 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질의 맛 및/또는 풍미 및/또는 기호성을 조절하고 지시할 기회를 제공한다. 전형적으로, Arg 아미노산 잔기는 마이야르 반응 생성물 및/또는 고급 당화 최종 생성물이 형성되기 쉽다.

[0076] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 단계 d) 이후 선택적 추가 단계 f1)에서 단계 d)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 바람직하게는 분무-건조, 유동층 건조에 의한 건조, 동결건조, 굴절 건조 중 임의의 하나 이상을 적용하여 건조시킨다. 추가 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 선택적 방법 단계 e2) 이후 선택적 추가 단계 f2)에서 단계 e2)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 바람직하게는 분무-건조, 유동층 건조에 의한 건조, 동결건조, 굴절 건조 중 임의의 하나 이상을 적용하여 건조시킨다. 진술한 수용성 동애등에 유충 단백질 조성물과 같은 건조된 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 이점은 예를 들면 저장시 저장 수명의 연장, 및 단백질 농도를 조절할 수 있도록 수용액 내 선택된 최종 단백질 농도로 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제조할 수 있는 기회와 관련이 있다. 또한 단백질을 용해하기 위한 수용액의 유형 및 원하는 pH를 선택할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 본 발명의 방법의 단계 a)에서 제공된 미리 건조된 수용성 곤충 단백질 조성물은 전형적으로 상기 방법의 단계 a)에서 용해된 단백질을 제공하기 전에 물에 용해시킨다.

[0077] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 단계 d) 이후 선택적 추가 단계 f3)에서 단계 d)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이 농축되고, 바람직하게는 농축된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 건조물 함량이 농축 단계 f3) 이후 농축된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총 중량을 기준으로 적어도 30 중량%, 바람직하게는 적어도 50중량%이다. 일 구현예는 본 발명의 방법이며, 선택적 방법 단계 e2) 이후 선택적 추가 단계 f4)에서 단계 e2)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이 농축되고, 바람직하게는 건조물이 단계 e2)의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 농축된 마이야르 반응 생성물

의 건조물 함량이 농축 단계 f4) 이후 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 농축된 마이야르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 적어도 30중량%, 예컨대 적어도 50중량%가 되도록 농축된다.

[0078] 일 구현예는 본 발명의 방법이며, 상기 방법은 선택적 농축 단계 f3)을 포함하고, 상기 선택적 농축 단계 f3) 이후 농축된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 건조물 함량이 농축된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총 중량을 기준으로 30중량% 내지 80중량%이며, 바람직하게는 45중량% 내지 75중량%, 보다 바람직하게는 50중량% 내지 70중량%이다. 일 구현예는 본 발명의 방법이며, 상기 방법은 선택적 농축 단계 f4)를 포함하고, 상기 선택적 농축 단계 f4) 이후 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 농축된 마이야르 반응 생성물의 건조물 함량이 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 농축된 마이야르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 30중량% 내지 80중량%, 바람직하게는 45중량% 내지 75중량%, 보다 바람직하게는 60중량% 내지 70중량%이다.

[0079] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 단계 b)의 단백질/펩티다제 혼합물 내 수용성 곤충 단백질의 양이 단백질/효소 혼합물의 총 중량을 기준으로 0.2중량% 내지 30중량%이며, 단백질/효소 혼합물의 총 중량을 기준으로 바람직하게는 0.5중량% - 25중량%, 보다 바람직하게는 1중량% - 20중량%, 보다 바람직하게는 2중량% - 15중량%, 가장 바람직하게는 3중량% - 10중량%, 예컨대 3.5중량% 내지 7중량%, 또는 3중량% - 5중량%이다.

[0080] 본 발명의 구현예에 따라, 본 발명의 방법의 단계 a)에서 제공된 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 농축된 단백질 조성물이거나, 또는 본 발명의 방법으로 제공된 가수분해된 단백질 조성물은 선택적으로 예를 들어 펫 사료, 식품, 가축 사료 등, 또는 둘 모두의 제조에서 가수분해된 단백질을 사용하기 이전에 농축된다. 본 발명의 방법의 단계 a)에서 농축된 수성 수용성 곤충 단백질을 제공하는 이점은 단백질 가수분해의 조절 가능한 속도 및 정도에 관한 것이다. 즉, 효소적 가수분해는 보다 농축된 단백질 조성물을 단백질 가수분해에 적용할 때 더 짧은 시간 프레임 내에 일어날 수 있다. 또한, 더 농축된 가수분해된 단백질 조성물의 제공은 가수분해물을 식품 또는 사료 성분으로 적용하는 것을 고려할 때 더 많은 유연성을 제공한다. 농축된 가수분해된 단백질 조성물이 본 발명의 방법에 적용될 때, 식품 또는 사료 제품의 제조 동안 더 작은 부피의 가수분해된 곤충 단백질 조성물이 적용되어야 한다. 이는 수용성 곤충 단백질 가수분해물의 사용과 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 사용에 대한 기회와 응용을 확대시킨다. 본 발명의 방법에서 농축된 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 적용함으로써, 본 발명의 방법으로 수득된 생성물의 첨가에 의한 식품 또는 사료 성분의 조성물의 희석이 제한된다. 본 발명의 방법으로 농축된 가수분해된 단백질을 제공하기 위한 것과 동일하며, 가수분해된 단백질 또는 가수분해된 단백질의 마이야르 반응 생성물은 예를 들어 가수분해된 단백질을 인간 섭취용 식품 제조에서 식품 성분, 펫 사료 성분, 동물 사료 성분, 풍미제, 기호제로 적용하기 전에 농축 단계를 거친다.

[0081] 일 구현예는 본 발명의 방법이며, 방법의 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물이 집파리, 동애등에, 벼메뚜기, 메뚜기 및 귀뚜라미로부터 유래한 수성 수용성 곤충 단백질 조성물 중 임의의 하나이다. 일 구현예는 본 발명의 방법이며, 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 딱정벌레 유충, 집파리, 동애등에, 벼메뚜기, 메뚜기, 귀뚜라미, 바퀴벌레 유충, 야자 바구미(palm weevil) 유충, 누에, 물장군(giant water bug), 매미, 뱀부 웜(bamboo worm), 개미, 여치, 나비, 멸구(leafhopper), 플랜트호퍼(planthopper) 및 벌 유충 중 임의의 하나 이상에서 유래한 수성 수용성 곤충 단백질 조성물이고, 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 바람직하게는 동애등에로부터 유래하며, 그리고 바람직하게는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 유래한 수성 수용성 단백질 조성물이다. 바람직하게는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에로부터 유래하며, 보다 바람직하게는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 유래한 수성 수용성 단백질 조성물이다. 전형적으로 이러한 동애등에 유충은 유충에서 번데기 전 단계로 이동하기 직전의 나이이다. 전형적으로, 동애등에 유충은 12일령 내지 25일령이며, 예컨대 16-22일령이다. 이러한 유충은 전형적으로 일정한 사료 공급 조건, 즉 임의의 섭식 및 29℃ - 32℃, 예컨대 30.5℃ - 31℃의 온도에서 배양되거나 양식된다. 동애등에 유충은 전형적으로 단백질 함량이 유충의 총 중량(건조물 기준)을 기준으로 35중량% 초과, 예컨대 40중량% 초과, 45중량% 초과, 50중량% 초과, 55중량% 초과, 60중량% 초과, 예컨대 35중량% - 65중량%, 또는 63중량% 미만이다. 이러한 높은 단백질 함량으로 인해 동애등에 유충은 수용성 곤충 단백질을 회수하기 위한 공급원으로서 특히 적합하며, 이러한 단백질을 본 발명의 방법에 적용하기에 적합하다. 놀랍게도, 본 발명의 방법에서 수성 수용성 동애등에 유충 단백질 조성물을 적용하는 경우, 단백질 가수분해물 및 단백질 가수분해물의 마이야르 반응 생성물이 얻어지며, 이는 예를 들어 인간 대상체에 의해 그 자체로 소비될 때 및 예를 들어 국수 및 채식주의 버거에서 성분으로 포함되어 인간이 소비할 때 및 예를 들어 고양이 사료와 혼합될 때 및 개 사료와 혼합될 때 쇠고기와 같은 맛 및/또는 풍미 및/또는 기호성이 강하다.

- [0082] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 방법 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 물과 같은 수용액에 용해된 수용성 곤충 단백질 조성물, 바람직하게는 동애등에 유충으로부터 유래한 수용성 곤충 단백질 조성물이며, 상기 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 곤충을 하기 단계에 의해 또는 적어도 하기 단계에 의해 적어도 하나의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물로 전환시킴으로써 제공된다:
- [0083] (i) 곤충, 바람직하게는 동애등에 유충을 제공하는 단계,
- [0084] (ii) 단계 (i)의 곤충의 크기를, 바람직하게는 다지기에 의해 감소시키는 단계, 그리고
- [0085] (iii) 단계 (ii)의 크기가 감소된 곤충으로부터 펄프를 얻는 단계, 그리고
- [0086] (iv) 단계 (iii)의 펄프를 70-100℃의 온도로 가열하는 단계, 그리고
- [0087] (v) 단계 (iv)의 가열된 펄프를 바람직하게는 경사분리 및/또는 원심분리를 포함하는 물리적 분리 단계로 처리하여, 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계, 그리고
- [0088] (vi) 단계 (v)의 곤충 단백질 조성물을 수용액 예컨대 물 또는 수성 완충액, 바람직하게는 물에 혼합하여, 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계.
- [0089] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 단계 a)에서 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 유래되고 물에 용해된 수용성 곤충 단백질 조성물이고, 상기 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충을 하기 단계에 의해 또는 적어도 하기 단계에 의해, 바람직하게는 하기 단계에 의해 적어도 하나의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물로 전환시킴으로써 제공된다:
- [0090] (i) 동애등에 유충, 바람직하게는 12-30일령, 바람직하게는 14-28일령, 보다 바람직하게는 14-26일령, 가장 바람직하게는 유충이 번데기 전 단계로 변형되기 12시간-3일 전, 예컨대 변형되기 1-2일 전의 동애등에 유충을 제공하는 단계,
- [0091] (ii) 단계 (i)의 동애등에 유충의 크기를, 바람직하게는 다지기에 의해 감소시키는 단계로서, 여기서 단계 a)의 펄프 내 곤충 잔해의 평균 입자 크기가 10미크론 내지 500미크론 범위인 단계, 그리고
- [0092] (iii) 단계 (ii)의 크기가 감소된 곤충으로부터 펄프를 얻는 단계, 그리고
- [0093] (iv) 단계 (iii)의 펄프를 80-95℃의 온도, 바람직하게는 85-92℃의 온도로 가열하고, 바람직하게는 70초 - 100초, 보다 바람직하게는 75초 - 90초 동안 가열하는 단계, 그리고
- [0094] (v) 단계 (iv)의 가열된 펄프를 바람직하게는 경사분리 및/또는 원심분리를 포함하는 물리적 분리 단계로 처리하여, 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계, 그리고
- [0095] (vi) 단계 (v)의 곤충 단백질 조성물을 물 또는 수성 완충액, 바람직하게는 물에 혼합하여 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계.
- [0096] 전형적으로, 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 단백질 공급원으로서 동애등에 유충으로부터 유래한다. 본 발명의 방법의 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공할 수 있도록 동애등에 유충이 단백질 추출 수단 및 방법에 적용되는 경우, 동애등에 유충은 12일 내지 30일령, 바람직하게는 14일 내지 28일령, 보다 바람직하게는 14-26일령, 가장 바람직하게는 유충이 번데기 전 단계로 변형되기 12시간-3일 전, 예컨대 변형되기 1-2일 전이라면 적합하다.
- [0097] 본 발명에 따라, 예를 들어 다진 동애등에 유충 고기는 수용액으로 제공되는 수용성 곤충 단백질 조성물의 공급원으로 적용된다. 다진 곤충 잔해의 평균 입자 크기가 10 내지 500미크론 범위일 때 유리하다. 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 예를 들어 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 특히 실시예 1, 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 기술된 바와 같이 동애등에 유충으로부터 단백질성 분획을 분리하는 방법을 적용하여 동애등에 유충으로부터 얻은 수용성 곤충 단백질 조성물이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질은 첨가된 탄수화물의 존재하에 단백질 가수분해물을 가열함으로써 마이야르 반응을 겪게 된다. 그러나, 본 발명의 방법의 단계 a)에서 제공되는 수성 수용성 곤충 단백질 조성물은 동애등에 유충으로부터 단백질성 분획을 분리하기 위한 하기의 유충 처리 방법 단계 (i)-(vi)를 적용함에 따라 동애등에 유충으로부터 얻은 수용성 곤충 단백질 조성물인 경우에 유리하다:
- [0098] (i) 동애등에 유충, 바람직하게는 12-30일령, 바람직하게는 14-28일령, 보다 바람직하게는 14-26일령, 가장 바람직하게는 유충이 번데기 전 단계로 변형되기 12시간-3일 전, 예컨대 변형되기 1-2일 전의 동애등에 유충을 제

공하는 단계,

- [0099] (ii) 단계 (i)의 동애등에 유충의 크기를, 바람직하게는 다지기에 의해 감소시키는 단계로서, 여기서 단계 a)의 펄프 내 곤충 잔해의 평균 입자 크기가 10미크론 내지 500미크론 범위인 단계, 그리고
- [0100] (iii) 단계 (ii)의 크기가 감소된 곤충으로부터 펄프를 얻는 단계, 그리고
- [0101] (iv) 단계 (iii)의 펄프를 80-95℃의 온도, 바람직하게는 85-92℃의 온도로 가열하고, 바람직하게는 70초 - 100초, 보다 바람직하게는 75초 - 90초 동안 가열하는 단계, 그리고
- [0102] (v) 단계 (iv)의 가열된 펄프를 바람직하게는 경사분리 및/또는 원심분리를 포함하는 물리적 분리 단계로 처리하여, 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계, 그리고
- [0103] (vi) 단계 (v)의 곤충 단백질 조성물을 물 또는 수성 완충액, 바람직하게는 물에 혼합하여, 본 발명에 따른 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법의 단계 a)의 수성 수용성 곤충 단백질 조성물을 제공하는 단계.
- [0104] 본 발명자들은 이러한 유충 처리 방법 단계를 본 발명의 방법의 일부로 적용함으로써, 상기 방법의 단계 a)에서 단백질 공급원으로서 동애등에 유충으로부터 얻은 단백질 펄프가 얻어지며, 상기 펄프는 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 특히 실시예 1의 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 개괄된 방법과 같이 당업계에 공지된 대안적인 동애등에 유충 처리 방법을 적용하여 이러한 유충으로부터 얻은 펄프와 비교할 때, 특징 및 구조적 특성이 놀랍게도 개선됨을 확인하였다. 특히, 본 발명의 방법의 단계 (iv)에서 100초 미만의 비교적 짧은 가열 시간은 개선된 유충 펄프를 얻는데 필수적인 것으로 간주된다. 본 발명자들은 시간-온도 조합을 사용함으로써 단백질 분획내에 더 적은 오일이 포획되어, 단백질 공급원으로 동애등에 유충으로부터 단백질 펄프를 단리하기 위한 대안적인 현행 수단 및 방법을 사용하여 제공된 단백질 공급원과 비교할 때 본 발명의 방법의 단계 a)에서 보다 순수한 단백질 공급원을 제공함을 발견하였다. 또한 마이야르 반응으로 인한 펄프(단백질)의 변색이 크게 방지되어, 얻어지는 생성물의 품질이 향상됨이 밝혀졌다. 예를 들어, 다진 동애등에 유충을 90℃에서 80초 동안 또는 90℃±2℃의 온도에서 75-85초 동안 가열할 때 지방 함량이 감소된 단백질이 얻어진다. EP2953487에서, 가열 시간은 적어도 5분, 심지어 30분이다. 또한, 다진 동애등에 펄프에 대한 최대 100초, 바람직하게는 약 70-90초의 비교적 짧은 가열 시간은 당업계에 공지된 현행 방법에 적용된 긴 가열 시간과 비교하여 덜 과립화되고 덜 응집된 곤충 펄프가 얻어진다. 덜 과립화된 유충 펄프는 펄프에 포함된 단백질의 효소적 가수분해에 유리하다. 입자상 물질은 효소 분자에 대한 접근성이 낮기 때문에 과립화는 효소 효율을 감소시킨다. 본 발명의 방법의 일부로서 유충 처리 방법 단계를 적용함으로써, 동애등에 유충 펄프가 100초 초과 예컨대 5분에서 30분 동안 가열 처리되어 얻어지는 더 큰 단백질 응집체 및 입자와 비교하여, 짧은 가열 시간은 더 작은 단백질 클러스터, 응집체, 입자, 또는 심지어 (주로) 단백질 단량체 및/또는 작은 다량체로 구성된 단백질 조성물을 생성한다.
- [0105] 본 발명의 방법에 적용되는 동애등에는 동애등에 유충인 것이 바람직하다. 동애등에 유충과 같은 곤충을 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 생산하기 위한 본 발명의 방법에 적용하기에 적합한 수성 수용성 곤충 단백질 조성물로 전환시키는 전형적인 방법이 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 특히 실시예 1의 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 제시되어 있다. 가열 단계 (iv)는 전형적으로 50초 내지 120초, 바람직하게는 80초 동안 지속되고, 전형적으로 단계 (iv)에서의 가열 온도는 80℃ - 95℃, 및 바람직하게는 약 90℃이다. 본 발명의 방법에 따라, 단계 (i)에서 동애등에 유충이 제공되는 경우 단계 (iv)에서 곤충 펄프를 90℃에서 80초 동안 가열할 때 높은 단백질 수율을 달성할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질은 첨가된 탄수화물의 존재하에 단백질 가수분해물을 가열함으로써 마이야르 반응을 겪게 된다. 일부 구현예에서, 수용성 곤충 단백질의 공급원은 또한 예를 들어 EP2953487의 실시예 부문, 특히 실시예 1의 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 기재된 방법으로 제공된 수성 수용성 곤충 단백질 조성물이며, 이는 본 발명에 따른 방법 단계 e1) 및 e2)를 추가로 거치기 전에 본 발명의 방법의 방법 단계 a)-d)를 거쳐 마이야르 반응 생성물 및/또는 최종당화산물을 제공한다. 본 발명의 방법에 따른 수성 수용성 곤충 단백질 조성물의 제공 및 가수분해된 단백질 및 가수분해된 단백질의 마이야르 반응 생성물의 제공을 위한 단계의 개요는 또한 도 1을 참조한다.
- [0106] 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 방법의 단계 d)에서 제공된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질은 수용액 예컨대 물 또는 완충 수용액에서 단계 d)에서 제공된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총량의 중량을 기준으로 적어도 60중량%, 바람직하게는 적어도 70중량%, 예컨대 70중량% - 100중량%의 정도로 가용성이다. 일 구현예는 본 발명에 따른 방법이며, 방법의 단계 e2)에서 제공된 효소적으로 가수분해된 수용성

곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물은 수용액 예컨대 물 또는 완충 수용액에서 방법의 단계 e2)에서 제공된 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 총량의 중량을 기준으로 적어도 60중량%, 바람직하게는 적어도 70중량%, 예컨대 70중량% - 100중량%의 정도로 가용성이다. 동애등에 유충으로부터 유래한 단백질을 고려할 때, pH 7의 물과 같은 수용액에서의 단백질 용해도는 위에서 설명한 단계 (i) - (v)에 따라 동애등에 유충으로부터 얻은 단백질에 존재하는 단백질의 총량을 기준으로 적어도 90중량%이고 본질적으로 100중량%이다.

