

*Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 순차적접종 발효한 갈색거저리유충과 누에번데기 발효물의 품질특성

강상훈¹, 정장호^{1,*}

¹세종대학교 식품조리외식경영학과

Characteristics of *Tenebrio molitor* larvae and *Bombyx mori* pupae sequentially fermented with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*

Sanghun Kang¹ and Chang-Ho Chung^{1,*}

¹Department of Culinary Science and Foodservice Management, Sejong University

Abstract Defatted soybean, larvae of brown mealworm (*Tenebrio molitor*), and powdered pupae of silkworm (*Bombyx mori*) were fermented in solid and liquid forms using *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*. The protein degradation rate (NDR) through solid fermentation was the highest in the fermented soybean control sample (54.69±6.54%), followed by silkworm pupae (34.82±5.99%) and brown mealworm larvae (30.54±3.80%). When these edible insects were fermented in liquid form, solid extraction yield was 37.73-46.88%, and protein yield was 47.47-63.02%. NDR of fermented liquid form products increased to 58.90, 52.62, and 50.13% for soybean, brown mealworm larvae, and silkworm pupae, respectively. SDS-PAGE of the liquid fermented products confirmed that microbial fermentation decomposed higher-molecular-weight proteins into small polypeptides. *In vitro* digestibility of liquid forms of edible insects increased by 1.26 to 1.53 times after fermentation. The protein solubility, foaming ability, and foam stability of liquid-fermented edible insects all tended to increase through fermentation.

Keywords: edible insects, microorganism, fermentation, protein hydrolysis

서 론

전세계 인구증가에 따라 나타날 수 있는 미래의 식량부족사태를 극복할 대체 식량자원의 하나로 관심이 커져가고 있는 식용 곤충은 단백질 함량이 대두, 계란, 소고기와 유사하거나 높고(Kim, 2013), 환경오염저감에도 효과적이어서, 세계식량농업기구(FAO)은 영양보충을 위한 새로운 자원으로의 그 가능성을 인정한 바 있다(Durst 등, 2010). 이러한 시대 흐름에 따라 국내에서도 곤충 산업촉진을 위해 2020년 백장감, 쌍별귀뚜라미, 메뚜기, 식용누에, 수벌번데기, 갈색거저리유충, 장수풍뎅이유충, 흰점박이꽃무지유충, 아메리카왕거저리 유충 탈지분말 등 9종의 식용 곤충이 식품 원료로서 허가되었다(Kim 등, 2021). 식품분야에서 식용 곤충을 이용한 가공식품개발 및 다양화를 이루어 가고 있으며, 지속적으로 식용곤충 시장규모가 성장할 것으로 예상하고 있다. 식용곤충을 이용한 연구에서도 영양물질제조(Ghaly와 Alkoaik, 2009; Jones 등, 1972) 및 식품소재화(Cho 등, 2018; Kim 등, 2015; Kim, 2017; Lee 등, 2017; Zhao 등, 2018) 등 다양한 연구가 진행된 바

있고 점차 확대되어지고 있으나 미생물 발효방법을 통한 식용곤충 단백질 분해와 관련한 연구는 현재까지 미진한 실정이다.

식품 가공공정에서 단백질 가수분해물을 생성하는 방법으로는 크게 산(acid)이나 단백질 분해효소를 이용하거나 또는 이러한 단백질 분해효소를 분비하는 미생물을 이용하는 발효법 등을 들 수 있다. 하지만 산 분해의 경우는 분해과정에서 3-chloropropane-1,2-diol과 같은 발암물질(Finley 등, 1982) 등이 생성되기도 하여 이를 중화과정을 거쳐 제거해야 하며, 단백질분해를 위한 정제효소 사용은 상대적으로 처리비용이 높은 편이다. 발효법의 경우는 상업적 생산보다 장시간의 발효 숙성과정을 거치기 때문에 시간 효율성이 낮으나 소비자 선호도가 높은 장점이 있다. 발효를 통한 단백질 가수분해물을 포함한 식품 제품으로는 간장 및 된장 등 한국 전통발효식품과 서양의 치즈 등이 대표적이며 이러한 식품들은 단백질이 저분자화 되는 가수분해 과정 속에서 생성된 유리아미노산과 저분자 펩타이드들이 이들 식품의 고유한 맛을 결정하는 주요 물질로 작용하기도 하고 상대적으로 인체흡수도 용이하여 산업적 조미소재나 단백질공급원으로 이용되기도 한다. 또한 생성된 단백질 가수분해물은 가수분해를 통해 펩타이드 결합이 끊어지며 분자량이 상대적으로 작고 단백질 결합 내의 2차구조 등이 감소된 형태를 갖게 되어 등전점 부근에서 용해도가 증가되고, 점도는 감소되며, 기포성, 겔화 및 유화특성 등 원료단백질과는 다른 물리 화학적인 변화가 나타나게 된다(Kim 등, 1990). 단백질 자원 중 분리대두단백은 탈지대두를 효소 및 산가수분해하여 단백질 함량을 90% (w/w)내외로 높여 식품 제조 시 물성의 변화 및 안정화를 위한 첨가제로 사용되기도 하

*Corresponding author: Chang-Ho Chung, Department of Culinary Science and Foodservice Management, Sejong University, Seoul 05006, Republic of Korea
Tel: +82-2-3408-3222
Fax: +82-2-3408-4314
E-mail: cchung@sejong.ac.kr
Received October 25, 2021; revised December 16, 2021;
accepted December 27, 2021

며, 또한 음료, 아이스크림, 육류식품, 제빵 등 폭넓은 산업적 높은 활용도로 사용되고 있다. 본 연구에서는 미래식량의 단백질자원으로 식용곤충을 활용하기 위해서는 이미 산업적 완성도와 활용도가 높은 대두단백질과의 비교가 필요하고 또한 사용 발효균주들이 대두발효에 이용되고 있는 점을 감안하여 식용곤충 중 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor* larvae; Mealworm)과 누에번데기(*Bombyx mori* pupa; Silkworm pupa) 탈지원료를 사용하여 *Aspergillus oryzae* 및 *Bacillus subtilis* 장류기반 미생물을 이용한 발효과정을 통하여 단백질 발효물을 제조하였으며, 이에 대한 이화학적 특성과 가공 기능을 분석하여 발효과정을 통한 식용곤충 단백질 추출공정 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 식용곤충은 갈색거저리 유충과 누에번데기 2가지 시료이었으며, 갈색거저리 유충은 압착탈지분말 형태로, 누에번데기는 동결건조 형태로 양주시 농업기술센터에서 제공받았다. 대조군으로는 인도 수입산 탈지대두(Bainy 등, 2008)를 S장류회사로부터 제공받아 사용하였다. 식용곤충의 잔여 지질함량을 낮추기 위해 Jeon 등(2016)의 탈지처리방법을 일부 변형하여 탈지과정을 실시하였다. 간단히 서술하면, 동결 건조 형태의 식용곤충 분말과 n-hexane (96%, special grade, Samchun Chemical, Pyeongtaek, Korea)을 1:4 (w/v) 비율로 섞어 교반기를 이용하여 3시간 동안 상온에서 진탕 후, 원심분리기(HMR-220IV, Hanil industrial Co, Namyangju, Korea)로 상층액을 분리하였고, 남은 잔사를 같은 방법으로 총 2회 반복하였다. 침전물의 잔여 n-hexane은 fume hood에서 충분히 제거 후 얻은 것을 탈지분말 실험재료로 사용하였다. 발효과정 사용균주 *A. oryzae*는 충무발효에서 제공받았고, *B. subtilis*는 시판 청국장에서 분리한 균주를 사용하였다.

발효추출물 제조

식용곤충을 이용한 발효추출물 제조는 Kim(2018)의 방법을 일부 변형하여 사용하였으며 Fig. 1과 같이 발효고형물(a)과 액상추출고형물(b) 형태로 준비하였다. 탈지 대두, 갈색거저리 유충 및

누에번데기 분말과 이들 건조중량의 6배 증류수를 혼합한 다음, 수육조(CWB-20L, HYSC, Seoul, Korea)에서 90°C, 2시간 동안 1차 열처리하였다. 이를 25°C까지 방냉하고 8000 rpm, 20분간 원심분리(HMR-220IV, Hanil Industrial Co.) 하였다. 1차 상층액은 -55°C 이하의 냉동고에 보관하고, 남은 원심분리박은 건조중량 대비 충무발효 제공 *A. oryzae* 분말 0.5%를 1차로 접종하여 37°C에서 48시간 발효 후, 멸균수로 희석하여 분광기(Spectronic 20D+, Milton roy, Rochester, NY, USA)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 0.3으로 맞춘 *B. subtilis* 용액 1%를 접종하여 다시 48시간을 발효한 것을 발효고형물(a)로 하였다. 이때 얻어진 발효고형물을 각각 대두(fsS: fermented solid of soybean), 갈색거저리유충(fsT: fermented solid of *Tenebrio molitor* L.), 누에번데기(fsP: fermented solid of *Bombyx mori* pupae) 발효고형물로 명명하였다. 액상추출고형물(b)은 발효고형물(a)에 이전에 냉동보관 된 상기 1차 상층액을 해동 시킨 후 첨가하여 발효와 미생물 효소반응을 위해 55°C에서 6시간 동안 2차 열처리한 후, 25°C까지 방냉하고 원심분리(8000 rpm, 20 min)하여 2차 상층액을 동결건조 한 분말로 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 이때 얻어진 추출물 동결건조 시료들을 각각 대두(efS: extract of fermented soybean), 갈색거저리유충(efT: extract solution of fermented *Tenebrio molitor* L.), 누에번데기(efP: extract of fermented *Bombyx mori* pupae) 액상추출고형물로 명명하였다.

일반성분분석

일반성분 조성은 AOAC법(AOAC, 1990)의 방법에 따라 측정하였다. 수분은 상압가열건조법, 조회분은 550°C 직접회화법을 이용하였다. 조단백질 함량은 Kjeldahl 질소정량법, 조지방은 Soxhlet 추출법을 이용하여 측정하였다.

pH 및 적정산도

식용곤충 발효물의 pH 측정은 pH meter (MP230, Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 적정산도의 측정방법은 희석시료에 0.1 N NaOH 용액을 이용하여 pH 8.3까지 소비된 양을 확인하여 계산식으로 측정하였다.

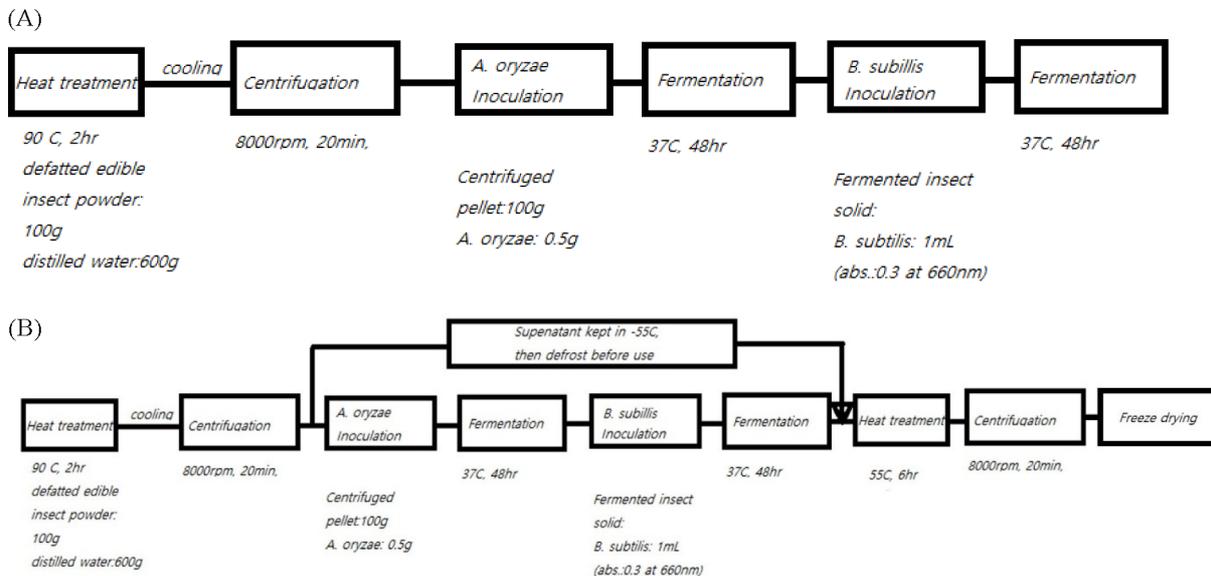


Fig. 1. Procedures for fermented edible insect products. (A) Solid fermentation (fsS, fsT, fsP) (B) Fermented liquid extraction (efS, efT, efP)

총 질소, 아미노질소 및 가수분해도(Degree of hydrolysis)

식용곤충 발효물의 총 질소는 AOAC법(AOAC, 1990)에 준하여 Kjeldahl 질소정량법을 이용하여 측정하였으며, 아미노질소는 Formol 적정법(Chae 등, 2002)으로 측정하였다. 가수분해도(DH, degree of hydrolysis)는 단백질로부터 해리된 유리아미노기의 비율을 구하기 위해 총질소함량과 아미노질소 함량의 백분율로 나타내었다.

유리아미노산 분석

액상추출고형물의 유리아미노산 분석은 시료를 증류수에 2% (w/v) 농도로 희석 후 60분 동안 진탕 및 초음파처리를 통해 분획하였으며, 이후 5-sulfosalicylic acid를 희석액의 2% (w/v)를 첨가하여 60분간 진탕추출하였다. 추출액은 원심분리 후(7000 rpm, 20 min) 0.45 µm nylon syringe filter (Whatman Ltd., Piscataway, NJ, USA)로 여과하여 아미노산 분석을 하였다. 분석 시 이용한 컬럼은 (Eclipse AAA, 4.5×150 mm, 5 µm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA)이며, 분석에 사용된 시료의 주입량은 5 µL였다. 이동상으로 사용한 A 용매는 40 mM NaH₂PO₄ (pH 7.8), B용매는 Acetonitrile:Methanol:Water (45:45:45, v/v/v)이며, 이동상의 유속 조건은 A용매의 비율을 1.9분까지 100%로 유지 후 18.1분까지 43%, 18.6분까지 0%로 낮추어 22.3분 까지 유지하다가, 23.2분까지 100%로 상승시켜 26분까지 유지하였다. 이때, 파장은 220와 570 nm로 설정하였으며, 유속은 2.0 mL/min으로 설정하여 분석하였다. Detector는 fluorescence detector (Ex: 340 nm, EM: 112 450 nm)을 사용하여 유리아미노산을 검출하였다.

SDS-PAGE에 의한 분자량

액상추출고형물은 Laemmli(1976)의 방법을 참고하여 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. Stacking Gel은 4% acrylamide gel을 사용하였으며, Resolving gel은 15% gel을 사용하였다. 시료는 Bradford법으로 수용성 단백질의 양을 측정하여 500 µg/mL 동일한 농도로 희석한 후 2X sample buffer와 동량으로 혼합하고, 100°C에서 10분간 끓인 후 식혀 20 µL를 gel에 loading 하였다. 전기영동 조건은 초반 80 V의 전압을 유지하였고, stacking gel을 통과한 후 110 V로 높여 분리하였다. 분리가 끝난 gel은 comassie blue R-250을 이용하여 염색하였으며, 10% acetic acid가 함유된 50% 메탄올을 이용하여 탈색하였다.