[0107] 본 발명의 일 양태는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 의해 수득되거나, 또는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 의해 수득가능한 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 추가 양태는 마이야르 반응 생성물의 제공을 위한 추가 단계를 포함하는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 의해 수득되거나, 또는 마이야르 반응 생성물의 제공을 위한 추가 단계를 포함하는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 의해 수득가능한 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물에 관한 것이다.

[0108] 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 의해 수득되거나, 또는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 의해 수득가능한 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이거나, 또는 마이야르 반응 생성물의 제공을 위한 추가 단계를 포함하는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 의해 수득되거나 또는 마이야르 반응 생성물의 제공을 위한 추가 단계를 포함하는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 제조방법에 의해 수득가능한 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이며, 여기서 곤충 단백질 공급원은 본 발명의 구현예에 따른 동애등에 유충 단백질이고 및/또는 곤충 단백질 공급원은 본 발명의 유충 처리 방법의 단계 (i)-(vi)에 따라 제공된다.

[0109] 본 발명의 일 양태는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물에 관한 것으로, 여기서 상기 단백질의 적어도 50중량%는 상기 단백질의 총 중량을 기준으로 1,000달톤 미만의 분자량을 가지며, 바람직하게는 55중량% - 100중량%, 보다 바람직하게는 65중량% - 100중량%, 가장 바람직하게는 75중량% - 100중량%, 예컨대 80중량% - 95중량% 또는 85중량% - 90중량% 또는 85중량% - 100중량%이다. 곤충 단백질은 바람직하게는 수용성 동애등에 유충 단백질이며, 예컨대 수성 수용성 동애등에 유충 단백질 조성물이다. 동애등에 유충과 같은 유충으로부터 유래한 이러한 단백질 조성물은 바람직하게는 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 실시예 1의 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 기재된 방법을 적용하여 수득된다.

[0110] 일 구현예는 본 발명에 따른 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이며, 여기서 상기 단백질의 총 중량을 기준으로 단백질의 적어도 10중량%는 유리 아미노산 잔기이며, 바람직하게는 15중량% - 60중량%, 보다 바람직하게는 20중량% - 55중량%, 가장 바람직하게는 35중량% - 50중량%, 예컨대 25중량% - 40중량% 또는 45중량% - 55중량%이다. 일 구현예는 본 발명에 따른 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이며, 여기서 상기 단백질의 총 중량을 기준으로 단백질의 적어도 10중량%는 유리 아미노산 잔기이며, 바람직하게는 15중량% - 60중량%, 보다 바람직하게는 20중량% - 50중량%, 가장 바람직하게는 25중량% - 35중량%, 예컨대 25중량% - 40중량% 또는 35중량% - 50중량%이다. 전형적으로, 수용성 곤충 단백질 조성물을 본 발명의 방법에 적용하면 단백질 조성물 중 단백질의 총 중량을 기준으로 33중량% - 48중량%의 유리 아미노산 잔기를 포함하는 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질 조성물이 생성된다. 본 발명에 따라, 상기 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질을 마이야르 반응의 선택적 방법 단계 e1) 및 e2)에 적용하면, 단백질 조성물 중 단백질의 총 중량을 기준으로 전형적으로 33중량% - 48중량%의 유리 아미노산 잔기가 생성되며, 상기 유리 아미노산 잔기의 일 분획은 이제 Arg 잔기와 같은 마이야르 반응 생성물로 제공된다. 일 구현예는 본 발명에 따른 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이며, 상기 단백질의 총 중량을 기준으로 단백질의 적어도 10중량%가 유리 아미노산 잔기이며, 바람직하게는 15중량% - 60중량%, 보다 바람직하게는 20중량% - 55중량%, 가장 바람직하게는 30중량% - 50중량%, 예컨대 25중량% - 40중량% 또는 35중량% - 50중량%이다.

[0111] 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이며, 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총 중량을 기준으로 적어도 2.5중량%가 유리 아르기닌이고, 및/또는 적어도 2.5중량%가 유리 글루탐산이고, 및/또는 적어도 1.25중량%가 유리 류신이고, 및/또는 적어도 2.2중량%가 유리 리신이며, 바람직하게는 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총 중량을 기준으로 적어도 3.7중량%가 유리 아르기닌, 적어도 3.0중량%가 유리 글루탐산, 적어도 1.5중량%가 유리 류신 및 적어도 2.6중량%가 유리 리신이며, 그리고

바람직하게는 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총 중량을 기준으로 4.7중량% 미만이 유리 아르기닌 및/또는 4.0중량% 미만이 유리 글루탐산 및/또는 3.0중량% 미만이 유리 류신 및/또는 4.0중량% 미만이 유리 리신이며, 바람직하게는 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 총 중량을 기준으로 4.5중량% 미만이 유리 아르기닌 및 3.7중량% 미만이 유리 글루탐산 및 2.7중량% 미만이 유리 류신 및 3.6중량% 미만이 유리 리신이다.

[0112] 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이며, 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 적어도 2.5중량%가 유리 아르기닌이고, 및/또는 적어도 2.5중량%가 유리 글루탐산이고 및/또는 적어도 1.25중량%가 유리 류신이고 및/또는 적어도 2.2중량%가 유리 리신이며, 바람직하게는 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 적어도 3.7중량%가 유리 아르기닌, 적어도 3.0중량%가 유리 글루탐산, 적어도 1.5중량%가 유리 류신 및 적어도 2.6중량%가 유리 리신이며, 그리고 바람직하게는 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 4.7중량% 미만이 유리 아르기닌 및/또는 4.0중량% 미만이 유리 글루탐산 및/또는 3.0중량% 미만이 유리 류신 및/또는 4.0중량% 미만이 유리 리신이며, 바람직하게는 상기 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 총 중량을 기준으로 4.5중량% 미만이 유리 아르기닌 및 3.7중량% 미만이 유리 글루탐산 및 2.7중량% 미만이 유리 류신 및 3.6중량% 미만이 유리 리신이다.

[0113] 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이며, 여기서 상기 수용성 단백질은 cfu/g 단백질의 미생물 수를 대장균(*E.coli*)의 경우 50 미만, 예컨대 10 이하, 및/또는 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 1 미만, 예컨대 0, 및/또는 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 500 미만, 예컨대 150 미만 또는 10 미만, 및/또는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C.perfringens*)의 경우 500 미만, 예컨대 50 미만 및 바람직하게는 10 미만으로 포함하며, 바람직하게는 cfu/g 단백질의 미생물 수는 대장균(*E.coli*)의 경우 10 미만 및/또는 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 0.1 미만 및 바람직하게는 살모넬라(*Salmonella*)의 부재 및/또는 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 10 미만 및/또는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C.perfringens*)의 경우 10 미만이며, 보다 바람직하게는 상기 수용성 단백질은 cfu/g 단백질의 미생물 수를 대장균(*E.coli*)의 경우 10 미만, 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 10 미만 및 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C.perfringens*)의 경우 10 미만으로 포함하며, 여기서 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 25g의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 내 살모넬라(*Salmonella*) 수의 평가시 미생물 수는 0 cfu/g 단백질이다 (살모넬라(*Salmonella*)는 25g의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 샘플에서 검출되지 않음).

[0114] 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이며, 여기서 상기 수용성 단백질은 cfu/g 단백질의 미생물 수를 대장균(*E.coli*)의 경우 50 미만, 예컨대 10 이하, 및/또는 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 1 미만, 예컨대 0, 및/또는 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 500 미만, 예컨대 150 미만 또는 10 미만, 및/또는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C.perfringens*)의 경우 500 미만, 예컨대 50 미만 및 바람직하게는 10 미만으로 포함하며, 바람직하게는 cfu/g 단백질의 미생물 수는 대장균(*E.coli*)의 경우 10 미만 및/또는 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 0.1 미만 및 바람직하게는 살모넬라(*Salmonella*)의 부재 및/또는 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 10 미만 및/또는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C.perfringens*)의 경우 10 미만이며, 보다 바람직하게는 상기 수용성 단백질은 cfu/g 단백질의 미생물 수를 대장균(*E.coli*)의 경우 10 미만, 바실루스 세레우스(*B. cereus*)의 경우 10 미만 및 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C.perfringens*)의 경우 10 미만으로 포함하며, 여기서 살모넬라(*Salmonella*)의 경우 25g의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 내 살모넬라(*Salmonella*) 수의 평가시 미생물 수는 0 cfu/g 단백질이다 (살모넬라(*Salmonella*)는 25g의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 샘플에서 검출되지 않음).

[0115] 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 및 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물은 모두, 상기 가수분해된 단백질을 인간이 소비하는 식품 제품 또는 식품 성분으로 적용하는 것이 고려되는 경우 상기 표시된 미생물에 대해 유럽 위원회에서 허용하는 상한값 미만의 cfu/g 단백질로 표시되는 미생물 수를 갖는다. 도 2를 참조한다.

[0116] 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이며, 여기서 수용성 단백질은 본 발명에 따른 방법으로 제공된다. 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이며, 여기서 수용성 단백질은 본 발명에 따른 방법으로 제공된다. 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이며, 여기서 곤충 단백질 공급원은 동애등에 유충 단백질이다. 특히, 단백질 공급원은 본 발명의 동애등에 유

충 처리 방법의 단계 (i)-(vi)을 적용함으로써 본 발명의 방법의 단계 a)에서 제공된다.

[0117] 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질로서, 기호성 증진제(palatability enhancer) 및 습윤제, 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 하나 이상을 추가로 포함한다. 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물로서, 기호성 증진제 및 습윤제, 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0118] 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질로서, 기호성 증진제는 금속 피로포스페이트, 2-메틸 푸란, 2-메틸 피롤, 디메틸 디설파이드이고, 및/또는 습윤제는 프로필렌 글리콜, 글리세린, 옥수수 시럽 및 무기염으로부터 선택된다. 일 구현예는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물로서, 기호성 증진제는 금속 피로포스페이트, 2-메틸 푸란, 2-메틸 피롤, 디메틸 디설파이드이고, 및/또는 습윤제는 프로필렌 글리콜, 글리세린, 옥수수 시럽 및 무기염으로부터 선택된다.

[0119] 본 발명의 일 양태는 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분의 생산, 또는 식품 제품 또는 식품 성분의 생산, 바람직하게는 고양이 사료, 개 사료 또는 새우 사료 예컨대 흰다리새우용 사료의 생산에서 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 추가 양태는 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분의 생산, 또는 식품 제품 또는 식품 성분의 생산, 바람직하게는 고양이 사료, 개 사료 또는 새우 사료 예컨대 흰다리새우용 사료의 생산에서 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물의 용도에 관한 것이다. 일 구현예는 전술한 용도이며, 여기서 펫은 개 또는 고양이, 바람직하게는 개이거나, 또는 여기서 동물은 개, 고양이 또는 새우, 바람직하게는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)이다.

[0120] 일 구현예는 본 발명에 따른 용도이며, 상기 생산된 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분은 임의의 식품 또는 식품 성분 또는 펫, 고양이, 개, 물고기, 흰다리새우와 같은 새우, 참치, 대구, 양식 해양 생물, 양식 민물 생물, 대문짝 넙치(turbot), 연어, 잉어, 이유 동물(weaning animal), 이유 후 동물용, 바람직하게는 고양이, 개, 흰다리새우와 같은 새우용 사료 또는 사료 성분이거나, 또는 사료 또는 식품 풍미제 또는 사료 또는 식품 풍미증진제거나, 또는 상기 생산된 식품 제품 또는 생산된 식품 성분은 임의의 육수, 소스, 풍미제, 식품 풍미제, 식품 풍미증진제, 수프, 육류 대체 제품 또는 성분 또는 육류 대용 제품 또는 성분, 예컨대 삶은 쇠고기, 쇠고기 육수, 돼지고기 육수, 쇠고기, 조리된 고기의 대용품이다. 일 구현예는 본 발명에 따른 용도이며, 상기 생산된 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분은 임의의 식품 또는 식품 성분 또는 펫, 고양이, 개, 물고기, 새우, 참치, 대구, 양식 해양 생물, 양식 민물 생물, 대문짝 넙치(turbot), 연어, 잉어, 이유 동물, 이유 후 동물용 사료 또는 사료 성분, 본 발명의 방법에서 적용된 곤충 종과 상이하고 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 본 발명에 따른 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이 얻어지고 유래하는 곤충 종과 상이한 곤충 종, 예를 들면, 화분매개자, 예컨대, 그러나 이에 한정되지 않는, 벌 또는 생물학적 방제에 사용되는 유익충(beneficial), 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 무당벌레, 및 예컨대 호박벌, 모기, 흰개미 및 초파리용 사료이거나; 또는 사료 또는 식품 풍미제 또는 사료 또는 식품 풍미증진제이거나, 또는 상기 생산된 식품 제품 또는 생산된 식품 성분은 임의의 육수, 소스, 풍미제, 식품 풍미제, 식품 풍미증진제, 수프, 육류 대체 제품 또는 성분 또는 육류 대용 제품 또는 성분, 예컨대 삶은 쇠고기, 쇠고기 육수, 돼지고기 육수, 쇠고기, 조리된 고기 대체품이다. 전형적으로, 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이 얻어지고 유래한 또는 본 발명에 따른 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물은 BSF 유충으로부터 얻어지고 유래한다. 본 발명의 방법에 적용된 곤충 종과 상이하고 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질이 얻어지고 유래하거나 또는 본 발명에 따른 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물이 얻어지고 유래하는 곤충 종과 상이한 곤충 종을 위한 사료에서, 이러한 곤충 종은 이에 따라 전형적으로 딱정벌레 유충, 집파리, 동애등에, 벼메뚜기, 메뚜기, 귀뚜라미, 바퀴벌레 유충, 야자 바구미 유충, 누에, 물장군, 매미, 뱀부 웜, 개미, 여치, 나비, 멸구, 플랜트호퍼 및 벌 유충과 상이하며, 바람직하게는 집파리, 동애등에, 벼메뚜기, 메뚜기, 귀뚜라미, 바퀴벌레 유충, 야자 바구미 유충, 누에, 물장군, 매미, 뱀부 웜, 개미, 여치, 나비, 멸구, 플랜트호퍼 및 벌 유충과 상이하며, 그리고 바람직하게는 BSF, 특히 BSF 유충과 상이하다.

[0121] 본 발명의 일 양태는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하거나 이로 구성된 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분, 바람직하게는 고양이 사료 제품 또는 성분, 개 사료 제품 또는 성분 또는 새우 사료 제품 또는 성분, 예컨대 흰다리새우용 사료 제품 또는 성분에 관한 것, 또는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 포함하

나 이로 구성된 식품 제품 또는 식품 성분에 관한 것이다.

- [0122] 일 구현예는 본 발명에 따른 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분으로서, 상기 펫 사료 제품, 펫 사료 성분, 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분은 펫, 고양이, 개, 생선, 새우, 참치, 대구, 양식 해양 생물, 양식 민물 생물, 대문짝 넙치(turbot), 연어, 잉어, 이유 동물, 이유 후 동물, 바람직하게는 고양이, 개 또는 흰다리새우와 같은 새우용 임의의 식품 또는 사료 또는 식품 성분 또는 사료 성분이거나, 또는 식품 풍미제 또는 식품 풍미증진제 또는 사료 풍미제 또는 사료 풍미증진제고, 또는 본 발명에 따른 식품 제품 또는 식품 성분으로서, 상기 식품 제품 또는 식품 성분은 임의의 옥수, 소스, 버거, 햄버거, 국수, 풍미제, 식품 풍미제 또는 식품 풍미증진제, 수프, 육류 대체 제품 또는 성분 또는 육류 대용 제품 또는 성분, 예컨대 삶은 쇠고기, 쇠고기 옥수, 돼지고기 옥수, 쇠고기, 조리된 고기, 쇠고기 기반 햄버거, 쇠고기 기반 버거, 쇠고기 기반 수프, 국수 등이다.
- [0123] 본 발명의 제6 양태는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물의 항산화제로서의 용도에 관한 것이다. 특히 항산화 활성이 있는 식품 또는 사료 성분으로서 사용된다. 따라서 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 및 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물은 항산화 특성을 갖는다.
- [0124] 본 발명의 제7 양태는 본 발명의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분의 항산화제 및/또는 건강 증진 가능성이 있는 성분으로서의 용도에 관한 것이다.
- [0125] 본 발명의 일 양태는 세포의 산화적 손상의 예방 및/또는 억제 방법에 사용하기 위한 본 발명의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분에 관한 것이다.
- [0126] 본 발명의 추가적 양태는 본 발명에 따른 항산화 활성을 갖는 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물을 포함하는 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분에 관한 것이다. 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물을 포함하는 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분의 항산화 활성은 본 발명의 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이아르 반응 생성물의 항산화 특성에 기인한다.
- [0127] 본 발명자들은 놀랍게도 BSF 유충에서 얻은 동애등에 수성 단백질 가수분해물의 시험관내 항산화 활성을 확인하고 분석하였으며, 여기서 동애등에-수성 단백질 가수분해물(BSF-APH)의 항산화 활성은 라디칼 제거 모델(DPPH 및 ABTS 분석), 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase) 반응을 포함하는 효소 모델(고전 및 SIEFED 분석), 및 호중구 반응을 포함하는 세포 모델을 사용하여 분석하였다 (하기 실시예 부문 참조). 상업용 어분 및 계육분을 비교예에서 산업상 벤치마크로 사용하였다. 비교예에서, 어분 및 계육분은 호중구 및 미엘로퍼옥시다제 반응의 결과로 발생하는 산화적 손상을 억제하는 측면에서 이점이 거의 또는 전혀 없음이 시험 결과로 밝혀졌다. 더욱이, 어분과 계육분은 또한 이 연구에서 사용된 일부 모델에서 산화촉진 작용을 나타낸다. 결과는 놀랍게도 동애등에 수성 단백질 가수분해물이 숙주 호중구 및 미엘로퍼옥시다제 반응으로 인한 세포(산화적) 손상을 보호하는데 효과적임을 보여준다. 따라서, 본 발명의 동애등에 수성 단백질 가수분해물(APH)은 펫 사료 및 양식 사료 제제의 성분, 예를 들어 식품 또는 사료 성분으로 포함시킴에 있어 계육분 및 어분에 비해 이점을 나타낸다.
- [0128] 본 발명자들은 BSF 수성 단백질 가수분해물이 1000 Da 미만의 유의한 양의 단백질을 갖는다는 것을 확인하였다. 여기에는 단백질 펩티드 및 유리 아미노산의 혼합물이 포함된다. 일부 단백질 펩티드 및 유리 아미노산은 항산화 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 이들 분자는 ROS 및 자유 라디칼을 활발히 제거할 수 있다. Firmansyah 및 Abduh[3]는 BSF 단백질 가수분해물의 DPPH(2,2-디페닐-1-피크릴히드라질) 제거 능력을 평가하였다. Zhu et al.[4]는 BSF 단백질 가수분해물의 DPPH, ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산), 수퍼옥사이드 및 히드록실 라디칼 제거 능력을 평가하였다. 기본적 효소 및 세포 모델을 사용하여 BSF 단백질 가수분해물의 항산화 활성을 확인한 본 발명자들이 아는 한, 가수분해된 BSF 유충 단백질(BSF-APH)에 의한 놀라운 높은 항산화 활성 및 산화 스트레스 및/또는 손상에 대한 우수한 보호성을 나타내는 어떠한 연구도 이제까지 실현된 바 없다. 따라서 연구가 이제껏 따라서 현재 확인된 발명 이전에는 BSF 단백질 가수 분해물의 항산화 가능성에 대한 근본적인 이해가 부족하여 아직까지 공개되지도, 예상되지도, 기대되지도 않았다. 본 발명에 따라, BSF 단백질 가수 분해물의 시험관내 항산화 활성에 대한 상세한 조사는 동물 건강을 개선하기 위한 이들 단백질 유도체의 새로운 응용을 가능하게 한다.
- [0129] 본 발명자들은 놀랍게도 (1) DPPH 및 ABTS를 포함하는 라디칼 제거 모델; (2) 미엘로퍼옥시다제 반응을 포함하

는 효소 모델; 및 (3) 호중구 반응을 포함하는 세포 모델을 사용하여, BSF 단백질 가수분해물의 높은 항산화 가능성 및 활성을 밝혀냈다. 계속본 및 어분은 본 발명에 따른 BSF 단백질 가수분해물의 항산화 활성과 비교하기 위해 비교예에서 산업상 벤치마크로 사용하였다.

[0130] 본 발명의 일 양태는 활성산소종에 의해 유도된 염증 반응의 예방 및/또는 억제를 위한 방법에 사용하기 위한 본 발명의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분에 관한 것이다.

[0131] 본 발명의 일 양태는 항산화 가능성이 있는 본 발명의 동물 사료 제품 또는 동물 사료 성분 또는 펫 사료 제품 또는 펫 사료 성분의 용도에 관한 것이다.

[0132] 용어 '항산화 특성'은 일반적인 과학적 의미를 가지며 본원에서는 본 발명의 가수분해된 단백질과 같은 화합물 또는 조성물을 지칭하며, 이는 항염증 반응과 같은 항산화 활성을 갖는 항산화제로 구성되거나 또는 이를 포함한다. 전형적으로, 이러한 항염증 반응은 예를 들어 펫 또는 인간 대상체와 같은 포유동물의 세포 또는 어류의 세포에서, 예를 들면 활성산소종에 의해 유도된 염증 반응에 대한 반응이다. 예를 들어 "Antioxidants in Food: Practical Applications"(Jan Pokorny, Nedyalka Yanishlieva 및 Michael Gordon(편집자), 2001, Cambridge: CRC Press, Woodhead Publishing Ltd. ISBN 1 85573 463 X, CRC Press, ISBN 0-8493-1221-1)의 제1, 5 및 6장을 참조한다. 항산화제는 항산화 활성을 갖는 화합물 또는 항산화 활성을 갖는 조성물 또는 숙주 면역 반응으로 인한 산화적 손상에 대한 활성과 같은 항산화 활성을 갖는 화합물을 포함하는 조성물이다. 예를 들어 항산화제는 산화를 억제한다. 예를 들면 피험자에서 산화, 예를 들어 활성산소종은 세포(산화적) 손상을 유도한다.

[0133] '건강증진 식품', '건강증진 활성', '건강증진 특성' 및 '건강증진 가능성'과 같은 '건강증진'이라는 용어는 일반적인 과학적 의미를 가지며 여기서 화합물 또는 본 발명의 가수분해된 단백질과 같은 조성물이 동물에 의해 소비되는 경우, 펫 또는 인간 개체와 같은 포유동물과 같은 동물의 건강에 관한 것이다. 건강 증진 가능성이 있는 화합물 또는 조성물의 소비는 펫 또는 인간 대상체와 같은 포유동물과 같은 동물의 건강 상태에 기여하거나 지지하거나 촉진시키거나 증가 또는 유지시킨다. 예를 들어 "Antioxidants in Food: Practical Applications"(Jan Pokorny, Nedyalka Yanishlieva and Michael Gordon (editors), 2001, Cambridge: CRC Press, Woodhead Publishing Ltd. ISBN 1 85573 463 X, CRC Press, ISBN 0-8493-1221-1)의 제1, 5 및 6장을 참조한다.

[0134] 본 발명은 다수의 예시적인 구현예를 참고하여 상기에서 설명되었다. 수정이 가능하며 이는 첨부된 청구범위에 정의된 보호 범위에 포함된다. 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 어떤 식으로든 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0135] 실시예

[0136] 실시예 1

[0137] 물과 같은 수용액에 수용성 단백질이 실질적으로 완전히 용해되는 수성 수용성 단백질 조성물 또는 건조된 수용성 단백질 조성물은 유럽 특허 출원 EP2953487의 실시예 부문, 실시예 1의 12쪽, 8-13행 및 13쪽, 3-5행에 기재된 방법에 따라 동애등에 유충으로부터 단백질성 분획을 분리시켜 제공된다. 간략히, 하기에 실질적으로 설명된 대로 동애등에 유충을 제공하고 곤충이나 벌레를 영양 흐름(nutrient stream)으로 전환시키는 방법을 적용하였다(도 1 참조).

[0138] 곤충 또는 벌레를 영양 흐름으로 전환시키는 방법으로서, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:

[0139] (a1) 곤충 또는 벌레, 여기서는 동애등에 유충을 제공하는 단계,

[0140] (a2) 곤충이나 벌레의 크기를 감소시키는 단계,

[0141] (a3) 곤충 또는 벌레로부터 펄프를 얻는 단계,

[0142] 그리고

[0143] (b) 상기 펄프를 70-100℃의 온도로 가열하는 단계, 그리고

[0144] (c) 상기 가열된 펄프를 물리적 분리 단계를 적용하여 지방 분획, 수성 단백질 분획("유충수"라 함) 및 고체 함유 분획을 얻는 단계.

[0145] 동애등에 유충에 곤충을 영양 흐름으로 전환시키는 방법을 적용할 때 수성 단백질 분획은 수성 수용성 단백질 분획이다. 수성 수용성 단백질 분획은 일부 구현예에서 분무-건조를 사용하여 단계 (c) 이후에 건조되고, 이로

써 건조된 동애등에 유충 단백질이 제공된다. 동 방법은 방법의 임의의 단계에서 펄프의 효소적 처리를 포함하지 않는다. 선택적으로, 방법은 유충 펄프의 효소적 처리를 포함하지만, 현재 실시예의 경우 동애등에 유충을 영양 흐름으로 전환시키는 방법에 효소적 분해 단계를 적용하지 않았다. 상기 방법의 단계 (b)에서, 다진 동애등에 유충은 펄프(또는 '퓨레')를 90℃에서 80초간 가열하여 저온살균하고, 저온살균된 유충의 '고기'를 제공한다. 저온살균된 고기는 후속으로 단계 (c)에서 기계적으로 분리되어 액체 단백질 분획(유충수)을 얻는다. 수성 단백질 분획은 효소적으로 가수분해된 곤충- 또는 벌레 단백질의 제공 및 효소적으로 가수분해된 곤충- 또는 벌레 단백질의 마이야르 반응 생성물의 제공을 위해 본 발명의 방법의 단계 (a)에서 적어도 하나의 단백질을 포함하는 수성 곤충- 또는 벌레 단백질 조성물로서 제공되기 전에 추가 처리 단계(예를 들어, 건조 또는 농축) 없이 직접 '그대로' 사용되거나, 또는 수성 단백질 분획(유충수)은 예를 들어 3 내지 12배, 예를 들어 5-10배로 먼저 농축되거나 또는 물과 같은 수용액에 용해되기 전에 예를 들어 분무 건조를 이용하여 우선 건조된 후, 이어서 상기 방법의 단계 (a)에서 적어도 하나의 단백질을 포함하는 수성 곤충- 또는 벌레 단백질 조성물로서 제공된다.

[0146] 상기에서 설명한 곤충 또는 벌레를 영양 흐름으로 전환시키는 방법인 단계 (c)에서 얻은 유충수의 조단백질 함량은 유충수의 총 중량을 기준으로 3.8중량%였다. 조지방 함량은 유충수의 총 중량을 기준으로 0.3중량%였다. 얻어진 유충수의 경우, 30℃ (ISO 4833)에서 호기성 증온성 수로 평가된 총 플레이트 수는 26000 cfu/g이고; 30℃ (ISO 7932)에서 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) 수는 <40 cfu/g이고; 37℃ (ISO 7937)에서 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 수는 <10 cfu/g이고; 44℃에서 대장균(*Escherichia coli*) 수는 <10 cfu/g이고; 살모넬라(*Salmonella*)는 신속 PCR 방법(ISO 6579)을 사용하여 25g의 생성물에서 검출되지 않았다. 따라서 유충수 내 미생물 수는 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대해 40 cfu/g 단백질 미만이고; 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)에 대해 10 cfu/g 단백질 미만이고; 대장균(*Escherichia coli*)에 대해 10 cfu/g 단백질 미만이고; 살모넬라(*Salmonella*) 수는 25g의 유충수를 평가했을 때 0 cfu/g 단백질이었다. 여기서 미생물 수는 식품 제품 또는 식품 성분에서 유충수를 적용하기 위해 도달해야 하는 값의 경계 내에 있었다.

[0147] 수성 수용성 단백질 분획(유충수)은 농축 여부와 관계없이, 또는 먼저 건조된 다음 다시 용해되며, 동애등에 유충 수용성 단백질 분획에서 적어도 하나의 단백질의 효소적 가수분해를 위한 기질로 적용된다. 액체 수성 수용성 단백질 분획은 수성 단백질 분획(유충수)의 총 중량을 기준으로 대략 91중량%의 수분 함량, 약 4중량%의 단백질을 함유하며, 액체 수성 수용성 단백질 분획은 지방 함량이 낮았다(수성 단백질 분획의 총 중량을 기준으로 <1중량%, 즉, 현재 제형에서 0.3%). 유충수는 수용성 단백질의 효소적 가수분해 전에 회석 단계가 필요하지 않은 용해된 수용성 단백질의 원액이다. 수성 수용성 단백질 분획(유충수)은 수불용성 키틴을 포함하지 않는다.

[0148] 효소적 가수분해

[0149] 수성 수용성 단백질 분획(유충수)은 온도 조절(30℃-100℃), pH 조절(pH 4-9) 및 지속적인 교반(최대 1250rpm)이 있는 생물 반응기에서 효소적 가수분해를 거쳤다. 단백질은 일부 예에서 단일 아미노-펩티다제를 사용하고 추가 예에서 엔도펩티다제 및 엑소펩티다제 활성을 갖는 아미노펩티다제의 조합을 사용하여 효소적으로 가수분해되었다. 효소 농도는 하나 이상의 아미노-펩티다제에 대해 효소(들)을 포함하는 수성 수용성 수용성 단백질 분획의 총 중량을 기준으로 0.1중량% 내지 2중량%였다. 예를 들어, Flavourzyme(Novozymes, 덴마크)는 효소(들)을 포함하는 수성 단백질 분획의 총 중량을 기준으로 1중량%로 사용되었다.

[0150] 반응 조건

[0151] 효소적 가수분해 동안, 반응의 pH(전형적으로 4 내지 8), 반응 온도(전형적으로 35℃ 내지 60℃) 및 효소적 가수분해 시간(전형적으로 2시간 내지 12시간)은 선택된 효소의 유형에 따른다. Flavourzyme을 사용하여 수성 수용성 단백질 분획은 50℃의 온도에서 6시간 동안 pH 7(유충수의 pH이기도 함)에서 가수분해되었다.

[0152] 효소 불활성화를 유도하기 위한 가열

[0153] 효소 가수분해 반응은 75℃ 내지 110℃에서 1분 내지 10분 동안 효소(들)의 열 불활성화에 의해 종결되었다. 일반적으로, 효소 가수분해 반응은 효소를 포함하는 수성 수용성 단백질 분획의 반응 혼합물을 100℃에서 2분 동안 가열하여 종결되고, 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 수용성 단백질을 제공하였다. Flavourzyme 효소를 적용하였을 경우, 효소적으로 가수분해된 단백질은 가수분해 곤충 추출물 1 ("HIE1" 또는 "HIE 1")이라고 한다.

[0154] 선택적 단계

[0155] 효소적으로 가수분해된 단백질을 조리하여 마이야르 반응 유도

[0156] 마이야르 반응은 첨가된 탄수화물과 혼합된 효소적으로 가수분해된 단백질의 총 중량을 기준으로 0.05%-1중량%의 글루코스 또는 수크로스를 첨가한 후, 제공된 효소적으로 가수분해된 곤충 단백질을 100℃-170℃에서 5분-60분 동안 주의 깊게 가열하여 이루어진다. 예를 들어 수크로스와 혼합된 HIE1의 총 중량을 기준으로 1중량%의 수크로스와 혼합된 HIE1을 150℃에서 15분 동안 가열함으로써 마이야르 반응을 수행하였다. 이 마이야르 반응으로 가수분해 곤충 추출물 2 ("HIE2" 또는 "HIE 2") 로 지칭되는 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 제공하였다.

[0157] **최종 생성물**

[0158] 조성물 HIE 1 및 HIE 2는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 제공하기 위해 또는 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질의 마이야르 반응 생성물을 제공하기 위해 본 발명의 방법과 함께 제공된 용액을 이용하여, 풍미, 기호성 등을 테스트하기 위한 실험을 연속적으로 적용하며, 또는 HIE 1 및/또는 HIE 2는 우선 건조물 함량이 예를 들어 농축된 HIE 1 또는 HIE 2의 총 중량의 적어도 30중량%, 예컨대 적어도 50중량%가 되도록 수용액을 증발시킴으로써 농축 단계를 거친다. 대안적으로, HIE 1 또는 HIE 2는 HIE 1 또는 HIE 2로 실행되는 증발 단계, 및 예를 들어 유동층 건조기를 사용하고/하거나 분무 건조기를 사용하는 건조 단계에 의해, 건조된 가수분해된 단백질, 예를 들어 분말로서 적용되어, 건조된 HIE 1 또는 건조된 HIE 2의 건조물(DM) 함량이 건조된 HIE 1의 총 중량을 기준으로 또는 건조된 HIE 2의 총 중량을 기준으로 적어도 92중량%의 DM이 되도록 한다.

[0159] **조성**

[0160] 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 수용성 단백질 HIE 1 및 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 수용성 단백질 HIE 2의 마이야르 반응 생성물의 화학적 조성은 표 1에 제시되어 있다. 또한, 동애등에 유충(유충수)의 수성 수용성 단백질 분획의 화학적 조성도 표 1에 제시되어 있다. 동애등에 유충(유충수) 및 HIE 1의 수성 수용성 단백질 분획의 유리 아미노산 조성은 표 2에 기재하였다. 일부 병원성 미생물의 수는 표 3에 제시되어 있다.

[표 1] 동애등에 유충의 수성 수용성 단백질 분획(유충수), 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 단백질 HIE 1 및 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 단백질의 마이야르 반응 생성물 HIE 2의 화학적 조성

성분*	동애등에 유충의 수성 수용성 단백질 분획(유충수)	HIE 1	HIE 2
수분	90.9%	90.8	88.7
단백질	3.8%	3.8%	4.0%
지질	0.3%	<0.3%	0.3%
회분	1.2%	1.3%	1.3%
전분	0.8%	< 0.5%	< 0.5%
총 당류 (글루코스 포함)	0.9%	1.5%	1.9%
* 나열된 성분의 양은 분석된 조성물의 총 중량을 기준으로 한 중량 백분율로 제공			

[0161] 

[표 2] 효소적으로 가수분해된 동태등에 유출 단백질 HIE 1의 유리 아미노산 조성.

유리 아미노산의 양은 DJA75 테스트(ISO 13903:2005/IC-UV)를 적용하여 결정된다.

성분	HIE 1	HIE 2
펩신 소화성	100%	100%
단백질 <1000 Da (단백질 총 중량의 중량%)	100%	87.5%
유리 아미노산 함량 (단백질 총 중량의 중량%)	47.7%	46.3%
유리 알라닌*	0.272%	0.282%
유리 아르기닌	0.171%	0.177%
유리 아스파르트산	0.0740%	0.0790%
유리 시스테인	0.0180%	0.0200%
유리 글루탐산	0.137%	0.138%
유리 글리신	0.0860%	0.0890%
유리 히스티딘	0.0940%	0.0970%
유리 이소류신	0.0620%	0.0570%
유리 류신	0.0940%	0.0860%
유리 라이신	0.116%	0.119%
유리 메티오닌	0.0120%	0.0120%
유리 페닐알라닌	0.0560%	0.0580%
유리 프롤린	0.172%	0.179%
유리 세린	0.0700%	0.0730%
유리 트레오닌	0.0850%	0.0860%
유리 트립토판	0.0360%	0.0380%
유리 티로신	0.128%	0.130%
유리 발린	0.144%	0.118%
총 유리 아미노산	1.81%	1.85%
*나열된 유리 아미노산 잔기의 양은 단백질 가수분해물의 총 중량을 기준으로 한 중량 백분율로 제공되며, 단백질 가수분해물은 단백질 가수분해물 조성물의 총 중량을 기준으로 4 중량%의 단백질을 포함한다. HIE 1 또는 HIE 2의 총 단백질 함량의 유리 아미노산 잔기의 양은 HIE 1 또는 HIE 2의 단백질 함량의 총 중량을 기준으로 한 중량 백분율로 제공된다.		

[0162]

[0163]

HIE 1 및 HIE 2에 존재하는 단백질의 총 중량을 기준으로 50중량% 초과와 가수분해된 단백질 (즉, 각각 100% 및 87.5%)은 매우 짧은 사슬의 펩티드로 검출된다. "매우 짧은 사슬 펩티드"는 본원에서 약 6개 아미노산 잔기 내지 약 20개 아미노산 잔기의 아미노산 잔기 사슬 길이를 갖는 펩티드로 정의된다.

[표 3] 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 단백질 HIE 1 및 효소적으로 가수분해된

동애등에 유충 단백질의 마이야르 반응 생성물 HIE 2 내 병원성 박테리아 수

미생물 cfu/g	HIE 1	HIE 2
총 플레이트 수	28000 cfu/g	63000 cfu/g
대장균(<i>E. coli</i>)	<10 cfu/g	<10 cfu/g
살모넬라(<i>Salmonella</i>)	25 g 에서 미검출	25 g 에서 미검출
바실루스 세레우스(<i>B. cereus</i>)	<10 cfu/g	<10 cfu/g
클로스트리디움 퍼프린젠스(<i>C. perfringens</i>)	<10 cfu/g	<10 cfu/g

[0164]

[0165]

'호기성 중온성 수 30℃'(ISO 4833과 동일)로도 지칭되는 총 플레이트 수는 Nutrilab(Rijswijk, NL)에 의해 결정되었으며; 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) 수는 30℃에서 평가되었고 (ISO 7932와 동일); 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 수는 37℃에서 측정되었으며 (ISO 7937과 동일); 대장균(*Escherichia coli*) 플레이트 수는 44℃에서 평가되었고; 살모넬라(*Salmonella*) 수는 신속 PCR 방법 (ISO 6579와 동일)을 사용하여 평가되었다. 따라서 두 생성물 HIE 1 및 HIE 2에서 미생물 수는 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대해 10 cfu/g 단백질 미만; 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)에 대해 10 cfu/g 단백질 미만; 대장균(*Escherichia coli*)에 대해 10 cfu/g 단백질 미만; 및 25g의 HIE 1 또는 HIE 2를 평가하였 때 살모넬라(*Salmonella*) 수는 0 cfu/g 단백질이었다. 이와 함께 HIE 1 및 HIE 2 모두에 대한 미생물 수는 식품 제품 또는 식품 성분에서 유충수를 적용하기 위해 도달해야 하는 값의 경계 내에 있었다. 즉, 유럽 위원회의 "미생물 해충 방제 제품에 대한 미생물 오염 물질 제한에 관한 OECD 발행 문서"에 따르면, 상기 표시된 미생물에 대한 검출된 플레이트 수는 유럽 위원회 지침에 따라 허용 가능한 한도 내에 있었다. 도 2를 참조한다.