고형분 및 단백질 수율

액상발효추출물의 고형분 추출수율은 미리 항량시킨 칭량접시에 취하여 105°C에서 증발 건조시킨 후 건조무게를 측정하였고, 단백질 수율은 추출물 단백질중량을 해당 추출물 제조에 사용된 원시료 중량(건물량)에 대한 백분율로 계산하였다.

고형분 수율(%)

$$= \text{발효추출물의 건조중량} / \text{투입 원료의 건조중량} \times 100$$

단백질 수율(%)

$$= \text{발효추출물의 단백질중량} / \text{투입원료의 단백질중량} \times 100$$

단백질 소화율(In vitro)

액상발효추출물의 단백질 소화율은 Njingtang 등(2001) 및 Nunes 등(2004)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 시료 2 g을 0.1 N HCl 50 mL에 현탁(4%, w/v)시킨 다음 시료의 1% pepsin (w/w) 첨가 후 37°C 수욕조에서 200 rpm으로 2시간 동안 교반하였다. 이를 5 N NaOH용액을 이용하여 pH 7.5로 조정해 pepsin의 효소활성을 실패시키고 시료의 1% pancreatin (w/w) 첨가하여 37°C

수욕조에서 200 rpm으로 2시간 동안 교반시켰다. 10% trichloroacetic acid (TCA) 4 mL를 첨가하여 filter paper (Whatman, No1, 110 mm Ø)로 여과 후 상층액을 분석시료로 사용하였다. 단백질 소화율은 아래의 방법을 이용하여 계산하였다.

단백질 소화율(%)

$$= \text{여액의 Total nitrogen (mg)} / \text{시료의 Total nitrogen (mg)} \times 100$$

단백질 용해도

액상발효추출물의 용해도(Solubility)는 Lawhon 등(1972)의 방법과 Morr 등(1985)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료 0.3 g을 0.1 N NaOH 용액 30 mL에 용해시킨 다음 30분간 균질화시킨 후 3 mL씩 1 N NaOH와 1 N HCl로 pH 1.5에서 12.0로 각각 조절하였다. 조정된 용액은 실온에서 30분간 평형화시킨 후 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 Bradford 방법(Kruger, 2009)에 따라 Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 단백질 함량을 정량하였다. 측정된 값을 이용하여 다음 식에 대입하여 용해도를 측정하였다.

단백질 용해도(%)

$$= \text{pH별 단백질 함량(mg/mL)} / \text{pH 12.0에서의 단백질 함량(mg/mL)} \times 100$$

거품형성능 및 안정성

액상발효추출물의 거품형성능 및 거품안정성은 Lawhon(1972) 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료 3 g을 30 mL의 증류수에 희석한 후 mixer에 1분간 shaking 하여 거품을 형성하였다. 형성된 거품을 50 mL 메스실린더에 부어준 뒤, 거품의 부피를 측정하여 아래와 같이 거품형성능을 측정하였다. 거품안정성은 메스실린더에서 시간별 거품의 부피를 측정하여, 거품 형성 직후의 거품형성능과 비교하여 그 비율로 나타내었다.

통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복실험을 기본으로 하였으며, 실험결과는 SPSS 프로그램(IBM SPSS Statistics for windows, version 21.0. Armonk, NY, USA)을 사용하였다. 통계적 유의적 검정은 일원배치 분산분석을 실시하였으며, 측정 평균값 간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준으로 Duncan의 다중범위시험법을 사용해 검증하고자 하였다.

결과 및 고찰

원재료 일반성분 분석

제공받은 식용곤충의 잔여 지질함량이, 갈색거저리 유충 압착 탈지분은 11.52%, 동결건조 누에번데기는 27.64%로 높아 n-hexane을 이용하여 한번 더 탈지과정을 거친 후 탈지대두와 비교하여 결과 값을 Table 1에 나타내었다. 최종 탈지한 시료들의 단백질 함량은 갈색거저리 유충, 누에번데기, 탈지대두 순으로 높고, 식용곤충 탈지분이 탈지대두보다 유의적으로 높은 값을 나타내었다($p < 0.05$). 이는 대두에 비해 식용곤충은 식이섬유와 같은 탄수화물 함량이 낮은 차이에 기인한 것으로 판단하였다(Son, 2017). 지질함량은 시료 간 유의적으로 차이가 있었으나($p < 0.01$), 상업용 유기용매처리를 통해 제거 가능함을 확인하였다. Kim 등(2016)의 연구에서 갈색거저리 유충 탈지분은 지질 함량이 3.94%, 단백질 함량이 70.42%, 번데기 탈지분은 지방함량이 4.75%, 단백

Table 1. Proximate analysis of samples

Sample	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude lipid (%)	Crude ash (%)	Carbohydrate (%)
pT ¹⁾	4.15±0.06	64.84±0.52	11.52±2.63	4.47±0.08	15.02
rawP ²⁾	5.24±0.04	60.10±0.32	27.64±0.28	4.36±0.01	2.66
S	9.74±0.24 ^{a,3,4)}	48.92±0.40 ^c	0.97±0.19 ^c	6.68±0.39 ^a	33.70
T	4.81±2.85 ^b	73.11±1.99 ^a	1.82±0.68 ^{ab}	4.84±0.89 ^b	15.42
P	6.70±2.78 ^{ab}	66.15±2.35 ^b	2.00±0.63 ^a	7.02±0.56 ^a	18.14
F-value	4.665*	193.144***	4.074*	12.999**	

¹⁾pT: pre-defatted *Tenebrio molitor* larvae by piston pressing

²⁾rawP: raw silkworm pupa, S: commercial de-fatted soybean, T: de-fatted *Tenebrio molitor* larvae by n-hexane, P: de-fatted silkworm pupa by n-hexane

³⁾mean±SD. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

⁴⁾a-c Means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test

Table 2. Moisture, pH, titratable acidity of fermented solid of soybean, *Tenebrio molitor* L. and silkworm pupa

Sample	Moisture (%)	pH	Titratable acidity (%)
fsS ¹⁾	65.63±3.50 ^{a,2,3)}	7.40±0.24 ^b	0.82±0.10 ^a
fsT	51.48±4.91 ^b	7.60±0.28 ^a	0.77±0.19 ^{ab}
fsP	67.51±4.45 ^a	7.52±0.21 ^{ab}	0.67±0.15 ^b
F-value	67.707***	2.415*	3.864*

¹⁾fsS: Fermented solid of commercial de-fatted soybean with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*

fsT: Fermented solid of de-fatted *Tenebrio molitor* L. with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*

fsP: Fermented solid of de-fatted silkworm pupa with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*

²⁾mean±SD. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

³⁾a-c means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test

Table 3. Total nitrogen, amino nitrogen and NDR of fermented solid of soybean, *Tenebrio molitor* L. and silkworm pupa

Sample	Total nitrogen (%)	Amino nitrogen (%)	Degree of protein hydrolysis (%)
fsS ¹⁾	3.72±0.49 ^{c,2,3)}	2.01±0.13 ^b	54.69±6.54 ^a
fsT	6.97±0.64 ^a	2.11±0.12 ^a	30.54±3.80 ^c
fsP	4.64±0.63 ^b	1.59±0.14 ^c	34.82±5.99 ^b
F-value	120.685***	75.305***	76.803***

¹⁾fsS: Fermented solid of commercial de-fatted soybean with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*

fsT: Fermented solid of de-fatted *Tenebrio molitor* L. with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*

fsP: Fermented solid of de-fatted silkworm pupa with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*

²⁾mean±SD. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

³⁾a-c means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test

질 함량이 67.54%로 나타났는데, 이는 용매탈지 방법에 따라 지질 함량이 차이가 나 본 연구에서의 지질 함량이 낮고, 단백질 함량이 상대적 높은 것으로 판단하였다.

발효고형물의 총 질소, 아미노질소 및 단백질 가수분해도 (Nitrogen Degradation Ratio)

식용곤충 및 대두 발효고형물의 수분함량, pH 및 적정 산도는 Table 2과 같다. 수분의 경우 누에번데기와 탈지대두분의 수분함량이 상대적으로 높았는데 이는 발효에 따라 각 물질의 조직분해를 통해 수분보유성이 차이를 보이기 때문이라고 판단하였다. 발효 과정 중 pH는 발효 초기 모든 실험군에서 6.0-6.8의 범위로 나타났으며, 발효 시간이 지나면서 7.4-7.6의 범위로 증가한 것으로 나타났다. 미생물의 증식은 단백질의 분해물 및 암모니아성 질소화합물의 함량의 증가로 이어져 pH의 증가에도 영향을 준 것으로(Park 등, 1989) 판단되었다. 적정 산도는 탈지대두(0.82±0.10), 갈색거저리유충(0.77±0.19), 누에번데기(0.67±0.15) 순

으로 발효 초기보다 3-4배 증가한 것으로 나타났다. Zhao(2017)의 연구에 따르면 메주 형태로 48시간 발효된 대두의 pH는 7.24, 적정산도는 1.08%, 갈색거저리 유충의 pH는 7.16, 적정 산도는 1.56%, 번데기의 pH는 6.58, 적정 산도는 2.64% 정도로 나타나 pH는 비슷한 경향성을 보이나 적정 산도는 본 연구에서 더 낮은 것으로 나타났다. 이는 발효 시간 및 조건변화에 따른 *A. oryzae* 유기산 및 *B. subtilis*의 의해 생성된 암모니아나 아민류 계열에 의해 적정산도 차이에 따른 것(Cho 등, 2016)으로 판단하였다.

총 질소 함량(Table 3)은 갈색거저리 유충 발효물이 가장 높았으며(6.97±0.64%), 누에번데기(4.64±0.63%), 탈지대두(3.72±0.49%) 순으로 시료 간 유의적 차이가 있었으며(*p*<0.001) 건량 기준으로 계산 시 발효 전보다 발효물 내의 단백질 함량이 상대적으로 증가하였다. 아미노 질소는 유리아미노기 형태로 존재는 분자 내 질소를 말하며, 아미노기(-NH₂) 말단을 가지는 화합물의 총량을 가리켜 식품의 품질지표항목으로 이용된다(Cho 등, 2014). 발효 시 단백질이 protease에 의해 아미노산으로 가수분해 되며, 아미노

Table 4. Crude protein, amino nitrogen and degree of protein hydrolysis of extract powder of fermented soybean, *Tenebrio molitor*, *Bombyx mori* pupae

Sample	Crude protein (%)	Amino nitrogen (%)	Degree of protein hydrolysis (%)
efS ¹⁾	69.67±2.35 ^{2)c3)}	6.60±0.32 ^b	58.90±1.70 ^a
efT	86.06±2.30 ^a	7.24±0.47 ^a	52.62±4.26 ^b
efP	82.48±3.75 ^b	6.69±0.47 ^b	50.13±5.15 ^b
F-value	117.718***	10.014***	16.059***

¹⁾efS: extract of fermented soybean; efT: extract of fermented *Tenebrio molitor* L.; efP: extract of fermented *Bombyx mori* pupae

²⁾mean±SD. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, NS: no significant

³⁾a-c means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test

질소는 정미성분 등 품질 변화 및 숙성의 지표로도 사용된다(Cho 등, 2014). 아미노질소 함량은 탈지대두 발효물이 2.01±0.13%, 갈색거저리 유충이 2.11±0.12%, 누에번데기가 1.59±0.14%로 유의적으로 차이가 있었다(*p*<0.001). 고휘발효를 통한 단백질 가수분해율은 대두 발효물이 54.69±6.54%로 가장 높았으며, 누에번데기가 34.82±5.99%, 갈색거저리 유충은 30.54±3.80%를 나타내었다. Choi (2018)의 연구에서는 상업용 단백질 분해효소인 flavourzyme 및 alcalase의 혼합 처리를 통해 식용곤충의 가수분해물을 제조하였는데, 가수분해도를 측정된 결과 갈색거저리 유충의 경우 4시간 경과 시 58%, 누에번데기의 경우 3시간 경과 시 68%로 보고하였다. Lee(2017)의 연구에서는 갈색거저리 유충에 alcalase 및 flavourzyme 효소의 혼합 처리 시 8시간 경과 시 34.27%의 가수분해도를 나타낸다고 보고하였는데 이는 갈색거저리 유충 단백질을 96시간의 미생물발효를 통해 얻은 본 실험과 유사하였다. 이러한 가수분해도의 차이는 식용곤충 단백질 가수분해물 제조 시 전처리공정, 효소활성, 최적온도, pH 환경에 따라 차이가 난 것으로 판단되며 효과적인 가공처리공정을 통한 개선의 여지도 가능할 것으로 판단된다.

액상발효추출물의 단백질 함량, 고휘분 및 단백질 추출 수율

식용곤충 액상발효추출물의 단백질함량, 아미노질소 및 단백질 가수분해도는 Table 4에 나타내었다. 단백질 함량은 69.67-86.06%로 갈색거저리유충(efT), 대두(efS), 누에번데기(efP) 순으로 높게 나타났으며(*p*<0.001), 단백질 가수분해도 측정 결과, 대두(efS), 갈색거저리유충(efT), 누에번데기(efP) 순으로 나타나(*p*<0.001) 발효과정 중의 미생물 기인 관련 효소들 작용을 통해 단백질분해를 증가시킬 수 있었다. 고휘분 추출수율은 Table 5에 나타내었다. 갈색거저리유충(efT)과 누에번데기(efP)의 고휘분 수율은 유의적 차이가 없었으며, 대두발효추출물(efS)이 식용곤충들보다 추출 수율이 상대적으로 높게 나타났다(*p*<0.001). 단백질 수율에서도 같은 경향성을 나타내 대두가 가장 높았으며, 누에번데기는 50.32±4.46%, 갈색거저리 유충은 47.47±3.03%로 식용곤충 두 시료간에는 유의적 차이는 없었다(*p*<0.001). 단백질 분해 효소로 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물을 제조한 선행 연구 중 Yu 등(2017)은 갈색거저리 유충에 alcalase, flavourzyme, neutrase 효소 각 1% 씩 첨가하여 24시간 동안 가수분해 한 단백질 가수분해물의 수율을 측정된 결과, alcalase를 첨가 시 42.05%, neutrase 30.01%, flavourzyme 26.27%로 보고하였다. Lee(2017)의 연구에 의하면 기질 대비 1%의 alcalase 효소 첨가의 경우 1시간부터 8시간 동안 37.72-53.00% 범위로 나타났으며, alcalase처리군이 가장 높았으며 alcalase와 flavourzyme의 복합처리군, flavourzyme군 순으로 수율이 높았다고 보고하

Table 5. Yield of extract powder of fermented soybean, *Tenebrio molitor* L. and *Bombyx mori* pupae

Sample	Yield (%)	Protein yield (%)
efS ¹⁾	46.88±1.91 ^{2)a3)}	63.02±5.11 ^a
efT	37.87±2.24 ^b	47.47±3.03 ^b
efP	37.76±4.14 ^b	50.32±4.46 ^b
F-value	19.833***	27.036***

¹⁾efS: extract of fermented soybean; efT: extract of fermented *Tenebrio molitor* L.; efP: extract of fermented *Bombyx mori* pupae

²⁾mean±SD. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, NS: no significant

³⁾a-b means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test

였다. Alcalase를 이용한 누에번데기 단백질 가수분해물의 경우, 30시간 처리 시 수율이 59.63% 이라 하였다(Son, 2007). 비록 시간과 처리 방법이 차이가 있기는 하나 식용곤충 단백질을 미생물 발효로 분해한 본 연구 값들이 일부 단백질분해 효소처리 군들과 유사한 측정값을 나타내었다.