[0166]

본 발명의 방법에 따른 상기 공정으로부터 생성된 생성물, 즉 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 수용성 단백질 HIE 1 및 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 수용성 단백질 HIE 2의 마이야르 반응 생성물에 대해 감각 파라미터, 즉 풍미 프로파일, 풍미 점수, 향 점수 및 쓴맛에 대해 조사하고, 동애등에 유충의 수성 수용성 단백질 분획과 비교하였다. 풍미 프로파일링은 서술적으로; 인간 응답자(응답자 1-3)에게 형성된 제품과 가장 가까운 비교를 하도록 요청하였다. 다른 파라미터에 대해서는 제품을 3명의 인간 응답자가 1(매우 싫어함)에서 5(매우 좋아함)의 척도로 점수를 매겼다. 결과를 표 4에 나타냈다. 본 발명자들에게 놀랍게도 HIE 1 및 HIE 2는 모두 쓴맛이 없었다. 이에 더해, 동애등에 유충의 수성 수용성 단백질 분획(유충수)에 대해 초기에 있었던 곤충과 같음이라는 기록은 효소적으로 가수분해된 수용성 곤충 단백질을 제공하는 방법을 적용한 후 고기와 같음이라는 기록(쇠고기의 풍미 및 맛과 유사)으로 바뀌었다. HIE 1을 마이야르 반응시킨 결과 형성된 HIE 2는 HIE 1 및 유충수에 비해 조리된 고기 풍미가 더 두드러졌다. 놀랍게도 HIE 1과 HIE 2의 고기 유사 맛의 강도는 쇠고기 자체의 고기 맛의 강도보다 몇 배나 높았다. HIE 1 및 HIE 2의 이러한 고기 유사 풍미는 분명히 HIE 1 및 HIE 2의 유리 아미노산 조성물과 관련이 있다.

[표 4] 인간 응답자에 의한 동애등에 유충의 수성 수용성 단백질 분획(유충수), 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 단백질 HIE 1 및 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 단백질의 마이야르 반응 생성물 HIE 2의 감각 프로파일링 (n=3).

파라미터 (평균점수)*	동애등에 유충의 수성 수용성 단백질 분획 (유충수)	HIE 1	HIE 2
맛	2.33	4	4.33
향	2.67	3.33	4.33
쓴맛	5	5	5
풍미 프로파일			
응답자 1	전형적인 곤충 맛	삶은 쇠고기	단맛이 더해진 삶은 쇠고기
응답자 2	전형적인 곤충 맛	쇠고기/돼지고기 육수	바람직한 측면의 약간의 육수
응답자 3	전형적인 곤충 맛	소 꼬리 수프	조리된 고기 풍미가 더욱 강렬함
* '응답자 1-3'으로 지칭되는 3 명의 인간 피험자는 감각 파라미터인 맛, 향 및 쓴맛을 1-5의 점수 척도로 점수를 매겼으며, 점수 1-5의 의미는 다음과 같다: 1. 매우 싫음; 2. 약간 싫음; 3. 확실하지 않음; 4. 약간 좋음; 및 5. 매우 좋음. 3명 응답자의 개별 점수에 대한 평균값을 제시함.			

[0167]

[0168]

HIE 1 및 HIE 2의 감각 프로파일의 관점에서, 이들 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 수용성 단백질은 다음과 같은 응용 분야에 적합하다:

[0169]

1. 고양이와 개, 더욱 구체적으로 고양이를 위한 펫 사료 풍미증진제로서, 이는 맛이 음식 수용에서 중심적 역할을 한다. 유리 아미노산 수준과 HIE 1 및 HIE 2의 총 조성 모두, 및 추가로 특이적이고 강렬한 고기 유사 프로파일은 사료 조성물의 제조에서 가수분해물의 높은 적합성에 기여한다.

[0170]

2. 예를 들어 양식 해양 및 민물 생물에 대한 양식 사료 기호. 보다 구체적으로, HIE 1 및 HIE 2는 새우 사료용 사료 첨가제로 적합하며, 이는 특이적 유리 아미노산의 조합이 이미 새우 사료에 첨가되어 사료 수용성을 증가시킨다.

[0171]

3. 식품 제조의 구성요소. 한편으로 인간은 고기를 먹는 것을 좋아하지만 다른 한편으로는 식단에서 동물성 고기 수준을 줄이려는 임무를 수행하고 있다. 이러한 HIE 1 또는 HIE 2 제제는 고기 유사 풍미를 부여함으로써 식품의 매력을 향상시킨다. 생성물의 미생물 수(표 3 참조)는 또한 생성물이 인간의 섭취에 안전한 미생물 수 내에 있음을 나타낸다.

[0172]

4. 가축 사료의 첨가제 또는 구성요소. 이유기 및 이유 후 동물(특히 펫 및 이유기 돼지, 부화 후 가금류 및 물고기)은 복합 사료의 소화 문제로 인해 위장 장애로 고생한다. HIE 1 및 HIE 2는 1000 Da 미만의 분자량을 가진 다량의 단백질을 포함하고 있다 (표 2 참조). 이들 단백질은 쉽게 소화가 잘된다. 이는 또한 높은 펩신 소화율로 나타난다 (표 2 참조). 이러한 비교적 높은 소화율(100%)을 갖는 이러한 제품은 어린 동물을 위한 영양 보조제로 유익하게 사용된다. 실제로 옥수수 및 대두박 기반 식단에 특정량(예: 2-8%)의 동물성 단백질 가수분해물(예: 돼지 내장, 돼지 점막, 연어 내장 또는 가금류 조직 가수분해물) 또는 대두 단백질 가수분해물을 포함하는 것은 이유기 돼지, 어린 송아지, 부화 후 가금류 및 어류에서 바람직한 성장률 및 사료 효율을 보장할 수 있다 --(Hou *et al.*, 2017). 이와 함께, 이러한 포유동물/어류/가금류 기반 단백질 가수분해물은 가축 및 반려동물의 영양 및 이들의 건강(특히 장 건강) 및 웰빙을 최적화할 수 있는 가능성이 있다.

[0173]

실시예 - 감각 실험(맹검 인간 소비자)

[0174]

실시예 1. 인간의 맹검 실험(국수 요리에 HIE 1 적용)

[0175] HIE 1 및 HIE 2 제품의 초기 시음 테스트(위 참조)에서 가수분해된 곤충 추출물 1 및 가수분해된 곤충 추출물 2가 모두 쇠고기와 유사한 풍미를 가짐이 분명하였다. 따라서, 실시예 1의 목적은 관능수용시험에서 가수분해된 곤충 추출물 1에 의한 쇠고기 국수의 쇠고기 또는 쇠고기 풍미 성분을 대체하는 효과를 연구하는 것이었다.

[표 A] 테스트에 사용된 레시피

성분	대조군 레시피	HIE 1을 포함하는 테스트 레시피
큐브 쇠고기 스튜 고기	0.45kg	-
다진 양파	1 컵	1 컵
다진 셀러리	1 컵	1 컵
쇠고기 부용 과일	1/4 컵	-
건조 파슬리	1/4 컵	1/4 컵
갈은 후추	1 꼬집	1 꼬집
다진 당근	1 컵	1 컵
물	5.75 컵	5 컵

[0176]

[0177] 재료 및 방법

[0178] allrecipes.com (Loop, n.d.)에서 4.5/5 등급의 레시피를 선택하였다. 모든 재료는 현지 수퍼마켓에서 조달하였다. 성분에 대한 상세한 내용은 표 A에 제시되어 있다. 테스트 레시피에서 쇠고기 스튜 고기와 쇠고기 과립은 가수분해된 곤충 추출물 1, HIE 1로 대체하였다.

[0179] 두 레시피 모두 큰 소스 팬에서 제조하였다. 대조군 레시피 고기의 경우 양파와 셀러리는 중간 고열에서 5분 동안 가열하였다 (또는 고기의 모든 면이 갈색으로 변할 때까지). 다른 재료들은 넣고 약한 불에서 끓이다가 30분간 끓인다. 테스트 레시피에서 양파와 셀러리는 갈색으로 변할 때까지 동일한 열 수준으로 5분 동안 가열하였다. 이어서 파슬리, 후추, 당근, 물, 가수분해된 곤충 추출물 1 및 계란 국수를 첨가하였다. 생성물을 약한 불에서 30분간 끓여 조리하였다.

[0180] 비프 큐브는 감각 응답자의 편향 행동을 피하기 위해 대조군 레시피에서 제거하였다. 감각 패널은 6명의 구성원으로 구성되었다(모두 25세 내지 40세). 각 응답자에게 각각 100g의 국수 수프를 블라인드로 제공하였다. 두 번의 시음 사이에 시식 팔레트를 세척하기 위해 각 응답자에게 컵에 물이 제공되었다. 수용 테스트는 9점의 쾌락 척도(9-매우 좋아함, 5-중지도 싫지도 않음, 1-매우 싫어함)을 사용하여 고려하였다.

[0181] 결과 및 논의

[0182] 응답자의 블라인드 감각 반응은 표 B에 표시되어 있다. 응답자에게는 블라인드 방식으로 대조군 레시피의 일부와 테스트 레시피의 일부가 제공되었다: 응답자는 대조군 레시피를 먹고 있는지 또는 테스트 레시피를 먹고 있는지 그리고 어떤 순서로 먹는지 사전에 통지받지 않았다.

[표 B] 감각 점수

인간 응답자	대조군 레시피	테스트 레시피
R1	6	8
R2	4	7
R3	5	9
R4	7	8
R5	6	6
R6	5	7
평균 점수 + SD	5.5 ± 1.0	7.5 ± 1.0

[0183]

[0184] 모든 응답자가 테스트 레시피를 좋아하였다. 이는 평균 점수에서도 확인할 수 있었다. 테스트 레시피는 대조 레시피보다 유의하게 더 나은 맛을 보였다 (t-검정, $p < 0.05$). 대부분의 응답자는 테스트 레시피가 대조군 레시피에 비해 쇠고기 풍미가 더 많다고 맹검으로 표시하였다.

[0185] **결론**

[0186] 국수 시험의 결과는 가수분해된 곤충 추출물 1(HIE 1)이 식품 제형의 식품 성분으로 적합하고 HIE 1이 식품 제품, 예를 들어 시험된 국수에 쇠고기 유사의 고기 풍미를 강화하거나 심지어 부여함으로 보여준다.

[0187] **실시예 2 - 비육류 제조에서 가수분해된 곤충 추출물 2(HIE 2)의 풍미 증진 가능성**

[0188] **재료 및 방법**

[0189] allrecipes.com (DownHomeCitySisters, n.d.; 2019년 9월 액세스)에서 4.5/5 등급의 퀴노아 블랙빈 버거 레시피를 선택하였다. 모든 재료는 현지 슈퍼마켓에서 구입하였다. 기본 레시피 조성물은 표 5에 언급된 재료를 사용하여 만들었다. 퀴노아를 물에 끓인 다음, 물이 모두 흡수되고 퀴노아가 부드러워질 때까지 중불에서 끓였다. 블랙빈을 으개 페이스트로 만들었다. 그런 다음 모든 재료를 그릇에서 혼합하였다. 혼합물을 동일한 2개의 부분으로 나누었다. 기본 레시피라고 하는 조성물의 대조군 부분은 12.5g의 물과 혼합하고, 기본 레시피 조성물의 테스트 부분은 이전에 5배 농축된 가수분해된 곤충 추출물 2(HIE 2) 12.5g과 혼합하였다 (단백질 함량이 HIE 2의 총 중량을 기준으로 약 20중량%). 두 부분 모두 4℃에서 1시간 동안 마리네이드되도록 두었다. 이 단계에 따라 대조군 레시피와 테스트 레시피로부터 직경 2.5cm(대략)의 작은 버거를 만들었다. 이들 버거는 짙은 황금색 크러스트가 얻어질 때까지 올리브 오일(약한 불 사용)에서 튀겼다.

[표 5] 기본 레시피의 성분

성분	기본 레시피
통조림 블랙빈 (씻은 것)	0.42kg
퀴노아	¼ 컵
물	½ 컵
빵 부스러기	½ 컵
노란 피망	¼ 컵
다진 양파	2 테이블스푼
다진 마늘	1 쪽(큰것)
그라운드 커민	1.5 티스푼
소금	0.5 티스푼
고추 소스	1 티스푼
계란	1
올리브유(튀김용)	3 테이블스푼

[0190]

[0191] 감각 패널('응답자')은 7명의 인간 구성원으로 구성되었다(모두 25세 내지 45세). 각 응답자에게는 HIE 2 및 대조군 레시피를 포함하는 테스트 레시피의 버거가 블라인드로 제공되었다. 따라서 응답자들은 어떤 버거가 대조군 레시피이고 어떤 버거가 테스트 레시피인지 알지 못하였다. 두 번의 시음 사이에 시식 팔레트를 세척하기 위해 각 응답자에게 컵에 물이 제공되었다. 수용 테스트는 5점의 쾌락 척도(5-매우 좋아함, 3-좋지도 싫지도 않음, 1-매우 싫어함)를 사용하여 고려되었다.

[0192] **결과 및 논의**

[0193] 응답자의 감각 반응은 표 6에 표시되어 있다.

[표 6] 감각 점수

응답자	컨트롤 레시피	테스트 레시피 (HIE 2)
R1	3.5	5
R2	3	5
R3	3.5	4
R4	4	5
R5	3	5
R6	3	4
R7	3	5
평균 점수 + SD	3.2 ± 0.39	4.7 ± 0.48

[0194]

[0195] 표 6의 점수카드에서 볼 수 있듯이 모든 응답자는 대조군 레시피보다 테스트 레시피(가수분해된 곤충 추출물 2 포함)를 선호하였다. 테스트 레시피가 대조군 레시피보다 맛이 유의하게 우수하였다(t-검정, $p < 0.05$). 모든 응답자는 테스트 레시피가 쇠고기와 같은 맛이 나는 것으로 나타났다. 일부 응답자는 또한 테스트 레시피가 고기 풍미가 강할 뿐만 아니라 대조군 레시피와 비교하여 향신 풍미가 더 좋았다고 지적하였다.

[0196] **결론**

[0197] 상기 맹검 시험으로부터, 가수분해된 곤충 추출물 2가 채식 제형에서 고기 풍미, 즉 쇠고기 풍미를 효율적이고 만족스럽게 부여한다는 결론이 내려졌다. HIE 2 함유 조성물에서, HIE 2의 존재는 또한 테스트 레시피에서 다른 성분의 풍미를 향상시킨다. 이와 함께 HIE 2 단백질 가수분해물을 비육류 식품 제품의 풍미 및/또는 풍미 증진 식품 성분으로 적용하면 육류 소비를 감소시킬 가능성이 있으며(쇠고기, 돼지고기 및 가금류), 육류 소비 감소는 지속 가능한 농업 및 식량 생산 및 식량 소비에 기여할 것이다. 이제 본 발명으로 인해, 예를 들어 HIE 1 및 HIE 2 가수분해물을 식품 제품 성분으로 적용함으로써 인간의 대량 생산 및 대량 소비에 적합한 유익한 정도로 이러한 식품 제형의 동물성 고기 풍미를 향상시키므로, 육류 단백질 가수분해물은 현재 제한된 지속 가능한 단백질 공급원(예: 식물성 단백질)에 추가된다.

[0198] **실시예 3**

[0199] **2. 재료 및 방법**

[0200] **2.1. 시약**

[0201] 모든 시약은 분석 등급이었다. 디메틸설폭사이드, 메탄올, 에탄올, 염화칼슘, 염화칼륨, 염화나트륨, 과산화수소 및 Tween-20은 Merck(VWR, Leuven, 벨기에)에서 구입하였다. 아질산나트륨, 소 혈청 알부민, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 및 PercollTM은 Sigma(Bornem, 벨기에)에서 구입하였다. 수성 추출물과 용액은 Milli-Q 물 시스템(Millipore, Bedford, USA)을 사용하여 얻은 Milli-Q 물에서 만들었다. 비신코닌산(Bichinchonic acid) 및 황산구리(II) 용액은 Sigma(Steinheim, 독일)에서 구입하였다. Whatman 여과지 등급 4(270mm)는 Amersham(Buckinghamshire, 영국)에서 구입하였다. Sterlip 30 ml 일회용 진공 필터 시스템은 Millipore(Bedford, USA)에서 구입하였다. 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질 및 2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-설폰산)은 Aldrich(Darmstadt, 독일)에서 구입하였다. 8-아미노-5-클로로-7-페닐피리도[3,4-d]피리다진-1,4(2H,3H)디온(L-012)은 Wako Chemicals(Neuss, 독일)에서 구입하였다.

[0202] **2.2. 원료**

[0203] 계육분(CM) 및 어분(FM)은 2019년 9월 온라인 웹샵에서 구입하였다. 공급업체가 공표한 두 성분의 화학적 조성은 표 7에 제시되어 있다.

[표 7] 계육분 및 어분의 화학적 조성(기본으로, 공급업체에서 제공한대로).

영양소	계육분	어분
수분(g/kg)	60.0	100.0
조단백질(g/kg)	700.0	710.0
조지방(g/kg)	120.0	120.0
추가된 항산화제	없음	있음(E324)
형태	분말	

[0204]

[0205]

BSF PureeX™ (BSF-P)라고도 하는 BSF 유충의 푸레는 2019년 10월 Protix BV(Dongen, 네덜란드)에 의해 제조되었다. 푸레는 다음 방법에 따라 얻었다. 14일령의 살아있는 세척된 동애등에 유충은 유충을 다지기 위한 분쇄기로 처리(이로써 유충 펄프 제공)하기 직전에 채집하고, 이어서 사용할 때까지 4℃에서 보관하였다. 각 실험에서 유충은 신선하게 다졌다. 다진 유충은 분리 단계를 거쳐, 본 발명에 따른 수용성 BSF 유충 단백질을 얻었다. 수용성 BSF 유충 단백질을 본 발명의 방법에 따라 연속 교반 하에 50℃(±2℃)에서 6시간 동안 단백질 질량을 기준으로 1중량%의 Flavourzyme으로 처리하였다. Flavourzyme(Novozymes, 덴마크)는 엔도펩티다제 및 엑소펩티다제 활성을 갖는 아미노펩티다제의 조합이다. 본 발명의 방법에 따라 효소의 불활성화를 위해 효소-처리된 수용성 BSF 유충 단백질을 후속적으로 가열하였다.

[0206]

위에서 설명한 대로 얻은 수성 단백질 가수분해물(BSF-APH)은 2019년 10월 Protix B.V.(Dongen, 네덜란드)에 의해 제공되었다. Protix에 따르면: BSF-APH는 본 발명의 방법에 따라 제조된, 수용성 BSF 단백질의 가수분해물이다. BSF-APH는 물에 대한 용해도가 높은 것으로 확인되었다(>95%). 공급업체 또는 Protix(발명자들)이 공표한 세 가지 성분 모두의 화학적 조성은 표 8에 기재하였다.