유리아미노산

액상발효추출물의 유리아미노산의 총량은 갈색거저리유충(10,251 mg/100 g), 번데기(8,531 mg/100 g), 탈지대두(8,058 mg/100 g) 발효물 순으로 나타나 식용곤충 단백질 발효추출물이 대조구(대두)에 비해 1.06-1.27배 높은 것으로 나타났다(Table 6). 필수아미노산의 총합에서도 동물성단백질인 갈색거저리와 번데기에서 더 높은 수치를 보여 식물성단백질인 탈지대두에 비해 영양학적으로 우수함을 확인할 수 있었다. 유리아미노산은 정미성분의 주요 지표로 알려져 있으며 aspartate와 glutamate는 감칠맛, serine, glycine, threonine, alanine, proline은 단맛, isoleucine, phenylalanine, lysine, leucine, arginine, histidine, tyrosine은 쓴맛에 관여하는 것으로 알려져 있다(Nishimura과 Kato, 1988). 단백질 발효추출물의 유리아미노산 구성성분 중 탈지대두와 번데기 발효물에는 glutamate가 각각 20.04, 11.97%로 가장 높았으며, 갈색거저리 유충 발효물에는 proline이 23.49%로 가장 높은 것으로 나타났다. 갈색거저리 유충의 경우, alcalase 및 flavourzyme를 이용해서 단백질 가수분해물을 제조한 Lee의 연구(2017)에서도 proline 함량이 가장 높았다는 보고와 일치하는 결과를 나타냈다. 단백질 가수분해 효소의 종류에 따라 가수분해 부위가 다를 수 있으므로 생성 아미노산과 아미노산 배열이 다른 펩타이드의 생성을 통해 유리아미노산 종류와 함량에도 영향을 주는 것으로 판단하였다(Kristinsson과 Rasco, 2000).

Table 6. Free amino acids composition of extract powder of fermented soybean, *Tenebrio molitor* L. and *Bombyx mori* pupae protein (unit: mg/100g dry sample)

Amino acid	efS ¹⁾	efT	efP
Aspartate	782.02	507.57	649.77
Glutamate	1614.60	1043.29	1021.57
Serine	214.01	377.37	485.91
Histidine*	0.00	128.11	355.51
Glycine	313.57	372.70	383.48
Threonine*	426.85	515.59	237.63
Arginine	172.39	392.39	502.85
Alanine	501.19	828.90	463.41
Tyrosine	405.79	506.05	610.82
Valine*	428.33	909.39	922.71
Methionine*	205.94	226.83	343.03
Phenylalanine*	383.72	292.84	378.92
Isoleucine*	368.26	447.20	398.27
Leucine*	634.04	670.48	522.69
Lysine*	563.94	624.45	683.52
Proline	1043.37	2407.85	570.90
Sum of essential	3011.08	3814.89	3842.28
Total	8058.00	10251.00	8531.00

¹⁾efS: extract of fermented soybean; efT: extract of fermented *Tenebrio molitor* larvae; efP: extract of fermented *Bombyx mori* pupae; *: essential amino acid

SDS-PAGE에 의한 분자량

액상발효추출물의 분자량을 가수분해를 시키지 않은 식용곤충 탈지분과 함께 비교하여 Fig. 2에 나타내었다. 단백질분리층을 비교한 결과 갈색거저리 유충 탈지분은 50, 37 kDa 부근 및 15-10 kDa 사이 등에서 여러 분리층이 발견되었다. 단백질 발효추출물은 20 kDa 이상의 단백질 분리층이 희미해졌으며, 15 kDa 이하의 저분자 펩타이드로 가수분해 되었음을 확인할 수 있었다. 번데기 탈지분은 100-250 및 37-50 kDa 부근에서 선명한 분리층이

관찰되었고, 단백질 발효추출물은 100-250 kDa 부근의 분리층은 거의 나타나지 않았으며, 50 kDa 부근에 새로운 분리층이 나타났으며, 37-50 kDa 사이의 밴드가 희미해졌고, 대부분 분자량 15 kDa 이하로 분해된 것을 확인할 수 있었다. 대두 탈지분은 75-200 kDa 사이에서 4개의 뚜렷한 분리층, 37-59 kDa 부근에서 1개의 뚜렷한 분리층이 발견되었다. 단백질 발효추출물은 75, 50 kDa 부근 및 37-50 kDa 사이에서 분리층이 선명해졌으며, 대부분 20 kDa 이하로 분해된 것을 확인할 수 있었다. 식용곤충 단백질을 이용한 효소적 가수분해에 관한 연구(Choi, 2018)에 따르면, 갈색거저리 유충은 75 kDa 부근 및 37-50 kDa 사이에서, 번데기는 75 kDa 부근 및 25-37 kDa 사이에서 뚜렷한 분리층이 발견되었다고 보고했으며, 본 연구와 비슷한 경향성을 확인할 수 있었다.

단백질 소화율(In vitro)

인체에서 단백질 분해는 일반적으로 위에서의 분비되는 소화 효소인 펩신과 이어서 췌장에서 분비되는 트립신과 키모트립신에 의해 소화가 시작되며, 마지막 단계에서는 장 표면에서 존재하는 프로테아제에 의해 아미노산과 펩타이드로 분해된다(Akimov and Bezuglov, 2012). 식용곤충 및 대두 액상발효물의 *in vitro* 단백질 소화율을 각 시료의 탈지원료와 비교하여 Fig. 3에 나타내었다. 식용곤충 및 대두 탈지원료의 소화율은 59.60±0.50-76.03±0.96%로 번데기가 가장 높았으며 갈색거저리 유충, 대두 순으로 유의적으로 높게 나타났다($p<0.001$). 액상발효추출물의 경우 91.02±0.62-95.86±0.83%로 각 시료의 탈지분 보다 단백질 소화율이 1.26-1.53배 증가하였다. 이는 발효과정 중 미생물이 생성하는 protease에 의해 가수분해되어 상대적으로 저분자로 분해(Fig. 2)되어 소화율이 높아진 것으로 판단되며, *Bacillus*속 세균을 이용한 발효가 소화율을 향상시킨다는 연구보고(Reddy, 2018; Sarkar and Tamang, 1995)와 유사한 경향성을 보였다. Yi 등(2016)의 연구에 따르면 갈색거저리 유충의 *in vitro* 단백질 소화율이 탈지분말의 경우 약 54%, 수용성단백질의 소화율은 약 85%로 나타났으며, Longvah 등(2011)에 따르면 누에번데기의 *in vitro* 단백질 소화율은 87%라고 보고하였다. 식품 단백질의 영양가는 아미노산 조성뿐만 아니라 단백질 소화성으로도 평가된다. 다른 종류의 식용곤충 단백질 소화율을 측정한 연구에서는 Kinyuru 등(2010)에 의하면 메뚜기(*Ruspolia differens*)의 경우 단백질소화율이 82-

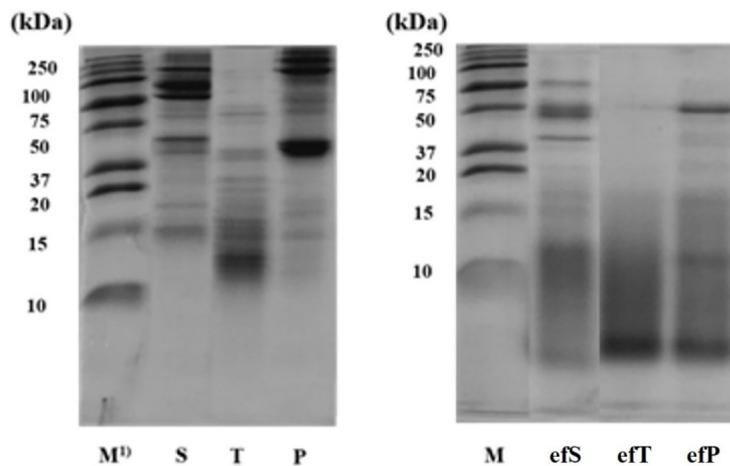


Fig. 2. SDS-PAGE of fermented soybean/insect. ¹⁾M: Marker; S: Commercial de-fatted soybean; T: De-fatted *Tenebrio molitor* L.; P: De-fatted *Bombyx mori* pupae; efS: extract of fermented soybean; efT: extract of fermented *Tenebrio molitor* larvae; efP: extract of fermented *Bombyx mori* pupae

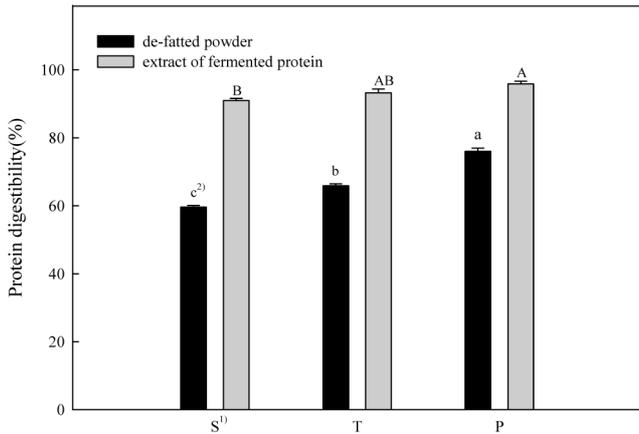


Fig. 3. Protein digestibility of de-fatted soybean/insect powder and fermented extracts. ¹⁾S: soybean; T: *Tenebrio molitor* L.; P: *Bombyx mori* pupae ²⁾a-c, A-C means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test

86%로, 쇠고기(89%), 돼지고기(90%), 칠면조(78%), 연어(85%)와 비교 시 비슷한 소화율을 나타냈다고 발표하였으며, 21종의 식용 곤충의 *in vitro* 단백질 소화율을 측정된 결과 60-98%인 것으로 보고된 바 있다(Ramos-Elorduy 등, 1997). 현재 식용곤충의 단백질에 관한 연구는 활발히 이루어지고 있으나(Ghaly과 Alkoaik, 2009; Yi 등, 2013), 소화율에 관한 연구에서 소화되는 단백질의 유형에 대한 정보는 미비한 것으로 알려져 있다. 키틴질 등이 포함되어 소화율이 상대적으로 낮은 식용곤충을 효과적 단백질 분해과정을 거칠 경우 식용곤충의 소화성을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

단백질 용해도

식용곤충 액상발효추출물의 기능적 특성 중 단백질 용해도를 pH 2.0-12.0의 범위에서 측정하였으며, 탈지원료물의 단백질 용해도와 비교한 결과는 Fig. 4와 같다. 탈지원료의 단백질 용해도 (Fig. 4A)는 모든 시료에서 pH 12.0에서 용해도가 가장 높았으며,

대두(efS)와 갈색거저리 유충(efT)은 pH 4.0, 번데기(efP)는 pH 6.0 부근에서 단백질 용해도가 가장 낮았다(Fig. 4B). 용해도는 단백질의 가장 중요한 물리화학적 및 기능적 특성 중 하나이며 단백질 분자의 수화도 및 소수성 정도에 따라 달라진다(Sathe과 Salunkhe, 1981). 일반적으로 단백질의 등전점(isoelectric point)에서는 용해도가 낮아지며, 대부분의 식품 단백질은 산성에서 등전점을 가지므로 산성식품에 이용하는 경우 낮은 용해도로 인해 침전물이 발생하여 탁도가 증가하는 등의 이용에 제한이 있다(Hwang 등, 1992). 단백질 발효추출물의 용해도(Fig. 4B)는, 모든 시료가 pH 전 범위에서 탈지원료물보다 용해도가 상대적으로 높았으며, 중성인 pH 6-8 사이에서 단백질 용해도가 대두 79.73-88.56%, 갈색거저리 83.00-89.21%, 누에번데기의 경우 83.71-77.33% 정도로 각 원 시료인 탈지분보다 5.11, 2.63, 1.26배 높았다. 이러한 결과는 Son(2017)의 연구에서 갈색거저리유충 원료보다 효소 가수분해물의 높은 용해도를 보인 결과와 Zhao 등(2016)의 연구결과와 비슷한 경향성을 보였다. 또한 Fig. 2의 SDS-PAGE 단백질 밴드와 비교 시, 갈색거저리가 상대적으로 대두와 누에번데기보다 낮은 분자량으로 가수분해 된 것을 확인했을 때, Yim 등(2000)의 연구에서 단백질의 분자의 크기가 작아질수록 용해도가 증가한다는 보고와 일치하였다. 그러나 가수분해도가 높아 용해도가 높은 단백질의 경우 식품의 기능을 향상시키기 위한 양극성이 부족하고 쓴맛이 나는 펩타이드와 같은 바람직하지 못한 효과를 가져올 수 있다는 보고(Tavano, 2013; Villamil 등, 2017)가 있어 이 부분에 대해서는 추후 확인이 필요해 보인다.

거품형성능 및 안정성

식용곤충 액상발효추출물의 기능적 특성 중 거품형성능과 거품안정성을 탈지원료들과 비교한 결과는 각각 Table 7과 Fig. 5에 제시하였다(Fig. 5A). 탈지원료들의 거품형성능은 번데기 (43.33%), 대두(36.67%), 갈색거저리(17.78%) 순으로 나타났으며 ($p < 0.005$), 발효추출물의 경우도 순서는 동일하였으며(번데기; 92.22, 대두; 46.67, 갈색거저리; 38.89%) 각 시료에서 탈지원료보다 거품형성능이 식용곤충의 경우 2배 이상 향상된 것을 확인할 수 있었다(Table 7). 이는 발효 과정 중 미생물의 protease에 의해 단백질이 가수분해되어 용액 내 펩타이드의 확산과 용해도를 증

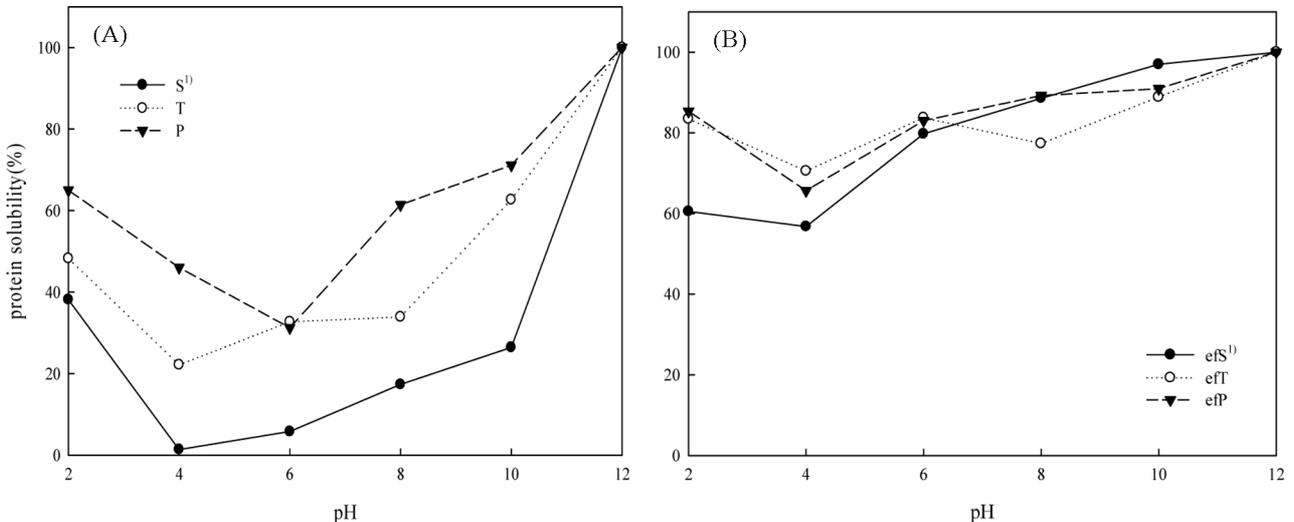


Fig. 4. Protein solubility of de-fatted soybean/insect powder (A) and fermented extracts (B). ¹⁾S: commercial de-fatted soybean; T: de-fatted *Tenebrio molitor* L.; P: de-fatted *Bombyx mori* pupae, efS: extract of fermented soybean; efT: extract of fermented *Tenebrio molitor* larvae; efP: extract of fermented *Bombyx mori* pupae