[표 8] BSF 단백질 유도체 **BSF-APH**의 화학적 조성 (기본으로, Protix에서 제조한대로).

영양소	BSF-APH ³
수분(g/kg)	55 ^a
조단백질(g/kg)	455 ^a
조지방(g/kg)	35 ^a
추가된 항산화제	없음
<1000 Da인 총 단백질의 %	>98
형태	분말

³BSF-APH: BSF 수성 단백질 가수분해물; ^aProtix에 의해 결정된 범위를 기준으로 한 평균값.

[0207]

[0208]

수용성 추출물은 CM 및 FM에 대해 준비되었다. 이들 제품(각각 100g)을 각각의 건조물 함량을 기준으로 6배 부피의 Milli-Q 물에 용해시키고 자기 교반기에서 2시간 동안 교반하였다. 원심분리(4℃에서 30분 동안 1000 xg) 후, 상부 지방층을 제거하고 상청액을 Whatman 필터(등급 4)를 사용하여 여과하였다. 모든 불용성 잔류물을 제거하기 위해 원심분리 및 여과 단계를 다시 반복하였다. 끝으로 Sterlip 필터(50mL, 0.22 μm)를 사용하여 상청액을 여과하고 이틀에 걸쳐 동결 건조하여 각각의 수용성 추출물 분말을 얻었다. BSF-APH는 95% 초과 수용해도를 가지기 때문에 직접 사용하였다. 모두 4개의 수용성 추출물과 BSF-APH 분말은 추가 사용이 있을 때까지 테스케이터(18℃)에 보관하였다.

[0209] 2.3. 단백질 정량

[0210] 4개의 수용성 추출물과 BSF-APH 분말의 총 단백질 함량을 비신코닌산(BCA) 단백질 분석법을 이용하여 분석하였다[24]. 검량선은 농도: 0, 0.125, 0.25, 0.5 및 1 mg/ml에서 표준물질로 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 얻었다. 3 mg/ml 수용성 추출물과 BSF-APH의 스톱 용액을 분석에 사용하였다. BCA(49/50) 4900 μ l 및 황산구리(II)(1/50) 100 μ l를 녹여 시험용액을 만들었다. 샘플 스톱 용액(10 μ l) 및 시험용액(200 μ l)을 96웰 플레이트의 웰에 첨가하였다. 이 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하고 Multiscan Ascent(Fisher Scientific, Asse, 벨기에)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0211] 2.4. DPPH 분석

[0212] DPPH 라디칼 제거 능력은 Brand-Williams *et al.*의 프로토콜에 따라 약간의 변형으로 분석하였다[25]. DPPH 시험용액은 40ml 에탄올에 10.5mg DPPH를 용해시켜 제조하였다. 시험용액을 신선하게 만들고 추가 사용이 있을 때까지 어두운 곳에 보관하였다. DPPH 작업용액은 시험용액을 10배 에탄올로 희석하여 만들었다(517 nm에서 흡광도 0.6-0.8가 되도록). DPPH 작업용액(1920 μ l)을 20 μ l의 샘플 희석액(Milli-Q 물 중 4개의 수용성 추출물 및 BSF-APH)과 혼합하여 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 및 0.2mg/ml의 최종 농도를 얻었다. 어두운 곳에서 30분 및 60분 인큐베이션 후 HP 8453 UV-vis 분광광도계(Agilent Technologies, Waldbronn, 독일)를 사용하여 510nm에서 흡광도 감소를 기록하였다. 대조군의 경우 샘플 희석액 대신 Milli-Q 물만 사용하였다.

[0213] 2.5. ABTS 분석

[0214] ABTS 양이온 라디칼 제거 능력은 Arnao *et al.*의 프로토콜에 따라 약간의 변형으로 분석하였다[26]. ABTS 시험용액은 Milli-Q 물에 7.0mmol/l ABTS 및 2.45mmol/l 과황산칼륨을 용해시켜 제조하였다. 시험용액을 실온의 어두운 곳에 밤새 두었다. ABTS 작업 용액은 734 nm에서 0.7 내지 0.8의 흡광도를 얻기 위해 메탄올로 희석하여 만들었다. ABTS 작업 용액(1920 μ l)을 20 μ l의 샘플 희석액(Milli-Q 물 중 4개의 수용성 추출물 및 BSF-APH)과 혼합하여 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 및 0.2mg/ml의 최종 농도를 얻었다. 어두운 곳에서 30분 인큐베이션 후 HP 8453 UV-vis 분광광도계(Agilent Technologies, Waldbronn, 독일)를 사용하여 734nm에서 흡광도 감소를 기록하였다. 대조군의 경우 샘플 희석액 대신 Milli-Q 물만 사용하였다.

[0215] 2.6. 특이적 면역학적 추출 후 효소검출(SIEFED) 분석법을 이용한 미엘로퍼옥시다제(MPO) 활성

[0216] SIEFED 분석법은 동물 기원 MPO의 특이적 검출을 위해 Franck *et al.*[27]에 의해 개발되어 허가된 방법이다. MPO 용액은 인간 MPO를 20mM 인산염 완충 식염수(pH 7.4), 5g/l BSA 및 0.1% Tween-20에 희석하여 제조하였다. 최종 농도 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml의 샘플 희석액을 최종 농도 25ng/ml의 MPO 용액으로 10분 동안(37°C에서) 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상기 혼합물을 말 MPO에 대한 토끼 다클론성 항체(3 μ l/ml)로 코팅된 96웰 마이크로타이터 플레이트의 웰에 로딩하고 어두운 곳에서 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 웰을 세척한 후, 과산화수소(10 μ M), NO₂⁻(10mM) 및 AmplexTM Red(40 μ M)를 첨가하여 항체에 의해 포획된 효소의 활성을 측정하였다. AmplexTM Red의 형광 부가물 레조루핀으로의 산화는 Fluoroskan Ascent(Fisher Scientific, Asse, 벨기에)를 사용하여 37°C에서 30분 동안 모니터링하였다. 대조군의 경우 샘플 희석액 대신 Milli-Q 물만 사용하였다.

[0217] 2.7. 고전적 측정법을 이용한 미엘로퍼옥시다제(MPO) 활성

[0218] MPO 용액은 상기 단락 2.6에 기재한 대로 준비하였다. 최종 농도 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml의 샘플 희석액을 최종 농도 25ng/ml의 MPO 용액으로 10분 동안(37°C에서) 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상기 혼합물(100 μ l)을 즉시 96웰 마이크로타이터 플레이트로 옮겼다. 이어서 10 μ l의 NO₂⁻(10mM) 및 100 μ l의 AmplexTM Red 및 과산화수소 혼합물 (단락 2.6에서 언급된 농도)을 추가하였다. AmplexTM Red의 형광 부가물 레조루핀으로의 산화는 관련 혼합물을 첨가한 직후 Fluoroskan Ascent(Fisher Scientific, Asse, 벨기에)를 사용하여 37°C에서 30분 동안 모니터링하였다. 대조군의 경우 샘플 희석액 대신 Milli-Q 물만 사용하였다.

[0219] 2.8. 세포 항산화 활성

[0220] 호중구 및 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA) 용액의 제조는 Paul *et al.*[17]에 따라 실시되었다. 샘플의 호중구 반응 조절 활성은 Tsumbu *et al.*[16]의 프로토콜을 사용하여 분석하였다. 호중구 현탁액(1백만 세포/143 μ l PBS)을 96웰 마이크로타이터 플레이트의 웰에 로딩하고 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 및 0.2mg/ml의 최

중 농도에서 샘플의 인산염 완충 식염수와 함께 10분 동안(어두운 곳에서 37℃에서) 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 25 µl 염화칼슘(10 µM) 및 20 µl L-012(100 µM)를 웰에 첨가하였다. Fluoroskan Ascent(Fisher Scientific, Asse, 벨기에)를 사용하여 37℃에서 30분 동안 호중구의 화학발광 반응을 모니터링하기 직전에 10 µl PMA(16 µM)로 호중구를 활성화하였다. 대조군의 경우 샘플 희석액 대신 인산염 완충 식염수만 사용하였다.

2.9. 통계 분석

모든 분석은 삼중으로 수행되었다. 단백질 정량을 위해 선형 회귀를 사용하여 적합선 방정식(the equation of a fitted line)과 R-제곱값을 계산하였다. 항산화 분석에서 얻은 농도와 억제 사이의 관계는 본질적으로 비단조적(non-monotonic)이었다. 이를 해결하기 위해 LOESS(Local Estimated scatterplot smoothing) 회귀 기법을 사용하여 관계를 모델링하였다[28]. 모델은 R 통계 소프트웨어를 사용하여 피팅되었다[29]. 이러한 모델에는 로컬 회귀의 평활화 감도(smoothing sensitivity)를 정의하는 스캔 파라미터가 필요하다. 육안 검사로 0.4의 스캔 파라미터 값(span parameter value)이 모든 농도 및 억제 관계 곡선에 적합한 것으로 확인되었다. IC₅₀(50% 억제에 도달하는 농도)과 같은 관심의 예측된 억제 백분율 농도는 수치 검색 루틴과 결합된 적합 모델을 사용하여 확인되었다.

3. 결과

3.1. 단백질 정량

BSA를 사용하여 얻은 검량선, 선 방정식 및 R-제곱값을 설정한다. 샘플의 광학 밀도 및 단백질의 상대 농도(선 방정식을 이용하여 계산)는 표 9에 제공하였다. CM 추출물 용액(3mg/ml)이 가장 높게 나타난 반면, BSF-APH 용액은 BCA 분석법을 이용한 시험용액 중에서 가장 낮은 단백질 농도를 나타낸다.

[표 9] BCA 분석법을 이용한 단백질 정량화

제품	모든 분석에서 시험에 사용된 제품	평균 광학 밀도	단백질 농도 (mg/ml)
BSF-APH ³	Protix 에서 생산하는 제품	0.383	0.702
FM ⁴	수용성 추출물	0.425	0.829
CM ⁵	수용성 추출물	0.481	0.998

³BSF-APH: BSF 수성 단백질 가수분해물; ⁴FM: 어분; ⁵CM: 계육분.

3.2. DPPH 분석

30분 및 60분의 인큐베이션 후 모든 5개 샘플의 DPPH 라디칼 제거 능력을 각각 도 3 및 도 4에 도시하였다. 플롯은 측정값과 LOESS에서 얻은 적합 곡선을 보여준다. CM은 30분 및 60분 인큐베이션 후의 모든 시험 농도에서 산화촉진 거동을 나타냈다. 반면 FM은 30분 인큐베이션 후 5개 시험 농도 중 4개 및 60분 인큐베이션 후 모든 시험 농도에서 산화촉진 거동을 보였다. 분석 동안 샘플이 산화촉진제 활성을 나타내거나 또는 50% 억제가 달성되지 않았기 때문에 모든 샘플(30분 또는 60분 인큐베이션 후)에 대한 IC₅₀을 계산하는 것은 불가능하였다. 모든 샘플의 E_{max}(분석 동안 달성된 최대 억제)는 또한 표 11에 제시하였으며, 30분 인큐베이션 후 순서는 다음과 같다: BSF-APH>FM.

[표 10] 다양한 분석을 이용하여 얻은 샘플의 항산화 활성 IC₅₀ (mg/ml)

분석	BSF-APH ³	FM ⁴	CM ⁵
DPPH 30 분	NE ^c	NE ^c	PO ^d
DPPH 60 분	NE ^c	PO ^d	PO ^d
ABTS 30 분	0.03	0.11	0.09
MPO ^a SIEFED	0.18	PO ^d	PO ^d
MPO ^a 고전적	0.05	PO ^d	PO ^d
CAA ^b	NE ^c	NE ^c	NE ^c

³BSF-APH: BSF 수성 단백질 가수분해물; ⁴FM: 어분; ⁵CM: 계육분; ^aMPO: 미엘로페록시다제; ^bCAA: 호중구 모델을 이용한 세포 항산화 활성; ^cNE: 시험 농도에서 50% 억제가 달성되지 않았기 때문에 추정되지 않음; ^dPO: 시험 농도에서 샘플이 산화촉진 활성을 나타내므로 추정되지 않음.

[표 11] 다양한 분석을 이용하여 얻은 샘플의 항산화 활성 E_{max} (% 억제)

분석	파라미터	BSF-APH ³	FM ⁴	CM ⁵
DPPH 30 분	최대(%)	16.26	0.75	PO ^c
	C*(mg/ml)	0.20	0.03	-
DPPH 60 분	최대(%)	17.75	PO ^c	PO ^c
	C*(mg/ml)	0.20	-	-
ABTS 30 분	최대(%)	90.81	70.40	69.39
	C*(mg/ml)	0.20	0.20	0.20
MPO ^a SIEFED	최대(%)	53.08	PO ^c	PO ^c
	C*(mg/ml)	0.20	-	-
MPO 고전적	최대(%)	90.86	PO ^c	PO ^c
	C*(mg/ml)	0.20	-	-
CAA ^b	최대(%)	36.62	21.81	5.08
	C*(mg/ml)	0.20	0.05	0.20

^cC: E_{max}가 달성되는 농도; ³BSF-APH: BSF 수성 단백질 가수분해물; ⁴FM: 어분; ⁵CM: 계육분; ^aMPO: 미엘로페록시다제; ^bCAA: 호중구 모델을 이용한 세포 항산화 활성; ^cNE: 시험 농도에서 50% 억제가 달성되지 않았기 때문에 추정되지 않음; ^dPO: 시험 농도에서 샘플이 산화촉진 활성을 나타내므로 추정되지 않음.

3.3. ABTS 분석

30분 인큐베이션 후 샘플의 ABTS 양이온 라디칼 제거 능력을 도 5에 도시하였다(측정값 및 LOESS에서 얻은 적합 곡선). 모든 샘플은 유사한 억제 패턴, 즉 농도 증가의 함수로 %억제가 증가함을 나타냈다. 샘플의 IC₅₀는 표 10에 기재되어 있으며 순서는 다음과 같다: FM>CM>BSF-APH. IC₅₀이 낮을수록 ABTS 양이온 라디칼 제거 능력이 높

다. 모든 샘플의 $E_{\max}$ (분석 동안 달성된 최대 억제)는 표 11에 제시하였으며, 순서는 다음과 같다: BSF-APH>FM>CM.

[0233] 3.4. 특이적 면역학적 추출 후 효소검출(SIEFED) 분석법을 이용한 미엘로퍼옥시다제(MPO) 활성

[0234] SIEFED 분석법을 이용하여 얻은 샘플의 MPO 반응 조절 활성을 도 6에 도시하였다(측정값 및 LOESS에서 얻은 적합 곡선). 샘플의 IC_{50} 은 표 10에 기재되어 있다. 샘플의 $E_{\max}$ 는 표 11에 제시하였다. FM 및 CM은 모든 시험 농도에서 산화촉진 거동을 나타낸다.

[0235] 3.5. 고전적 분석법을 이용한 미엘로퍼옥시다제(MPO) 활성

[0236] 고전적 분석법을 이용하여 얻은 샘플의 MPO 반응 조절 활성은 도 7에 도시하였다(측정값 및 LOESS에서 얻은 적합 곡선). CM 및 FM은 모든 시험 농도에서 산화촉진 거동을 나타냈다. 모든 시험 샘플의 $E_{\max}$ 는 표 11에 기재되어 있다. BSF-APH는 $E_{\max}>75\%$ 를 나타낸다. 샘플의 IC_{50} 은 표 10에 제공하였다.

[0237] 3.6. 세포 항산화 활성

[0238] 샘플의 호중구 반응 조절 활성(측정값 및 LOESS에서 얻은 적합 곡선) 및 $E_{\max}$ 는 각각 도 8 및 표 11에 제시되어 있다. 모든 시험 샘플은 $E_{\max}>0\%$ 를 나타냈다. BSF-APH, FM 및 CM은 $E_{\max}<40\%$ 를 나타냈다. CM은 5개의 시험 농도 중 3개에서 산화촉진 거동을 나타냈다. 샘플의 IC_{50} 은 표 10에 제공하였다.

[0239] 4. 논의

[0240] 4.1. 단백질 정량

[0241] 비신코닌산 분석법을 이용하여 추정된 BSF-APH 및 2개의 수용성 추출물의 단백질 농도는 표 9에 제시되어 있다. BSF-APH의 경우, 3mg/ml 용액은 0.702mg/ml의 단백질 농도를 나타내며, 이는 BSF-APH(또는 23.5% 단백질)의 그램 당 0.235mg의 단백질로 해석된다. 본 발명자들(Protix)에 따르면, BSF-APH의 평균 단백질 함량은 45.5%이다(표 8 참조, 듀마스(Dumas) 방법을 이용하여 분석). 단백질 함량의 차이는 분석 방법으로 인해 발생한다. 비신코닌산 분석법은 Cys, Trp 및 Tyr에 특이적인 결합의 검출을 기반으로 한다. 반면 듀마스 분석법은 총 유기질소의 추정을 기반으로 한다. 따라서 듀마스 방법을 이용하여 추정된 단백질 함량은 항상 비신코닌산 분석법을 이용하여 추정된 것보다 항상 높다. 그러나 이들 두 가지 단백질 추정법의 비교는 본 발명의 양태가 아니다. FM과 CM 사이의 아미노산 패턴 유사성을 고려할 때 두가지 수용성 추출물의 단백질 함량은 $CM>FM>45.5\%$ 의 순서로 결론지어진다.

[0242] 4.2. DPPH 라디칼 제거 능력

[0243] DPPH 및 ABTS 분석은 일반적으로 식품 및 사료 제품의 항산화 가능성을 분석하기 위해 사용된다. DPPH 라디칼 제거 능력은 자유 라디칼을 안정화하기 위해 샘플이 수소 원자(수소 원자 전달이라고 함) 또는 전자(단일 전자 전달이라고 함)를 공여하는 능력을 나타낸다. 시험된 모든 샘플에 대한 DPPH 분석 IC_{50} 및 $E_{\max}$ 는 각각 표 10 및 표 11에 언급되어 있다. 30분의 인큐베이션 후, 모든 시험 샘플은 $E_{\max}<50\%$ 를 나타내며 BSF-APH가 <1000 Da인 단백질을 적어도 98% 함유한다. 본 발명자들은 FM 및 CM의 분자량 분포에 대한 어떠한 대표적 문헌도 찾을 수 없었다. 그러나 문헌에 따르면 FM 및 CM은 각각 2.2% 및 1.1%의 유리 아미노산(총 단백질의)을 함유하고 있다[Li, P.; Wu, G. Composition of amino acids and related nitrogenous nutrients in feedstuffs for animal diets. *Amino Acids* **2020**, 1-20, doi:10.1007/s00726-020-02833-4.]. 이는 FM 및 CM가 각각 <1000 Da의 단백질을 적어도 2.2% 및 1.1% 함유하는 것으로 해석된다. 단백질성 물질의 자유 라디칼 제거 능력은 단백질 분자량 분포에 달려 있다. 저분자량 펩티드를 갖는 단백질은 자유 라디칼을 보다 효율적으로 제거할 수 있다. 그러나 이것이 BSF-APH가 <1000 Da의 단백질을 더 많이 함유하며 여전히 DPPH 자유 라디칼의 더 낮은 억제를 나타낸다는 사실을 설명하는 것은 아니다. 단백질성 분자의 자유 라디칼 제거 능력은 또한 다음에 의해 영향을 받는다: (1) 아미노산 조성: 소수성 아미노산(예: Tyr, Phe, Pro, Ala, His 및 Leu)은 친수성 아미노산에 비해 우수한 라디칼 제거 능력을 갖는다; (2) 아미노산 서열: 양친매성 펩티드는 샘플의 라디칼 제거 능력을 향상시킬 수 있다. 화학적 분석에 따르면 Tyr은 수소 원자 전달 메커니즘을 통해 항산화 거동을 나타낸다. 반면에 Cys, Trp 및 His와 같은 아미노산은 단일 전자 전달 메커니즘을 통해 항산화 거동을 나타낸다.