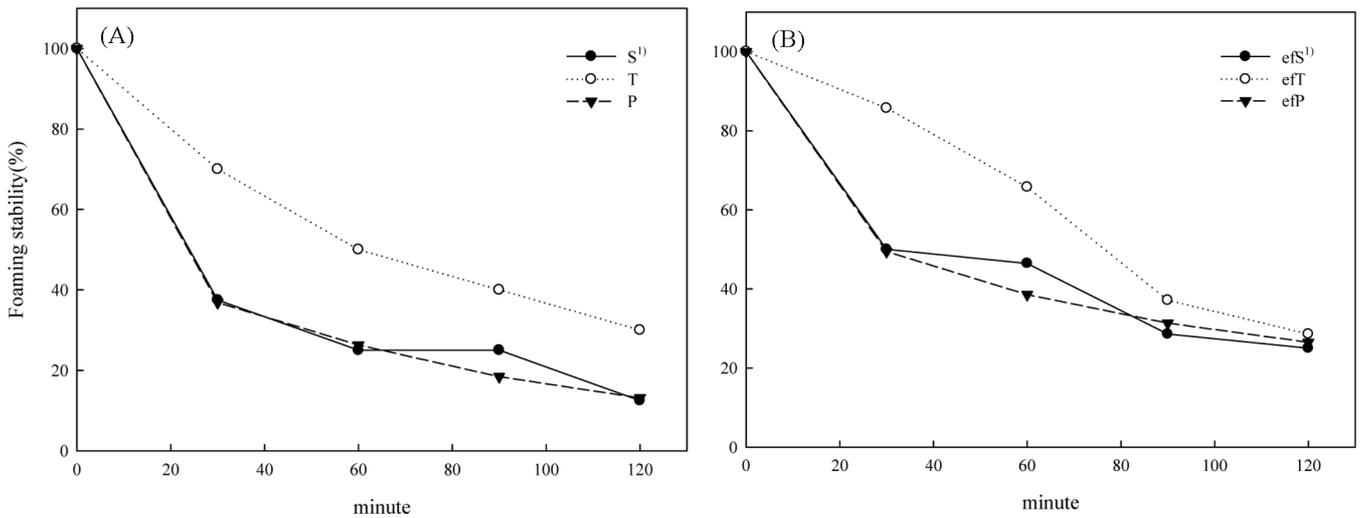


Fig. 5. Foaming stability of de-fatted soybean/insect powder (A) and fermented extracts (B). ¹S: commercial de-fatted soybean; T: de-fatted *Tenebrio molitor* L.; P: de-fatted *Bombyx mori* pupae, efS: extract of fermented soybean; efT: extract of fermented *Tenebrio molitor* larvae; efP: extract of fermented *Bombyx mori* pupae

Table 7. Foam expansion capacity of de-fatted soybean/insect powder and extract powder of fermented soybean/insect powder

Sample ¹⁾	Foam expansion capacity (%)
S ²⁾	36.67±5.77 ^{a, 3)}
T	17.78±5.09 ^b
P	43.33±6.67 ^a
F-value	15.256**
efS	47.74±2.07 ^b
efT	38.90±1.91 ^c
efP	92.22±3.85 ^a
F-value	323.188***

¹⁾Samples were freeze-dried

²⁾S: de-fatted soybean; T: de-fatted

Tenebrio molitor L.; P: de-fatted *Bombyx mori* pupae; efS: extract of fermented soybean; efT: extract of fermented *Tenebrio molitor* L.; efP: extract of fermented *Bombyx mori* pupa protein

³⁾a-c means in a column by different superscripts are significantly different at 5% significance level by Duncan's multiple range test

가시하며, 흡수속도 및 계면의 초기 안정화를 증가시켜 거품형성능에 영향을 준 것으로 판단하였다(Liceaga-Gesualdo과 Li-Chan, 1999). Purschke 등(2018)은 메뚜기과의 풀무치를 효소 가수분해 시 원료보다 거품형성능이 증가하였다고 보고하였고, Hall 등(2017)은 가수분해된 귀뚜라미(cricket) 분말이 다른 식용곤충에 비교하여 우수한 거품형성능을 가졌다고 보고하였다. 시간이 지남에 따라 거품형성 초기의 부피와 비교하여 측정된 거품안정성은 각 시료의 단백질 발효추출물이 탈지분보다 거품안정성이 1.14-2.01배 높았으며, 갈색거저리 유충 액상발효건조물이 전반적으로 거품안정성이 높은 것으로 확인되었다. Wouters 등(2018)은 곤충이외 글루텐 가수분해물이 난백 거품형성능이 뛰어나지만 안정성이 낮다고 보고하였으며, 두 시료를 1:5의 비율로 포함하는 용액은 높은 안정성의 거품(foam)형성체를 가진다고 발표하였는데 이와 같이 식용곤충 액상발효추출물을 다른 단백질과의 혼합을 통해 기능성 향상위한 연구도 가능할 것으로 판단하였다.

요 약

탈지 갈색거저리 유충과 번데기 분말을 *A. oryzae* 및 *B. subtilis* 균주를 이용하여 발효추출물을 제조하였다. 그 결과 발효추출물의 단백질 함량은 69.67-86.06% ($p < 0.001$)이며, 액상발효물의 고형분 수율은 37.76-46.88% ($p < 0.001$)로 나타났다. 단백질 분해율은 대두발효물(esS) 58.90%, 갈색거저리유충(esT; 52.62%), 누에번데기(esP; 50.13%) 순으로 나타났으며($p < 0.001$), 단백질 수율의 경우 47.47-63.02% 이었다($p < 0.001$). 또한 SDS-PAGE 결과, 발효과정을 거치지 않은 각각의 탈지원물과 비교 시 액상발효물들의 단백질이 저분자로 분해됨을 확인하였다. 액상발효물의 *in vitro* 소화율을 측정된 결과, 탈지원물(59.60-76.03%)에 비해 발효추출물의 단백질 소화율이 91.02-95.86%로 1.26-1.53배 증가하였다($p < 0.001$). 액상발효물의 단백질 용해도, 거품형성능, 거품안정성 모두 발효과정을 통해 수치가 증가하는 경향성을 나타냈다. 이를 바탕으로 발효공정을 통한 단백질 추출물 공정의 가능성을 확인하였으며, 추후 추출물의 이화학적 특성 및 기능성을 기반으로 새로운 기능성 식품 소재 개발에 기여할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구결과물은 농림수산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치기술개발사업의 지원을 받아 연구(과제번호316057-03-2-HD030)되었음에 이에 감사드립니다.