[0244] FM 및 CM은 30분 및 60분의 인큐베이션 후에 테스트된 대부분의 농도에서 산화촉진 거동을 나타낸다(도 3 및 4

참조). 이 거동은 주로 열처리에서 발생한다. FM 및 CM 모두에서, 열처리는 일반적으로 원료 제품을 고온에서 15-20분 동안 가열하는 것을 포함한다. 노르웨이에서는 어분 생산 과정에서 장내세균(*Enterobacteriaceae*) 및 살모넬라(*Salmonella*) 수를 100 log₁₀ 감소시키기 위해 70℃ 이상의 온도에서 20분 이상 동안 자연산 물고기를 가열 처리한다. 이러한 엄격한 열처리 조건은 지방 및 단백질의 산화를 초래할 수 있다. 어분은 열 산화에 더욱 민감한 고도불포화지방산이 풍부한 지질을 함유하고 있다. 항산화제는 일반적으로 고도불포화지방산의 산화 방지를 위해 어분에 첨가된다(표 7에서도 볼 수 있음). 아미노산의 열 유도 산화는 광범위한 산화 생성물의 발달로 이어진다. 아미노산 산화 부산물의 산화촉진 거동은 이미 알려져 있다. 이들로 인해 동물 신체의 광범위한 건강 상태를 초래할 수 있다. 공급업체에 따르면, 본 연구에 사용된 모든 동태등에 단백질 유도체는 <100℃의 온도에서 <1.5분 동안 열처리되었다. 공급업체는 또한 이러한 열처리 시간-온도 조합이 영양소(단백질 및 지방)에 대한 손상을 최소화하고 병원성 미생물총(microbiota)의 적절한 불활성화를 보장하기 위해 채택되었다고 밝혔다. 이는 FM 및 CM의 산화촉진 거동이 주로 엄격한 생산방법으로 인해 발생함을 의미한다.

[0245] 4.3. ABTS 양이온 라디칼 제거 능력

[0246] ABTS 양이온 라디칼 제거는 샘플이 전자를 공여하고 자유 라디칼을 안정화하는 능력을 나타낸다. 모든 샘플의 ABTS 분석 IC₅₀은 표 10에 제시하였다. 그 순서는 다음과 같다: FM>CM>BSF-APH. IC₅₀이 높을수록 항산화 활성이 낮다. 동 분석에서는 FM 및 CM도 항산화 활성을 나타낸다. FM 및 CM 추출물은 단일 전자 전달 메커니즘을 이용하여 자유 라디칼(들)이 안정화될 수 있는 경우 효율적일 수 있는 것으로 보인다. 그러나 이들은 여전히 BSF-APH와 비교하여 더 낮은 제거 능력을 나타낸다.

[0247] BSF-APH는 적어도 98%의 단백질이 <1000 Da의 분자량을 가지며(모든 시험 샘플 중에서 가장 낮은 단백질 분자량), 또한 가장 낮은 ABTS IC₅₀을 나타냈다. 단백질 분자량에 대한 라디칼 제거 능력의 상관성은 이미 단락 4.2에 설명되어 있다.

[0248] Zhu et al.[23]은 광범위한 상용 효소를 사용하여 BSF 단백질 가수분해물을 개발하였다. 가수분해물을 한외여과(ultrafiltration)를 이용하여 그룹 1(<3000 Da), 그룹 2(3000-10,000 Da) 및 그룹 3(>10,000 Da)으로 추가 분별하였다. 또한 이들 가수분해된 분획물의 활성을 ABTS 양이온 라디칼 제거 능력에 대해 조사하였다. 동 연구에서 아스코르브산이 참조 분자로 사용되었다. 흥미롭게도 가장 성능이 좋은 분획물 및 아스코르브산은 0.05mg/ml 농도에서 ABTS 양이온 라디칼을 각각 85.67% 및 92.11% 억제할 수 있었다. 본 발명자들은 이제 BSF-APH가 91%(0.2 mg/ml에서)의 ABTS 양이온 라디칼 제거 E_{max}를 나타낸다는 것을 확인하였다. 이는 BSF-APH를 분획화하면 매우 강력한 항산화 가능성을 갖는 분획이 생성된다는 것을 보여준다.

[0249] 4.4. 호중구 반응 조절 활성

[0250] BSF 유도체의 강력한 자유 라디칼 제거 능력은 단락 4.2 및 4.3에서 분명히 확인된다. 또한 모든 샘플에 대해 호중구 반응 조절 활성을 시험하였다. 호중구는 동물(인간, 펫, 물고기, 가금류 및 돼지 포함) 체내에 존재하는 백혈구이다. 그들은 병원체에 대한 1차 방어에 관여한다. 병원성 미생물이 동물 체내로 들어가면 호중구는 침입 부위로 달려가 방어를 시작한다. 과립화 동안, 호중구는 NADPH 옥시다제를 비롯한 광범위한 산화효소를 방출하며, 이는 슈퍼옥사이드 음이온 및 부산물(예: 과산화수소) 생성의 원인이 된다. 슈퍼옥사이드 음이온은 추가로 산화질소 라디칼과 반응하여 퍼옥시니트리트(peroxynitrite)를 생성할 수 있다. 이 과정은 또한 히드록실 라디칼을 생성한다(과산화수소와 금속 이온의 반응에 의해). 이 산화 반응 배터리는 숙주 동물의 방어에 중요하다. 그러나 숙주 방어 중에 생성된 이러한 ROS는 신체 세포의 효소, 단백질, 지질 등과 반응하여 다양한 건강 상태(예: 세포 노화, 암 등)를 유발할 수 있다. 이 연구에서 수행된 호중구 분석은 호중구 활성의 결과로 생성된 ROS를 제거하는 단백질성 분자의 능력을 결정한다. PMA는 호중구에 존재하는 단백질 키나제 C를 활성화하는데 사용되었으며, 이로써 ROS 생성을 촉매하는 NADPH 옥시다제가 생성된다. 시스템에서 ROS 생성은 루시게닌(lucigenin) 증폭 화학발광과 결합된다. 단백질성 샘플의 ROS(특히 슈퍼옥사이드 음이온) 제거 능력은 화학발광 감소로 표시된다. 본 발명자가 아는 한, 이는 BSF 유도체의 시험관내 호중구 반응 조절 활성에 대한 첫 번째 분석이며 결정이다. CM은 5개의 시험 농도 중 3개에서 산화촉진 거동을 나타냈으며, E_{max}는 0.2mg/ml에서 5%에 불과하였다(도 8 및 표 11 참조). CM은 일반적으로 펫 사료 제조에 사용된다. 그러나, 본 발명자들은 이제 본 발명의 가수분해물의 제거 능력과 대조적으로 CM 함유가 호중구에 의해 생성된 ROS 제거와 관련된 이점을 거의 또는 전혀 제공하지 않음을 확인하였다. 더욱이, 본 발명의 BSF 유출 단백질 가수분해물과 대조적으로, CM 함유로 숙주 세포에 염증성 손상을 초래할 수도 있다. 개 또는 고양이 세포의 반복적인 염증성 손상은 노화 가속화, 인지 기능 저하

등과 같은 상태로 해석될 수 있다.

[0251] 반면에 FM은 동 분석에서 E_{max} 가 22%인 약한 항산화 거동을 나타낸다(표 11 참조). 0.2 mg/ml에서, FM은 5%의 억제율을 나타낸다. 양식용 배지(즉, 물)는 병원성 박테리아의 지속적인 완충액을 제공한다. 따라서 양식 생물은 지속적인 병원성 박테리아의 침입 위험에 놓여 있다. 이는 면역 감소, 노화 등을 포함하는 광범위한 건강 상태를 초래한다. 본 발명자들은 반복적인 호중구 활성화로 인한 염증성 손상을 억제하기 위한 FM의 부적절성을 강조하는, FM을 이용한 비교 실험을 실시하였다. 이는 종종 항생제 및 영양 보충제 사용의 결과로 발생하는 증분 비용으로 해석된다. 놀랍게도, BSF-APH는 36.62%의 E_{max} 를 나타낸다(표 11 참조). 따라서, 어떠한 이론에 얽매이지 않고, 본 발명자들에 따르면, 본 발명의 BSF-APH는 병원성 침입으로 인한 산화적 손상을 억제하기 위한 자연적이고 지속 가능한 해결책을 제공한다.

[0252] 4.5. MPO 반응 조절 활성(SIEFED 및 고전적 분석)

[0253] 호중구 반응의 일반적인 메커니즘은 알려져 있다. 호중구 세포의 트랩에는 병원성 미생물을 불활성화하는데 필요한 여러 분자가 포함되어 있다. 호중구 세포의 트랩에 존재하는 MPO 효소는 과산화수소와 염화 이온으로부터 차아염소산을 생성할 수 있다. 또한 MPO는 티로신을 티로실 자유 라디칼로 산화시킬 수 있다. MPO 산화의 두 생성물(차아염소산 및 티로실 자유 라디칼)은 병원체를 불활성화하는데 중요하다. 다시 말하지만, 이들 분자와 동물 세포의 반복적인 상호작용으로 염증성 손상이 발생한다. 동물 체내에서 MPO-Fe(III)(활성 형태)는 과산화수소와 반응하여 옥소페일 π 양이온 라디칼(CpI 형태)을 형성한다. CpI 형태는 염화 이온과 결합된 MPO-Fe(III)로 다시 전환되어 차아염소산으로 변환된다. 그러나 본 실험에서 CpI 형태의 MPO-Fe(III)로의 역환원은 2단계로 이루어졌다. 아질산 이온을 통해 전자 전달을 통한 CpI의 MPO-Fe(IV)=O로의 첫 번째 환원. 그 다음, MPO-Fe(IV)=O를 MPO-Fe(III) 형태로 전환시키는 전자 제공(AmplexTM Red 산화를 통해 레조루핀 반응으로)이 이루어졌다. 단백질질 분자는 CpI 형태와 직접 반응하여 할로겐화를 종료하거나 또는 MPO 활성의 결과로 생성된 ROS에 수소를 공여(수소 원자 전달)함으로써 MPO로 인한 산화적 손상을 방지할 수 있다. MPO 반응 조절 활성은 고전적 및 SIEFED 분석법을 이용하여 분석하였다. 고전적 분석은 CpI 형태와 복합체를 형성하여 ROS를 안정화하는 샘플의 능력을 측정한다. SIEFED 분석에서는 MPO가 토끼 다클론성 항체에 결합되어(그리고 나머지 화합물은 씻어 냄), CpI 형태와 복합체를 형성하는 샘플의 능력을 순수하게 측정한다.

[0254] 호중구 반응 조절 활성과 마찬가지로, BSF 유도체 가수분해된 BSF 유충 단백질의 MPO 반응 조절 활성도 본 발명자들에 의해 처음으로 확인되었다. FM 및 CM은 두 분석 모두에서 산화촉진 거동을 나타낸다(도 6 및 7 참조). 산화촉진 반응을 일으킬 수 있는 FM 및 CM 내 산화 반응 생성물의 존재(제조 공정의 결과로서)는 이미 단락 4.2에서 논의되었다. 본 발명자들에 의해 실현된 비교예에서의 상세한 시험관내 조사로부터, BSF-APH에서 관찰된 효과와 대조적으로 동물 사료 내 FM 및 CM을 포함하는 것이 염증성 손상을 초래할 수 있음을 알 수 있다.

[0255] 고전적 분석법에서, BSF-APH는 놀랍도록 강력한 항산화 가능성을 나타낸다. BSF-APH는 고전적 분석에서 강력한 항산화 가능성을 보여준다(표 10 참조). 이러한 관찰은 BSF-APH가 MPO 활성화로 인한 염증성 손상을 효과적으로 억제하기 위해 펫 사료 및 양식 제제에 사용하기에, 예를 들어 식품 또는 사료 성분으로 사용하기에 매우 적합함을 나타낸다.

[0256] 본 발명자들은 놀랍게도 BSF 단백질 유도체가 FM 및 CM에 비해 항산화 이점을 제공한다는 것을 발견하였다.

[0257] 실시예 4

[0258] 단백질 가수분해물 - 고양이 기호성 테스트

[0259] 도입

[0260] 단백질 가수분해물을 본 발명의 방법에 따라 제조하여, 본 발명의 단백질 가수분해물, 즉 효소적으로 가수분해된 동애등에 유충 단백질 HIE 1을 제공하였다(HIE 1을 제조하기 위한 세부 사항은 예를 들어 본원의 상기 실시예 1에 설명되어 있음). 실시예 4에서 적용된 단백질 가수분해물은 1000 Da 미만의 분자량(단쇄 펩티드)을 갖는 단백질을 100% 함유하였다. 또한, 단백질 가수분해물 내 단백질의 최대 45%가 유리 아미노산 형태로 존재한다.

[0261] 단쇄 펩티드 및 유리 아미노산 잔기(아미노산 조성 및 배열에 따름)는 모두 펫 사료 제형에 풍미를 부여할 수 있다. 실시예 4는 고양이 사료 제조에서 단백질 가수분해물 HIE 1의 풍미 증진 가능성에 대한 평가를 제공한다.

[0262] 재료

[0263] 고양이 사료 기호성 테스트는 De Morgenstond(Dussen, 네덜란드) 업체에서 실시하였다. 단백질 가수분해물 HIE 1은 본 발명자들에 의해 제조 및 제공되었다. 두 개의 시판되는 고양이 사료 기호성 증진제("풍미제 A" 및 "풍미제 B"라고 함)는 상위의 풍미제 회사 제품이다. 이들 고양이 사료 기호성 증진제는 가수분해된 단백질 용액으로 구성된다(Givaudan, 네덜란드). 매우 마일드한 농도의 기호성 증진제가 포함된 *Purina Felix* (습식 고양이 사료)는 현지에서 조달하였다.

[0264] 방법

[0265] 단백질 가수분해물 HIE 1 분말을 물에 용해시켜 건조물(테스트에 사용됨)을 기준으로 25%의 최종 용액을 만들었다. 풍미제 A 및 B는 이미 액체로 공급되었다. 동 연구의 실시예 4에서 사용된 기호성 증진제의 용량은 표 12에 기재하였다.

[표 12] 시판되는 기호성 증진 풍미제 A 및 풍미제 B 및 HIE 1의 용량

테스트 설정 1	
레시피 1.1	레시피 1.2
Felix (제 조업체에서 첨가한 습식 마일드 기호제) + 1.25% 본 발명의 단백질 가수분해물 HIE 1	Felix (제 조업체에서 첨가한 습식 마일드 기호제) + 1% 풍미제 A
테스트 설정 2	
레시피 2.1	레시피 2.2
Felix (제 조업체에서 첨가한 습식 마일드 기호제) + 1.25% 본 발명의 단백질 가수분해물 HIE 1	Felix (제 조업체에서 첨가한 습식 마일드 기호제) + 1% 풍미제 B

[0266]

[0267] 최종 레시피의 건조물 함량의 균형을 맞추기 위해 1% 농도의 풍미제 A 및 풍미제 B가 1.25%의 단백질 가수분해물 HIE 1과 비교하여 사용되었다. 두 테스트 설정 모두에서, 20마리의 적격 고양이에게 총 4일 동안 레시피 1(1.1 또는 2.1) 및 레시피 2(1.2 또는 2.2)를 급여하였다. 기호성 증진은 소비된 사료 백분율 및 1차 선택 백분율의 합수로 측정되었다.

[0268] 결과

[0269] 이 실험의 결과를 표 13에 제시하였다.

[표 13] 고양이 기호성 시험 결과

파라미터	레시피 1	레시피 2
테스트 설정 1		
	Felix (첨가된 습식 마일드 기호제) + 1.25% Protix 단백질 가수분해물	Felix (첨가한 습식 마일드 기호제) + 1% 풍미제 A
% 사료 소비율	62%	38%
% 1차 선택률	57%	43%
테스트 설정 2		
	Felix (첨가된 습식 마일드 기호제) + 1.25% Protix 단백질 가수분해물	Felix (첨가한 습식 마일드 기호제) + 1% 풍미제 B
% 사료 소비율	63%	37%
% 1차 선택률	68%	32%

[0270]

[0271] 두 가지 경우 모두에서 단백질 가수분해물 HIE 1 함유 사료가 동일한 양(건조물 기준)의 시판중인 풍미제 A 및 풍미제 B가 강화된 고양이 사료보다 더 많이 소비되었다. 또한, 테스트 고양이의 1차 선택도 또한 본 발명의 단백질 가수분해물 HIE 1 함유 사료였다.

[0272] **결론**

[0273] 단백질 가수분해물 HIE 1은 고양이 사료에 동일한 용량을 적용한 경우 현재 시판중인 고양이 사료 기호성 증진제와 비교하여 개선된 고양이 사료 기호성 증진제이다.

[0274] **실시예 5**

[0275] 단백질 가수분해물 - 개 기호성 테스트

[0276] **실시예 5의 목적**

[0277] HIE 2의 개 사료 기호성 증진제로서의 가능성을 보여준다.

[0278] **재료 및 방법**

[0279] 사료 제조의 세부 사항은 다음과 같다:

[0280] - 건사료(키블사료)는 개 기호성 테스트에 사용되었다.

[0281] - 키블사료(비교적 마일드한 농도의 기호제 함유)는 현지 슈퍼마켓에서 구입하였다(네덜란드). 이 키블사료는 대조군으로 사용되었다.

[0282] - 시험 개 사료 제형은 HIE 2가 물로 희석된, 희석된 HIE 2 용액의 총 부피를 기준으로 0.5%, 1.25% 및 2.5%의 농축 HIE 2(증발기를 사용하여 5배 농축)를 키블사료에 코팅하여 제조하였다. 상기 시험 제형은 코팅 후 1주일 동안 실온에서 건조 및 템퍼링되도록 두었다.

[0283] 기호성 증진 테스트의 세부 사항은 다음과 같다:

- [0284] - 기호성 테스트를 위해 대조군 제형 및 시험 제형을 개에게 제공하였다.
- [0285] - 설계:
- [0286] 개 마리 수: 20
- [0287] 테스트 기간: 4일
- [0288] 배당량(Portion size): 시험 제형 및 대조군 제형 각각 100g/개(dog)/일
- [0289] - 아침에 개에게 2개의 배당(1개의 시험 제형 및 1개의 대조군 제형)을 제공하였다. 남은 사료의 무게를 다음날 아침(정확히 24시간 후)에 측정하고 기록하였다. 더 적게 남은 배당이 더 구미에 맞는 것으로 간주하였다.
- [0290] **결과 및 논의**
- [0291] 0.5%, 1.25% 및 2.5%의 농축 HIE 2, 즉 시험 제형을 함유하는 식이와 관련된 개의 사료 소비율% 결과 및 1차 선택률% 결과를 각각 도 9A, 도 9B 및 도 9C에 도시하였다.
- [0292] 시험 제형을 포함하는 3가지 시험 모두에서 시험 제형인 HIE 2 함유 식이의 소비율%은 대조군 식이의 소비율보다 더 높았다. 유사하게, 세 가지 테스트 사례 모두에서 HIE 2 함유 식이의 1차 선택률%이 대조군 식이의 1차 선택률%보다 더 높았다. 이러한 결과는 종래의 개 사료와 비교할 때 개 사료 내 HIE 2의 비교적 강한 기호성 증진 가능성을 나타낸다. 기호성 효과는 예를 들어 그리고 무엇보다도 HIE 2 내 높은 수준의 유리 아미노산 및 단쇄 펩티드의 존재에 기인한다.
- [0293] **결론**
- [0294] HIE 2는 개 식이에서 기호성 증진 가능성, 즉 종래의 현재 개 사료와 비교할 때 개 식이에서 비교적 강한 기호성 증진 가능성이 있다.
- [0295] **실시예 6**
- [0296] 흰다리새우(*L. vannamei*)용 사료에서 기호성 증진제로서 HIE 1의 평가
- [0297] **도입**
- [0298] Pontus Research(영국)는 본 실시예에서 흰다리새우(*L. vannamei*)용 사료의 기호성 증진제로서 본 발명의 가수분해된 단백질 HIE 1(실시예 6에서 'HSW'라고도 함)의 강도, 효능 및 적합성을 확인하였다.
- [0299] **시험 설계 및 방법**
- [0300] 흰다리새우(*L. vannamei*)용 사료의 기호성 증진제로서 가수분해된 단백질 HIE 1의 강도, 효능 및 적합성에 대한 확인은 하기 표 A-G에 요약된 시험 세부 사항에 따라 실시하였다.

표 A. 시험 재료

시험 재료	단백질 가수분해물 HIE 1
작용기전	유인제로 작용하는 곤충 단백질 가수분해물
실시예	산업 표준 사료에 대해 흰다리새우(<i>L. vannamei</i>)에서 시험된 본 발명의 HIE 1 을 포함하는 시험 사료의 기호성을 확인하기 위해

[0301]

표 B. 시험 종

종	흰다리새우(<i>L. vannamei</i>)
공급원	글로벌 블루 테크놀로지(Global Blue Technologies)사

표 C. 시험 시설

유형	기호성 테스트를 위한 맞춤형 테스트 챔버 (test chamber), 10 x 140 리터 탱크(holding tank).
탱크의 수와 크기	1 x 140 리터 테스트 챔버, 10 x 70 리터 탱크
입수	탄소 여과된 정수.
기계적 및 생물학적 여과	공기 구동 스폰지 필터 - 테스트 챔버; 전체 RAS -탱크
소독	UV - 탱크
탱크 물 교환	70 l/h - 탱크
시스템 물 교환	10 %/일 - 탱크
표적 NH_3	<0.03mg/l.
표적 NO_2	<0.6mg/l.
표적 NO_3	<75mg/l.
물 화학 테스트	HANNA Multiparameter Bench Photometer 를 사용하여 주 2 회.
온도 조절	수중 히터 - 테스트 챔버, 인라인 히터 - 탱크.
pH 조절	자동.
모니터링	수동, 매일 - 산소, pH, 온도

표 D. 실험 사료

공급업체	Pontus Research 에서 제제화하고, Sparos(포르투갈)에서 제조.
사료 수	4.
설명	2 개의 실험 사료 및 2 개의 표준 상업용 사료.
예상 FCR	~1.5.
필요한 사료 - 총 동물 수 x 체중 증가량 x FCR	20% 비상 포함 사료당 2kg.

[0304]

표 E. 사료 설계(제제 허용)

	사료			
	0% HSW + 오징어 분말 + 크릴 오일	0% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일	1% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일	2% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일
코드(라벨)	1	3	2	4
어분 LT70 NORVIK	300.0	300.0	300.0	300.0
유채박 - 13042018	0.0	0.0	0.0	0.0
대두박 48	193.0	250.0	240.3	230.7
콩 농축액	0.0	0.0	0.0	0.0
옥수수 글루텐	0.0	0.0	0.0	0.0
원두콩	0.0	0.0	0.0	0.0
밀 글루텐	0.0	0.0	0.0	0.0
밀	417.8	389.6	389.6	389.8
오징어분말 83 08SP	30.0	0.0	0.0	0.0
HSW	0.0	0.0	10.0	20.0
어유 - BL75056- V19095-02	34.7	46.0	45.9	45.7
크릴 오일 - 15/130517	10.0	0.0	0.0	0.0
프리믹스	10.0	10.0	10.0	10.0
메티오닌	0.0	0.0	0.0	0.0
리신	0.0	0.0	0.0	0.0
항산화제	0.0	0.0	0.0	0.0
Vit C	0.0	0.0	0.0	0.0
산화이트륨	0.0	0.0	0.0	0.0
구아검	0.0	0.0	0.0	0.0
CaCO ₃	3.5	3.6	3.8	3.8
MCP	1.0	0.8	0.4	0.0
	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

[0305]

표 F. 시험

시험 설계	단일 요인 반복 연구
반복수	10.
사용된 총 탱크 수	11 – 1 개의 테스트 챔버 및 10 개의 탱크.
목표 시작 무게 g	30-35g.
테스트 챔버당 동물	10.
총 동물	>220
급식 체제	그룹당 단일 급여 이벤트.
시험기간(예정)	기호성 – 10 일 – 하루에 2 회 급여 이벤트. 공격 시간 – 4 일 – 크기 등급별로 사료당 5 회 급여 이벤트.
적응 기간	30 분.
명암 주기	12/12.
온도	28.0 ± 1°C.
pH	8.00 ± 0.25.
산소	> 80% 포화도.
염분	15ppt.

[0306]

표 G. 데이터 및 샘플 수집 및 분석

기호성 및 공격 시간 결합	- 아래 이미지와 같이 "적응" 챔버에 10 마리의 새우를 배치하였으나 추가의 사료 챔버를 포함하도록 수정하였다. - 적응 시간 30 분. - 단일 사료 2g 을 챔버 A, B, C 또는 D 에 무작위로 배치. - 사료 "냄새"가 퍼지는 동안 10 분. - 셔터가 올라간다. - 첫 번째 새우가 먹이를 먹기 시작하는데 걸린 시간을 기록한다. 1, 2, 5, 10, 15 분에 각 챔버 내 새우 수를 기록한다. - 강력한 데이터 세트 구축을 위해 이를 사료당 5 회 반복한다. - 반복 사이에 "냄새"가 남지 않도록 탱크를 완전히 배수하고 청소한다. - 위의 단계는 각 크기 등급별로 반복된다. - 시간은 총 대략 20 시간이 소요될 것이다.
----------------------	--

[0307] **데이터 계산 및 통계 처리**

[0308] 모든 데이터는 R 버전 4.0.2으로 하기 프로토콜을 사용하여 평균값 간의 차이의 유의성을 결정하기 위해 통계적으로 분석하였다:

[0309] · 기호성 데이터는 분산 파라미터가 추가된 포아송(Poisson) 회귀 모델을 사용하여 분석되었다. 크릴 오일을 포함한 처리는 더미 변수(dummy variable)로 포함되었고 HSW를 포함한 처리는 연속 변수로 처리되었다.

[0310] · 공격 시간 데이터는 정규성(normality)에 대한 Shapiro-Wilk 테스트와 등분산성에 대한 Levene 테스트와 함께, 분산분석(ANOVA) 명령을 사용하여 분석되었다.

[0311] · 분산의 정규성 및 등분산성이 확인되는 경우, ANOVA 결과를 허용하였다.

[0312] · 통계적으로 유의한 ANOVA 결과가 결정되면($p < 0.05$), Tukeys 쌍별 사후검정을 실시하여 $p < 0.05$ 에서 어떤 처리가 다른 처리와 상이한지를 결정하였다.

[0313] · 정규성 및 등분산성이 확인되지 않는 경우, Conover-Iman 쌍별 사후검정으로 데이터에 대해 Kruskal-Wallis 비모수 검정을 실시하여 어떤 처리가 다른 처리와 상이한지를 결정하였다.

[0314] 이 정보는 다음 표시 중 하나로 나타낸다:

[0315] · ND - 통계적 차이 없음, ANOVA 또는 Kruskal-Wallis $p > 0.05$

[0316] · $p < 0.05$ - $p < 0.05$ 의 신뢰 수준에서 유의한 통계적 차이를 보여주는 쌍별 사후검정

[0317] 이상값(outliers)으로 간주되는 임의의 데이터는 상기 데이터에서 제거하였다.

[0318] **결과**

[0319] **기호성**

[0320] 표 14에 기호성 결과를 요약하였다.

[표 14] 기호성 결과. 시간 경과에 따른 각 식이의 평균 새우 수($\pm$ 표준오차).

시간(분)	0% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일	0% HSW + 오징어 분말 + 크릴 오일	1% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일	2% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일
1	0.2 ± 0.18	0.00 ± 0.00	0.6 ± 0.54	0.2 ± 0.18
2	0.4 ± 0.22	0.00 ± 0.00	0.8 ± 0.52	0.4 ± 0.22
5	0.8 ± 0.52	0.4 ± 0.22	1.6 ± 0.83	0.8 ± 0.44
10	1.4 ± 0.61	1.8 ± 0.77	2.4 ± 1.04	3.6 ± 0.73
15	1.2 ± 0.33	2.8 ± 0.66	2.4 ± 0.92	4.6 ± 0.88

[0321]

[0322] 도 10A는 각 시간 간격에서의 지터 카운트 관찰을 기준으로, 시간 경과에 따른 각 사료에 대한 예측 성능 적합성을 표시한다(화살표로 표시).

[0323] **공격 시간**

[0324] 표 15는 새우의 공격 시간을 요약한 것이다.

[표 15] 공격 시간. 한 마리의 새우가 먹이를 먹기 시작하는데 걸리는 평균 시간(초).

다른 위 첨자는 사료군 간에 통계적으로 유의한 차이가 나타난 위치를 보여준다($p < 0.05$).

0% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일	0% HSW + 오징어 분말 + 크릴 오일	1% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일	2% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일
490.20 ± 171.30 ^a	426.80 ± 99.05 ^a	366.20 ± 139.22 ^a	282.60 ± 77.61 ^a

[0325]

[0326] 도 10B는 공격 시간을 표시하였다. 새우 한 마리가 사료를 섭식하기 시작하는 평균 시간으로, 표준 오차를 나타낸다. 다른 위 첨자는 사료군 간에 통계적으로 유의한 차이가 나타난 위치를 보여준다($p < 0.05$).

[0327] · 0% HSW + 오징어 분말 + 크릴 오일 및 0% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일 간 새우 수의 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p > 0.05$).

[0328] · 1% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일은 0% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일과 비교하여 새우 수가 유의하게 많았다 ($p < 0.05$).

[0329] · 2% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일은 0% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일과 비교하여 새우 수가 유의하게 많았다 ($p < 0.05$).

[0330] · 1% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일 그룹 및 2% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일 그룹에서는 0% HSW + 오징어 분말 + 크릴 오일 및 0% HSW - 오징어 분말 - 크릴 오일의 두 개의 사료와 비교하여, 더 빠른 공격 시간이 관찰되었다 ($p > 0.05$) ($p > 0.05$).

[0331] **논의 및 결론**

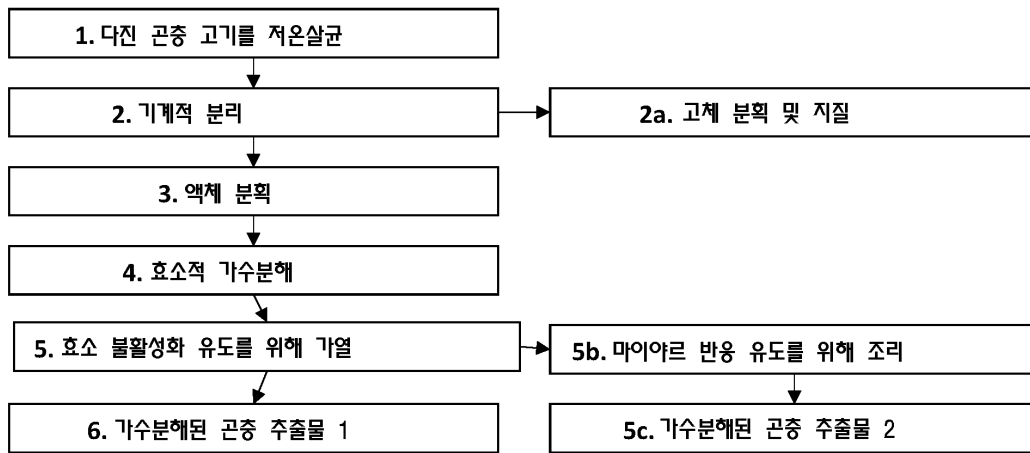
[0332] HIE 1(여기서는 HSW라 칭함)을 1% 및 2%로 함유하는 것은 두 대조군 사료와 비교할 때 새우 수가 유의하게 증가하였으며, 크릴 오일 함유는 새우 수에 유의한 영향을 미치지 않았다. HIE 1 및 크릴 오일 함유 처리에서 공격 시간이 감소했으며, 2% HSW(=HIE 1)를 포함하는 시험 사료는 음성 대조군과 비교하여 공격 시간이 42.6% 감소하여 가장 큰 효과를 나타냈다.

참고문헌

- Anuar, M.A.K., Narashid, N.H.H., Salleh, M.M., Yahya, A., 2017. Conversion of chicken viscera into protein hydrolysate for palatant production. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* 13, 606-611. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v0n0.615>
- Clark, J.E., 1998. Taste and flavour: their importance in food choice and acceptance. *Proceedings of the Nutrition Society* 57, 639-643. <https://doi.org/10.1079/PNS19980093>
- Dong, C., He, G., Mai, K., Zhou, H., Xu, W., 2016. Palatability of water-soluble extracts of protein sources and replacement of fishmeal by a selected mixture of protein sources for juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Ocean Univ. China* 15, 561-567. <https://doi.org/10.1007/s11802-016-2898-8>
- Everson, I., 2008. *Krill: Biology, Ecology and Fisheries*. John Wiley & Sons.
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., Wu, G., 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *J Anim Sci Biotechnol* 8. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
- Kato, H., Rhue, M.R., Nishimura, T., 1989. Role of Free Amino Acids and Peptides in Food Taste, in: *Flavor Chemistry*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 158-174. <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0388.ch013>
- Paul et al. (2016). Grasshoppers as a food source? Review. *BASE*, 20(S1), 337-352.
- PEW Charitable Trusts, 2014. Protecting Antarctic Krill (Fact Sheet). PEW Charitable Trusts, USA.
- Senevirathne, M., Kim, S.-K., 2012. Chapter 32 - Utilization of Seafood Processing By-products: Medicinal Applications, in: Kim, S.-K. (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research, Marine Medicinal Foods*. Academic Press, pp. 495-512. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00032-9>
- Tantikitti, C., 2014. Feed palatability and the alternative protein sources in shrimp feed. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 36, 51-55.
- Tchorbanov, B., Marinova, M., Grozeva, L., 2011. Debittering of Protein Hydrolysates by Lactobacillus LBL-4 Aminopeptidase [WWW Document]. *Enzyme Research*. <https://doi.org/10.4061/2011/538676>
- Wisuthiphaet, N., Klinchan, S., Kongruang, S., 2016. Fish Protein Hydrolysate Production by Acid and Enzymatic Hydrolysis. <https://doi.org/10.14416/ijast.2016.11.004>, *KMUTNB Int. J. Appl. Sci. Technol.*, Vol. 9, No. 4, pp. 261-270.
- Sergiy Smetana, Eric Schmitt, Alexander Mathys, 2019. Sustainable use of *Hermetia illucens* insect biomass for feed and food: Attributional and consequential life cycle assessment. *Resources, Conservation & Recycling* 144, pp. 285-296.
3. Firmansyah, M.; Abduh, M.Y. Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. *Heliyon* 2019, 5, e02005. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02005
4. Zhu, D.; Huang, X.; Tu, F.; Wang, C.; Yang, F. Preparation, antioxidant activity evaluation, and identification of antioxidant peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae. *J. Food Biochem.* 2020, e13186, doi:10.1111/jfbc.13186.
16. Tsumbu, C.N.; Deby-Dupont, G.; Tits, M.; Angenot, L.; Frederich, M.; Kohnen, S.; Mouithys-Mickalad, A.; Serfeyn, D.; Franck, T. Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase. *Int J Mol Sci* 2012, 13, 628-650, doi:10.3390/ijms13010628.
17. Paul, A. Field border flowering strips as a source of valuable compounds, Gembloux Agro-Bio Tech University of Liège, Gembloux, Belgique, 2017.
20. Firmansyah, M.; Abduh, M.Y. Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. *Heliyon* 2019, 5, e02005. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02005.
23. Zhu, D.; Huang, X.; Tu, F.; Wang, C.; Yang, F. Preparation, antioxidant activity evaluation, and identification of antioxidant peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae. *J. Food Biochem.* 2020, e13186, doi:10.1111/jfbc.13186.
24. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985, 150, 76-85, doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
25. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 1995, 28, 25-30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
26. Amaro, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 2001, 73, 239-244, doi:10.1016/S0308-8146(00)00324-1.
27. Franck, T.; Kohnen, S.; Boudjellia, K.Z.; Van Antwerpen, P.; Bosseloir, A.; Niesten, A.; Gach, O.; Nys, M.; Deby-Dupont, G.; Serfeyn, D. A new easy method for specific measurement of active myeloperoxidase in human biological fluids and tissue extracts. *Talanta* 2009, 80, 723-729, doi:10.1016/j.talanta.2009.07.052.
28. Zhang, H.; Holden-Wiltse, J.; Wang, J.; Liang, H. A Strategy to Model Nonmonotonic Dose-Response Curve and Estimate IC50. *PLOS ONE* 2013, 8, e69301, doi:10.1371/journal.pone.0069301.
29. R Core Team R: A language and environment for statistical computing; R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria, 2017.