References

Akimov M, Bezuglov V. Methods of protein digestive stability assay-state of the art. New advances in the basic and clinical gastroenterology: InTech. ISBN: 978-953-51-0521-3. doi: 10.5772/33286 (2012)

AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 15th ed. Method 954.01 Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (1990)

Bainy E, Tosh S, Corredig M, Poysa V, Woodrow L. Varietal differences of carbohydrates in defatted soybean flour and soy protein isolate by-products. Carbohydr. Polym. 72: 664-672 (2008)

- Chae S, Kang G, Ma S, Bang K, Oh M, Oh S. Standard food analysis. Jigu-moonwha publishing co., Seoul, Korea. pp. 381-382 (2002)
- Cho KM, Kang JR, Kim GM, Kang MJ, Hwang CE, Jeong YS, Kim JH, Lee CK, Shin JH. Quality characteristics of low salted garlic Doenjang during fermentation. Korean J. Food Preserv. 21: 627-635 (2014)
- Cho M, Shim J, Lee J, Lee K, Yao Z, Liu X, Kim J. Properties of meju fermented with multiple starters. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 44: 109-116 (2016)
- Cho JH, Zhao HL, Kim JS, Kim SH, Chung CH. Characteristics of fermented seasoning sauces using *Tenebrio molitor* larvae. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 45: 186-195 (2018)
- Choi BD. Characterization of edible insects' proteins and its enzymatic hydrolysates. MS thesis. Chung-Ang university, Seoul, Korea (2018)
- Durst PB, Johnson DV, Leslie RN, Shono K. Forest insects as food: humans bite back. UN-FAO, RAP Publication. pp. 1-22 (2010)
- Finley J, Wheeler E, Walker Jr H, Finlayson A. Effect of cystine oxidation on lysinoalanine formation in proteins. J. Agr. Food Chem. 30: 818-820 (1982)
- Ghaly AE, Alkoak F. The yellow mealworm as a novel source of protein. Am. J. Agr. Biol. Sci. 4:319-31 (2009)
- Hall FG, Jones OG, O'Haire ME, Liceaga AM. Functional properties of tropical banded cricket (*Grylodes sigillatus*) protein hydrolysates. Food Chem. 224: 414-422 (2017)
- Hwang JK, Kim YS, Pyun YR. Effect of protein and oil concentration on the emulsion stability of soy protein isolate. J. Appl. Biol. Chem. 35: 457-461 (1992)
- Jones L, Cooper R, Harding R. Composition of mealworm *Tenebrio molitor* larvae. J. Zoo Anim. Med. 3: 34-41 (1972)
- Jeon YH, Son YJ, Kim SH, Yun EY, Kang HJ, Hwang IK. Physicochemical properties and oxidative stabilities of mealworm (*Tenebrio molitor*) oils under different roasting conditions. Food Sci. Biotechnol. 25: 105-110 (2016)
- Kim YM. Quality Characteristics of white bread with hot air-dried *Tenebrio molitor* larvae Linne powder. Korean J. Food Cook. Sci. 33: 513-522 (2017)
- Kim JS. Characteristics and descriptive analysis of fermented edible insect seasoning sauces. MS thesis, Sejong University, Seoul, Korea (2018)
- Kim HS, Jung C. Nutritional characteristics of edible insects as potential food materials. J. Apic. 28: 1-8 (2013)
- Kim HM, Kim JN, Kim JS, Jeong MY, Yun EY, Hwang JS, Kim AJ. Quality characteristics of patty prepared with mealworm powder. Korean J. Food Nutr. 28: 813-820 (2015)
- Kim SY, Park PS, Rhee KC. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. J. Agric. Food Chem. 38: 651-6 (1990)
- Kim HW, Setyabrata D, Lee YJ, Jones OG, & Kim YHB. Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 38: 116-123 (2016)
- Kim TK, Yong HI, Lee JH, Cha JY, Kang MC, Jung S, Choi YS. Development of new technology for functional materials for edible insects as alternative food. Korean society for food science of animal resources 10: 31-43 (2021)
- Kinyuru JN, Kenji GM, Njoroge SM, Ayieko M. Effect of processing methods on the *in vitro* protein digestibility and vitamin content of edible winged termite (*Macrotermes subhylanus*) and grasshopper (*Ruspolia differens*). Food Bioprocess Technol. 3: 778-782 (2010)
- Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 40: 43-81 (2000)
- Laemmli U. SDS-PAGE to evaluate extent of hydrolysis of proteins. Nature 227:680-685 (1976)
- Lawhon J, Rooney L, Cater C, Mattil K. Evaluation of a protein concentrate produced from glandless cottonseed flour by a wet-extraction process. J. Food Sci. 37: 778-782 (1972)
- Lee JW. A study on characteristics of fermented and hydrolysed *Tenebrio molitor* larvae for liquefied flavoring material application. MS thesis, Seoul National University, Seoul, Korea (2017)
- Liceaga-Gesualdo A, Li-Chan E. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). J. Food Sci. 64: 1000-1004 (1999)
- Longvah T, Mangthya K, Ramulu P. Nutrient composition and protein quality evaluation of eri silkworm (*Samia ricinii*) prepupae and pupae. Food Chem. 128: 400-403 (2011)
- Morr C, German B, Kinsella J, Regenstein J, Buren JV, Kilara A, Lewis B, Mangino M. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. J. Food Sci. 50: 1715-1718 (1985)
- Nishimura T, Kato H. Taste of free amino acids and peptides. Food Rev. Int. 4: 175-194 (1988)
- Nunes A, Correia I, Barros A, Delgadillo I. Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. J. Agric. Food Chem. 52: 2052-2058 (2004)
- Park C-K, Nam J-H, Song H-I, & Park H-Y. Studies on the shelf-life of the grain shape improved meju. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 876-883 (1989)
- Purschke B, Meinschmidt P, Horn C, Rieder O, Jäger H. Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. Eur. Food Res. Technol. 244: 999-1013 (2018)
- Ramos-Elorduy J, Moreno JMP, Prado EE, Perez MA, Otero JL, De Guevara OL. Nutritional value of edible insects from the state of Oaxaca, Mexico. J. Food Compos. Anal. 10: 142-157 (1997)
- Reddy NR. Legume Based Fermented Foods: 1st Ed: CRC Press, Boca Raton, FL. USA. pp. 1-4 (2018)
- Sarkar P, Tamang J. Changes in the microbial profile and proximate composition during natural and controlled fermentations of soybeans to produce kinema. Food Microbiol. 12: 317-325 (1995)
- Sathe S, Salunkhe D. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. J. Food Sci. 46: 71-81 (1981)
- Son SI. Optimization of production for silkworm larvae protein hydrolysate. MS thesis, Chungbuk National University, Chungju, Korea (2007)
- Son Yj. Physicochemical characteristics of mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) and preparation of powders for food material. Ph.D. Dissertation, Seoul National University, Seoul, Korea (2017)
- Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. J. Mol. Catal., B Enzym. 90: 1-11 (2013)
- Villamil O, Vázquez H, Solanilla JF. Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties. Food Chem. 224: 160-171 (2017)
- Wouters A, Brijis K, Delcour J, Murray B. Foaming and air-water interfacial characteristics of mixed egg white gluten hydrolysate protein solutions. Food Hydrocoll. 77: 176-186 (2018)
- Yi L, Lakemond CM, Sagis LM, Eisner-Schadler V, van Huis A, van Boekel MA. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. Food Chem. 141: 3341-3348 (2013)
- Yi L, Van Boekel MA, Boeren S, Lakemond CM. Protein identification and *in vitro* digestion of fractions from *Tenebrio molitor*. Eur. Food Res. Technol. 242: 1285-1297 (2016)
- Yim MH, Lee JH. Functional properties of fractionated soy protein isolates by proteases from meju. Food Sci. Biotechnol. 9: 253-257 (2000)
- Yu MH, Lee HS, Cho HR, Lee SO. Enzymatic preparation and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Tenebrio molitor* larvae (Mealworm). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 46: 435-441 (2017)
- Zhao H. Development and quality characterization of a fermented paste seasoning using edible insects. MS thesis, Sejong University, Seoul, Korea (2017)
- Zhao H, Cho CH, Chung CH. Characteristics of seasoning pastes fermented by *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* using edible insects. Korean J. Food Sci. 50: 297-307 (2018)
- Zhao X, Vázquez-Gutiérrez JL, Johansson DP, Landberg R, Langton M. Yellow mealworm protein for food purposes-Extraction and functional properties. PLoS One 11: e0147791 (2016)