도면

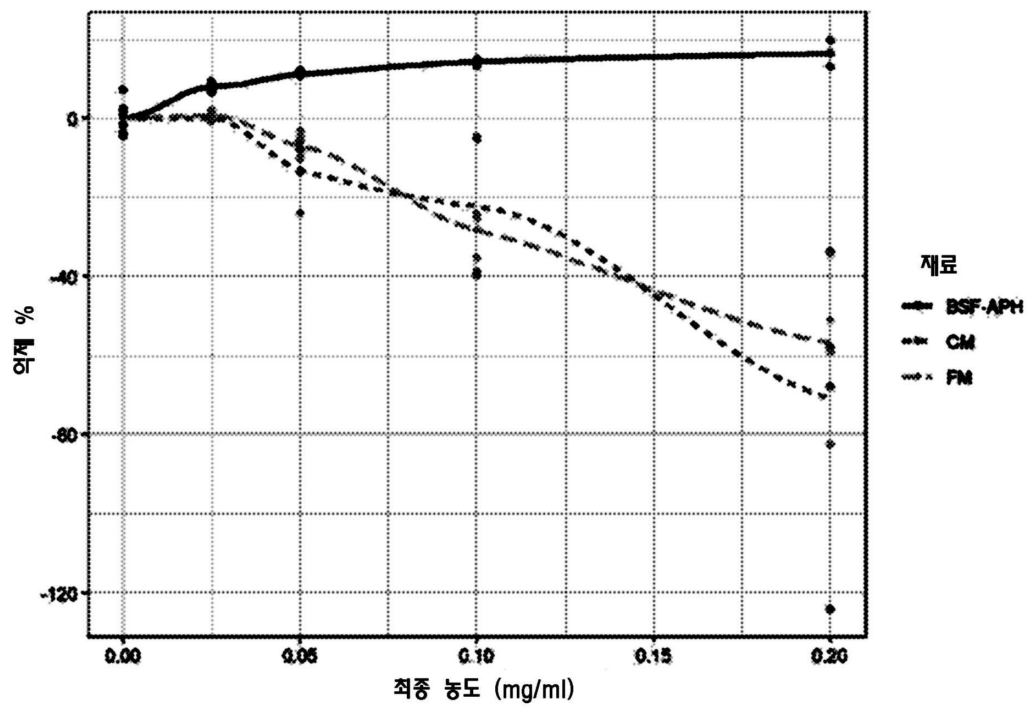
도면1



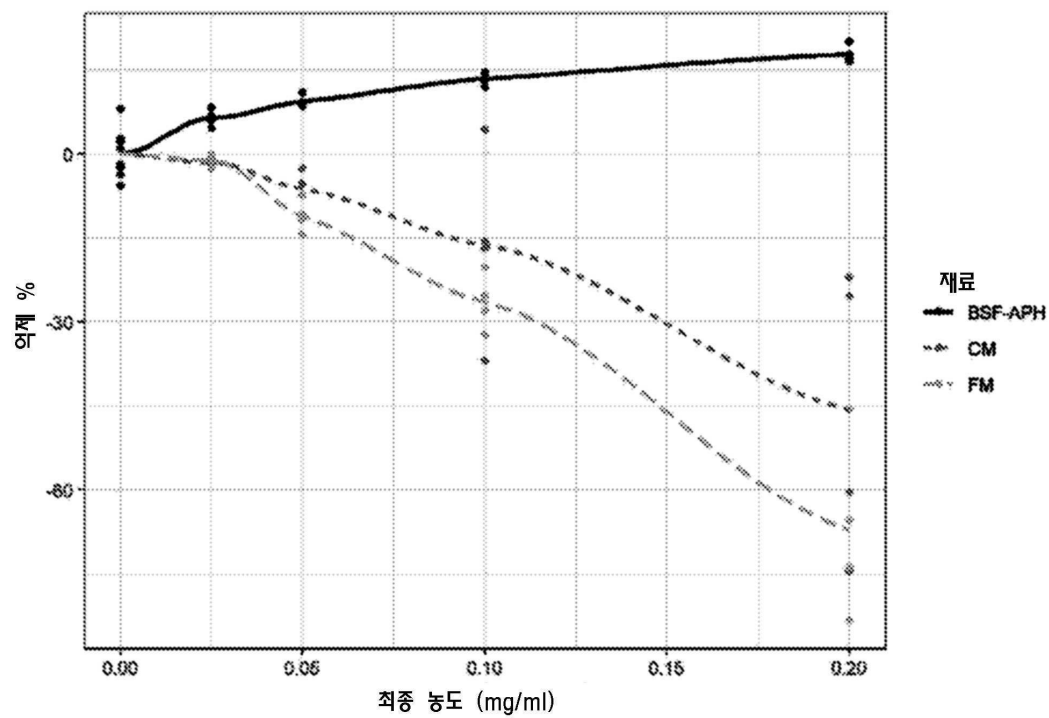
도면2

파라미터	목표 한계	한계 기준	방법
총 호기성 수	< 10 000 cfu/g	< 100 000 cfu/g	ISO 4833과 동일
참고문헌: Microbiological criteria of food stuffs Regulation(EC) 2073/2005 (Regulation (EC) 1441/2007에 의해 업데이트): 다진 고기			
장내세균(Enterobacteriaceae)	< 10 cfu/g	< 100 cfu/g	NEN-ISO 21528-2와 동일
참고문헌: Microbiological criteria of food stuffs Regulation(EC) 2073/2005 - 계란 제품			
대장균(E. coli)	< 10 cfu/g	< 100 cfu/g	Rapid'E.coli
참고문헌: Microbiological criteria of food stuffs Regulation(EC) 2073/2005 - 고기 제형			
살모넬라(Salmonella)	25g에서 부재	25g에서 부재	ISO 6579와 동일
참고문헌: Microbiological criteria of food stuffs Regulation(EC) 2073/2005 - 조리된 갑각류 및 연체 조개류			
리스테리아 모노사이토제니스 (Listeria monocytogenes)	25g에서 부재	< 100 cfu/g	NEN-EN-ISO 11290-1과 동일
참고문헌: Dutch Warenwet and Hygiene code for butchers			
코아굴라제-양성 황색포도상구균 (Coagulase-Positive Staphylococcus)	< 10 cfu/g	< 100 cfu/g	NEN-EN-ISO 6888-2와 동일, 37°C
참고문헌: Dutch Warenwet and Hygiene code for butchers			
바실루스 세레우스 (Bacillus cereus)	< 10 cfu/g	< 100 cfu/g	ISO 7932와 동일
참고문헌: Dutch Warenwet and Hygiene code for butchers			
클로스트리디움 퍼프린젠스 (Clostridium perfringens)	< 100 cfu/g	< 1000 cfu/g	ISO 7937과 동일
참고문헌: Dutch Warenwet and Hygiene code for butchers			
캄필로박터(Campylobacter)	25g에서 부재	25g에서 부재	NEN-EN-ISO 10272-1)
참고문헌: Dutch Warenwet and Hygiene code for butchers			
효모 및 곰팡이(Yeast and moulds)	< 100 cfu/g	< 1000 cfu/g	ISO 21527-1/2:2008과 동일
참고문헌: 'OECD issue paper on microbial contaminants limits for microbial pest control products' by European commission			

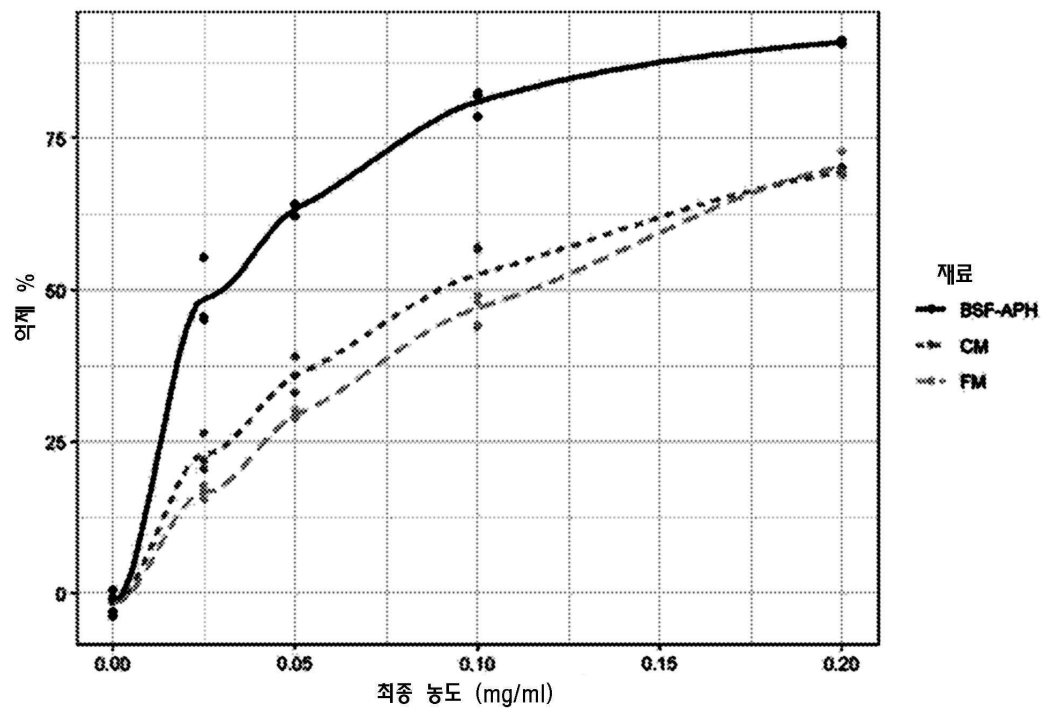
도면3



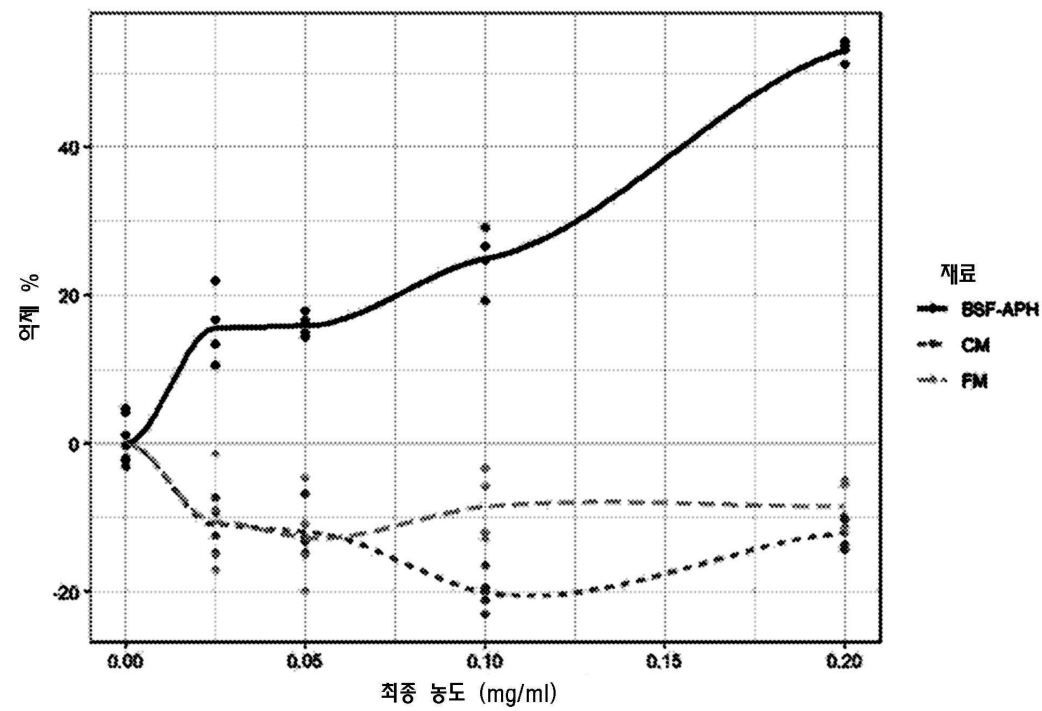
도면4



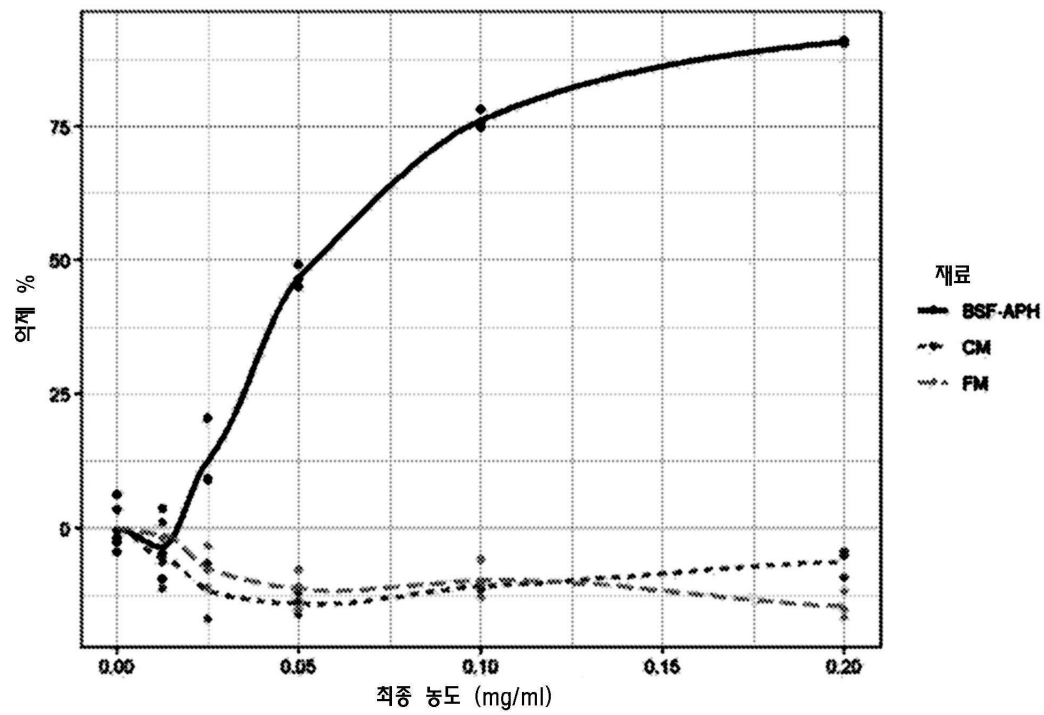
도면5



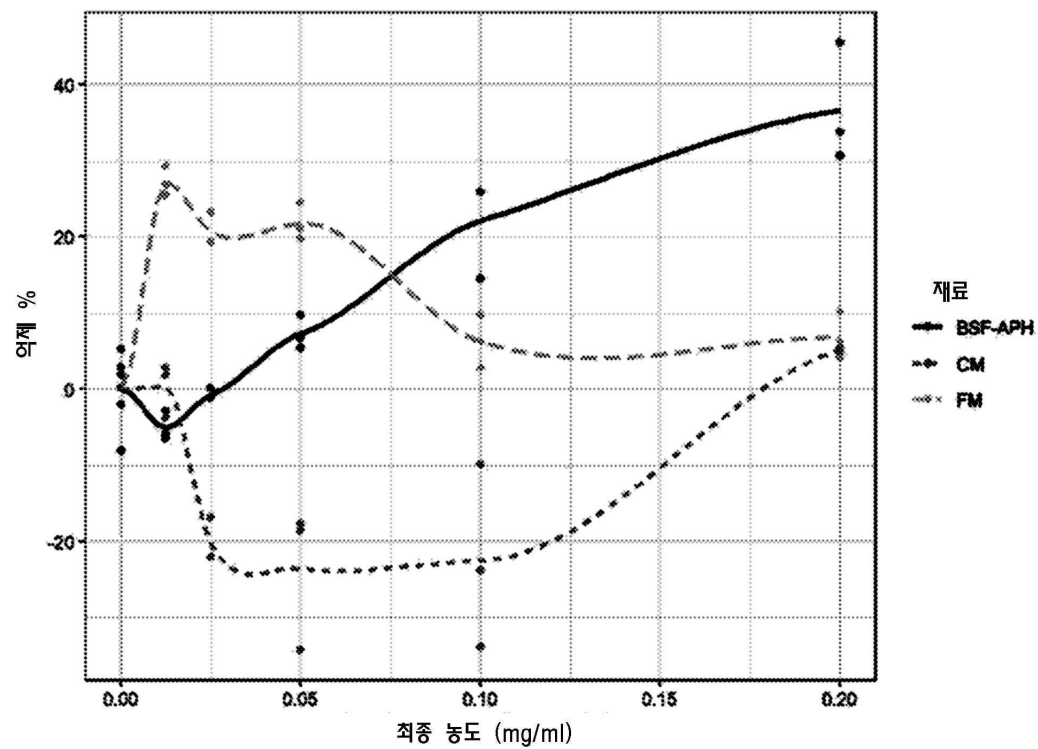
도면6



도면7

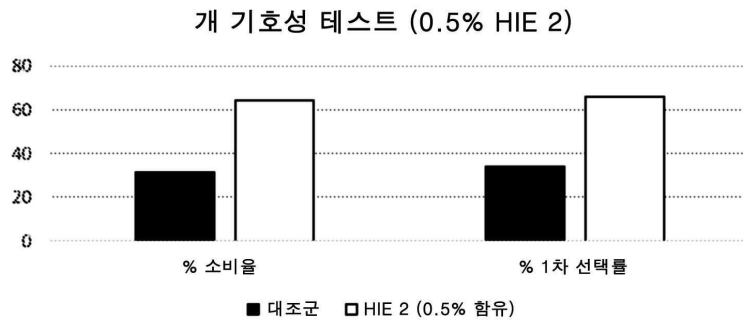


도면8

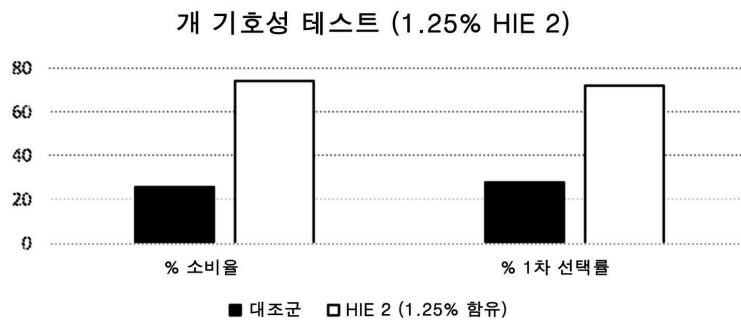


도면9

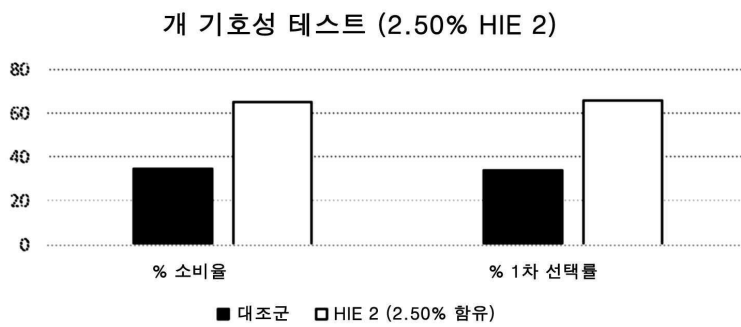
A



B

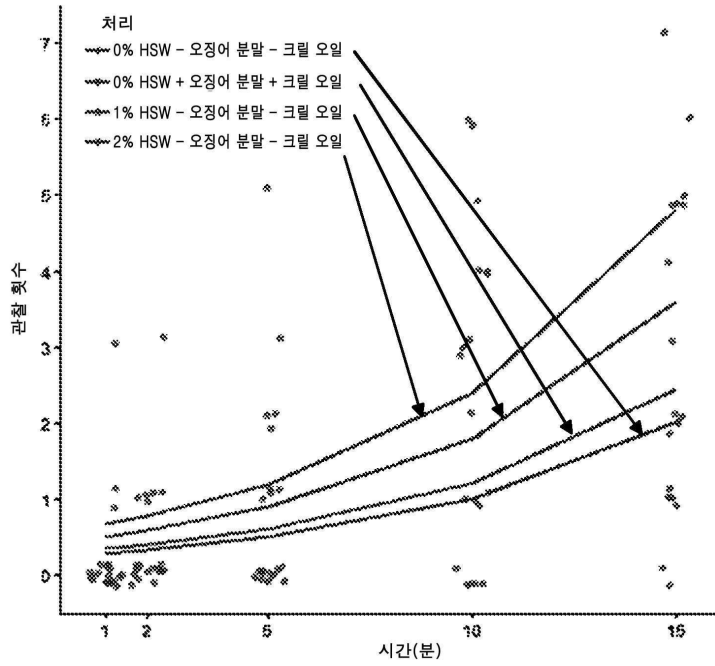


C



도면10

A



B

